

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 262**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2020** **PCT/EP2020/082972**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2021** **WO21099611**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2020** **E 20808127 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024** **EP 4061399**

54 Título: **Efectos insulíntricos y glucagonotrópicos de la beta-lactoglobulina**

30 Prioridad:

20.11.2019 EP 19210344

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

26.06.2024

73 Titular/es:

ARLA FOODS AMBA (100.0%)

**Sønderhøj 14
8260 Viby J, DK**

72 Inventor/es:

**MOSE, MAIKE;
RITTIG, NIKOLAJ FIBIGER;
MØLLER, NIELS;
MIKKELSEN, ULLA RAMER;
FREDERIKSEN, PERNILLE DORTHEA;
LAURIDSEN, KASPER BØGELUND;
CHRISTENSEN, BRITT;
MARKHOLM, MIE;
NIELSEN, SØREN BANG;
JÆGER, TANJA CHRISTINE;
SMEDEGAARD, STINE BECH y
HULMAN, ADAM**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 974 262 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

Efectos insulíntricos y glucagóntricos de la beta-lactoglobulina

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a a) beta-lactoglobulina o b) una composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la atrofia muscular.

10 Antecedentes de la invención

La insulina y el glucagón son hormonas importantes en el metabolismo humano ya que desempeñan un papel importante en la regulación de los niveles de lípidos y glucosa en sangre en el cuerpo. Por tanto, la insulina y el glucagón funcionan juntos para equilibrar los niveles de lípidos y glucosa en sangre, manteniéndolos en el estrecho intervalo que requiere el cuerpo. La insulina reduce el nivel de glucosa en sangre, mientras que el glucagón aumenta el nivel. Por tanto, la regulación de estas hormonas es muy importante para el tratamiento y/o la prevención de varias enfermedades tales como los trastornos metabólicos y la atrofia muscular.

La insulina es una hormona esencial producida en las células beta de la glándula pancreática, y el papel principal de la insulina es transportar la glucosa desde el torrente circulatorio a las células del cuerpo, donde la glucosa se convierte en energía. La falta de insulina o la incapacidad de las células de responder a la insulina (sensibilidad a la insulina disminuida) conduce a altos niveles de glucosa en sangre, hiperglucemia, que con el tiempo provoca una variedad de complicaciones (por ejemplo, enfermedad cardiovascular, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad renal y enfermedad ocular). La insulina también desempeña un papel importante en la modulación de las concentraciones de lípidos en el torrente circulatorio ya que la insulina aumenta la captación de lípidos en los músculos.

El glucagón también es una hormona peptídica esencial producida por las células alfa del páncreas. Funciona para aumentar la concentración de glucosa en el torrente circulatorio, y se considera que es la principal hormona catabólica del cuerpo. El glucagón también tiene la capacidad de aumentar el gasto energético y de inhibir el apetito. Por tanto, la administración de proteínas que aumentan el nivel de glucagón en la sangre tendrá potencial en la lucha contra, por ejemplo, la obesidad y la enfermedad de hígado graso.

Por tanto, la insulina y el glucagón también están estrechamente relacionados con la diabetes mellitus (diabetes), cuya prevalencia continúa aumentando en el mundo occidental. En la actualidad, prácticamente 1500 millones de personas viven con diabetes. La diabetes es una afección crónica que se produce cuando los niveles de glucosa en la sangre están elevados, debido a un desequilibrio entre la sensibilidad a la insulina y la producción de insulina. Por tanto, la diabetes tiene un grave impacto sobre la salud si no se trata. Sin embargo, si se logra una gestión apropiada de la diabetes, pueden retrasarse o prevenirse las graves complicaciones de la diabetes.

Por tanto, se han realizado varios intentos para tratar y/o prevenir la diabetes; véase, por ejemplo, "Postprandial glucose-lowering effect of premeal consumption of protein-enriched, dietary fibre fortified bar in individuals with type 2 diabetes mellitus or normal glucose tolerance, J Diabetes Investig, vol. 9, n.º 5, septiembre de 2018, Jae Hyun Bae, Lee Kyung Kim, Se Hee Min, Chang Ho Ahn, Young Min Cho.

El documento US 2018/0153964 A1 describe un método para tratar la atrofia muscular mediante la inyección por vía intraperitoneal a ratones con una composición que comprende péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), fragmento de GLP-1, agonista del receptor de GLP-1 (GLP-1R), potenciador de la secreción de GLP-1, inhibidor de la degradación de GLP-1 y/o exendina-4.

ANNAL. GILLESPIE ET AL. ("Whey proteins have beneficial effects on intestinal enteroendocrine cells stimulating cell growth and increasing the production and secretion of incretin hormones", FOOD CHEMISTRY, vol. 189, 1 de diciembre de 2015 (01-12-2015), páginas 120-128, XP055771685) describen un estudio *in vitro*. El estudio investiga las respuestas hormonales en un modelo de células enteroendocrinas (EE), es decir, células del tracto gastrointestinal. El estudio usó la línea celular pGIP/Neo STC-1 como modelo para estudiar los efectos generales de las proteínas del lactosuero, tanto proteínas intactas como hidrolizadas de las proteínas, sobre la salud de las células enteroendocrinas y examinaron su capacidad para estimular la secreción de hormonas incretinas.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han realizado el sorprendente descubrimiento de que la administración de BLG o una composición nutricional que comprende BLG en una pureza de al menos el 75 % con respecto a la proteína total tiene tanto un efecto insulíntrico como un efecto glucagóntrico en sujetos humanos. Los efectos estimuladores de la insulina y el glucagón son superiores a los obtenidos mediante el uso de dosis similares de aislado de proteína de lactosuero (WPI) como fuente de proteínas.

Esto abre las puertas para usar productos enriquecidos en BLG para prevenir y/o tratar trastornos relacionados con desequilibrios de estas hormonas relacionados con los trastornos metabólicos y/o la atrofia muscular o para el tratamiento terapéutico o no terapéutico para estimular, por ejemplo, la síntesis muscular y aumentar el gasto energético.

Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a a) beta-lactoglobulina o b) una composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina en la que dicha beta-lactoglobulina está presente en una cantidad de al menos el 75 % p/p con respecto a la proteína total, en la que a) o b) se proporciona en una cantidad terapéuticamente eficaz, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la atrofia muscular, en la que el sujeto es un ser humano y en la que el uso implica aumentar el nivel de insulina en la sangre del sujeto y en la que la administración de a) o b) es mediante administración oral.

Por ejemplo, los presentes inventores han realizado el sorprendente descubrimiento de que la administración de BLG tiene un efecto insulínico en sujetos humanos y, por tanto, puede usarse para prevenir y/o tratar la diabetes o prediabetes. Este efecto fue imprevisto.

Los presentes inventores han realizado el sorprendente descubrimiento de que la administración de BLG según la presente invención tiene un efecto superior de estimular la liberación de insulina en humanos con respecto a otras proteínas de la leche. Por tanto, se ha hallado sorprendentemente que la BLG aumenta los niveles de insulina y polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) en un sujeto, lo que potencialmente podría tener efectos beneficiosos de reducción de glucosa en sujetos diabéticos y prediabéticos. Los efectos estimuladores de la insulina y el GIP son superiores a los obtenidos mediante el uso de dosis similares de aislado de proteína de lactosuero (WPI) o caseína como fuente de proteínas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra el modelo catabólico (día previo al estudio; exposición a LPS + ayuno + reposo en cama) y las tres intervenciones con beta-lactoglobulina, caseína y lactosuero (día de estudio), administradas por vía oral como bolo + régimen de sorbos (flechas) junto con los puntos de tiempo para la extracción de muestras de sangre (B).

La figura 2 ilustra las concentraciones de glucosa en sangre medias después de intervenciones con BLG (punto negro), CAS (punto blanco) y WHE (triángulo negro) con EEM (barras de error). NS = Ninguna diferencia significativa entre intervenciones. Se usó modelado mixto de medidas repetidas sobre el área bajo la curva incremental (iAUC) para comparar intervenciones.

La figura 3 ilustra las concentraciones de glucagón en plasma medias después de intervenciones con BLG (punto negro), CAS (punto blanco) y WHE (triángulo negro) con EEM (barras de error). # = significativamente diferente de caseína. Se usó modelado mixto de medidas repetidas sobre la iAUC para comparar intervenciones.

La figura 4 ilustra las concentraciones de insulina en suero medias después de intervenciones con BLG (punto negro), CAS (punto blanco) y WHE (triángulo negro) con EEM (barras de error). # = significativamente diferente de caseína, * = significativamente diferente de WHE. Se usó modelado mixto de medidas repetidas sobre la iAUC para comparar intervenciones.

La figura 5 ilustra las concentraciones de GIP en plasma medias después de intervenciones con BLG (punto negro), CAS (punto blanco) y WHE (triángulo negro) con EEM (barras de error). # = significativamente diferente de caseína ($p=0,001$), (*) = diferente de lactosuero ($p=0,057$). Se usó modelado mixto de medidas repetidas sobre delta GIP ($t=210$ menos $t=150$) para comparar intervenciones.

La figura 6 ilustra las concentraciones de GLP-1 en plasma medias después de intervenciones con BLG (punto negro), CAS (punto blanco) y WHE (triángulo negro) con EEM (barras de error). # = significativamente diferente de caseína ($p<0,05$). Se usó modelado mixto de medidas repetidas sobre delta GLP-1 ($t=210$ menos $t=150$) para comparar intervenciones.

La figura 7 ilustra las concentraciones de aminoácidos totales en plasma después de intervenciones con BLG (punto negro), CAS (punto blanco) y WHE (triángulo negro) con EEM (barras de error). NS = Ninguna diferencia significativa entre intervenciones ($p>0,05$). Se usó modelado mixto de medidas repetidas sobre la iAUC para comparar intervenciones.

La figura 8 ilustra las concentraciones de leucina en plasma después de intervenciones con BLG (punto negro), CAS (punto blanco) y WHE (triángulo negro) con EEM (barras de error). # = significativamente diferente de caseína. * = significativamente diferente de lactosuero. Se usó modelado mixto de medidas repetidas sobre la iAUC para comparar intervenciones.

Figura 9: Diagrama de flujo del estudio. Los sujetos se aleatorizaron para ingerir una de dos precomidas

i) β -lactoglobulina (BLG) o ii) aislado de proteína de lactosuero (WPI) 30 minutos antes de una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT) de 75 g en el laboratorio o antes de un desayuno y una cena en el hogar. Los sujetos llevaban puesto un monitor continuo de glucosa (CGM), un monitor de actividad y se les proporcionaron comidas de desayuno normalizado. Los sujetos también se aleatorizaron para ingerir precomidas antes del desayuno y la cena el día 2-3 o el día 4-5 y control (agua del grifo) los otros dos días. Los días de estudio se repitieron después de 1-6 semanas desde la OGTT.

La figura 10 a+b ilustra las curvas de glucosa en plasma medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 10 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 11 a+b ilustra las curvas de insulina en suero medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 11 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 12 a+b ilustra las curvas de glucagón en suero medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 12 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 13 a+b ilustra las curvas de GIP en plasma medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 13 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 14 a+b ilustra las curvas de GLP-1 en plasma medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 14 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 15 a+b ilustra las curvas de leucina en plasma medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 15 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 16 a+b ilustra las curvas de fenilalanina en plasma medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 16 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 17 a+b ilustra las curvas de aspartato en plasma medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 17 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 18 a+b ilustra las curvas de glutamato en plasma medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 18 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 19 a+b ilustra las curvas de lisina en plasma medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 19 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 20 a+b ilustra las curvas de metionina en plasma medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 20 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 21 a+b ilustra las curvas de prolina en plasma medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 21 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 22 a+b ilustra las curvas de tirosina en plasma medias por intervención (negro: BLG, gris: WPI) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 22 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 23 a+b ilustra las curvas de glucosa en líquido intersticial (glucosa en ISF) medias por intervención (negro: BLG, gris oscuro: WPI, gris claro: CTR) y su diferencia como porcentaje, ambos con IC del 95 % basándose en un modelo de efectos mixtos. La figura 23 c ilustra el área bajo la curva incremental (iAUC) individual con un gráfico de barras que muestra la media $\pm$ desviación estándar. ANOVA de MR unilateral, tiempo x intervenciones, $P = 0,002$ y pruebas de la t para datos emparejados *a posteriori* (Student–Newman-Keuls): a) PWPI frente a CTR = 0,002, b) PBLG frente a CTR = 0,08, c) PWPI frente a BLG = 0,052.

Descripción detallada

Los presentes inventores han realizado el sorprendente descubrimiento de que la administración de BLG o una composición nutricional que comprende BLG en una pureza de al menos el 75 % con respecto a la proteína total tiene tanto un efecto insulínico como un efecto glucagónico en sujetos humanos. Los efectos estimuladores de la insulina y el glucagón son superiores a los obtenidos mediante el uso de dosis similares de aislado de proteína de lactosuero (WPI) como fuente de proteínas.

Esto abre las puertas para usar productos enriquecidos en BLG para prevenir o tratar trastornos relacionados con desequilibrios de estas hormonas relacionados con los trastornos metabólicos y/o la atrofia muscular o para el tratamiento terapéutico o no terapéutico para estimular, por ejemplo, la síntesis muscular y aumentar el gasto energético y reducir la adiposidad.

Un aspecto de la invención se refiere a a) beta-lactoglobulina o b) una composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina, en la que dicha beta-lactoglobulina está presente en una cantidad de al menos el 75 % p/p con respecto a la proteína total, en la que a) o b) se proporciona en una cantidad terapéuticamente eficaz, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la atrofia muscular, en la que el sujeto es un ser humano y en la que el uso implica aumentar el nivel de insulina en la sangre del sujeto y en la que la administración de a) o b) es mediante administración oral.

Los inventores han hallado que la BLG tiene efectos insulínicos y glucagónicos superiores con respecto a otras proteínas de la leche y, por tanto, la BLG puede usarse ventajosamente para prevenir y/o tratar el trastorno metabólico y/o la atrofia muscular. Véanse las figuras 11 y 12, así como los ejemplos 4 y 5.

Se sabe que la insulina modula eficazmente las concentraciones de lípidos en el torrente circulatorio ya que la insulina aumenta la captación de lípidos en los músculos, mientras que el glucagón tiene un impacto positivo sobre el gasto energético e inhibe el apetito. Por tanto, la administración de BLG a un sujeto que padece un trastorno metabólico será beneficiosa, ya que esto dará como resultado un aumento en las concentraciones circulantes de glucagón e insulina.

Los inventores han demostrado que la ingesta de BLG aumenta la concentración circulante de insulina, glucagón y aminoácidos específicos tales como leucina, fenilalanina, metionina, prolina, tirosina, aspartato, glutamato y lisina. La combinación de insulina y especialmente leucina ha demostrado efectos anabólicos particularmente eficaces en los músculos y, por tanto, puede ser útil para preservar o fortalecer los músculos durante una afección tal como cáncer, caquexia, sarcopenia, enfermedad inflamatoria, tras una derivación/manga gástrica y desnutrición, y también en la población general (incluyendo atletas) donde se desea el mantenimiento o la acumulación de tejido/masa muscular.

En el contexto de la presente invención, el término “trastorno metabólico” se refiere a una afección en la que reacciones químicas anómalas en el cuerpo alteran el proceso metabólico normal. Ejemplos de trastornos metabólicos son síndrome metabólico, obesidad, dislipidemia, esteatosis hepática, diabetes, prediabetes e intolerancia a la glucosa.

En el contexto de la presente invención, el término “atrofia muscular” se refiere a una afección de pérdida de masa musculoesquelética que puede estar provocada, por ejemplo, por sarcopenia, caquexia, endocrinopatías, desnutrición, inmovilidad y/o actividad física reducida, efecto secundario de medicamento, resistencia anabólica, resistencia a la insulina, trastornos de la conducta alimentaria e hipoalbuminemia.

En el contexto de la presente invención, el término “beta-lactoglobulina” o “BLG” se refiere a beta-lactoglobulina de especies de mamíferos, por ejemplo, en formas nativas, no plegadas y/o glicosiladas, e incluye las variantes genéticas que se producen de manera natural. El término incluye además BLG agregada, BLG precipitada y BLG cristalina. Cuando se hace referencia a la cantidad de BLG, se hace referencia a la cantidad total de BLG incluyendo BLG agregada. La cantidad total de BLG se determina según el ejemplo 1.18. El término “BLG

agregada" se refiere a BLG que está al menos parcialmente no plegada y que, además, se ha agregado con otras moléculas de BLG desnaturalizadas y/u otras proteínas de lactosuero desnaturalizadas, normalmente por medio de interacciones hidrófobas y/o enlaces covalentes.

- 5 El término BLG se refiere a BLG no hidrolizada, es decir, BLG madura de longitud completa tal como está presente en la leche, que puede determinarse usando filtración en gel y/o electroforesis en gel. Por tanto, el término BLG no incluye fragmentos peptídicos de BLG.

10 La BLG es la proteína más predominante en el suero de la leche y el lactosuero bovinos y existe en varias variantes genéticas, denominándose las principales A y B en la leche de vaca. Las secuencias de aminoácidos de las variantes genéticas de BLG son bien conocidas por el experto. La secuencia de aminoácidos de la variante B de BLG bovina madura se encuentra, por ejemplo, con el número de registro: P02754 (actualizado el 16 de octubre de 2019) en uniprot.org (aminoácidos 17-178).

15 La BLG es una proteína lipocalina y puede unirse a muchas moléculas hidrófobas, lo que sugiere un papel en su transporte. También se ha demostrado que la BLG puede unirse al hierro a través de sideróforos y podría tener un papel en la lucha contra los patógenos. En la leche materna humana falta un homólogo de BLG.

20 La BLG es una proteína relativamente pequeña de aproximadamente 162 residuos de aminoácido con un peso molecular de aproximadamente 18,3-18,4 kDa. En condiciones fisiológicas, es predominantemente dimérica, pero se disocia en un monómero por debajo de aproximadamente pH 3, preservando su estado nativo tal como se determina usando espectroscopía de resonancia magnética nuclear. A la inversa, la BLG también se produce en formas de agregación tetraméricas, octaméricas y otras multiméricas en una variedad de condiciones naturales.

25 En el contexto de la presente invención, el término "beta-lactoglobulina no agregada" o "BLG no agregada" también se refiere a beta-lactoglobulina de especies de mamíferos, por ejemplo, en formas nativas, no plegadas y/o glicosiladas, e incluye las variantes genéticas que se producen de manera natural. Sin embargo, el término no incluye BLG agregada, BLG precipitada o BLG cristalizada. La cantidad o concentración de BLG no agregada se determina según el ejemplo 1.4.

30 El porcentaje de BLG no agregada con respecto a BLG total se determina calculando $(m_{\text{BLG total}} - m_{\text{BLG no agregada}})/m_{\text{BLG total}} * 100 \%$. $m_{\text{BLG total}}$ es la concentración o cantidad de BLG determinada según el ejemplo 1.18 y $m_{\text{BLG no agregada}}$ es la concentración o cantidad de BLG no agregada determinada según el ejemplo 1.4.

35 En el contexto de la presente invención, el término "cristal" se refiere a un material sólido cuyos constituyentes (tales como átomos, moléculas o iones) están dispuestos en una estructura microscópica altamente ordenada, formando una red cristalina que se extiende en todas las direcciones.

40 En el contexto de la presente invención, el término "cristal de BLG" se refiere a cristales de proteína que contienen principalmente BLG no agregada y preferiblemente nativa dispuestos en una estructura microscópica altamente ordenada, formando una red cristalina que se extiende en todas las direcciones. Los cristales de BLG pueden ser, por ejemplo, monolíticos o policristalinos y pueden ser, por ejemplo, cristales intactos, fragmentos de cristales o una combinación de los mismos. Los fragmentos de cristales se forman, por ejemplo, cuando los
45 cristales intactos se someten a cizalladura mecánica durante el procesamiento. Los fragmentos de cristales también tienen la estructura microscópica altamente ordenada de cristal pero pueden carecer de la superficie regular y/o los bordes o las esquinas regulares de un cristal intacto. Véanse, por ejemplo, la figura 18 de la solicitud PCT n.º PCT/EP2017/084553 para un ejemplo de muchos cristales intactos de BLG y la figura 13 de la solicitud PCT n.º PCT/EP2017/084553 para un ejemplo de fragmentos de cristales de BLG. En ambos casos, el
50 cristal o los fragmentos de cristales de BLG pueden identificarse visualmente como estructuras bien definidas, compactas y coherentes usando microscopía óptica. El cristal o los fragmentos de cristales de BLG a menudo son al menos parcialmente transparentes. Se sabe además que los cristales de proteína son birrefringentes, y puede usarse esta propiedad óptica para identificar partículas desconocidas que tienen una estructura cristalina. Por otro lado, los agregados de BLG no cristalinos a menudo aparecen como poco definidos, no transparentes y
55 como protuberancias abiertas o porosas de tamaño irregular.

En el contexto de la presente invención, el término "cristalizar" se refiere a la formación de cristales de proteína. La cristalización puede ocurrir, por ejemplo, de manera espontánea o iniciarse mediante la adición de semillas de cristalización.

60 En el contexto de la presente invención, el término "que previene", "prevenir" o "prevención" se refiere a posponer, ralentizar o evitar el desarrollo de una afección tal como un trastorno metabólico tal como diabetes o prediabetes o atrofia muscular en un sujeto.

65 En el contexto de la presente invención, el término "que trata", "tratamiento" y "tratar" se refiere a aliviar, curar o eliminar una afección tal como un trastorno metabólico tal como diabetes o prediabetes o atrofia muscular en un

sujeto. El alivio puede dar como resultado una dosificación de medicamento reducida de, por ejemplo, medicamentos de reducción de glucosa.

En el contexto de la presente invención, "síndrome metabólico" es un trastorno complejo asociado con un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2. El síndrome metabólico está vinculado con tensión arterial aumentada, glucosa en ayunas elevada y resistencia a la insulina, sobrepeso (por ejemplo, índice de masa corporal (IMC) mayor de o igual a 25 kg/m²), obesidad abdominal, inactividad física habitual, hipertensión (por ejemplo, mayor de o igual a 140/90 mmHg en adultos, colesterol HDL mayor de o igual a 35 mg/dl; niveles de triglicéridos mayores de o iguales a 250 mg/dl (Indian 3 Endocrinol Metab. Enero-febrero de 2012; 16(1): 7-12. doi:10.41033/2230-821.91175. Changing definitions of metabolic syndrome, Rakesh M. Parikh y Viswanathan Mohan).

En el contexto de la presente invención, el término "obesidad" se refiere a una afección médica en la que se ha acumulado un exceso de grasa corporal en tal medida que puede tener un efecto negativo sobre determinados estados de salud o una mortalidad aumentada. Los humanos generalmente se consideran obesos cuando su índice de masa corporal (IMC) es superior a 30 kg/m². El IMC es una medición que se obtiene dividiendo el peso de una persona entre la altura de la persona al cuadrado.

En el contexto de la presente invención, el término "sobrepeso" se define para un adulto cuando el IMC está en el intervalo de 25-30 kg/m².

En el contexto de la presente invención, el término "dislipidemia" se refiere a una afección en la que la persona tiene una cantidad anómala de lípidos (por ejemplo, triglicéridos, colesterol y/o fosfolípidos grasos) en la sangre. Cuando sólo los niveles de colesterol son altos o bajos, esto se denomina hipercolesterolemia o hipocolesterolemia.

Por tanto, en el contexto de la presente invención, el término "hipercolesterolemia" se refiere a una afección de la presencia de niveles altos de colesterol no HDL y colesterol LDL en la sangre.

HDL significa lipoproteína de alta densidad. "Colesterol no HDL" a menudo se denomina colesterol malo ya que se refiere al valor de colesterol total de una persona menos el colesterol HDL. Colesterol LDL significa lipoproteína de baja densidad.

Por tanto, la hipercolesterolemia es una forma de hiperlipidemia, alto contenido de lípidos en sangre e hiperlipoproteinemia (niveles elevados de lipoproteínas en la sangre). Los niveles elevados de colesterol no HDL y LDL en la sangre pueden ser una consecuencia de la dieta, la obesidad, enfermedades hereditarias (genéticas) (tales como mutaciones del receptor de LDL en hipercolesterolemia familiar) o la presencia de otras enfermedades tales como diabetes tipo 2 e hipotiroidismo.

En el contexto de la presente invención, el término "esteatosis hepática" o "enfermedad de hígado graso" se refiere a una afección en la que se acumula un exceso de grasa en el hígado. A menudo hay pocos o ningún síntoma. Ocasionalmente puede haber cansancio o dolor en el lado superior derecho del abdomen. Las complicaciones pueden incluir cirrosis, cáncer de hígado y varices esofágicas.

Hay dos tipos de enfermedad de hígado graso: enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y enfermedad hepática alcohólica. La NAFLD se compone de hígado graso simple y esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Los riesgos primarios incluyen alcohol, diabetes tipo 2 y obesidad. Otros factores de riesgo incluyen determinados medicamentos tales como los glucocorticoides y la hepatitis C.

En el contexto de la presente invención, el término "hipertrigliceridemia" se refiere a niveles altos (-hiper) en sangre (-emia) de triglicéridos, la molécula grasa más abundante en la mayoría de los organismos. Los niveles elevados de triglicéridos están asociados con aterosclerosis, incluso en ausencia de hipercolesterolemia (niveles altos de colesterol) y predisponen a la enfermedad cardiovascular. Los niveles muy altos de triglicéridos también aumentan el riesgo de pancreatitis aguda. La propia hipertrigliceridemia es habitualmente asintomática, aunque los niveles altos pueden estar asociados con lesiones cutáneas conocidas como xantomas.

En el contexto de la presente invención, el término "intolerancia a la glucosa" (GI) se refiere a disglucemia que comprende tanto prediabetes como diabetes. Incluye las afecciones de glucosa en ayunas alterada (IFG), tolerancia a la glucosa alterada (IGT), diabetes mellitus gestacional (GDM) y diabetes mellitus (DM).

En el contexto de la presente invención, el término "diabetes" o "diabetes mellitus" se refiere a una enfermedad crónica que se produce o bien cuando las células beta pancreáticas no producen suficiente insulina o bien cuando el cuerpo no puede usar eficazmente la insulina que produce.

Usando la definición de diabetes de la OMS, a un humano se le diagnostica diabetes cuando:

1) la glucosa en ayunas es ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l), o

2) la glucosa en plasma (PG) a las 2 horas es ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT). La prueba debe realizarse tal como describe la OMS, usando una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua, o

3) la hemoglobina A1c (HbA1C) en plasma es $\geq 6,5$ % (48 mmol/mol). La prueba debe realizarse en un laboratorio usando un método que está certificado y normalizado por el "Programa Nacional de Normalización de Glucohemoglobina" (NGSP) para el ensayo de control y complicaciones de la diabetes (DCCT), o

4) en un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica, la glucosa en plasma aleatoria es ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l).

Véase Diabetes Care. Enero de 2010; 33(supl. 1): S62-S69. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association. doi: 10.2337/dc10-S062.

En el contexto de la presente invención, "ayunas" se define como la ausencia de ingesta calórica durante al menos 8 horas.

Un nivel persistentemente alto de glucosa en sangre se denomina hiperglucemia, mientras que los niveles bajos se denominan hipoglucemia. La diabetes mellitus está caracterizada por hiperglucemia persistente por cualquiera de varias causas y es la enfermedad más prominente relacionada con la insuficiencia de la regulación de la glucemia.

La diabetes tipo 1 representa sólo el 5-10 % de los pacientes con diabetes. La diabetes tipo 1 es el resultado de una destrucción autoinmunitaria mediada por células de las células beta del páncreas. La tasa de destrucción de células beta es bastante variable, siendo rápida en algunos individuos (principalmente lactantes y niños) y lenta en otros (principalmente adultos). En particular, los adultos pueden conservar una función residual de células β suficiente para prevenir la cetoacidosis durante muchos años. Un modo para determinar si un sujeto tiene una función de células beta conservada es midiendo el nivel de péptido C en sangre del sujeto.

Un sujeto no tratado con insulina (medido después de un ayuno durante la noche) que tiene un nivel de péptido C en plasma por encima del nivel de referencia inferior de 370 pmol/l tiene al menos cierta función de células beta conservada.

La administración de BLG a un sujeto que padece diabetes tipo 1, pero con cierta función de células beta conservada, será beneficiosa ya que dará como resultado un aumento en las concentraciones circulantes de GIP y/o GLP-1 e insulina.

La diabetes tipo 2 es el tipo más común de diabetes y representa el 90-95 % de los pacientes con diabetes. El riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física. Se produce más frecuentemente en mujeres con diabetes gestacional (GDM) previa y en individuos con hipertensión o dislipidemia, y su frecuencia varía en los diferentes subgrupos raciales/étnicos. A menudo está asociada con una fuerte predisposición genética. La hiperglucemia y la diabetes tipo 2 derivan de un desequilibrio entre la sensibilidad a la insulina y la función de células beta. Por tanto, una baja función de células beta y/o una baja sensibilidad a la insulina conducen a altas concentraciones de glucosa en sangre, que pueden evitarse eficazmente mejorando o bien la secreción de insulina o bien la sensibilidad a la insulina.

La diabetes gestacional (GDM) se desarrolla en el 4-5 % de todos los embarazos en Dinamarca. La mayoría de las veces, este tipo de diabetes es transitoria. Sin embargo, se sabe bien que la GDM está asociada con un riesgo sustancial de desarrollar diabetes tipo 2 en los años posteriores al embarazo.

La diabetes autoinmunitaria latente del adulto (LADA) es un subtipo de diabetes que está provocada principalmente por una disminución de la función de células beta (por ejemplo, bajo contenido de péptido C), y el tratamiento puede incluir inicialmente medicamentos habituales para la diabetes tipo 2 durante un determinado periodo de tiempo, tras el cual será esencial el tratamiento exógeno con insulina como lo es para los sujetos con diabetes tipo 1. Esto ha conducido al término diabetes tipo 1.5.

En el contexto de la presente invención, el término "prediabetes" se refiere a una afección asociada con un mayor riesgo de desarrollar diabetes a lo largo de la vida. Un sujeto con prediabetes normalmente es resistente a la insulina, tiene tolerancia a la glucosa alterada, padece un síndrome metabólico, es obeso o está predispuesto (por ejemplo, por genética/antecedentes familiares; porta alelos que dan como resultado una mayor incidencia de diabetes que en la población promedio o tiene padres o hermanos con diabetes).

Sin cambios en el estilo de vida, un sujeto con prediabetes tiene un riesgo aumentado de desarrollar diabetes tipo 2.

Se sabe que la insulina modula eficazmente las concentraciones de lípidos en el torrente circulatorio, ya que la insulina aumenta la captación de lípidos en los músculos. Mientras que se ha demostrado que el glucagón aumenta el gasto energético e inhibe el apetito. Dado que se halló sorprendentemente que la BLG aumenta las concentraciones tanto de insulina como de glucagón, se confía en que la BLG tenga ventajosamente el potencial de ser eficaz en el tratamiento del síndrome metabólico, la obesidad y/o la dislipidemia.

Además de esto, se sabe que los análogos individuales del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), los biagonistas de GLP-1 y glucagón y los triagonistas de GIP, péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y glucagón tienen el potencial de usarse para tratar la obesidad.

Dado que se halló sorprendentemente que la BLG aumenta las concentraciones de la totalidad de estas tres hormonas (GIP, GLP-1 y glucagón), se confía en que la BLG tenga ventajosamente el potencial de ser eficaz en el tratamiento de la obesidad.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la atrofia muscular se selecciona de una o más de: sarcopenia y/o caquexia.

En el contexto de la presente invención, el término "sarcopenia" se refiere a un tipo de atrofia muscular, pérdida muscular, que se produce con la edad y/o la inmovilidad. Se caracteriza por la pérdida degenerativa de masa, calidad y fuerza musculoesquelética. Existen muchas causas propuestas de sarcopenia y probablemente sea el resultado de múltiples factores que interactúan. La comprensión de las causas de la sarcopenia es incompleta.

Las posibles causas de la sarcopenia son, por ejemplo, cambios en hormonas, inmovilidad, cambios musculares relacionados con la edad, nutrición y cambios neurodegenerativos.

En el contexto de la presente invención, el término "caquexia" se refiere a un síndrome asociado con una enfermedad subyacente que provoca una pérdida muscular continua que no se revierte completamente con complementación nutricional. Una variedad de enfermedades pueden provocar caquexia, más comúnmente cáncer, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad renal crónica y SIDA. La caquexia es una consecuencia clínica grave de casi todas las enfermedades crónicas en estadios avanzados, afecta al 50-80 % de los pacientes con cáncer y representa hasta el 20 % de muertes por cáncer, con cifras similares válidas para la insuficiencia cardíaca crónica. La inflamación sistémica a partir de estas afecciones puede provocar cambios perjudiciales en el metabolismo y la composición corporal. La caquexia provoca principalmente pérdida muscular en lugar de pérdida de grasa.

En el contexto de la presente invención, el término "endocrinopatía" se refiere a una enfermedad de una glándula endocrina. El término endocrinopatía se usa habitualmente como término médico para un problema hormonal. Las endocrinopatías habituales incluyen hipertiroidismo e hipotiroidismo.

En el contexto de la presente invención, el término "desnutrición" se refiere a una condición que es el resultado de llevar una dieta que no suministra una cantidad sana/suficiente de uno o más nutrientes. Esta incluye dietas que tienen muy pocos nutrientes de modo que la dieta provoca problemas de salud. Los nutrientes involucrados pueden incluir calorías, proteínas, hidratos de carbono, grasa, vitaminas o minerales. Una falta de nutrientes se denomina hiponutrición o malnutrición, mientras que un exceso de nutrientes se denomina hipernutrición.

En el contexto de la presente invención, el término "inmovilidad" y/o "actividad física reducida" se refiere a una condición de desuso de los músculos durante un periodo de tiempo más largo. Por ejemplo, debido al reposo en cama, esto dará como resultado una disminución muscular significativa. Un nivel reducido de actividad física también conducirá a una pérdida de masa muscular, que en parte puede estar relacionada con una sensibilidad/capacidad de respuesta reducida del músculo.

En el contexto de la presente invención, el término "efecto secundario de medicamento" se refiere a una condición de un medicamento que tiene el efecto secundario no deseado de afectar negativamente a la masa/calidad/función muscular. Ejemplos de tales medicamentos son fármacos antineoplásicos, glucocorticoides, terapias biológicas, tratamientos antirreumáticos, inhibidores de la bomba de protones, estatinas, analgésicos, etc.

En el contexto de la presente invención, el término "resistencia anabólica" se refiere a una condición en la que el músculo esquelético es incapaz de responder de manera apropiada a los estímulos anabólicos mediante la estimulación de la síntesis de proteínas. La resistencia anabólica contribuye a la pérdida de masa muscular en los ancianos, durante la inmovilización, así como en respuesta a inflamación y cáncer.

En el contexto de la presente invención, el término "resistencia a la insulina" se refiere a una condición en la que las células en los músculos, la grasa y el hígado no responden bien a la insulina y no captan fácilmente la glucosa a partir de la sangre. Como resultado, el páncreas produce más insulina para ayudar a que la glucosa

entre en las células. Siempre que el páncreas pueda producir suficiente insulina para superar la débil respuesta de las células a la insulina, los niveles de glucosa en sangre permanecerán en el intervalo saludable.

En el contexto de la presente invención, el término "trastorno de la conducta alimentaria" tal como anorexia nerviosa y/o bulimia nerviosa se refiere a una condición de un trastorno mental definido por hábitos alimentarios anómalos que afectan negativamente a la salud física y/o mental de una persona. Los trastornos de la conducta alimentaria incluyen trastorno de la conducta alimentaria por atracón, en el que las personas comen una gran cantidad en un corto periodo de tiempo; anorexia nerviosa, en la que las personas comen muy poco por miedo a aumentar de peso y, por tanto, tienen un bajo peso corporal; bulimia nerviosa, en la que las personas comen mucho y luego ellos mismos intentan deshacerse de la comida.

En el contexto de la presente invención, el término "hipoalbuminemia" se refiere a una condición con bajas concentraciones de albúmina en suero. Esta condición a menudo está provocada por una ingesta nutricional insuficiente de proteína, una pérdida excesiva de proteína/albumina (por ejemplo, ascitis y excreción renal) o una combinación de estas dos. Esto se observa, por ejemplo, en pacientes con, por ejemplo, glomerulonefritis, cirrosis, anorexia nerviosa y cánceres.

En el contexto de la presente invención, el término "hipoabsorción" se refiere a una captación gastrointestinal insuficiente de nutrientes (grasa, hidrato de carbono o glucosa), minerales o vitaminas.

La hipoabsorción está asociada con afecciones o procedimientos tales como derivación gástrica, manga gástrica, enfermedad del intestino delgado, enfermedad de Crohn y/o colitis.

Se ha demostrado que el lactosuero fomenta la síntesis de proteínas musculares y mejora el estado nutricional en pacientes con caquexia y mejora la masa muscular e inhibe la inflamación en pacientes con sarcopenia. Estos efectos se han atribuido al alto contenido de leucina en el lactosuero. La BLG tiene un mayor contenido de leucina en comparación con el WPI y, además de esto, se ha hallado sorprendentemente que la BLG fomenta una mayor respuesta a la insulina. Por tanto, se cree que la BLG es beneficiosa en pacientes con sarcopenia, caquexia, desnutrición, inmovilización y/o actividad física reducida.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la atrofia muscular se selecciona de una o más de: sarcopenia y caquexia.

En una realización preferida de la presente invención, el uso de a) beta-lactoglobulina o b) una composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos el 75 % p/p con respecto a la proteína total para aumentar el nivel de insulina, glucagón y GLP-1 en la sangre de un sujeto.

En una realización preferida de la presente invención, el uso de a) beta-lactoglobulina o b) una composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos el 75 % p/p con respecto a la proteína total para aumentar el nivel de insulina, glucagón y GIP en la sangre de un sujeto.

En una realización preferida de la presente invención, el uso de a) beta-lactoglobulina o b) una composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos el 75 % p/p con respecto a la proteína total para aumentar el nivel de insulina, glucagón, GLP-1 y GIP en la sangre de un sujeto.

En el contexto de la presente invención, el término "reducir la adiposidad" se refiere a reducir la grasa corporal y/o prevenir la acumulación de grasa corporal.

Los inventores han hallado que la BLG tiene efectos insulíntrópicos y glucagóntrópicos superiores con respecto a otras proteínas de la leche. Por tanto, la BLG puede usarse en un sujeto para estimular o prolongar la saciedad o aumentar la saciedad, reducir la ingesta de alimentos, aumentar el gasto energético, reducir la adiposidad, lograr un efecto anabólico, lograr un efecto anabólico muscular. Véanse las figuras 11 y 12, así como los ejemplos 4 y 5.

Se sabe que la insulina modula eficazmente las concentraciones de lípidos en el torrente circulatorio ya que la insulina aumenta la captación de lípidos en los músculos, mientras que el glucagón tiene un impacto positivo sobre el gasto energético e inhibe el apetito. La administración de BLG es beneficiosa, ya que dará como resultado un aumento en las concentraciones circulantes de glucagón e insulina.

Los inventores han demostrado que la ingesta de BLG aumenta la concentración circulante de insulina, glucagón y aminoácidos específicos tales como leucina, fenilalanina, metionina, prolina, tirosina, aspartato, glutamato y lisina. La combinación de insulina y especialmente leucina ha demostrado efectos anabólicos particularmente eficaces en los músculos y, por tanto, puede ser útil para preservar o fortalecer los músculos en la población general (incluyendo atletas) donde se desea el mantenimiento o la acumulación de tejido/masa muscular.

En una realización preferida de la presente invención, el efecto anabólico muscular se selecciona de uno o más

de: estimular/aumentar la síntesis de proteínas musculares, reducir la descomposición de proteínas musculares, mejorar el equilibrio neto muscular y/o potenciar la recuperación muscular.

5 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el uso implica regular el nivel de glucosa, insulina, glucagón, polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y/o péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) en la sangre.

10 En el contexto de la presente invención, el término "insulina" se refiere a una hormona peptídica producida por las células beta de los islotes pancreáticos. Se considera que es la principal hormona anabólica del cuerpo. La insulina regula el metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y la proteína facilitando el transporte de glucosa desde la sangre a las células del hígado, la grasa y el músculo esquelético.

15 En el contexto de la presente invención, el término "glucagón" se refiere a una hormona peptídica secretada por las células alfa del páncreas. El páncreas libera glucagón cuando la concentración de insulina (e indirectamente de glucosa) en el torrente circulatorio es demasiado baja. El glucagón hace que el hígado convierta el glucógeno almacenado en glucosa, que se libera al torrente circulatorio, aumentando la glucemia; esto se denomina glucogénesis.

20 En el contexto de la presente invención, el término "polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP)" se refiere a una hormona de 42 aminoácidos que se produce predominantemente por células K enteroendocrinas y se libera a la circulación en respuesta a la estimulación de nutrientes. El GIP estimula la secreción de insulina de manera dependiente de la glucosa y, por tanto, se clasifica como una hormona incretina.

25 En el contexto de la presente invención, el término "péptido similar al glucagón 1 (GLP-1)" se refiere a una hormona peptídica de 30 ó 31 aminoácidos de longitud que se deriva del procesamiento posterior a la traducción específico de tejido del péptido proglucagón.

30 El GLP-1 es una hormona incretina que tiene efectos insulínicos; por tanto, tiene la capacidad de disminuir los niveles de glucemia de manera dependiente de la glucosa potenciando la secreción de insulina.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el uso implica aumentar el nivel de insulina y glucagón en la sangre del sujeto.

35 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el uso implica además aumentar el nivel de glucagón en la sangre del sujeto.

40 Los inventores hallaron sorprendentemente que la administración de BLG a seres humanos con diabetes eleva sus concentraciones circulantes tanto de insulina como de glucagón con respecto a la administración de una dieta similar que contiene proteína de lactosuero.

Se cree que el efecto insulínico de la BLG puede estar parcialmente mediado a través de los niveles aumentados de GIP y/o GLP-1 del tracto gastrointestinal. Esto se demuestra en los ejemplos 4 y 5.

45 Los inventores han hallado que la administración de BLG como precomida también aumenta las concentraciones de GIP y GLP-1 y reduce la glucosa en sangre.

Algunas de sus ventajas son la saciedad y un menor nivel de glucosa en sangre.

50 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el uso implica además aumentar el nivel de polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) en la sangre del sujeto.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el uso implica además aumentar el nivel de péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) en la sangre del sujeto.

55 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el uso implica además reducir el nivel de glucosa en la sangre del sujeto.

60 Se sabe que, además de los análogos de GLP-1, están desarrollándose biagonistas de GLP-1 y glucagón y triagonistas de GIP, GLP-1 y glucagón para el tratamiento de la obesidad. Dado que se halló sorprendentemente que la BLG aumenta las concentraciones de la totalidad de estas tres hormonas. Por tanto, la BLG puede usarse ventajosamente en el tratamiento y/o la prevención de la obesidad dado que se ha hallado que la BLG aumenta sorprendentemente el glucagón, el GLP-1 y el GIP.

65 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el uso implica aumentar el nivel de glucagón y péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) en la sangre del sujeto.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el uso implica además aumentar el nivel de glucagón, polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) en la sangre del sujeto.

- 5 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el uso implica además aumentar el nivel de glucagón y polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) en la sangre del sujeto.

- 10 Los inventores hallaron sorprendentemente que consumir BLG como precomida dio como resultado concentraciones elevadas de leucina y fenilalanina, que se ha demostrado que estimulan la secreción de insulina. Del mismo modo, se ha demostrado que la metionina y la tirosina aumentan las concentraciones de glucagón. Estudios en perros y roedores han demostrado que el aspartato, el glutamato, la lisina y la prolina también estimulan la secreción de glucagón. Todos estos aminoácidos mencionados anteriormente estaban más elevados en plasma tras el consumo de BLG en comparación con WPI.

- 15 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la administración de a) BLG o b) la composición nutricional implica aumentar la cantidad de aminoácidos que estimulan la concentración de glucagón y/o insulina en la sangre.

- 20 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, los aminoácidos son tirosina, metionina, prolina, aspartato, glutamato, lisina, leucina y/o fenilalanina.

En una realización preferida de la presente invención, el sujeto es un ser humano.

- 25 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto se selecciona de uno o más de: un obeso, un sujeto que padece dislipidemia, un sujeto que padece esteatosis hepática, un sujeto que padece prediabetes o diabetes, un sujeto que padece un síndrome metabólico, un sujeto que padece hipoglucemia, un sujeto que padece intolerancia a la glucosa, un sujeto en riesgo de sarcopenia, un sujeto en riesgo de caquexia, un sujeto que padece endocrinopatías, un ser humano desnutrido, un sujeto inmovilizado o con actividad física reducida, un sujeto que padece efectos secundarios de medicamento, un sujeto que padece resistencia anabólica, un sujeto que padece resistencia a la insulina, un sujeto que padece trastornos de la conducta alimentaria, un sujeto que padece hipoabsorción, un sujeto que padece hipoalbuminemia y/o un sujeto que padece cirrosis.

- 30 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto es obeso, padece un síndrome metabólico, padece dislipidemia, diabetes, prediabetes, padece sarcopenia, caquexia, está desnutrido, inmovilizado y/o tiene actividad física reducida.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto es obeso, padece un síndrome metabólico, dislipidemia, diabetes y/o prediabetes.

- 40 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto es obeso, padece un síndrome metabólico y/o dislipidemia.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto es obeso.

- 45 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto padece un síndrome metabólico.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto padece dislipidemia.

- 50 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto padece sarcopenia, caquexia, está desnutrido, inmovilizado y/o tiene actividad física reducida.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto padece sarcopenia o caquexia.

- 55 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto es un ser humano sano.

- En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto se selecciona de uno o más de atletas, sujetos con sobrepeso/obesos, sujetos sedentarios, sujetos recreacionalmente activos, sujetos de mediana edad, anciano, culturista, ser humano con una masa muscular reducida, que tiene como objetivo aumentar o mantener la masa muscular, ser humano en riesgo de desarrollar una masa muscular reducida y/o que está desnutrido.

- 60 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto padece prediabetes o diabetes.

- En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto es obeso y/o está padeciendo un síndrome metabólico.

- 65 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el sujeto está padeciendo sarcopenia y/o caquexia.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la composición nutricional b) comprende una cantidad total de proteína de al menos el 1,0 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional.

5 Los inventores han hallado que la administración de BLG según la presente invención tiene sorprendentemente un efecto insulínico superior con respecto a otras proteínas de la leche y, por tanto, puede usarse en la prevención y/o el tratamiento de la diabetes en un sujeto. Por tanto, se ha hallado que la BLG aumenta sorprendentemente las concentraciones circulantes de insulina y GIP, que son hormonas (y productos farmacéuticos) que se sabe que reducen la hiperglucemia. Los efectos son superiores a usar dosis similares de
10 WPI o caseína como fuente de proteínas.

Los inventores han hallado que la BLG tiene efectos insulínicos superiores con respecto a otras proteínas de la leche y, por tanto, puede usarse para prevenir y/o tratar la diabetes o prediabetes. Por tanto, tiene el potencial de aumento de insulina en diversos subgrupos de prediabetes y/o diabetes tales como, por ejemplo,
15 diabetes tipo 2 (TDM2), síndrome metabólico, diabetes gestacional (GDM), diabetes autoinmunitaria latente del adulto (LADA), diferentes variedades de prediabetes y fases tempranas de la diabetes tipo 1 (TDM1), donde la función de células beta no está totalmente extinta.

En el contexto de la presente invención, el término "mamífero" incluye, pero no se limita a, roedores, mamíferos acuáticos, animales domésticos tales como perros y gatos, animales de granja tales como ovejas, cerdos, vacas y caballos, y humanos. Cuando se usa el término mamífero, se contempla que también se aplica a otros animales que son capaces de producir el efecto mostrado o destinado a mostrarse por el mamífero.

En una realización preferida de la presente invención, el sujeto es un mamífero.

25 En algunas realizaciones preferidas de la invención, el sujeto se selecciona del grupo que consiste en un mamífero, incluyendo animales domésticos y seres humanos.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, el sujeto es un ser humano.

30 La diabetes o prediabetes, por ejemplo, la diabetes tipo 2, se observa en seres humanos, pero la diabetes también está extendiéndose cada vez más entre los animales domésticos y particularmente entre animales que se tienen como mascotas. Por tanto, en algunas realizaciones de la invención, el sujeto es preferiblemente un perro o un gato.

35 En algunas realizaciones de la presente invención, el sujeto es un ser humano, un perro y/o un gato.

En el contexto de la presente invención, el término "plasma sanguíneo" se refiere al componente líquido de color amarillento claro de la sangre que mantiene en suspensión las células sanguíneas de la sangre completa. Es la parte líquida de la sangre que transporta células y proteínas por todo el cuerpo. El plasma sanguíneo constituye aproximadamente el 55 % del volumen sanguíneo total del cuerpo. El plasma sanguíneo comprende principalmente agua (que constituye el 95 % en volumen) y contiene proteínas disueltas (6-8 %) (por ejemplo, albúminas séricas, globulinas y fibrinógeno), glucosa, factores de coagulación, electrolitos (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , Cl^- , etc.), hormonas, dióxido de carbono y oxígeno.

45 En el contexto de la presente invención, el término "suero sanguíneo" se refiere al plasma sanguíneo sin los factores de coagulación tales como los fibrinógenos.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, el uso implica reducir el nivel de glucosa en sangre.

50 En el contexto de la presente invención, el término "glucosa" se refiere a un azúcar sencillo con la forma molecular $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. La glucosa circula en la sangre. En todo momento están presentes aproximadamente 4 gramos de glucosa en la sangre de un humano de 70 kilogramos. Una elevación persistente de la glucosa en sangre conduce a toxicidad por glucosa, que contribuye a la disfunción celular y a la diabetes. La glucosa puede transportarse desde los intestinos o el hígado a otros tejidos en el cuerpo a través del torrente circulatorio. La captación celular de glucosa está regulada principalmente por la insulina.

Aparecerán elevaciones transitorias de glucosa en sangre tras una comida convencional. La insulina es la hormona más potente en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Por tanto, lo más probablemente es que mayores concentraciones de insulina antes, durante y después de una comida eviten o modulen fluctuaciones no deseadas de glucosa.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, el uso implica regular el nivel de insulina, glucagón, polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y/o péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) en la sangre.

65 Los inventores hallaron sorprendentemente que la administración de BLG a seres humanos con resistencia a la

insulina provocada, similar a la encontrada en pacientes con diabetes o prediabetes, eleva sus concentraciones circulantes de insulina en un 62 % con respecto a la administración de una dieta similar que contiene caseína y en un 30 % con respecto a una dieta similar que contiene proteína de lactosuero.

- 5 La resistencia a la insulina también se produce en sujetos con diabetes y prediabetes y, por tanto, la administración de BLG puede usarse para tratar a tales pacientes.

Se cree que el efecto insulínico de la BLG puede estar parcialmente mediado a través de los niveles aumentados de GIP y/o GLP-1 del tracto gastrointestinal. Esto se demuestra en el ejemplo 4.

10

Se sabe que la inflamación, el reposo en cama y el ayuno (tal como se usan en este ensayo, véase el ejemplo 4) provocan todos ellos resistencia a la insulina. Por tanto, los efectos insulínicos de la BLG también pueden estar presentes en sujetos con diabetes o prediabetes que tienen una función de células beta conservada.

- 15 En algunas realizaciones preferidas de la invención, el uso implica además aumentar el nivel de GIP en la sangre.

Los inventores también hallaron sorprendentemente que la administración de BLG a sujetos humanos con resistencia a la insulina provocada, similar a la encontrada en pacientes con diabetes o prediabetes, eleva las concentraciones de GIP en sangre. Esto se demuestra en el ejemplo 4.

20

Se halló que el GIP en plasma (que se secreta principalmente a partir de las células K enteroendocrinas en el intestino delgado proximal) aumentó más después de la ingesta de BLG en comparación con la caseína y la proteína de lactosuero. Esto podría formar parte de una explicación mecanística para las mayores concentraciones de insulina detectadas después de la administración de BLG en comparación con la caseína y el lactosuero/WPI. Tanto GIP como GLP-1 estimulan la secreción de insulina a partir de células beta (efecto de incretina).

25

En algunas realizaciones preferidas de la invención, el uso implica además aumentar el nivel de péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) en la sangre.

30

Se halló sorprendentemente que el GLP-1 aumentó más después de la ingesta de BLG en comparación con la caseína. Esto podría formar parte de una explicación mecanística para las mayores concentraciones de insulina detectadas después de la administración de BLG en comparación con la caseína. Tanto GIP como GLP-1 estimulan la secreción de insulina a partir de células beta (efecto de incretina).

35

En algunas realizaciones preferidas de la invención, el uso implica además aumentar el nivel de glucagón en la sangre.

- 40 En algunas realizaciones preferidas de la invención, la beta-lactoglobulina se administra en forma de composición nutricional.

En el contexto de la presente invención, el término "producto nutricional" o "composición nutricional" significa productos alimenticios que comprenden uno o más macronutrientes y opcionalmente componentes adicionales que comprenden fibras, vitaminas, agentes aromatizantes, edulcorantes artificiales, minerales y oligoelementos. Un producto nutricional o una composición nutricional puede comprender proteína como único nutriente o puede comprender, por ejemplo, proteína y un agente aromatizante.

45

El término "nutriente" significa una sustancia usada por un organismo para sobrevivir, crecer y reproducirse. Los nutrientes pueden ser o bien macronutrientes o bien micronutrientes. Los macronutrientes son nutrientes que proporcionan energía cuando se consumen, por ejemplo, proteína, lípido e hidrato de carbono. Los micronutrientes son nutrientes como las vitaminas, los minerales y los oligoelementos.

50

Una composición nutricional también puede contener aromas incluyendo aromas naturales y sintéticos, colorantes y potenciadores, agentes espesantes, modificadores del pH, estabilizadores, antisépticos, glicerina, alcoholes, agentes de carbonatación usados para bebidas carbonatadas, etc.

55

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la beta-lactoglobulina se administra en forma de composición nutricional líquida.

60

En el contexto de la presente invención, los términos "líquido" y "disolución" abarcan tanto composiciones que están libres de materia particulada como composiciones que contienen una combinación de partículas líquidas y sólidas y/o semisólidas, tales como, por ejemplo, cristales de proteína u otras partículas de proteína. Por tanto, un "líquido" o una "disolución" puede ser una suspensión o incluso una suspensión espesa. Sin embargo, un "líquido" y una "disolución" son preferiblemente bombeables.

65

En el contexto de la presente invención, el término "composición nutricional líquida" se refiere a cualquier líquido nutricional a base de agua que puede ingerirse como bebida, por ejemplo, mediante alimentación por sonda o vertido.

- 5 Se prefiere particularmente que la composición nutricional comprenda un aislado de BLG, por ejemplo, en combinación con otras fuentes de proteínas, preferiblemente como fuente de proteínas principal y posiblemente incluso como única fuente de proteínas.

- 10 La composición nutricional líquida contiene normalmente una cantidad total de agua en el intervalo del 50 al 99 % p/p, preferiblemente en el intervalo del 45 al 98 % p/p, más preferiblemente en el intervalo del 40 al 95 % p/p, incluso más preferiblemente en el intervalo del 35 al 90 % p/p y lo más preferiblemente en el intervalo del 30 al 85 % p/p.

- 15 En algunas otras realizaciones preferidas de la invención, la composición nutricional líquida contiene una cantidad total de agua en el intervalo del 55 al 90 % p/p, preferiblemente en el intervalo del 57 al 85 % p/p, más preferiblemente en el intervalo del 60 al 80 % p/p, incluso más preferiblemente en el intervalo del 62 al 75 % p/p y lo más preferiblemente en el intervalo del 65 al 70 % p/p.

- 20 En algunas otras realizaciones preferidas de la invención, la composición nutricional líquida contiene una gran cantidad de agua, tal como una cantidad total de agua en el intervalo del 85 al 98 % p/p, preferiblemente en el intervalo del 92 al 97,5 % p/p, más preferiblemente en el intervalo del 94 al 97 % p/p, incluso más preferiblemente en el intervalo del 95 al 97 % p/p y lo más preferiblemente en el intervalo del 96 al 97 % p/p. Estas realizaciones son útiles, por ejemplo, para bebidas transparentes similares al agua. En algunas otras realizaciones, se prefiere que la composición nutricional líquida contenga una cantidad total de agua en el
25 intervalo del 95 al 96 % p/p.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la beta-lactoglobulina se administra en forma de composición nutricional sólida, preferiblemente como barrita, como copos, como galletas o como bolitas.

- 30 En algunas realizaciones preferidas de la invención, la beta-lactoglobulina se administra en forma de bolitas, polvos, gránulos, cristales o comprimidos.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la BLG se administra en forma de comprimido.

- 35 Se prefiere particularmente que la composición nutricional esté en forma de polvo instantáneo rehidratado.

El término "polvo instantáneo" significa un polvo nutricional que puede convertirse en una composición líquida mediante la adición de un líquido tal como agua.

- 40 En algunas realizaciones preferidas de la invención, la BLG está en forma de cristales de BLG. Los cristales de BLG se convierten en una composición líquida mediante la adición de un líquido tal como agua.

- 45 En algunas realizaciones preferidas de la invención, la beta-lactoglobulina está presente en una cantidad de al menos el 1,0 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional.

- En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la beta-lactoglobulina está presente en una cantidad de al menos el 5,0 % p/p con respecto al peso de la composición, más preferiblemente al menos el 10,0 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente al menos el 20,0 % p/p con respecto al peso de la composición.

- 50 En otras realizaciones preferidas de la presente invención, la beta-lactoglobulina está presente en una cantidad del 1,0 al 45 % p/p con respecto al peso de la composición, más preferiblemente del 2,0 al 35 % p/p, incluso más preferiblemente del 3,0 al 32 % p/p, incluso más preferiblemente del 4,0 al 30 % p/p y lo más preferido del 5,0 al 25 % p/p con respecto al peso de la composición.

- 55 En algunas realizaciones de la invención, es ventajoso que la beta-lactoglobulina esté presente en la composición nutricional en una cantidad del 2,0 al 15,0 % p/p con respecto al peso de la composición.

- 60 Por tanto, en algunas realizaciones de la invención, la beta-lactoglobulina está presente lo más preferiblemente en la composición nutricional en una cantidad del 2,0 al 15 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente en una cantidad total de BLG del 3,0 al 12 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente en una cantidad total de BLG del 5,0 al 10 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente en una cantidad total de BLG del 6,0 al 8,0 % p/p con respecto al peso de la composición.

- 65 En algunas otras realizaciones de la invención, es ventajoso que el contenido de beta-lactoglobulina de la composición nutricional sea alto, tal como del 10,0 al 45,0 % p/p con respecto al peso de la composición.

Por tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, la beta-lactoglobulina está presente lo más preferiblemente en una cantidad del 10,0 al 40,0 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente en una cantidad total de BLG del 12,0 al 35 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente en
 5 una cantidad total de BLG del 15 al 30 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente en una cantidad total de BLG del 20 al 25 % p/p con respecto al peso de la composición.

En otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que la beta-lactoglobulina esté presente en la composición nutricional en una cantidad del 5,0 al 45,0 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional, preferiblemente del 6,0 al 35 % p/p, más preferiblemente del 7,0 al 34 % p/p, incluso más preferido del 8,0 al 32 % p/p y lo más preferido del 10 al 30 % p/p.
 10

En otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que la beta-lactoglobulina esté presente en una gran cantidad del 21 al 35 % p/p, por tanto la beta-lactoglobulina está presente preferiblemente en una cantidad del 21 al 35 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional, preferiblemente en una cantidad total de BLG del 25 al 35 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional, más preferiblemente en una cantidad total de BLG del 28 al 35 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional e incluso más preferiblemente en una cantidad total de BLG del 30 al 35 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional.
 15

En otras realizaciones preferidas de la presente invención, la beta-lactoglobulina está presente en la composición nutricional en una cantidad del 5,0 al 45 % p/p con respecto al peso de la composición, más preferiblemente del 5,0 al 35 % p/p, incluso más preferiblemente del 5,0 al 34 % p/p y lo más preferido del 5,0 al 32 % p/p.
 20

En el contexto de la presente invención, el término "seco" o "secado" significa que la composición o el producto en cuestión comprende como máximo el 10 % p/p de agua, preferiblemente como máximo el 6 % p/p y más preferiblemente incluso menos.
 25

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la composición nutricional comprende una cantidad total de proteína de al menos el 1,0 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional y en la que al menos el 75 % p/p de la proteína es beta-lactoglobulina.
 30

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la composición nutricional comprende BLG en una cantidad de al menos el 80 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 85 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 88 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 90 % p/p con respecto a la proteína total, incluso más preferiblemente al menos el 91 % p/p con respecto a la proteína total y lo más preferiblemente al menos el 92 % p/p con respecto a la proteína total de la proteína es BLG.
 35

Preferiblemente, al menos el 80 % p/p, más preferiblemente al menos el 85 % p/p, más preferiblemente al menos el 88 % p/p de la proteína es BLG, más preferiblemente al menos el 90 % p/p, incluso más preferiblemente al menos el 91 % p/p y lo más preferiblemente al menos el 92 % p/p de la proteína es BLG.
 40

Son tanto viables como deseables cantidades relativas de BLG incluso mayores; por tanto, en algunas realizaciones preferidas de la invención, al menos el 94 % p/p de la proteína es BLG, más preferiblemente al menos el 96 % p/p de la proteína es BLG, incluso más preferiblemente al menos el 98 % p/p de la proteína es BLG y lo más preferiblemente aproximadamente el 100 % p/p de la proteína es BLG.
 45

Por ejemplo, la composición nutricional comprende preferiblemente BLG en una cantidad de al menos el 97,5 % p/p con respecto a la proteína total, preferiblemente al menos el 98,0 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 98,5 % p/p con respecto a la proteína total, incluso más preferiblemente al menos el 99,0 % con respecto a la proteína total y lo más preferiblemente BLG en una cantidad de al menos el 99,5 % p/p con respecto a la proteína total, tal como aproximadamente el 100,0 % p/p con respecto a la proteína total.
 50

Por ejemplo, la composición nutricional comprende preferiblemente BLG en una cantidad del 88,0 al 100 % p/p con respecto a la proteína total, preferiblemente del 90,0 al 99,5 % p/p, más preferiblemente del 95,0 al 99,0 % p/p, incluso más preferiblemente del 96,0 al 98,0 % p/p y lo más preferiblemente BLG en una cantidad del 97,0 al 99,0 % p/p con respecto a la proteína total.
 55

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la composición nutricional comprende una cantidad total de proteína de al menos el 1,0 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente al menos el 5,0 % p/p con respecto al peso de la composición, más preferiblemente al menos el 10,0 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente al menos el 20,0 % p/p con respecto al peso de la composición.
 60

En otras realizaciones preferidas de la presente invención, la composición nutricional comprende una cantidad total de proteína del 1,0 al 45 % p/p con respecto al peso de la composición, más preferiblemente del 2,0 al 35 % p/p, incluso más preferiblemente del 3,0 al 32 % p/p, incluso más preferiblemente del 4,0 al 30 % p/p y lo más
 65

preferido del 5,0 al 25 % p/p.

En algunas realizaciones de la invención, es ventajoso que la composición nutricional tenga un contenido de proteína del 2,0 al 15,0 % p/p con respecto al peso de la composición.

5

Por tanto, en algunas realizaciones de la invención, la composición nutricional comprende preferiblemente una cantidad total de proteína del 2,0 al 15 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente una cantidad total de proteína del 3,0 al 12 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente una cantidad total de proteína del 5,0 al 10 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente una cantidad total de proteína del 6,0 al 8,0 % p/p con respecto al peso de la composición.

10

En algunas realizaciones de la invención, es ventajoso que el contenido de proteína de la composición nutricional sea alto, tal como del 10,0 al 45,0 % p/p con respecto al peso de la composición.

15

Altas concentraciones de proteína tales como del 10,0 al 45,0 % p/p son particularmente relevantes cuando la composición se administra como una precomida.

Por tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, la composición nutricional comprende preferiblemente una cantidad total de proteína del 10,0 al 40,0 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente una cantidad total de proteína del 12,0 al 35 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente una cantidad total de proteína del 15 al 30 % p/p con respecto al peso de la composición, preferiblemente una cantidad total de proteína del 20 al 25 % p/p con respecto al peso de la composición.

20

En otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que el contenido de proteína de la composición nutricional sea del 5,0 al 45,0 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional, preferiblemente del 6,0 al 35 % p/p, más preferiblemente del 7,0 al 34 % p/p, incluso más preferido del 8,0 al 32 % p/p y lo más preferido del 10 al 30 % p/p.

25

En otras realizaciones preferidas de la invención, la composición nutricional comprende preferiblemente una cantidad total de proteína del 21 al 35 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional, preferiblemente una cantidad total de proteína del 25 al 35 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional, más preferiblemente una cantidad total de proteína del 28 al 35 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional, e incluso más preferiblemente una cantidad total de proteína del 30 al 35 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional.

30

35

En otras realizaciones preferidas de la presente invención, la composición nutricional comprende una cantidad total de proteína del 5,0 al 45 % p/p con respecto al peso de la composición, más preferiblemente del 5,0 al 35 % p/p, incluso más preferiblemente del 5,0 al 34 % p/p y lo más preferido del 5,0 al 32 % p/p.

40

En realizaciones aún más preferidas de la presente invención, la composición nutricional, por ejemplo, en forma de polvo, gránulos, cristales, bolitas o comprimidos, comprende una cantidad total de proteína del 46 al 100 % p/p con respecto al peso de la composición, más preferiblemente del 50 al 99 % p/p, incluso más preferiblemente del 60 al 95 % p/p, incluso más preferiblemente del 60 al 92 % p/p y lo más preferido del 70 al 90 % p/p.

45

En algunas realizaciones de la presente invención, la composición nutricional tiene un pH en el intervalo de 3,0 a 4,7.

En algunas realizaciones de la presente invención, la composición nutricional tiene un pH en el intervalo de 3,0 a 4,3. Los inventores han hallado que este intervalo de pH se prefiere particularmente para la producción de composiciones líquidas transparentes que tienen baja viscosidad y sabor mejorado.

50

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la composición nutricional tiene un pH en el intervalo de 3,1 a 4,6, o preferiblemente de 3,2 a 4,4, o preferiblemente de 3,4 a 4,2, más preferiblemente de 3,5 a 4,0, e incluso más preferiblemente de 3,5 a 3,9.

55

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la composición nutricional tiene un pH en el intervalo de 4,1 a 4,7. Este intervalo de pH es particularmente relevante para la producción de composiciones estables que tienen un aspecto lechoso y alta turbidez al tiempo que todavía tienen una baja viscosidad.

60

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la composición nutricional tiene un pH en el intervalo de 6,5 a 8,0. Lo más preferiblemente, el pH empleado es un pH de 6,5 a 7,5 o un pH de 6,8 a 7,2.

La composición nutricional tiene preferiblemente un pH en el intervalo de 5,5 a 6,2, alternativamente la composición nutricional tiene un pH en el intervalo de 6,2 a 8,0.

65

Se halló que la composición nutricional de la invención era preferiblemente clara y transparente y que tenía una

baja viscosidad a un pH en el intervalo de 6,2 a 8,0, preferiblemente a un pH de 6,3 a 7,6, más preferiblemente a un pH de 6,5 a 7,2.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la composición nutricional está al menos pasteurizada.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la composición nutricional está esterilizada y, por tanto, es estéril.

En el contexto de la presente invención, el término “estéril” significa que la composición o el producto estéril en cuestión no contiene ningún microorganismo viable y, por tanto, carece de crecimiento microbiano durante el almacenamiento a temperatura ambiente. Una composición que se ha esterilizado es estéril.

Cuando un líquido, tal como una composición nutricional, se esteriliza y se envasa asépticamente en un recipiente estéril, normalmente tiene una vida útil en almacenamiento de al menos seis meses a temperatura ambiente. El tratamiento de esterilización destruye las esporas y los microorganismos que podrían provocar el deterioro del líquido.

Los términos “consiste esencialmente en” y “que consiste esencialmente en” significan que la reivindicación o característica en cuestión abarca los materiales o las etapas especificados y aquellos que no afectan materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) de la invención reivindicada.

En el contexto de la presente invención, la expresión “Y y/o X” significa “Y” o “X” o “Y y X”. En la misma línea de lógica, la expresión “ $n_1, n_2, \dots, n_{i-1}$ y/o n_i ” significa “ n_1 ” o “ n_2 ” o ... o “ n_{i-1} ” o “ n_i ” o cualquier combinación de los componentes: $n_1, n_2, \dots, n_{i-1}$ y n_i .

En el contexto de la presente invención, el porcentaje en peso (% p/p) de un componente de una composición, un producto o un material determinada significa el porcentaje en peso de ese componente con respecto al peso de la composición, el producto o el material específico, a menos que se mencione específicamente otra referencia (por ejemplo, sólidos totales o proteína total).

En el contexto de la presente invención, el término “razón en peso” entre el componente X y el componente Y significa el valor obtenido mediante el cálculo de m_x/m_y , donde m_x es la cantidad (peso) de componentes X y m_y es la cantidad (peso) de componentes Y.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra al sujeto en una dosis de toma de al menos 0,01 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente al menos 0,03 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente al menos 0,05 g de proteína/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente al menos 0,06 g de proteína/kg de peso corporal, lo más preferiblemente al menos 0,07 g de proteína/kg de peso corporal.

En otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administre al sujeto en una dosis de toma de 0,01 a 0,60 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente en una dosis de toma de 0,02 a 0,50 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente en una dosis de toma de 0,03 a 0,40 g de proteína/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente en una dosis de toma de 0,05 a 0,35 g de proteína/kg de peso corporal, lo más preferiblemente en una dosis de toma de 0,07 a 0,30 g de proteína/kg de peso corporal.

En otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administre al sujeto en una dosis de toma de 0,10 a 0,60 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente en una dosis de toma de 0,20 a 0,55 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente en una dosis de toma de 0,25 a 0,45 g de proteína/kg de peso corporal.

Estas dosis de toma proporcionarán a un sujeto una cantidad suficiente de beta-lactoglobulina para tratar y/o prevenir un trastorno metabólico y/o la atrofia muscular.

Estas dosis de toma también son particularmente relevantes para tratar y/o prevenir un síndrome metabólico, la obesidad y/o la dislipidemia.

Estas dosis de toma también son particularmente relevantes para tratar y/o prevenir la sarcopenia, la caquexia, la desnutrición, la inmovilidad y/o la actividad física reducida.

Estas dosis proporcionarán a un sujeto una cantidad suficiente de beta-lactoglobulina para tratar y/o prevenir la diabetes o prediabetes.

Bajas dosis de toma de BLG son ventajosas cuando es importante mantener bajo el contenido calórico. La administración de bajas dosis de beta-lactoglobulina de la presente invención también se prefiere para pacientes

que padecen enfermedades renales o que de otro modo tienen una función renal reducida, ya que las altas dosis de proteína pueden reducir adicionalmente la función renal a lo largo del tiempo.

5 Por tanto, en otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administre al sujeto en una dosis de toma de 0,01 a 0,15 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente en una dosis de toma de 0,02 a 0,12 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente en una dosis de toma de 0,03 a 0,10 g de proteína/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente en una dosis de toma de 0,05 a 0,09 g de proteína/kg de peso corporal.

10 En otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administre al sujeto en una dosis de toma de 0,10 a 0,60 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente en una dosis de toma de 0,12 a 0,50 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente en una dosis de toma de 0,15 a 0,45 g de proteína/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente en una dosis de toma de 0,30 a 0,40 g de proteína/kg de peso corporal.

15 Para el cálculo de la dosis de toma o dosis diaria se usa un peso corporal promedio de 70 kg, el sujeto puede ser un hombre o una mujer.

20 En otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administre al sujeto en una dosis de toma de 0,7 g a 40 g de proteína, preferiblemente en una dosis de toma de 1 a 30 g de proteína, más preferiblemente en una dosis de toma de 3 a 25 g de proteína, incluso más preferiblemente en una dosis de toma de 4 a 22 g de proteína, lo más preferiblemente en una dosis de toma de 5 a 20 g de proteína.

25 En algunas realizaciones preferidas de la invención, a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra a un sujeto en una dosis diaria de al menos 0,03 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente al menos 0,09 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente al menos 0,15 g de proteína/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente al menos 0,18 g de proteína/kg de peso corporal, lo más preferiblemente al menos 0,20 g de proteína/kg de peso corporal.

30 En otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administre al sujeto en una dosis diaria de 0,03 a 1,8 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente en una dosis diaria de 0,05 a 1,6 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente en una dosis diaria de 0,09 a 1,2 g de proteína/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente en una dosis diaria de 0,10 a 1,0 g de proteína/kg de peso corporal, lo más preferiblemente en una dosis diaria de 0,20 a 0,90 g de proteína/kg de peso corporal.

40 Estas dosis diarias proporcionarán a un sujeto una cantidad suficiente de beta-lactoglobulina para tratar y/o prevenir un trastorno metabólico y/o la atrofia muscular.

Los inventores han hallado que estas dosis diarias son relevantes para proporcionar a un sujeto una cantidad suficiente de beta-lactoglobulina para tratar y/o prevenir la sarcopenia y/o la caquexia.

45 En otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administre al sujeto en una dosis diaria de 0,03 a 0,70 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente en una dosis diaria de 0,05 a 0,60 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente en una dosis diaria de 0,09 a 0,50 g de proteína/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente en una dosis diaria de 0,1 a 0,4 g de proteína/kg de peso corporal, lo más preferiblemente en una dosis diaria de 0,20 a 0,30 g de proteína/kg de peso corporal.

50 En otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administre al sujeto en una dosis diaria de 0,50 a 2 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente en una dosis diaria de 1,0 a 1,8 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente en una dosis diaria de 1,2 a 1,6 g de proteína/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente en una dosis diaria de 1,3 a 1,5 g de proteína/kg de peso corporal, lo más preferiblemente en una dosis diaria de 1,2 a 1,4 g de proteína/kg de peso corporal.

60 En otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administre al sujeto en una dosis diaria de 2 g a 120 g de proteína, preferiblemente en una dosis diaria de 5 a 100 g de proteína, más preferiblemente en una dosis diaria de 10 a 90 g de proteína, incluso más preferiblemente en una dosis diaria de 12 a 80 g de proteína, lo más preferiblemente en una dosis diaria de 15 a 60 g de proteína.

65 En otras realizaciones preferidas de la invención, es ventajoso que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administre al sujeto en una dosis diaria de 0,30 a 1,80 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente en una dosis de toma de 0,60 a 1,65 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente en

una dosis de toma de 0,75 a 1,35 g de proteína/kg de peso corporal.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra como una precomida.

5

En el contexto de la presente invención, una "precomida" se define como una pequeña comida consumida 0-90 minutos antes de la comida real.

10

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la precomida puede incluso consistir esencialmente en proteína y agua.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la precomida se administra múltiples veces al día, preferiblemente tres veces al día.

15

En otras realizaciones preferidas de la presente invención, la precomida se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra 0-60 minutos antes de una comida, más preferido 0-40 minutos antes de una comida, incluso más preferido 0-30 minutos antes de una comida.

20

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra 15-60 minutos antes de una comida, más preferiblemente 20-40 minutos antes de una comida, incluso más preferiblemente 25-35 minutos antes de una comida.

25

En algunas realizaciones preferidas de la invención, a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra 0-90 minutos antes de una comida, preferiblemente 5-70 minutos antes de una comida, más preferiblemente 10-50 minutos antes de una comida, incluso más preferiblemente 20-30 minutos antes de una comida.

30

En una realización preferida de la presente invención, a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra 0-60 minutos antes de una comida, incluso más preferido 0-30 minutos antes de una comida. En otras realizaciones preferidas de la presente invención, la beta-lactoglobulina se administra 2-30 minutos antes de una comida, más preferiblemente 5-30 minutos antes de una comida, incluso más preferiblemente 10-30 minutos antes de una comida.

35

En otras realizaciones de la presente invención, a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra 30-90 minutos antes de una comida, preferiblemente 35-70 minutos antes de una comida, más preferiblemente 40-50 minutos antes de una comida.

40

En otras realizaciones de la presente invención, a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra al menos 5 minutos antes de una comida, preferiblemente al menos 10 minutos antes de una comida, más preferiblemente al menos 20 minutos antes de una comida, incluso más preferiblemente al menos 40 minutos antes de una comida.

45

En una realización preferida de la invención, a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra como parte o al final de una comida.

Una comida típica comprende el 25-40 % de E de grasa, el 45-60 % de E de hidratos de carbono y el 10-20 % de E de proteína.

50

En una realización preferida de la invención, una comida comprende menos del 30 % de E de grasa, el 20-75 % de E de hidratos de carbono y el 25-50 % de E de proteína.

En otra realización preferida de la invención, la comida comprende el 20-25 % de E de proteína

55

En algunas realizaciones preferidas de la invención, a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra en combinación con un medicamento adicional.

En una realización preferida de la invención, el medicamento adicional tiene un efecto antigluicémico.

60

En una realización de la invención, el medicamento adicional se selecciona del grupo que consiste en: sulfoniltiurea, inhibidores de SglT2, metformina, insulina, inhibidores de DPP4, análogos de GLP-1 y combinaciones de los mismos.

65

En realizaciones preferidas de la invención, el medicamento adicional es sulfoniltiurea.

En algunas otras realizaciones preferidas de la presente invención, el medicamento adicional se selecciona de uno o más de: estatinas, fibratos, resinas de intercambio aniónico, derivados de niacina y ezetimiba.

5 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el medicamento adicional se selecciona de uno o más de orlistat y/o Saxenda. Saxenda es un análogo de GLP-1.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el medicamento adicional es sulfoniltiurea.

10 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la administración de a) BLG o b) la composición nutricional es mediante administración oral.

15 En el contexto de la presente invención, el término "administración oral" o "administrado por vía oral" se refiere a una vía de administración en la que una sustancia se ingiere a través de la boca. También comprende la administración enteral, que se define como un modo de proporcionar una sustancia a través de un tubo colocado en la nariz, el estómago o el intestino delgado, también conocida como alimentación por sonda.

20 En algunas realizaciones preferidas de la invención, se mantiene la conformación nativa de la BLG. La conformación nativa de las proteínas se mantiene preferiblemente evitando tratamientos térmicos que dan como resultado cambios irreversibles en la conformación de la proteína de al menos BLG, y preferiblemente de todas las proteínas.

El grado de proteínas en estado nativo depende de varios factores incluyendo la concentración de proteína, el pH, la temperatura y el tiempo de tratamiento térmico.

25 En algunas realizaciones preferidas de la invención, la beta-lactoglobulina tiene un grado de desnaturalización de proteínas de como máximo el 10 %.

30 Preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de como máximo el 8 %, más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de como máximo el 5 %, incluso más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de como máximo el 3 %, incluso más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de como máximo el 1 % y lo más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de como máximo el 0,5 %.

35 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el grado de desnaturalización de proteínas es del 0,5 al 10 %, incluso más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas del 1 al 8 %, incluso más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas del 1 al 5 % y lo más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas del 0,5 al 3 %.

40 Cuando la BLG se ha sometido, por ejemplo, a un tratamiento térmico a alta temperatura u otro medio de desnaturalización, aumenta el grado de desnaturalización de proteínas.

45 En algunas realizaciones de la invención, el grado de desnaturalización de proteínas es de más del 10 %, más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de más del 20 %, preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de más del 30 %, preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de más del 40 %, o preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de más del 50 %, o preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de más del 60 %, o preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de más del 70 %, o preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de más del 80 %, o preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas de más del 90 %, o preferiblemente más del 95 %, o preferiblemente más del 99 %.

50 En una realización preferida de la invención, la beta-lactoglobulina tiene un grado de desnaturalización de proteínas de más del 10 %.

55 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el grado de desnaturalización de proteínas es del 10 al 99 %, incluso más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas del 20 al 90 %, incluso más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas del 25 al 90 % e incluso más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas del 30 al 90 % e incluso más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas del 50 al 95 % y lo más preferiblemente un grado de desnaturalización de proteínas del 60 al 99 %.

60 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la composición nutricional puede incluso consistir esencialmente en proteína. En algunas realizaciones preferidas de la invención, la proteína es BLG.

65 Los presentes inventores han hallado que puede ser ventajoso añadir componentes adicionales a la composición nutricional.

En algunas realizaciones de la invención, la composición nutricional comprende además al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vitaminas, agentes aromatizantes, minerales, edulcorantes, antioxidantes, ácidos alimentarios, lípidos, hidratos de carbono, prebióticos, probióticos, leche entera y proteína que no es de lactosuero, o una combinación de los mismos.

5

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la composición nutricional comprende además un agente aromatizante. En otras realizaciones preferidas de la presente invención, la composición nutricional comprende BLG, un agente aromatizante y agua. En otras realizaciones preferidas de la presente invención, la composición nutricional comprende además un edulcorante. En algunas realizaciones preferidas de la presente

10

invención, la composición nutricional comprende además un agente aromatizante y un edulcorante.

En otras realizaciones preferidas de la presente invención, la composición nutricional comprende además fibras solubles.

15

En el concepto de la presente invención, el término “fibra soluble”, “fibras alimentarias” o “polisacáridos no digeribles” se refiere a fibras solubles tales como agar, alginatos, carubina, pectina, por ejemplo, pectinas de frutas y verduras, por ejemplo, de cítricos y manzanas, y sus derivados, betaglucano, tal como betaglucano de avena, carragenanos, en particular carragenanos kappa, lambda y iota, furcellarano, inulina, arabinogalactano, celulosa y sus derivados, escleroglucano, psilio, tal como cáscara de semillas de psilio, mucilagos y gomas, por

20

ejemplo, gomas vegetales habitualmente disponibles y más particularmente goma konjac, goma xantana, goma guar (goma guaran), goma garrofin, goma de tara, goma tragacanto, goma arábica, goma karaya, goma ghatti, goma gellan y otras gomas esterculia relacionadas, alfalfa, trébol, fenogreco, harina de tamarindo. Pueden usarse fibras solubles nativa y modificadas, por ejemplo, hidrolizadas.

25

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la composición nutricional contiene uno o más ácidos alimentarios seleccionado del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido acético, ácido benzoico, ácido butírico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido ascórbico, ácido adipico, ácido fosfórico y mezclas de los mismos.

30

En una realización de la presente invención, la composición nutricional comprende además un aroma seleccionado del grupo que consiste en sal, aromatizantes, potenciadores del aroma y/o especias. En una realización preferida de la invención, el aroma comprende aroma a chocolate, limón, naranja, lima, fresa, plátano, frutos del bosque o combinaciones de los mismos. La elección del aroma puede depender de la composición nutricional que va a producirse.

35

Si se usa, la cantidad total de aroma está normalmente en el intervalo del 0,01 al 2 % p/p. Por ejemplo, la cantidad total de aroma puede estar en el intervalo del 0,03 al 1,5 % p/p. Alternativamente, la cantidad total de aroma puede estar en el intervalo del 0,05 al 1,2 % p/p.

40

En algunas realizaciones de la invención, la composición nutricional comprende además al menos un edulcorante de alta intensidad. En una realización, el al menos un edulcorante de alta intensidad se selecciona del grupo que consiste en aspartamo, ciclamato, sucralosa, sal de acesulfamo, neotamo, sacarina, extracto de estevia, un glicósido de esteviol tal como, por ejemplo, rebaudiósido A, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones de la invención, se prefiere particularmente que el edulcorante comprenda o incluso

45

consista en uno o más edulcorantes de alta intensidad (HIS).

Los HIS se encuentran entre edulcorantes tanto naturales como artificiales y normalmente tienen una intensidad de edulcoración de al menos 10 veces la de la sacarosa. Si se usa, la cantidad total de HIS está normalmente en el intervalo del 0,01 al 2 % p/p. Por ejemplo, la cantidad total de HIS puede estar en el intervalo del 0,05 al 1,5 % p/p. Alternativamente, la cantidad total de HIS puede estar en el intervalo del 0,1 al 1,0 % p/p.

50

La elección del edulcorante puede depender de la composición que va a producirse, por ejemplo, pueden usarse edulcorantes de azúcar de alta intensidad (por ejemplo, aspartamo, acesulfamo de K o sucralosa) en composiciones en las que no se desea aporte energético a partir del edulcorante, mientras que para composiciones que tienen un perfil natural pueden usarse edulcorantes naturales (por ejemplo, glicósidos de esteviol, sorbitol o sacarosa).

55

Además, puede preferirse que el edulcorante comprenda o incluso consista en uno o más edulcorantes de poliol. Ejemplos no limitativos de edulcorantes de poliol útiles son maltitol, manitol, lactitol, sorbitol, inositol, xilitol, treitol, galactitol o combinaciones de los mismos. Si se usa, la cantidad total de edulcorante de poliol está normalmente en el intervalo del 1 al 20 % p/p. Por ejemplo, la cantidad total de edulcorante de poliol puede estar en el intervalo del 2 al 15 % p/p. Alternativamente, la cantidad total de edulcorante de poliol puede estar en el intervalo del 4 al 10 % p/p.

60

65

En algunas realizaciones de la invención, la composición nutricional comprende además leche, preferiblemente leche entera. La leche procede preferiblemente de leche de mamífero, y preferiblemente de leche de rumiante tal

como, por ejemplo, leche de vaca, oveja, cabra, búfala, camella, llama, yegua y/o cierva. Se prefiere particularmente la leche bovina.

5 La composición nutricional de la presente invención puede comprender otros macronutrientes distintos de proteínas. En algunas realizaciones preferidas de la invención, la composición nutricional comprende además hidratos de carbono.

10 En una realización a modo de ejemplo, la al menos una fuente de hidratos de carbono se selecciona del grupo que consiste en: sacarosa, maltodextrina, sólidos de jarabe de maíz, sucrosa, maltosa, sucromaltosa, polvo de maltitol, glicerina, polímeros de glucosa, jarabe de maíz, almidones modificados, almidones resistentes, hidratos de carbono derivados del arroz, isomaltulosa, azúcar blanco, glucosa, fructosa, lactosa, jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, miel, alcoholes de azúcares, fructooligosacáridos, fibra de soja, fibra de maíz, goma guar, harina de konjac, polidextrosa, Fibersol y combinaciones de los mismos.

15 En algunas realizaciones preferidas de la invención, la composición nutricional comprende polímeros de azúcares, es decir, oligosacáridos y/o polisacáridos.

20 En algunas realizaciones preferidas, la composición nutricional comprende además hidratos de carbono en un intervalo de entre el 0 y el 95 % del contenido energético total de la composición, preferiblemente en un intervalo de entre el 10 y el 85 % del contenido energético total de la composición, preferiblemente en un intervalo de entre el 20 y el 75 % del contenido energético total de la composición o preferiblemente en un intervalo de entre el 30 y el 60 % del contenido energético total de la composición.

25 A menudo se prefiere un contenido de hidratos de carbono incluso menor; por tanto, en algunas realizaciones preferidas de la invención, el contenido de hidratos de carbono de la composición nutricional está preferiblemente en un intervalo de entre el 0 y el 30 % del contenido energético total de la composición, más preferiblemente en un intervalo de entre el 0 y el 20 % del contenido energético total de la composición, incluso más preferiblemente en un intervalo de entre el 0 y el 10 % del contenido energético total de la composición.

30 En algunas realizaciones preferidas de la invención, el contenido de hidratos de carbono de la composición nutricional es de como máximo el 5 % del contenido energético total de la composición, más preferiblemente como máximo el 1 % del contenido energético total de la composición e incluso más preferiblemente como máximo el 0,1 % del contenido energético total de la composición.

35 En una realización de la invención, la composición nutricional comprende una pluralidad de vitaminas. En una realización a modo de ejemplo, la composición nutricional comprende al menos diez vitaminas. En una realización a modo de ejemplo, la composición nutricional comprende una pluralidad de vitaminas seleccionadas del grupo que consiste en: vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B7, vitamina B9, vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina K, riboflavina, ácido pantoténico, vitamina E, 40 tiamina, niacina, ácido fólico, biotina y combinaciones de los mismos.

En una realización de la invención, la composición nutricional comprende una pluralidad de vitaminas y una pluralidad de minerales.

45 La composición nutricional de la presente invención puede comprender otros macronutrientes distintos de proteínas. En algunas realizaciones de la invención, la composición nutricional comprende además lípidos. El contenido total de lípidos en la composición nutricional de la invención depende del uso previsto de la composición nutricional.

50 En algunas realizaciones preferidas de la invención, la composición nutricional tiene un contenido de lípidos de entre el 0 y el 60 % del contenido energético total de la composición, o preferiblemente en un intervalo de entre el 0 y el 50 % del contenido energético total de la composición, o preferiblemente en un intervalo de entre el 0 y el 45 % del contenido energético total de la composición, o preferiblemente en un intervalo de entre el 0 y el 30 % del contenido energético total de la composición, o preferiblemente en un intervalo de entre el 0 y el 20 % del contenido energético total de la composición, o preferiblemente en un intervalo de entre el 0 y el 10 % del contenido energético total de la composición, o preferiblemente en un intervalo de entre el 0 y el 5 % del contenido energético total de la composición.

60 La cantidad de lípido se determina según la norma ISO 1211:2010 (Determinación del contenido de grasa . Método gravimétrico de Röse-Gottlieb).

65 En algunas realizaciones preferidas de la invención, el contenido de lípidos de la composición nutricional es de como máximo el 3 % del contenido energético total de la composición, más preferiblemente como máximo el 1 % del contenido energético total de la composición e incluso más preferiblemente como máximo el 0,1 % del contenido energético total de la composición.

En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la composición comprende una cantidad total de lípido de como máximo el 10 % de E, preferiblemente como máximo el 1 % de E.

5 En el contexto de la presente invención, los términos "lípido", "grasa" y "aceite", tal como se usan en el presente documento a menos que se especifique lo contrario, se usan indistintamente para referirse a materiales lipídicos derivados o procesados a partir de plantas o animales. Estos términos también incluyen materiales lipídicos sintéticos siempre que tales materiales sintéticos sean adecuados para el consumo humano.

10 En el contexto de la presente invención, el término "contenido energético" significa el contenido total de energía contenido en un producto alimenticio. El contenido energético puede medirse en kiloJulios (kJ) o kilocalorías (kcal) y se denomina calorías por cantidad de producto alimenticio, por ejemplo, kcal por 100 gramos del producto alimenticio. Un ejemplo es una composición que tienen un contenido energético de 350 kcal/100 gramos de la composición.

15 El contenido energético total de un producto alimenticio o una composición nutricional incluye el aporte energético de todos los macronutrientes presentes en el producto alimenticio, por ejemplo, energía de proteína, lípido e hidrato de carbono. La distribución de energía de los macronutrientes en el producto alimenticio puede calcularse basándose en la cantidad de los macronutrientes en el producto alimenticio y el aporte de los macronutrientes al contenido energético total del producto alimenticio. La distribución de energía puede indicarse
20 como porcentaje de energía (% de E) del contenido energético total del producto alimenticio. Por ejemplo, para una composición que comprende el 20 % de E de proteína, el 50 % de E de hidrato de carbono y el 30 % de E de lípido, esto significa que el 20 % de la energía total proviene de proteína, el 50 % de la energía total proviene de hidrato de carbono y el 30 % de la energía total proviene de grasa (lípido).

25 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, cuando la composición nutricional se administra como una comida, se prefiere particularmente que la composición nutricional sea un complemento nutricional nutricionalmente completo y que comprenda preferiblemente una cantidad total de lípido de menos del 30 % de E, preferiblemente en el intervalo del 20 al 50 % del contenido energético total, preferiblemente en un intervalo de entre el 30 y el 40 % de E.

30 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el complemento nutricional nutricionalmente completo comprende, por ejemplo, una cantidad total de lípido en el intervalo del 20 al 60 % del contenido energético total, preferiblemente en un intervalo de entre el 30 y el 50 % de E.

35 En una realización preferida de la invención, el complemento nutricional nutricionalmente completo comprende menos del 30 % de E de lípido, el 20-75 % de E de hidratos de carbono y el 25-50 % de E de proteína.

En otra realización preferida de la invención, el complemento nutricional nutricionalmente completo comprende menos del 30 % de E de lípido, el 45-80 % de E de hidratos de carbono y el 20-25 % de E de proteína

40 En una realización preferida de la presente invención, a) la beta-lactoglobulina o b) una composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos el 75 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 85 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 90 % p/p con respecto a la proteína total, en una cantidad terapéuticamente eficaz, para su uso en la prevención y/o el
45 tratamiento de la atrofia muscular, en la que la atrofia muscular es sarcopenia y/o caquexia y en la que el uso implica aumentar el nivel de insulina, y opcionalmente también de glucagón, en la sangre del sujeto.

En una realización preferida de la presente invención, a) la beta-lactoglobulina o b) una composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos el 75 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 85 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 90 % p/p con respecto a la proteína total, en una cantidad terapéuticamente eficaz, para su uso en la prevención y/o el
50 tratamiento de la atrofia muscular, en la que la atrofia muscular es sarcopenia y/o caquexia, desnutrición y en la que el uso implica aumentar el nivel de insulina, y opcionalmente también de glucagón, en la sangre del sujeto y en la que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra como una precomida,
55 preferiblemente 0-60 minutos antes de una comida, incluso más preferido 0-30 minutos antes de una comida.

En una realización preferida de la presente invención, a) la beta-lactoglobulina o b) una composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos el 75 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 85 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 90 %
60 p/p con respecto a la proteína total, en una cantidad terapéuticamente eficaz, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la atrofia muscular, en la que la atrofia muscular es sarcopenia y/o caquexia y en la que el uso implica aumentar el nivel de insulina, y opcionalmente también de glucagón, en la sangre del sujeto y en la que la BLG se administra como una composición nutricional en forma de precomida en una dosis diaria de 0,09-1,2 g de proteína/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente en una dosis diaria de 0,10-1,0 g de proteína/kg de
65 peso corporal, lo más preferiblemente en una dosis diaria de 0,20-0,90 g de proteína/kg de peso corporal.

En una realización preferida de la presente invención, a) la beta-lactoglobulina o b) una composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos el 75 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 85 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 90 % p/p con respecto a la proteína total, en una cantidad terapéuticamente eficaz, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la atrofia muscular, en la que el uso implica aumentar el nivel de insulina, y opcionalmente también de glucagón, en la sangre del sujeto y en la que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra como una precomida, preferiblemente 0-60 minutos antes de una comida, incluso más preferido 0-30 minutos antes de una comida.

En una realización preferida de la presente invención, a) la beta-lactoglobulina o b) una composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos el 75 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 85 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 90 % p/p con respecto a la proteína total, en una cantidad terapéuticamente eficaz, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la caquexia y en la que el uso implica aumentar el nivel de insulina, y opcionalmente también de glucagón, en la sangre del sujeto y en la que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra como una precomida, preferiblemente 0-60 minutos antes de una comida, incluso más preferido 0-30 minutos antes de una comida.

En una realización preferida de la presente invención, a) la beta-lactoglobulina o b) una composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos el 75 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 85 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 90 % p/p con respecto a la proteína total, en una cantidad terapéuticamente eficaz, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la atrofia muscular, en la que la atrofia muscular es sarcopenia y/o caquexia y en la que el uso implica aumentar el nivel de insulina, y opcionalmente también de glucagón, GIP y/o GLP-1, en la sangre del sujeto.

Debe observarse que las realizaciones y características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también se aplican a los demás aspectos de la invención.

La invención se describirá ahora en mayor detalle en los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1.1: determinación del grado de desnaturalización de proteínas de una composición de proteína de lactosuero

Se sabe que la proteína de lactosuero desnaturalizada tiene una menor solubilidad a pH 4,6 que a valores de pH inferiores o superiores a pH 4,6; por tanto, se determina el grado de desnaturalización de una composición de proteína de lactosuero midiendo la cantidad de proteína soluble a pH 4,6 con respecto a la cantidad total de proteína a un pH en el que las proteínas en la disolución son estables.

Más específicamente para las proteínas de lactosuero, la composición de proteína de lactosuero que va a analizarse (por ejemplo, un polvo o una disolución acuosa) se convierte en:

- una primera disolución acuosa que contiene el 5,0 % (p/p) de proteína total y que tiene un pH de 7,0 ó 3,0, y
- una segunda disolución acuosa que contiene el 5,0 % (p/p) de proteína total y que tiene un pH de 4,6.

Se realizan ajustes de pH usando NaOH (ac.) al 3 % (p/p) o HCl (ac.) al 5 % (p/p).

El contenido de proteína total ($P_{pH\ 7,0\ \text{ó}\ 3,0}$) de la primera disolución acuosa se determina según el ejemplo 1.3.

La segunda disolución acuosa se almacena durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se centrifuga a 3000 g durante 5 minutos. Se recupera una muestra del sobrenadante y se analiza según el ejemplo 1.3 para proporcionar la concentración de proteína en el sobrenadante ($S_{pH\ 4,6}$).

El grado de desnaturalización de proteínas, D, de la composición de proteína de lactosuero se calcula como:

$$D = ((P_{pH\ 7,0\ \text{ó}\ 3,0} - S_{pH\ 4,6})/P_{pH\ 7,0\ \text{ó}\ 3,0}) * 100 \%$$

Ejemplo 1.2 determinación de la desnaturalización de proteínas (con precipitación con ácido a pH 4,6) usando análisis de uplc de fase inversa.

Se diluyeron muestras de BLG hasta el 2 % en agua MQ. Se mezclan 5 ml de disolución de proteína, 10 ml de Milli-Q, 4 ml de ácido acético al 10 % y 6 ml de NaOAc 1,0 M y se agitan durante 20 minutos para permitir la aglomeración por precipitación de la proteína desnaturalizada a aproximadamente pH 4,6. Se filtra la disolución a

través de un filtro de 0,22 µm para retirar los aglomerados y las proteínas no nativas.

Todas las muestras se sometieron al mismo grado de dilución mediante la adición de agua depurada.

- 5 Para cada muestra, se cargó el mismo volumen en un sistema de UPLC con una columna de UPLC (Protein BEH C4; 300 Å; 1,7 µm; 150 × 2,1 mm) y se detectó a 214 nm.

Las muestras se desarrollaron usando las siguientes condiciones:

- 10 Tampón A: agua Milli-Q, TFA al 0,1 % p/p

Tampón B: acetonitrilo de calidad para HPLC, TFA al 0,1 % p/p

Flujo: 0,4 ml/min

- 15 Gradiente: 0-6,00 minutos 24-45 % de B; 6,00-6,50 minutos 45-90 % de B; 6,50-7,00 minutos 90 % de B; 7,00-7,50 minutos 90-24 % de B y 7,50-10,00 minutos 24 % de B.

- 20 Se usó el área de los picos de BLG frente a un patrón de proteína (Sigma L0130) para determinar la concentración de BLG nativa en las muestras (curva de calibración de 5 niveles).

Las muestras se diluyeron adicionalmente y volvieron a inyectarse si se encontraban fuera del intervalo lineal.

Ejemplo 1.3: determinación de la proteína total

- 25 El contenido de proteína total (proteína verdadera) de una muestra se determina mediante:

- 30 1) Determinar el nitrógeno total de la muestra siguiendo la norma ISO 8968-1/2|IDF 020-1/2 - Leche - Determinación del contenido de nitrógeno - Parte 1/2: Determinación del contenido de nitrógeno usando el método de Kjeldahl.

2) Determinar el nitrógeno no proteico de la muestra siguiendo la norma ISO 8968-4|IDF 020-4 - Leche - Determinación del contenido de nitrógeno - Parte 4: Determinación del contenido de nitrógeno no proteico.

- 35 3) Calcular la cantidad de proteína total como $(m_{\text{nitrógeno total}} - m_{\text{nitrógeno no proteico}}) \cdot 6,38$.

Ejemplo 1.4: determinación de blg, ala y cmp no agregados

- 40 Se analizó el contenido de alfa-lactoalbúmina (ALA), beta-lactoglobulina (BLG) y caseinomacropéptido (CMP) no agregados, respectivamente, mediante análisis de HPLC a 0,4 ml/min. Se inyectan 25 µl de muestra filtrada en 2 columnas TSKgel3000PWxl (7,8 mm × 30 cm, Tosohass, Japón) conectadas en serie con una precolumna PWxl (6 mm × 4 cm, Tosohass, Japón) unida equilibrada en el eluyente (que consiste en 465 g de agua Milli-Q, 417,3 g de acetonitrilo y 1 ml de ácido trifluoroacético) y usando un detector UV a 210 nm.

- 45 La determinación cuantitativa del contenido de alfa-lactoalbúmina (C_{alfa}), beta-lactoglobulina (C_{beta}) y caseinomacropéptido (C_{CMP}) nativos se realizó comparando las áreas de pico obtenidas para las proteínas patrón correspondientes con las de las muestras.

- 50 La cantidad total de proteína adicional (distinta de proteína BLG) se determinó restando la cantidad de BLG de la cantidad de proteína total (determinada según el ejemplo 1.3).

Ejemplo 1.5: determinación del contenido de cenizas

- 55 El contenido de cenizas de un producto alimenticio se determina según la norma NMKL 173:2005 "Ceniza, determinación gravimétrica en alimentos".

Ejemplo 1.6: determinación de los sólidos totales de una disolución

- 60 Los sólidos totales de una disolución pueden determinarse según la norma NMKL 110 2ª edición, 2005 (Sólidos totales (agua) - Determinación gravimétrica en leche y productos de la leche). NMKL es una abreviatura de "Nordisk Metodikkomité for Naeringsmidler" (Comité Nórdico para el Análisis de Alimentos).

El contenido de agua de la disolución puede calcularse como el 100 % menos la cantidad relativa de sólidos totales (% p/p).

- 65 Ejemplo 1.7: determinación del ph

Todos los valores de pH se miden usando un electrodo de vidrio de pH y se normalizan a 25 °C.

El electrodo de vidrio de pH (que tiene compensación de temperatura) se enjuaga cuidadosamente antes y se calibra antes de su uso.

Cuando la muestra está en forma líquida, entonces el pH se mide directamente en la disolución líquida a 25 °C.

Cuando la muestra es un polvo, se disuelven 10 gramos de polvo en 90 ml de agua desmineralizada a temperatura ambiente mientras se agita vigorosamente. Después se mide el pH de la disolución a 25 °C.

Ejemplo 1.8: determinación del contenido de agua de un polvo

El contenido de agua de un producto alimenticio se determina según la norma ISO 5537:2004 (Leche en polvo - Determinación del contenido de humedad (método de referencia)). NMKL es una abreviatura de "Nordisk Metodikkomité for Naeringsmidler" (Comité Nórdico para el Análisis de Alimentos).

Ejemplo 1.9: determinación de la cantidad total de lactosa

La cantidad total de lactosa se determina según la norma ISO 5765-2:2002 (IDF 79-2: 2002) "Leche en polvo, mezclas heladas en polvo y queso procesado - Determinación del contenido de lactosa - Parte 2: Método enzimático que utiliza el resto galactosa de la lactosa".

Ejemplo 1.10: determinación de la cantidad total de hidratos de carbono

La cantidad de hidratos de carbono en una bebida se determina mediante el uso del kit de ensayo de hidratos de carbono totales de Sigma Aldrich (n.º de cat. MAK104-1KT) en el que los hidratos de carbono se hidrolizan y se convierten en furfural e hidroxifurfurales que se convierten en un cromógeno que se monitoriza espectrofotométricamente a 490 nm.

Ejemplo 1.11: determinación de la cantidad total de lípidos

La cantidad de lípido se determina según la norma ISO 1211:2010 (Determinación del contenido de grasa - Método gravimétrico de Röse-Gottlieb).

Ejemplo 1.12: determinación de brix

Las mediciones de Brix se llevaron a cabo usando un refractómetro manual digital PAL- α (Atago) calibrado frente a agua depurada (agua filtrada mediante ósmosis inversa para obtener una conductividad de como máximo 0,05 mS/cm).

Se transfirieron aproximadamente 500 μ l de muestra a la superficie prismática del instrumento y se inició la medición. Se leyó y registró el valor medido.

El Brix de una disolución de proteína de lactosuero es proporcional al contenido de sólidos totales (TS) y TS (% p/p) es aproximadamente $\text{Brix} \times 0,85$.

Ejemplo 1.13: determinación de glucosa en plasma

Las concentraciones de glucosa en plasma se midieron usando un instrumento de laboratorio de glucosa destinado para su uso en aplicaciones de medicina deportiva y atención clínica. Para este estudio se usó el instrumento YSI 2300 modelo Stat Plus (Bie & Berntsen).

Las concentraciones de glucosa en plasma se analizaron inmediatamente después del muestreo, mientras que las muestras para las mediciones de insulina, GIP, GLP-1 y glucagón se congelaron inmediatamente después del muestreo y se mantuvieron a -80 °C hasta completarse el estudio. Después de eso, las muestras se analizaron por lotes.

Ejemplo 1.14: determinación de insulina en suero

Las concentraciones de insulina en suero se analizaron usando ELISA (ELISA de insulina de Mercodia, Suecia).

Ejemplo 1.15: determinación de glucagón en plasma

Las concentraciones de glucagón en plasma se analizaron mediante radioinmunoensayo (kit de radioinmunoensayo de glucagón (RIA) de EMD Millipore, Alemania).

Ejemplo 1.16: determinación de glp-1 y gip

Se extrajo sangre para determinar GLP-1 y GIP totales en tubos refrigerados que contenían EDTA (7,4 mmol/litro) y se mantuvieron a -80 °C hasta su análisis.

Las concentraciones de GLP-1 se determinaron con radioinmunoensayo (RIA) usando un antisuero dirigido de manera C-terminal (n.º de código 89390) para GLP-1 total (Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. Diabetes. Abril de 1994;43(4):535-9).

GIP total se analizó usando un antisuero dirigido de manera C-terminal (n.º de código 80867) obtenido en conejos inmunizados con un fragmento C-terminal de GIP [GIP (28-42)] conjugado con hemocianina de lapa californiana a través de su extremo N-terminal (Lindgren O, Carr RD, Deacon CF, *et al.* Incretin hormone and insulin responses to oral versus intravenous lipid administration in humans. J Clin Endocrinol Metab 2011;96:2519-2524).

Ejemplo 1.17: determinación de la concentración de leucina y aminoácidos esenciales totales en plasma

Después de la desproteinización con metanol, se añadieron las alícuotas del sobrenadante a 100 µl de una mezcla de patrones internos (aminoácidos isotópicamente marcados) y se secaron bajo nitrógeno. Después de la derivatización, las muestras se secaron nuevamente con N₂ y se reconstituyeron con fase móvil.

Se inyectaron 10 µl de estas muestras y se separaron durante 25 minutos con una columna C18-HPLC que desarrolla un perfil de gradiente. La medición se realizó con un espectrómetro de masas en tándem en modo ESI. Los aminoácidos se midieron en modo MRM y se cuantificaron usando el patrón interno correspondiente/apropiado y se calibraron frente a materiales de referencia certificados.

Con cada lote, se midieron una serie de materiales de control certificados para garantizar los estándares de calidad. Las concentraciones de aminoácidos totales en plasma se calcularon sumando los valores de los 21 aminoácidos esenciales en la sangre.

Los patrones internos usados son:

Ácido 2-aminobutírico	Glicina (2- ¹³ C, ¹⁵ N)
Alanina	L-Alanina (2,3,3,3-D ₄)
Arginina	L-Arginina : HCl (5- ¹³ C, 4,4,5,5-D ₄)
Asparagina	Glicina (2- ¹³ C, ¹⁵ N)
Ácido aspártico	Ácido L-aspártico (2,3,3-D ₃)
Citrulina	L-Citrulina (5,5-D ₂)
Cistina	L-Valina (D ₈)
Ácido glutámico	Ácido DL-glutámico (2,4,4-D ₃)
Glutamina	Glicina (2- ¹³ C, ¹⁵ N)
Glicina	Glicina (2- ¹³ C, ¹⁵ N)
Histidina	Glicina (2- ¹³ C, ¹⁵ N)
Hidroxiprolina	L-Alanina (2,3,3,3-D ₄)
Isoleucina	L-Leucina (5,5,5-D ₃)
Leucina	L-Leucina (5,5,5-D ₃)
Lisina	Glicina (2- ¹³ C, ¹⁵ N)
Metionina	L-Metionina (metil-D ₃)
Ornitina	L-Ornitina : HCl (5,5-D ₂)
Fenilalanina	L-Fenilalanina (anillo- ¹³ C ₆)
Prolina	L-Alanina (2,3,3,3-D ₄)
Serina	Glicina (2- ¹³ C, ¹⁵ N)
Treonina	Glicina (2- ¹³ C, ¹⁵ N)
Tirosina	L-Tirosina (anillo- ¹³ C ₆)

Valina	L-Valina (D ₆)
--------	----------------------------

Ejemplo 1.18: determinación de la cantidad de blg, ala y cmp

- 5 Este procedimiento es un método de cromatografía de líquidos (HPLC) para el análisis cuantitativo de proteínas tales como ALA, BLG y CMP y opcionalmente también otras especies de proteínas en una composición. A diferencia del método del ejemplo 1.4, el presente método también mide proteínas que están presentes en forma agregada y, por tanto, proporciona una medida de la cantidad total de las especies de proteínas en la composición en cuestión.
- 10 El modo de separación es cromatografía de exclusión molecular (SEC) y el método usada tampón HCl de guanidina 6 M como disolvente de muestra y fase móvil de HPLC. Se usa mercaptoetanol como agente reductor para reducir el disulfuro (S-S) en las proteínas o los agregados de proteína para crear estructuras monoméricas no plegadas.
- 15 La preparación de muestras se logra fácilmente disolviendo 10 mg de equivalente de proteína en la fase móvil. Se colocan en serie dos columnas TSK-GEL G3000SWXL (7,7 mm × 30,0 cm) (columnas GPC) y una precolumna para lograr una separación adecuada de las principales proteínas en las materias primas.
- 20 Los analitos eluidos se detectan y cuantifican mediante detección UV (280 nm).

Equipos/materiales:

- 25 1. Bomba 515 de HPLC con lavado manual de sellos (Waters)
2. Módulo II de controlador de bomba de HPLC (Waters)
3. Inyector automático 717 (Waters)
- 30 4. Detector de absorbancia dual 2487 (Waters)
5. Software informático capaz de generar informes cuantitativos (Empower 3, Waters)
6. Columna analítica: Dos TSK-GEL G3000SWXL (7,8 × 300 mm, n.º de pieza: 08541).
- 35 Precolumna: precolumna TSK- SWxL (6,0 × 40 mm, n.º de pieza: 08543).
7. Baño ultrasónico (Branson 5200)
- 40 8. Filtro de jeringa de 25 mm con membrana de acetato de celulosa de 0,2 µm (514-0060, VWR)

Procedimiento:

Fase móvil:

- 45 A. Disolución tampón madre.
1. Pesar 56,6 g de Na₂HPO₄, 3,5 g de NaH₂PO₄, y 2,9 g de EDTA en un vaso de precipitados de 1000 ml. Disolver en 800 ml de agua.
- 50 2. Medir el pH y ajustar a 7,5 ± 0,1, si es necesario, con HCl (disminuir el pH) o NaOH (aumentar el pH).
3. Transferir a un matraz aforado de 1000 ml y diluir hasta el volumen con agua.
- 55 B. Fase móvil de HCl de guanidina 6 M.
1. Pesar 1146 g de HCl de guanidina en un vaso de precipitados de 2000 ml y añadir 200 ml de la disolución tampón madre (A).
- 60 2. Diluir esta disolución hasta aproximadamente 1600 ml con agua mientras se mezcla con una barra de agitación magnética (50 °C).
3. Ajustar el pH a 7,5 ± 0,1 con NaOH.

4. Transferir a un matraz aforado de 2000 ml y diluir hasta el volumen con agua.

5. Filtrar usando el aparato de filtración de disolvente con el filtro de membrana de 0,22 µm.

5 Patrones de calibración

Los patrones de calibración de cada proteína que va a cuantificarse se preparan de la siguiente manera:

10 1. Pesar con precisión (hasta 0,01 mg) aproximadamente 25 mg del patrón de referencia de proteína en un matraz aforado de 10 ml y disolver en 10 ml de agua.

Esta es la disolución patrón madre de proteína (S1) de la proteína.

15 2. Pipetear 200 µl de S1 en un matraz aforado de 20 ml y diluir hasta el volumen con fase móvil.

Esta es la disolución patrón de trabajo de baja concentración WS1.

3. Pipetear 500 µl de S1 en un matraz aforado de 10 ml y diluir hasta el volumen con fase móvil.

20 Esta es la disolución patrón WS2.

4. Pipetear 500 µl de S1 en un matraz aforado de 5 ml y diluir hasta el volumen con fase móvil.

25 Esta es la disolución patrón WS3.

5. Pipetear 750 µl de S1 en un matraz aforado de 5 ml y diluir hasta el volumen con fase móvil.

Esta es la disolución patrón WS4.

30 6. Pipetear 1,0 ml de S1 en un matraz aforado de 5 ml y diluir hasta el volumen con fase móvil.

Esta es la disolución patrón de trabajo de alta concentración WS5.

35 7. Usar pipetas desechables graduadas para transferir 1,5 ml de WS1-5 a viales independientes.

Añadir 10 µl de 2-mercaptoetanol a cada vial y tapar. Agitar con vórtice las disoluciones durante 10 s.

Dejar reposar los patrones a temperatura ambiental durante aproximadamente 1 h.

40 8. Filtrar los patrones usando filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,22 µm.

La pureza de proteína se mide usando Kjeldahl ($N \times 6,38$) y el % de área de la disolución patrón WS5 usando HPLC.

45
$$\text{proteína (mg)} = \text{"peso de patrón de proteína" (mg)} \times P1 \times P2$$

$P1 = \% \text{ de } P \text{ (Kjeldahl)}$

$P2 = \% \text{ de área de proteína (HPLC)}$

50

Preparación de muestras

1. Pesar el equivalente de 25 mg de proteína de la muestra original en un matraz aforado de 25 ml.

55 2. Añadir aproximadamente 20 ml de fase móvil y dejar que la muestra se disuelva durante aproximadamente 30 min.

3. Añadir fase móvil hasta el volumen y añadir 167 µl de 2-mercaptoetanol a la disolución de muestra de 25 ml.

60 4. Someter a sonicación durante aproximadamente 30 min y, después de eso, dejar reposar la muestra a temperatura ambiental durante aproximadamente 1½ horas.

5. Mezclar la disolución y filtrar usando filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,22 µm.

65

Sistema/columnas de HPLC

Equilibrado de columnas

1. Conectar en serie la precolumna GPC y las dos columnas analíticas GPC.

Las columnas nuevas generalmente se envían en un tampón sal de fosfato.

2. Hacer circular agua a través de una columna nueva gradualmente desde 0,1 hasta 0,5 ml/min en de 30 a 60 min.

Continuar el lavado durante aproximadamente 1 hora.

3. Disminuir gradualmente la velocidad de flujo desde 0,5 ml/min hasta 0,1 ml/min y reemplazar con fase móvil en el depósito.

4. Aumentar gradualmente la velocidad de flujo de la bomba desde 0,1 hasta 0,5 ml/min en de 30 a 60 min para evitar un choque de presión y dejar a 0,5 ml/min.

5. Inyectar diez muestras para permitir que la columna se sature y esperar a que eluyan los picos.

Esto ayudará en el acondicionamiento de la columna.

Esta etapa se realiza sin la necesidad de esperar a que se complete cada inyección antes de inyectar la siguiente.

6. Equilibrar con la fase móvil durante al menos 1 hora.

Cálculo de los resultados

La determinación cuantitativa del contenido de las proteínas que van a cuantificarse, por ejemplo, alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina y caseinomacropéptido, se realiza comparando las áreas de pico obtenidas para las proteínas patrón correspondientes con las de las muestras. Los resultados se notifican como g de proteína específica/100 g de la muestra original o como porcentaje en peso de la proteína específica con respecto al peso de la muestra original.

Ejemplo 2: preparación de composiciones nutricionales genéricas que comprenden proteína de lactosuero

Polvos secos de proteína de aislado de BLG que contienen ≥ 85 % de BLG en base a proteínas se dispersan en hasta aproximadamente el 95 % del agua desmineralizada requerida para alcanzar una concentración de proteína final deseada.

Se producen polvos de aislado de BLG ácidos tal como se expone en el ejemplo 2 del documento PCT/EP2019/067015, mientras que se producen polvos de aislado de BLG a pH 5,5 tal como se expone en el ejemplo 7 del documento WO2018115520 (A1) (PCT/EP2017/084553).

Tal como se describe en el documento WO2018115520 (A1) (PCT/EP2017/084553), la disolución del material de BLG puede verse favorecida mediante la adición de ácido, base o sal (seleccionados entre uno o más ácidos, bases o sales de calidad alimentaria, tales como ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido málico o sales en sus formas disueltas o en polvo). Si se reduce el pH durante la disolución mediante la adición de ácido, el pH preferiblemente no debe superar el pH objetivo deseado (es decir, evitar la valoración innecesaria con ácido y/o base).

Opcionalmente, también pueden añadirse minerales, edulcorantes, aromas, estabilizadores, emulsionantes u otros componentes, incluyendo fuentes de grasas e hidratos de carbono. El procedimiento empleado comprende las siguientes etapas:

◦ En el caso de que se incluya grasa, entonces calentar en primer lugar aceite hasta 70 °C en un baño de agua.

◦ Mezclar con emulsionante (normalmente hasta el 0,2 % p/p en la receta final); por ejemplo, el emulsionante Grindsted Citrem LR10 que es un éster del ácido cítrico, recomendado para aplicaciones libres de fosfatos. Dejar enfriar hasta 60 °C (para evitar/reducir la posible desnaturalización/agregación cuando se mezcla con proteína).

◦ Mezcla lentamente con agua precalentada (60 °C).

◦ Añadir todos los componentes en polvo en forma premezclada (para evitar "ojos de pez"); esto incluye el mezclado previo de hidratos de carbono y proteína.

5 ◦ Opcionalmente añadir minerales (NaCl, KCl, CaCl₂ y MgCl₂) para lograr las concentraciones deseadas de Na, K, Ca y Mg. Los minerales se disolvieron en agua desmineralizada y se añadieron hasta alcanzar las concentraciones deseadas de Na, K, Ca y Mg. Otros minerales de calidad alimentaria pueden usarse y añadirse adicionalmente en forma disuelta o en polvo.

◦ Ajustar el pH si es necesario hasta un pH final usando hasta el 10 % de ácido fosfórico (u otro ácido de calidad alimentaria) o hasta el 10 % de NaOH.

10 ◦ Añadir el agua restante hasta alcanzar la concentración de proteína deseada y opcionalmente homogeneizar la composición ("homogenización previa").

◦ Opcionalmente someter la composición a tratamiento térmico.

15 ◦ Opcionalmente homogeneizar ("homogenización posterior").

Las muestras se almacenaron a 20 °C en un entorno oscuro.

Ejemplo 3: preparación de bebidas isocalóricas e isonitrogenadas

20 Para someter a prueba los efectos insulíntrópicos de diferentes proteínas de la leche, se prepararon tres bebidas diferentes que comprendían, respectivamente, al menos el 85 % de beta-lactoglobulina (BLG) de proteína total, caseína (CAS) y proteína de lactosuero (WHE).

25 El procedimiento empleado comprende las siguientes etapas:

- Mezclar todos los componentes secos.

- Añadir agua a un recipiente adecuado (preferiblemente un agitador con un alambre en espiral).

30 - Añadir el polvo al agua.

- Agitar/mezclar hasta homogeneidad (aproximadamente 15-30 segundos).

35 La composición de las tres muestras se muestra en las tablas 1 y 2 a continuación.

Para la muestra de BLG se usó un polvo de cristal de BLG a pH 5,5. Comprende el 98,6 % de BLG de proteína total y tiene un contenido de agua de 3,43. Tiene un grado de desnaturalización de proteínas del 0,84 % (medido según el ejemplo 1.1).

40 El polvo de cristal de BLG a pH 5,5 se produce tal como se expone en el ejemplo 7 del documento WO2018115520 (A1) (PCT/EP2017/084553).

45 A modo de comparación, el aislado de proteína de lactosuero (Lacprodan DI-9224, Arla Foods Ingredients) o el caseinato (caseinato de Na, Miprodan 30, Arla Foods Ingredients) reemplaza al producto con el 98,6 % de BLG en la preparación de muestras de referencia mientras se mantienen las etapas restantes.

50 El aislado de proteína de lactosuero (WPI) comprende varias proteínas y péptidos diferentes, incluyendo beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina, albúmina sérica, inmunoglobulinas, lactoferrina, proteosa peptona 3, osteopontina, glicomacropéptido, lactoperoxidasa, lisozima, catepsina D, fosfatasa ácida, ribonucleasas.

Tabla 1. Composición de tres batidos de bebidas isocalóricas e isonitrogenadas; BLG, CAS y WHE.

	BLG (% en peso)	Cas (caseína) (% en peso)	WHE (WPI) (% en peso)
PSNU30200, % de polvo de cristal de BLG a pH 5,4	10,7	0	0
% de caseinato de Na (Miprodan 30, Arla Foods Ingredients)	0	11	0
% de WPI-1 (Lacprodan DI-9224, Arla Foods Ingredients)	0	0	11,3
% de acesulfamo de K Sunett	0,13	0,13	0,13
% de aroma a naranja (polvo) SC649946 IFF	0,08	0,08	0,08

% de WMP (polvo de leche entera Arla 26%)	0,2	0	0
% de agua del grifo	88,9	88,8	88,5
% del total	100		
Materia seca total (%)	11,1	11,2	11,5

Tabla 2. Composición de tres bebidas (batidos) isocalóricas e isonitrogenadas: BLG, CAS y WHE.

	BLG	Cas (caseína)	WHE (WPI)
% en peso de proteína	10,1	10,1	10,1
% en peso de grasa	0,05	0,09	0,23
% en peso de hidratos de carbono	0,14	0,08	0,08
% en peso de sólidos totales	10,6	10,6	10,8
% en peso de lactosa	0,08	0,03	0,02
% en peso de calcio	0,01	0,02	0,01
Energía en kJ/100 g	175,9	176,0	180,7
Energía en kcal/100 g	41,4	41,4	42,6

- 5 Ejemplo 4: investigación de los efectos insulíntrópicos de beta-lactoglobulina, caseína y lactosuero tras endotoxemia

Métodos

- 10 Participantes:

Los participantes idóneos para el estudio fueron hombres, sanos y sin ingesta regular de medicamentos, tenían un índice de masa corporal (IMC) de entre 20 y 30 kg·m⁻², tenían entre 20 y 40 años. Los participantes se sometieron a un análisis de sangre de cribado, una electrocardiografía, una entrevista médica y un examen físico antes del estudio. Los participantes no tuvieron fiebre al menos siete días antes de cada estudio. Se les solicitó que no realizaran ejercicio 48 horas antes del estudio, comieran una comida normal la noche anterior al estudio (que comprendía el 10-20 % de proteína, como máximo el 30 % de grasa, el 50-60 % de hidratos de carbono) y después ayunaran desde las 22:00 h.

- 20 Diseño del estudio:

El estudio usó un diseño con doble enmascaramiento, aleatorizado y cruzado que incluía 10 participantes varones sanos y delgados. A los participantes se les investigó en tres ocasiones diferentes con 6-8 semanas de diferencia.

25

Para imitar las condiciones patológicas se usó un modelo inflamatorio catabólico validado. El modelo comprendía inflamación usando 1 ng de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*/kg de peso corporal seguido de 36 horas de ayuno y reposo en cama. De este modo, el modelo combina dos modelos catabólicos, es decir, "Amino acid supplementation is anabolic during the acute phase of endotoxin-induced inflammation: A human randomized crossover trial", Rittig N, Bach E, Thomsen HH, Johannsen M, Jørgensen JO, Richelsen B, Jessen N, Møller N. Clin Nutr. Abril de 2016;35(2):322-330. doi: 10.1016/j.clnu.2015.03.021. Publicación electrónica del 9 de abril de 2015. PMID: 25896101 y "Anabolic effects of leucine-rich whey protein, carbohydrate, and soy protein with and without beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) during fasting-induced catabolism: A human randomized crossover trial", Rittig *et al.*, Clin Nutr. Junio de 2017;36(3):697-705. doi: 10.1016/j.clnu.2016.05.004. Publicación electrónica del 25 de mayo de 2016.

35

El modelo inflamatorio catabólico usado indujo eficazmente resistencia a la insulina, con una disminución en la sensibilidad a la insulina del 41 % en comparación con las condiciones sanas (ayuno durante la noche) usando la metodología de pinza ("clamp") de referencia.

40

En el presente estudio, cada visita consistió en dos días consecutivos (un día previo al estudio y un día de estudio, véase el diagrama de flujo en la figura 1). Los participantes llegaron en taxi después de un ayuno durante la noche antes de la administración intravenosa de LPS, continuaron el ayuno y comenzaron el reposo en cama. Los participantes permanecieron durante la noche en el hospital para garantizar el reposo en cama y el ayuno.

45

El día de estudio se suministraron tres bebidas isocalóricas e isonitrogenadas (0,6 g de proteína/kg de peso

corporal). Las muestras se prepararon tal como se describe en el ejemplo 3. Se suministró un tercio (1/3) como bolo y el resto (2/3) como sorbos cada 20 minutos (véase el diagrama de flujo, figura 1).

Las tres intervenciones diferentes fueron:

1)

"Inflamación + 36 h de ayuno y reposo en cama" + beta-lactoglobulina (BLG)

2)

"Inflamación + 36 h de ayuno y reposo en cama" + caseína (CAS)

3)

"Inflamación + 36 h de ayuno y reposo en cama" + proteínas de lactosuero (WHE)

Los componentes exactos de BLG, CAS y WHE se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Composición de aminoácidos de las tres bebidas isocalóricas e isonitrogenadas.

	BLG (g/100g de proteína)	CAS (g/100g de proteína)	WHE (g/100g de proteína)
Metionina	3,10	2,97	2,55
Cisteína + cistina	2,69	0,40	2,38
Lisina	12,36	8,63	10,99
Treonina	5,34	4,59	8,09
Isoleucina	6,40	5,38	7,23
Leucina	16,05	10,00	12,19
Histidina	1,64	3,00	1,70
Fenilalanina	3,65	5,46	3,25
Tirosina	3,74	5,80	3,09
Valina	6,09	6,96	6,61
Alanina	7,02	3,16	6,16
Arginina	2,71	3,81	2,35
Ácido de asparagina	11,93	7,63	12,19
Ácido de glutamina, total	19,74	23,04	19,77
Glicina	1,37	1,91	1,64
Hidroxiprolina	<0,05	<0,05	<0,05
Ornitina	<0,05	<0,05	<0,05
Prolina	5,11	11,58	6,78
Serina	3,89	6,12	5,33
Triptófano	2,23	1,37	1,93

Durante el día de estudio, se insertó un catéter en la vena dorsal de la mano y se calentó en un paño caliente para imitar la sangre arterializada para la extracción de muestras de sangre.

Aleatorización:

Los participantes se aleatorizaron usando un sistema de aleatorización computarizado por parte del investigador principal.

Lipopolisacárido (LPS):

La inyección intravenosa en bolo de LPS (1 ng/kg de peso corporal) de endotoxina de *E. coli* (endotoxina 10.000 USP, lote HOK354; The United States Pharmacopeia Convention, Inc., Rockville, Maryland) se infundió durante

dos minutos a $t=-24$ horas el día previo al estudio seguido de 10 ml de infusión de solución salina. La inyección de LPS provocó un aumento transitorio de la temperatura axilar ($1,7^{\circ}\text{C}$) y de la frecuencia cardíaca (25 latidos/min) con diversos grados de cefalea, náuseas, escalofríos y dolor muscular y provocó una elevación del péptido C reactivo el día de estudio, que es un marcador de la última fase de inflamación.

5 Análisis de muestras de sangre

Las muestras de sangre se almacenaron a -80°C y después se analizaron en el mismo ensayo después de completarse el estudio para minimizar la variación analítica.

Se midieron la glucosa en plasma (ejemplo 1.13), la insulina en suero (ejemplo 1.14), el glucagón en plasma (ejemplo 1.15), el GIP y el GLP-1 en plasma (ejemplo 1.16), las concentraciones de aminoácidos totales en plasma (ejemplo 1.17) y las concentraciones de leucina en plasma (ejemplo 1.17).

15 Estadística:

Para las figuras y el análisis estadístico, se usaron Sigma Plot 11 (San José, California, EE. UU.) y STATA 13 (College Station, Texas, EE. UU.). Se inspeccionaron gráficos QQ para garantizar una distribución normal de los datos. Si los datos no se distribuían normalmente o mostraban heterogeneidad de la varianza, se realizó una transformación logarítmica. Los datos se presentan como medias $\pm$ eem, medianas (intervalo) o razón de diferencia media/mediana [intervalo de confianza (IC) del 95 %]. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. Para las mediciones con tres o más puntos de datos, se usó la iAUC (área bajo la curva incremental).

25 Resultados

En el estudio se aleatorizaron diez participantes. Se excluyó a un participante por motivos técnicos, dejando un total de 9 participantes incluidos en el estudio y el análisis. El estudio se llevó a cabo entre diciembre de 2017 y octubre de 2018 con una mediana de 54 días (intervalo de 40 a 85 días) entre cada visita. Las características iniciales de los nueve hombres que participaron en el estudio se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Características iniciales.

Características iniciales		
		Mediana (mín. máx.)
Edad	años	25 (22 29)
Altura	cm	182 (170 188)
Peso	kg	81 (69,2 87)
IMC	kg/m ²	24,3 (20,7 28,0)

35 Intervenciones:

Los participantes consumieron un promedio de $48,5 \pm 0,60$ gramos de proteína mezclados con agua del grifo ($\sim 11\%$ de disolución de proteína) en cada visita, sin ninguna diferencia en cuanto a gramos de proteína consumidos entre BLG, CAS y WHE ($p=0,89$). La dosis de intervención fue de 0,6 g de proteína/kg de peso corporal. La composición de las tres proteínas diferentes se muestra en la tabla 3.

Los resultados se presentan en la figura 2 (glucosa), la figura 3 (glucagón en plasma), la figura 4 (insulina en suero), la figura 5 (GIP en plasma), la figura 6 (GLP-1 en plasma), la figura 7 (concentraciones de aminoácidos en plasma) y la figura 8 (concentraciones de leucina en plasma).

45 Concentraciones de glucosa:

Las intervenciones con BLG, CAS o WHE no dieron como resultado diferencias en la iAUC de glucosa en plasma ($p=0,5$) tal como se ilustra en la figura 2.

Los participantes habían estado en ayunas durante 36 horas antes de la intervención con proteínas (BLG, CAS o WHE) y, por tanto, su glucosa en sangre era baja antes de comenzarse la intervención. Además, la intervención consistió únicamente en proteína con apenas hidratos de carbono. Por tanto, no se observó ninguna reducción adicional de la glucosa en sangre debido a la ingesta de BLG en comparación con WHE o CAS en esta población, puesto que un cuerpo sano, sin diabetes, siempre se esfuerza por mantener un nivel normal de glucosa en sangre, y reducir la glucosa en sangre sería "no fisiológico".

Concentraciones de glucagón en plasma:

Se halló que la iAUC de glucagón en plasma era significativamente mayor en WHE en comparación con CAS ($p=0,015$), mientras que no se observó ninguna diferencia entre WHE y BLG ni entre BLG y CAS. Véase la figura 3.

Concentraciones de insulina:

BLG aumentó la iAUC de insulina en suero en comparación con CAS (razón de mediana [IC del 95 %]; 1,62 [1,37 1,87], $p < 0,0001$) y WHE (razón de mediana [IC del 95 %]; 1,30 [1,10 1,51], $p=0,002$) y WHE aumentó la iAUC de insulina más que CAS (razón de mediana [IC del 95 %]; 1,25 [1,06 1,48], $p=0,006$) (figura 4).

Aunque los efectos insulíntrópicos de BLG no cambiaron la glucosa en sangre en participantes sanos que experimentaron condiciones de enfermedad inflamatoria, se espera que el efecto insulíntrópico pueda resultar beneficioso en una población que padece diabetes, puesto que ya se ha demostrado que la manipulación farmacológica de los niveles de GIP, GLP-1 e insulina (por ejemplo, insulina exógena, inhibidores de DDP4 y agonistas de GLP-1) del cuerpo en sujetos diabéticos es eficaz para reducir los niveles de glucosa en sangre.

Concentraciones de polipéptido inhibidor gástrico (GIP):

Las mediciones de GIP se muestran en la figura 5. En el momento del máximo de insulina ($t=210$), los niveles de deltaGIP (delta = GIP(210 min) menos GIP(150 min)) fueron mayores después de BLG en comparación con CAS y WHE (razón de mediana [IC del 95 %]; 1,7 [1,25 2,3], $p=0,001$ y 1,34 [0,99 1,82], $p=0,057$), mientras que no se observó ninguna diferencia entre WHE y CAS (1,27 [0,94 1,72], $p=0,12$).

Concentraciones de péptido similar al glucagón 1 (GLP-1):

Las mediciones de GLP-1 se muestran en la figura 6. DeltaGLP-1 (Delta = GLP-1(210 min) menos GLP-1(150 min)) fue mayor en BLG en comparación con CAS (media $\pm$ eem: $5,07 \pm 0,94$ pmol/l frente a $3,31 \pm 0,56$ pmol/l, $p=0,028$), mientras que no se observó ninguna diferencia entre BLG y WHE ($p=0,16$) ni entre WHE y CAS ($p=0,35$).

GIP en plasma (que se secreta principalmente a partir de células K enteroendocrinas en el intestino delgado proximal) aumentó más después de la ingesta de BLG en comparación con CAS y WHE. Esto podría formar parte de una explicación mecanística para la mayor secreción de insulina. Tanto GIP como GLP-1 estimulan la secreción de insulina a partir de células beta (efecto de incretina).

Del mismo modo, GLP-1 en plasma (que se secreta principalmente a partir de células L enteroendocrinas en sitios más distales del intestino delgado) también aumentó más después de la ingesta de BLG en comparación con CAS, pero no se observó ninguna diferencia entre BLG y WHE.

Debe observarse que el nivel inicial de GLP-1 apareció más disperso entre ensayos (BLG, WHE y CAS) que el de GIP.

Por tanto, podría especularse que la diferencia en la secreción de insulina entre BLG y WHE es más dependiente de la secreción de GIP, potencialmente provocada en las partes proximales del íleo, mientras que péptidos de BLG específicos pueden inducir la secreción de GIP. CAS induce una secreción más pequeña tanto de GIP como de GLP-1 en comparación con BLG.

Concentraciones de aminoácidos:

La concentración de aminoácidos totales en plasma (iAUC) no fue diferente entre grupos ($p=0,12$) (figura 7). La concentración de leucina en plasma fue significativamente mayor después de BLG en comparación con CAS y WHE (razón de mediana [IC del 95 %]; 1,82 [1,50 2,22], $p < 0,0001$ y 1,37 [1,13 1,67], $p=0,002$, respectivamente) y después de WHE en comparación con CAS (razón de mediana [IC del 95 %]; 1,33 [1,10 1,62], $p=0,005$) (figura 8).

Conclusiones:

Se halló sorprendentemente que la ingesta de bebidas con BLG aumenta la concentración de insulina en sangre en un 62 % más en comparación con caseína isocalórica y isonitrogenada y en un 30 % más que lactosuero isocalórico y isonitrogenado en participantes jóvenes, sanos y delgados del estudio tras la exposición a LPS, reposo en cama y ayuno. Sin estar restringidos por la teoría, el efecto insulíntrópico de BLG podría estar mediado a través de los niveles aumentados de GIP del tracto gastrointestinal.

Estudios previos han hallado que tomar una precomida proteica puede modular eficazmente las fluctuaciones de

glucosa después de una comida o una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT). Estos efectos se han atribuido principalmente a la liberación de GIP y GLP-1 y a la posterior liberación de insulina. Por tanto, se cree que la BLG en comparación con proteínas de lactosuero o caseína puede ser especialmente potente y servir como estrategia para aliviar, tratar o impedir la diabetes y las altas concentraciones circulantes de glucosa.

Ejemplo 5: investigación de los efectos insulínótropicos de beta-lactoglobulina y lactosuero en participantes con t2dm

Métodos

Participantes:

Los criterios de inclusión fueron: diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), edad entre 18 y 80 años, IMC entre 20 y 35 kg/m², hemoglobina (Hb)-A1c entre 40 y 69 mmol/l y péptido C entre 370 y 1200 pmol/l. Los participantes fueron reclutados a través de redes sociales (Facebook) y periódicos locales. Los criterios de exclusión fueron: alergias a la leche, ingesta diaria de complementos proteicos, medicamento antiglicémico distinto de metformina o incapacidad para hablar o comprender danés. Los participantes se sometieron a un cribado usando análisis de sangre para determinar HbA1c, parámetros renales y hepáticos, tirotrina, proteína C reactiva, hemoglobina y péptido C antes de la inclusión. Los participantes se alimentaron según las pautas nutricionales danesas (15 % de grasa, 30 % de proteína y 55 % de hidratos de carbono) durante 48 horas antes de los días de estudio y evitaron una actividad física vigorosa. Se interrumpió la metformina durante cinco días antes de y durante el estudio. Ayunaron desde las 22:00 h antes de acudir al laboratorio a la mañana siguiente.

Diseño:

El diseño era un ensayo aleatorizado, con doble enmascaramiento y cruzado con dos ramas de intervención. Los días de estudio incluían las intervenciones y una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT) realizadas en el laboratorio de los presentes inventores y cuatro días de monitorización en el hogar. Las dos intervenciones consistieron en: i) 25 g de BLG y ii) 25 g de aislado de proteína de lactosuero (WPI). El periodo de reposo farmacológico entre los días de estudio en el laboratorio fue de entre una semana y un máximo de seis semanas. Los investigadores y los participantes desconocían las intervenciones.

Para la muestra de BLG se usó un polvo de BLG ácido. Comprende el 98,2 % de BLG de proteína total. Se produce tal como se expone en el ejemplo 2 del documento WO2020/002426. A modo de comparación, el aislado de proteína de lactosuero (Lacprodan® DI-9213, Aria Foods Ingredients) reemplaza al producto con el 98,2 % de BLG en la preparación de una muestra de referencia.

En el laboratorio, los participantes consumieron 25 g o bien de WPI o bien de proteína BLG 30 minutos antes de consumir 75 g de OGTT (75 g de glucosa disuelta en 200 ml de agua). La prueba se realiza para evaluar la capacidad de un participante para eliminar la glucosa de la circulación. El resultado depende de la secreción de insulina y la sensibilidad a la insulina del individuo. Se tomaron muestras de sangre a través de un catéter intravenoso colocado en una vena antecubital y se recogieron a la llegada y consecutivamente las tres horas tras la OGTT. Se recogieron muestras de sangre a los -30, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos tras la OGTT.

Después del día de estudio en el laboratorio, los participantes fueron equipados con un monitor continuo de glucosa (CGM) y un monitor de actividad. Recibieron cuatro desayunos normalizados (50 g de copos de maíz (Vores Cornflakes 500 g), 31 g de pasas (Svansoe Rosiner 1500 g) y 250 ml de leche desnatada (Arla® Skummetmaelk 0,1 % 250 ml) equivalentes a 77,6 g de hidratos de carbono, 13,9 g de proteína, 1 g de grasa/1.593 kJ/375 kcal) y cuatro bolsas de plástico con 25 gramos de la intervención de proteína. Cada participante consumió las precomidas proteicas 30 minutos antes del desayuno y la cena durante dos días (día 2-3) y el control (cantidad isovoluminosa de agua del grifo) 30 minutos antes del desayuno y la cena durante dos días (día 4-5). Se aleatorizó la secuencia de los días 2-3 y 4-5 (figura 9). Evitaron una actividad física vigorosa y se alimentaron del mismo modo durante el experimento en el hogar. Los participantes mantuvieron un diario de alimentos con marcas de hora para las precomidas y las comidas para los análisis de CGM.

Para el plan del estudio, véase la figura 9.

Intervenciones:

Preparación antes de la toma: 1) añadir 200 ml de agua a un recipiente adecuado (preferiblemente un agitador con un alambre en espiral), 2) añadir polvo de proteína al agua (26,7 g de BLG y 28,3 g de WPI) para producir una muestra que comprende 25 g de proteína, 3) agitar hasta homogeneidad (aproximadamente 15-30 segundos). La composición de aminoácidos de BLG y WPI se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: Composición de aminoácidos de los polvos/productos de BLG y WPI.

/100 g de producto	BLG	WPI
Energía total, kcal	375	355
Grasa, g	0,1	0,1
Hidrato de carbono, g	0,1	0,1
Proteína, g	93,5	88,3
Alanina, g	6,58	5,32
Arginina, g	2,63	2,03
Ácido aspártico, g	11,30	10,40
Cisteína, g	2,89	2,30
Ácido glutámico, g	18,80	17,40
Glicina, g	1,28	1,40
Histidina, g	1,55	1,46
Hidroxiprolina, g	<0,05	<0,05
Isoleucina, g	5,91	6,21
Leucina, g	15,00	10,30
Lisina, g	11,50	9,39
Metionina, g	2,62	2,14
Ornitina, g	<0,05	<0,05
Fenilalanina, g	3,32	2,70
Prolina, g	5,05	6,02
Serina, g	3,67	4,65
Treonina, g	4,99	7,07
Triptófano, g	2,06	1,66
Tirosina, g	3,41	2,58
Valina, g	5,68	5,68
Suma, g	108,24	98,71

Aleatorización:

- 5 Los participantes se aleatorizaron usando un sistema de aleatorización computarizado por parte del investigador principal.

Análisis de muestras de sangre

- 10 Las muestras de sangre se almacenaron a -80 °C y después se analizaron en el mismo ensayo después de completarse el estudio para minimizar la variación analítica.

Métodos para analizar: glucosa en plasma: ejemplo 1.13, insulina en suero: ejemplo 1.14, glucagón en plasma: técnica de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando un kit comercial (ELISA de glucagón de Mercodia, Suecia), GIP y GLP-1 en plasma: ejemplo 1.16, aminoácidos en plasma: cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC). Se usó un sistema Ultimate 3000 de Thermo Scientific. En primer lugar, se diluyeron las muestras 1,11x con ácido perclórico (HClO₄) 2 M. Después se centrifugaron a 14.000 G a 4 °C durante 10 minutos. Después se retiró el sobrenadante y se usó un filtro de centrifugación (0,22 µm) para la filtración a 14.000 G durante 1 min. Después se diluyeron las muestras 50x mediante la adición de HClO₄ 0,2 M. Las muestras alcanzaron un factor de dilución final de 55,5. Después se inyectaron las muestras en el dispositivo de HPLC. Se usó una columna Kinetex EVO C18 2,6 µm 4,6×150 mm (Phenomenex) para la separación. La detección fluorométrica se realizó con una excitación a 337 nm y una emisión a 442 nm.

Monitorización continua de glucosa (CGM)

- 25 Se usó un dispositivo de CGM de NordicInfu Care Denmark, Dexcom G6, Dexcom Inc., San Diego, CA, EE.UU. para la recopilación de concentraciones de glucosa en el líquido intersticial (ISF). Se inserta un sensor subcutáneo en la piel del abdomen. El dispositivo se enmascaró de modo que los participantes no fueran

conscientes de su nivel de glucosa. Se usó el software CLARITY (Dexcom Inc., San Diego, CA, EE. UU.) para obtener: glucosa media $\pm$ desviación estándar (DE), nivel máximo diario de glucosa y coeficiente de variación (% de CV).

5 Monitor de actividad

Se usó un dispositivo (Actiheart) que es un acelerómetro y monitor de frecuencia cardíaca (HR) combinado (Actiheart, AH) para recopilar mediciones de actividad y gasto energético durante el periodo de investigación en el hogar. El dispositivo se lleva puesto en el pecho. Se usó el software AH (software Actiheart, versión 5.1.10, camNtech Ltd., Cambridge, Reino Unido) para obtener: gasto energético total, gasto energético por actividad, frecuencia cardíaca (HR), HR máxima y recuentos de actividad.

Estadística:

Para las figuras y los análisis estadísticos, se usaron nlme (versión 3.1-142), Epi (versión 2.37) en R (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria, versión 3.6.2) y SigmaPlot (San José, California, EE. UU., versión 14.0). Si los datos no se distribuían normalmente, los datos se transformaron logarítmicamente (logaritmo natural). Los datos se presentan como medias con intervalos de confianza del 95 % o medianas con intervalos. Las curvas se ajustaron usando modelos de efectos aleatorios con una especificación de spline cúbico natural para el tiempo. Se incluyeron términos de interacción para cada término de tiempo y una variable binaria que codificaba para las dos precomidas. Esto se combinó con matrices de contraste apropiadas para estimar las curvas para ambas precomidas y su diferencia en cualquier punto de tiempo durante el estudio. Dado que los resultados se transformaban logarítmicamente (logaritmo natural) antes de ejecutar los modelos debido a su distribución sesgada, la diferencia entre curvas se proporciona en porcentajes. En los modelos se incluyeron pendientes y ordenadas en el origen aleatorias específicas individuales para representar la dependencia dentro de los datos debido a su naturaleza de medición repetida. Para el análisis de glucosa después del desayuno, se incluyeron mediciones para el análisis si sus puntos de tiempo eran posteriores a la hora registrada para el desayuno y la cena, pero en el plazo de tres horas de la hora registrada para las comidas. Se calculó el área bajo la curva incremental (iAUC) usando el enfoque trapezoidal y se usó una prueba de la t para datos emparejados para comparar cada resultado durante el día en el laboratorio, y se usó ANOVA de medidas repetidas unilateral para comparar mediciones de iAUC de glucosa en el hogar. Se usó un modelo de efectos aleatorios para comparar variables de resumen basadas en CGM entre intervenciones y controles. Los valores de $p < 0,05$ y los intervalos de confianza del 95 % que no contienen cero se consideraron estadísticamente significativos.

35 Resultados

Dieciséis participantes acudieron a ambos días de estudio en el laboratorio. Los días de estudio se realizaron entre enero de 2020 y junio de 2020. Un participante no logró completar la parte en el hogar del estudio y, por tanto, estos análisis se basan en $n = 15$. Las características de los pacientes se muestran en la tabla 6. El periodo de reposo farmacológico fue una mediana de 8,5 días (intervalo de 7-23 días).

Tabla 6. Características iniciales.

Características	$n = 16$
Edad, años	67,5 (40-78)
IMC, kg/m ²	26,95 (21,2-32,9)
Mujeres, %	56,2
Tratamiento con metformina, n	14
HbA1c, mmol/mol	49,5 (43-55)
Péptido C en ayunas, nmol/l	931,5 (499-1155)
Insulina en ayunas, pmol/l	40 (20-94)
Los datos se presentan como medianas (intervalos) o números absolutos	

45 OGTT

La concentración de glucosa en plasma fue mayor después de ~120 minutos tras el consumo de BLG en comparación con WPI con una diferencia máxima de ~10 % 180 minutos después de la OGTT (figura 10). La concentración de insulina en suero aumentó en ~10 % y el glucagón en suero aumentó en ~20 % tras el consumo de BLG en comparación con WPI (figuras 11 y 12). Tanto BLG como WPI aumentaron las concentraciones de GIP en plasma y GLP-1 en plasma (figuras 13 y 14). Las concentraciones de aspartato, glutamato, lisina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina y tirosina en plasma estaban elevadas tras el consumo de BLG en comparación con WPI (figuras 15-22).

Los datos de OGTT muestran que las precomidas con BLG tomadas 30 min antes de una OGTT dan como resultado mayores concentraciones de insulina, glucagón y glucosa en comparación con WPI en pacientes con T2DM. Se esperaba que BLG redujera más la glucosa en individuos con T2DM debido a sus mayores efectos insulíntricos. Sin embargo, dado que sorprendentemente BLG también tiene un mayor efecto glucagóntrópico que WPI, el efecto de reducción de glucosa de BLG en comparación con WPI no es tan alto. La diferencia entre las proteínas en las capacidades para aumentar la insulina y el glucagón podría encontrarse en la composición única de aminoácidos de la BLG. BLG contiene más leucina y fenilalanina, que se ha demostrado que ambas estimulan la secreción de insulina. Del mismo modo, se ha demostrado que la metionina y la tirosina aumentan las concentraciones de glucagón. Estudios en perros y roedores han demostrado que el aspartato, el glutamato, la lisina y la prolina también estimulan la secreción de glucagón. Todos estos aminoácidos mencionados anteriormente estaban más elevados en plasma tras el consumo de BLG en comparación con WPI. No había ninguna diferencia en las concentraciones de GIP (un importante estimulador de glucagón). Por tanto, se considera probable que la diferencia en las concentraciones de insulina y glucagón puede atribuirse a la composición de AA específica de la BLG.

Monitorización continua de glucosa (CGM) - trayectorias de glucosa

Las precomidas tanto con BLG como con WPI redujeron la concentración de glucosa posprandial en líquido intersticial (ISF) tras el desayuno en comparación con CTR/agua. La mayor diferencia fue de ~15 % a aproximadamente los 60 minutos. La glucosa en ISF fue ~8 % menor después de ~150 minutos tras el consumo de WPI en comparación con BLG (figura 23).

Monitorización continua de glucosa (CGM) - estadísticas de resumen

La media de glucosa en ISF fue similar para BLG, WPI y CTR. El % de CV se redujo en un 9,5 % tras el consumo de WPI y en un 15,4 % tras el consumo de BLG en comparación con CTR. La desviación estándar (DE) se redujo en un 9,1 % tras el consumo de WPI y en un 13,1 % tras el consumo de BLG en comparación con CTR. Los niveles máximos de glucosa tras el desayuno fueron un 12,7 % más bajos tras el consumo de WPI y un 11,7 % más bajos tras el consumo de BLG en comparación con CTR. El nivel máximo diario de glucosa fue un 6,9 % más bajo tras el consumo de WPI y un 4,8 % más bajo tras el consumo de BLG en comparación con CTR. No hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre BLG y WPI en ninguna de las variables de resumen de CGM (tabla 2).

Tabla 2. Variables de resumen de CGM

<i>n</i> = 15	Media de glucosa, mmol/l	DE, mmol/l	CV, %
CTR	8,69 (7,86-9,51)	1,97 (1,75-2,18)	22,70 (21,34-24,06)
WPI	8,80 (7,96-9,65)	1,79 (1,55-2,02)	20,55 (18,87-22,22)
BLG	8,85 (8,01-9,70)	1,71 (1,48-1,94)	19,20 (17,53-20,88)
WPI-CTR	0,12 (-0,18-0,42)	-0,18 (-0,34-(-0,02))**	-2,15 (-3,86-(-0,45))*
BLG-CTR	0,17 (-0,13-0,47)	-0,26 (-0,42-(-0,10))**	-3,49 (-5,20-(-1,79))**
WPI-BLG	-0,05 (-0,39-0,29)	0,08 (-0,11-0,26)	1,34 (-0,62-3,31)
<i>n</i> = 15	Máx. tras el desayuno, mmol/l	Máx. diario, mmol/l	Máx. tras la cena, mmol/l
CTR	14,35 (13,06-15,63)	14,54 (13,20-15,87)	10,80 (9,76-11,84)
WPI	12,52 (11,20-13,85)	13,53 (12,15-14,90)	10,88 (9,73-12,03)
BLG	12,67 (11,35-13,99)	13,84 (12,47-15,22)	10,98 (9,82-12,14)
WPI-CTR	-1,82 (-2,38-(-1,27))*	-1,01 (-1,56-(-0,44))**	0,08 (-0,82-0,97)
BLG-CTR	-1,68 (-2,23-(-1,12))**	-0,70 (-1,27-(-0,12))*	0,18 (-0,73-1,09)
WPI-BLG	-0,15 (-0,79-0,49)	-0,32 (-0,98-0,35)	-0,12 (-1,14-0,93)

Los datos se presentan como medias con intervalos de confianza del 95 %. Los parámetros de variabilidad glucémica son el coeficiente de variación (CV) y la desviación estándar (DE). Los datos sobre los niveles de glucosa posprandial son la glucosa máxima (máx.) tras el desayuno y la cena durante las tres horas tras las comidas. CTR, control; WPI, aislado de proteína de lactosuero; BLG, beta-lactoglobulina.

*P <0,05

**P <0,01

La variabilidad glucémica, los niveles máximos de glucosa y las fluctuaciones de glucosa se redujeron todos ellos tras el consumo de ambas precomidas proteicas en comparación con el control/agua, lo que hace que ambas proteínas sean precomidas eficaces para reducir la glucosa en T2DM. En conclusión, puede usarse BLG como una precomida proteica en el tratamiento de T2DM.

Conclusiones:

Las precomidas con BLG elevan las concentraciones de insulina, glucagón y glucosa después de una OGTT en pacientes con T2DM en comparación con WPI. Ambas precomidas proteicas, WPI y BLG, redujeron las trayectorias de glucosa y la variabilidad glucémica en comparación con el agua del grifo.

Se ha demostrado que el glucagón aumenta el gasto energético e inhibe el apetito. En la actualidad están desarrollándose biagonistas de GIP y glucagón y triagonistas de GIP, GLP-1 y glucagón para el tratamiento de la obesidad. BLG aumenta las concentraciones de la totalidad de estas tres hormonas y, por tanto, BLG también puede ser relevante en el tratamiento y/o la prevención de la obesidad.

Se halló que BLG aumenta más las concentraciones de insulina en comparación con WPI. Se sabe que la insulina modula eficazmente las concentraciones de lípidos en el torrente circulatorio, ya que la insulina aumenta la captación de lípidos en los músculos. Por tanto, BLG podría ser eficaz en el tratamiento de la dislipidemia.

El síndrome metabólico se caracteriza por obesidad, dislipidemia y tolerancia a la glucosa reducida. La elevación de las concentraciones de insulina tras el consumo de BLG reduce los niveles de glucosa y lípidos. Tal como se mencionó, se ha demostrado que el glucagón aumenta el gasto energético y, por tanto, se cree que la BLG puede tener efectos positivos sobre el control del peso.

Se ha demostrado que el lactosuero fomenta la síntesis de proteínas musculares, mejora el estado nutricional en pacientes con caquexia y mejora la masa muscular e inhibe la inflamación en pacientes con sarcopenia. Estos efectos se han atribuido al alto contenido de leucina en el lactosuero. BLG tiene un mayor contenido de leucina en comparación con WPI y, además de esto, se ha hallado que la BLG fomenta sorprendentemente una mayor respuesta a la insulina. Por tanto, se cree que la BLG es beneficiosa en pacientes con sarcopenia, caquexia, desnutrición e inmovilización o actividad física reducida.

REIVINDICACIONES

1. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional que comprende beta-lactoglobulina en la que dicha beta-lactoglobulina está presente en una cantidad de al menos el 75 % p/p con respecto a la proteína total, en la que a) o b) se proporciona en una cantidad terapéuticamente eficaz, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la atrofia muscular, en la que el sujeto es un ser humano y en la que el uso implica aumentar el nivel de insulina en la sangre del sujeto y en la que la administración de a) o b) es mediante administración oral.
2. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según la reivindicación 1, en la que la atrofia muscular se selecciona de una o más de:
 - sarcopenia,
 - caquexia.
3. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el uso implica regular el nivel de glucosa, insulina, glucagón, polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y/o péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) en la sangre.
4. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el uso implica aumentar el nivel de polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) en la sangre del sujeto.
5. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el uso implica aumentar el nivel de péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) en la sangre del sujeto.
6. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el uso implica reducir el nivel de glucosa en la sangre del sujeto.
7. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la administración de a) beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional implica aumentar la cantidad de aminoácidos que estimulan la concentración de glucagón y/o insulina en la sangre.
8. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según la reivindicación 7, en la que los aminoácidos son tirosina, metionina, prolina, aspartato, glutamato, lisina, leucina y/o fenilalanina.
9. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el sujeto es uno o más de:
 - un sujeto en riesgo de sarcopenia,
 - un sujeto en riesgo de caquexia.
10. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el sujeto está padeciendo sarcopenia y/o caquexia.
11. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición nutricional comprende beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos el 80 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 85 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 88 % p/p con respecto a la proteína total, más preferiblemente al menos el 90 % p/p con respecto a la proteína total, incluso más preferiblemente al menos el 91 % p/p con respecto a la proteína total y lo más preferiblemente al menos el 92 % p/p con respecto a la proteína total de la proteína es BLG.
12. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición nutricional b) comprende una cantidad total de proteína de al menos el 1,0 % p/p con respecto al peso de la composición nutricional.
13. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra al sujeto en una dosis de toma de al menos 0,01 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente al menos 0,03 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente al menos 0,05 g de proteína/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente al menos 0,06 g de proteína/kg de peso corporal, lo más preferiblemente al menos 0,07 g de proteína/kg de peso corporal.

14. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra al sujeto en una dosis de toma de 0,01 a 0,60 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente en una dosis de toma de 0,02 a 0,50 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente en una dosis de toma de 0,03 a 0,40 g de proteína/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente en una dosis de toma de 0,05 a 0,35 g de proteína/kg de peso corporal, lo más preferiblemente en una dosis de toma de 0,07 a 0,30 g de proteína/kg de peso corporal.
15. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra a un sujeto en una dosis diaria de al menos 0,03 g de proteína/kg de peso corporal, preferiblemente al menos 0,09 g de proteína/kg de peso corporal, más preferiblemente al menos 0,15 g de proteína/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente al menos 0,18 g de proteína/kg de peso corporal, lo más preferiblemente al menos 0,20 g de proteína/kg de peso corporal.
16. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra como una precomida.
17. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra 0-60 minutos antes de una comida, más preferiblemente 20-40 minutos antes de una comida, incluso más preferiblemente 0-30 minutos antes de una comida.
18. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que a) la beta-lactoglobulina tiene un grado de desnaturalización de proteínas de como máximo el 10 %.
19. a) Beta-lactoglobulina o b) composición nutricional para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que a) la beta-lactoglobulina o b) la composición nutricional se administra en combinación con un medicamento adicional.

Figura 1

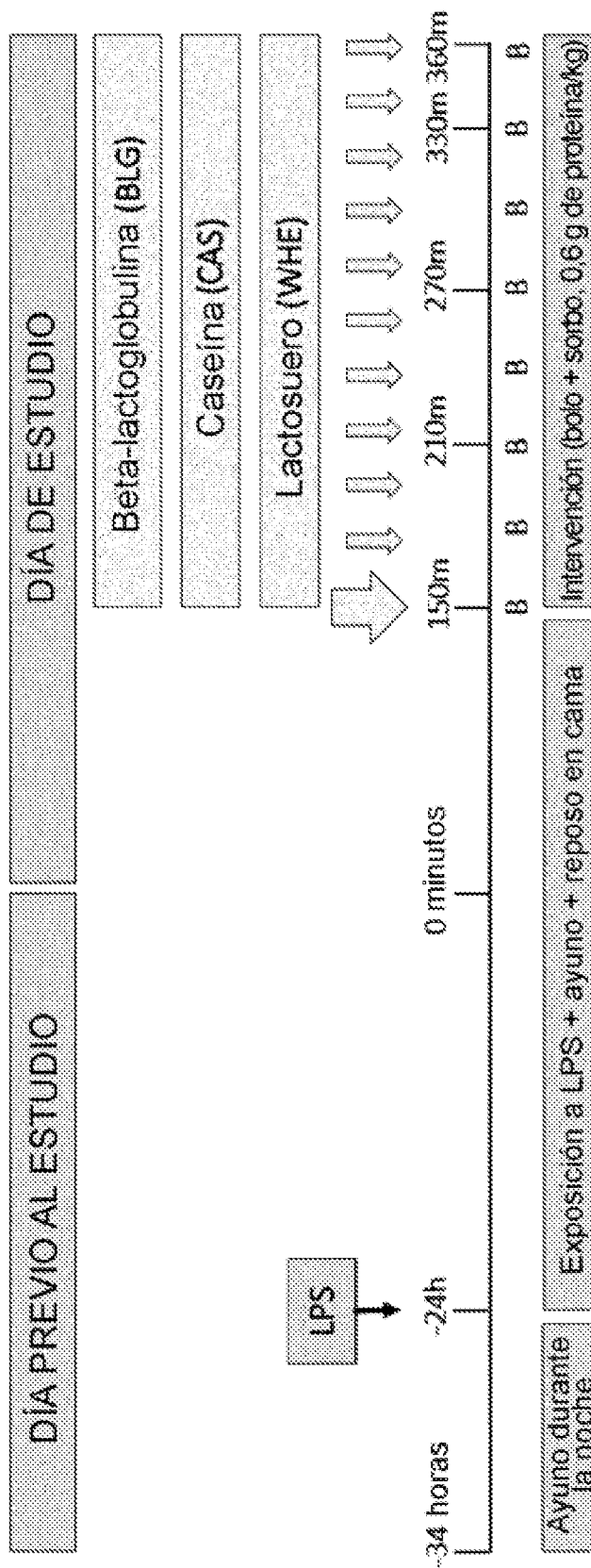


Figura 2

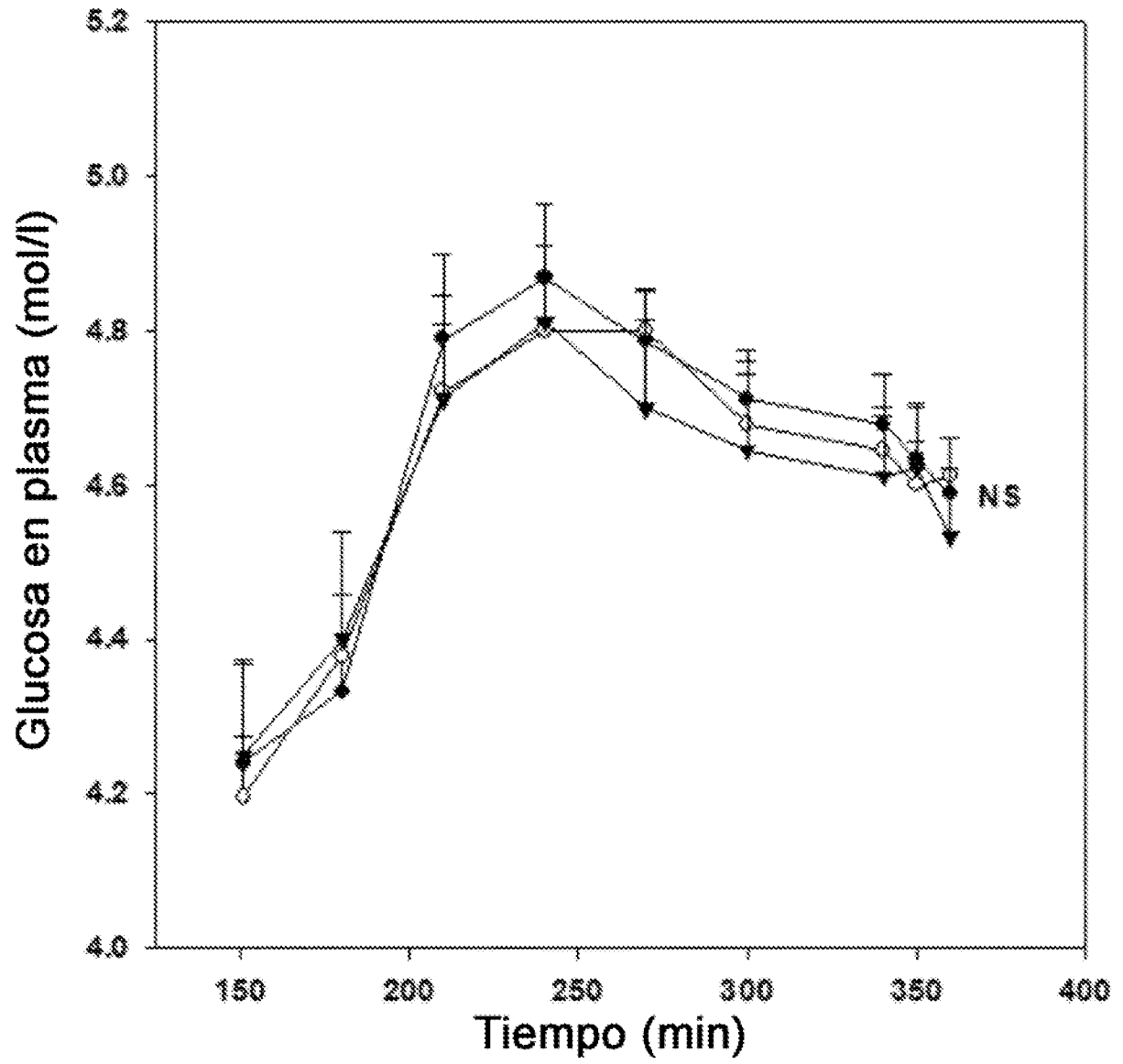


Figura 3

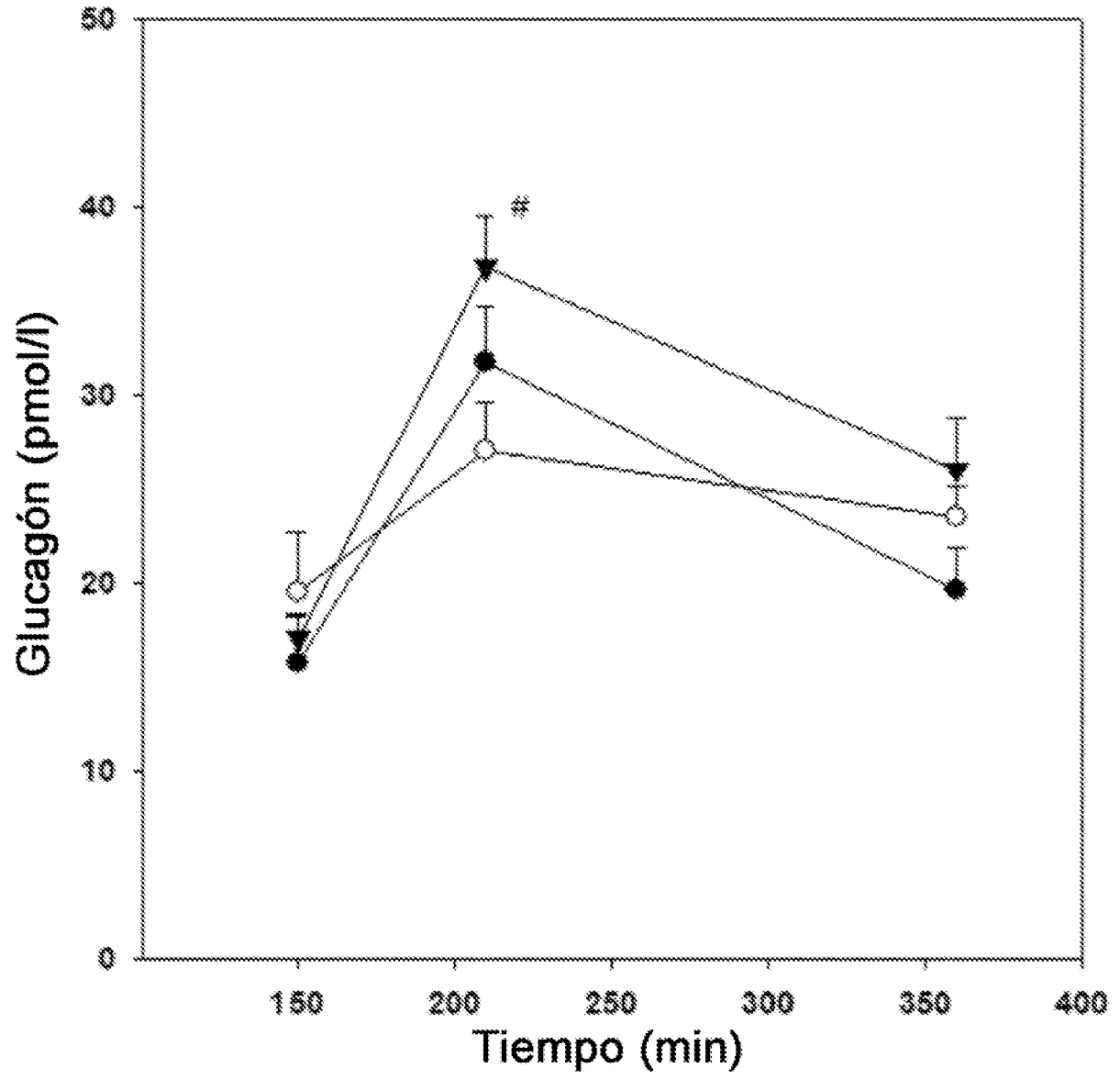


Figura 4

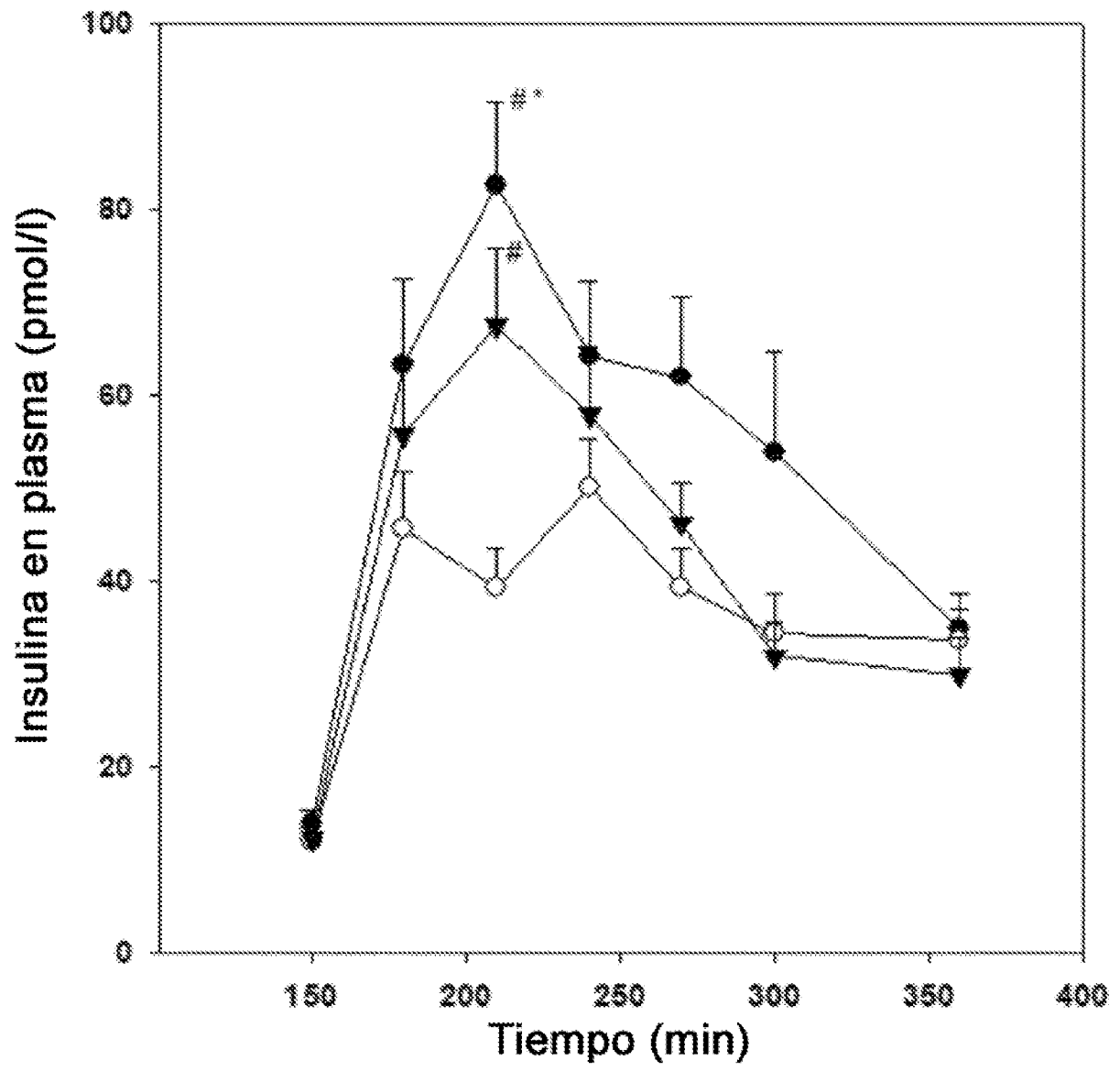


Figura 5

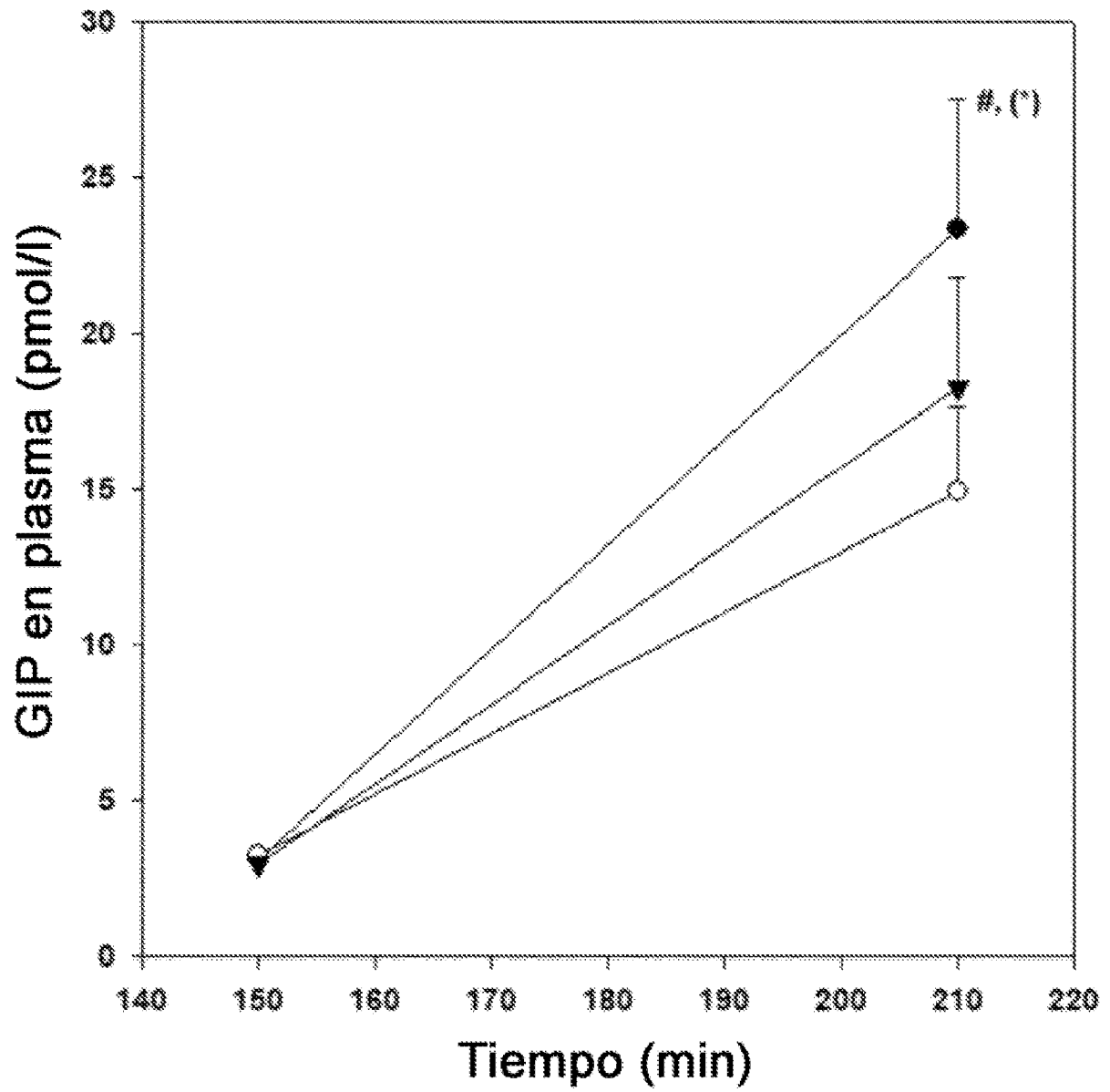


Figura 6

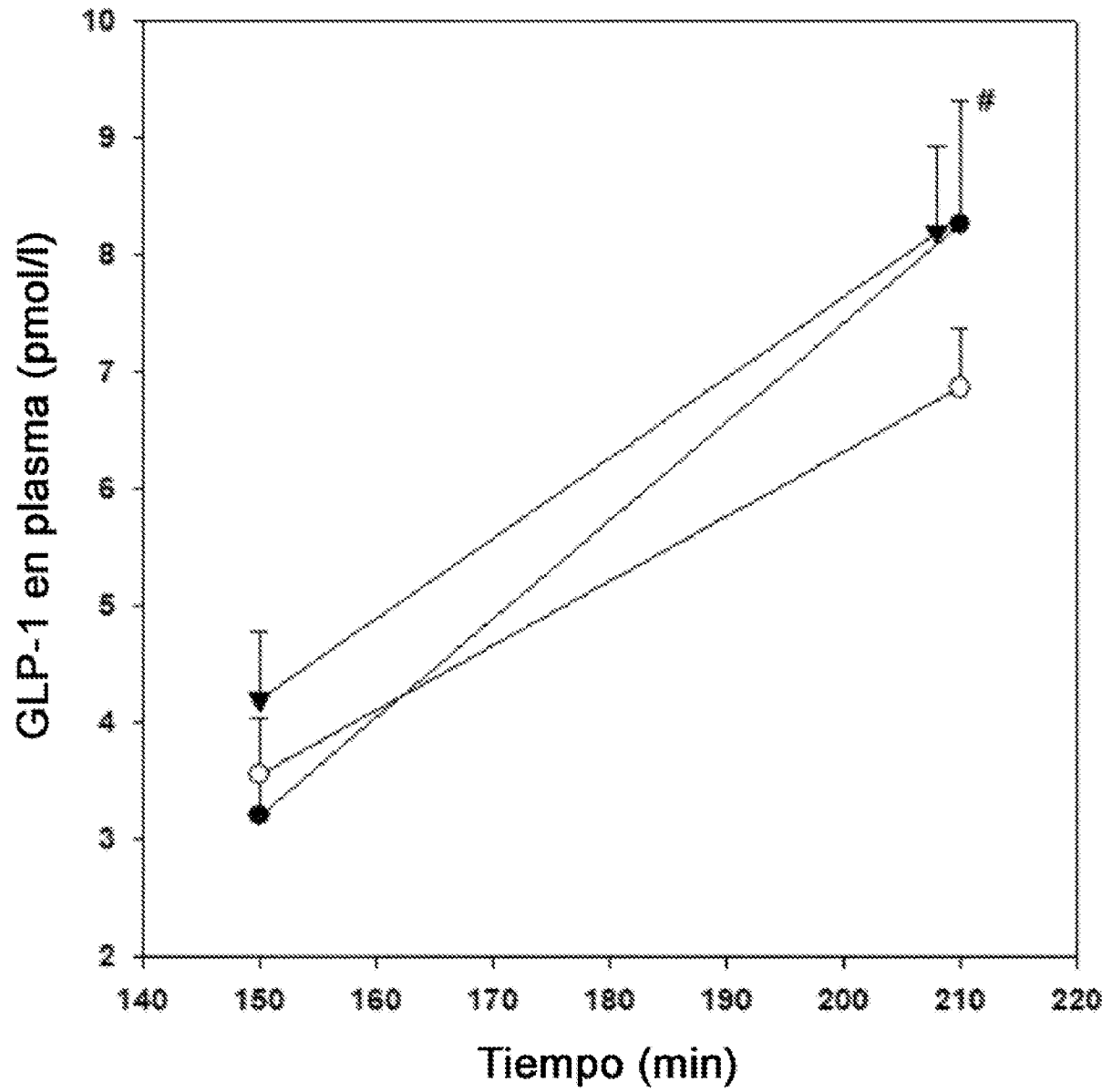


Figura 7

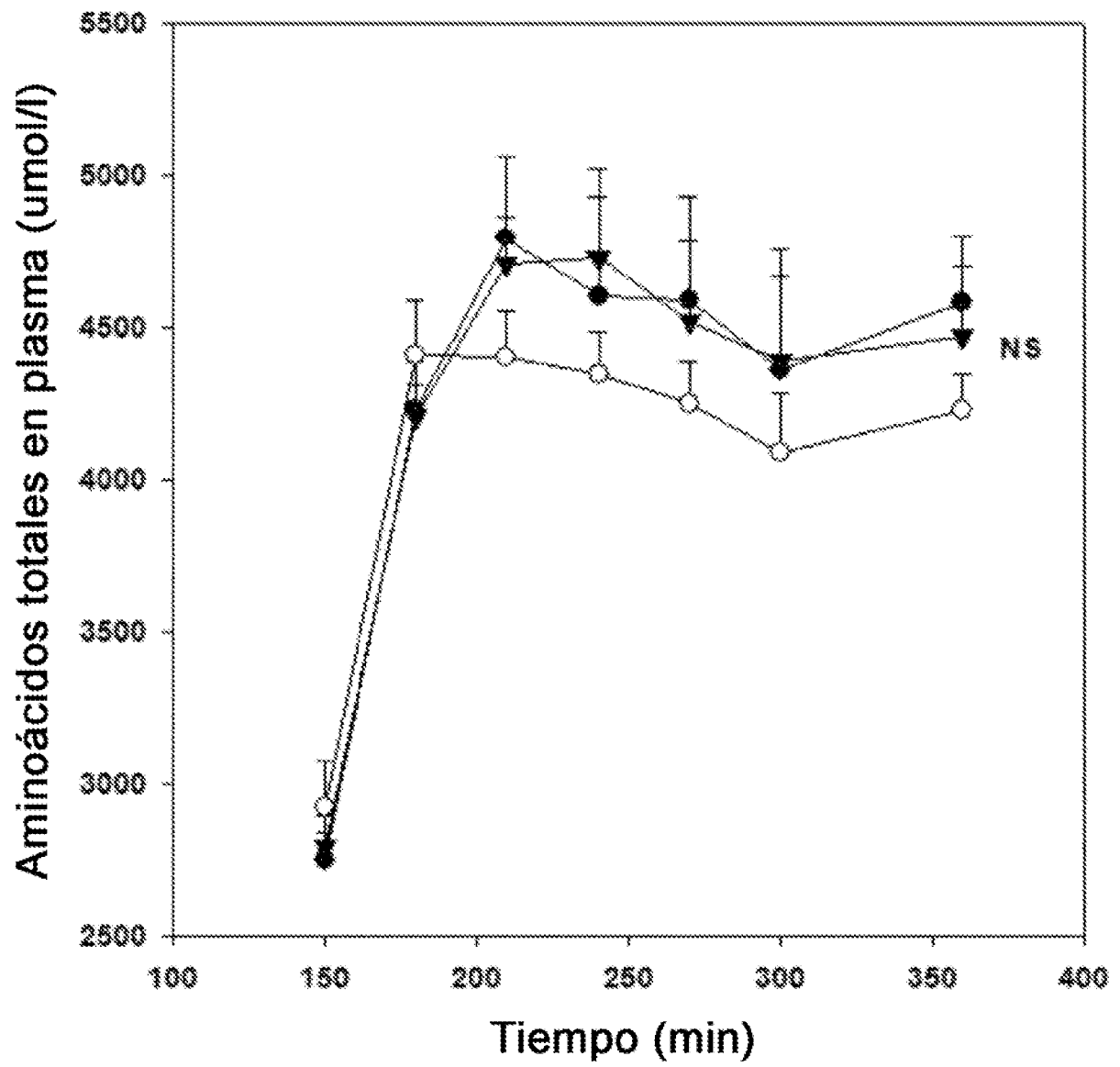
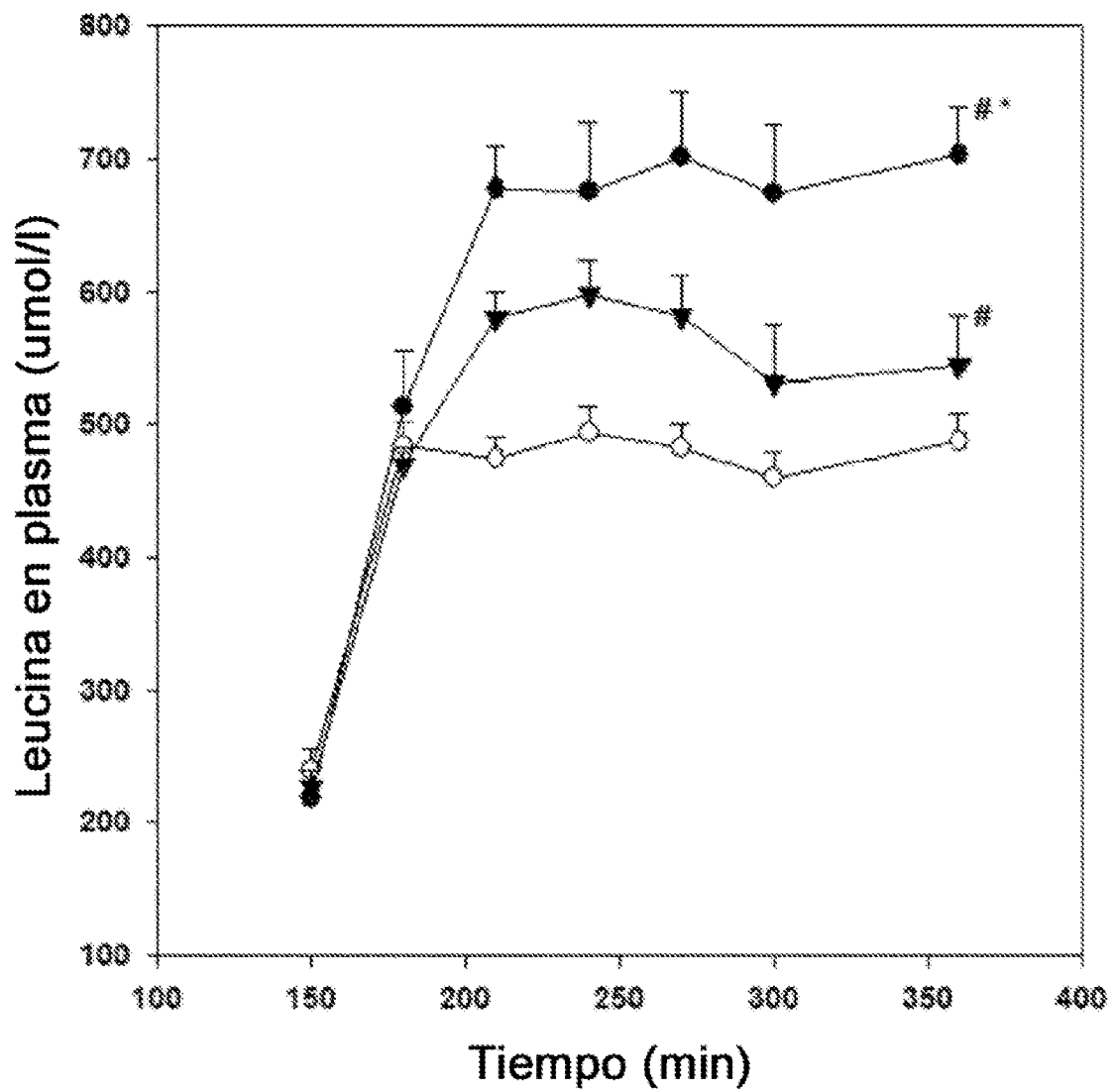


Figura 8



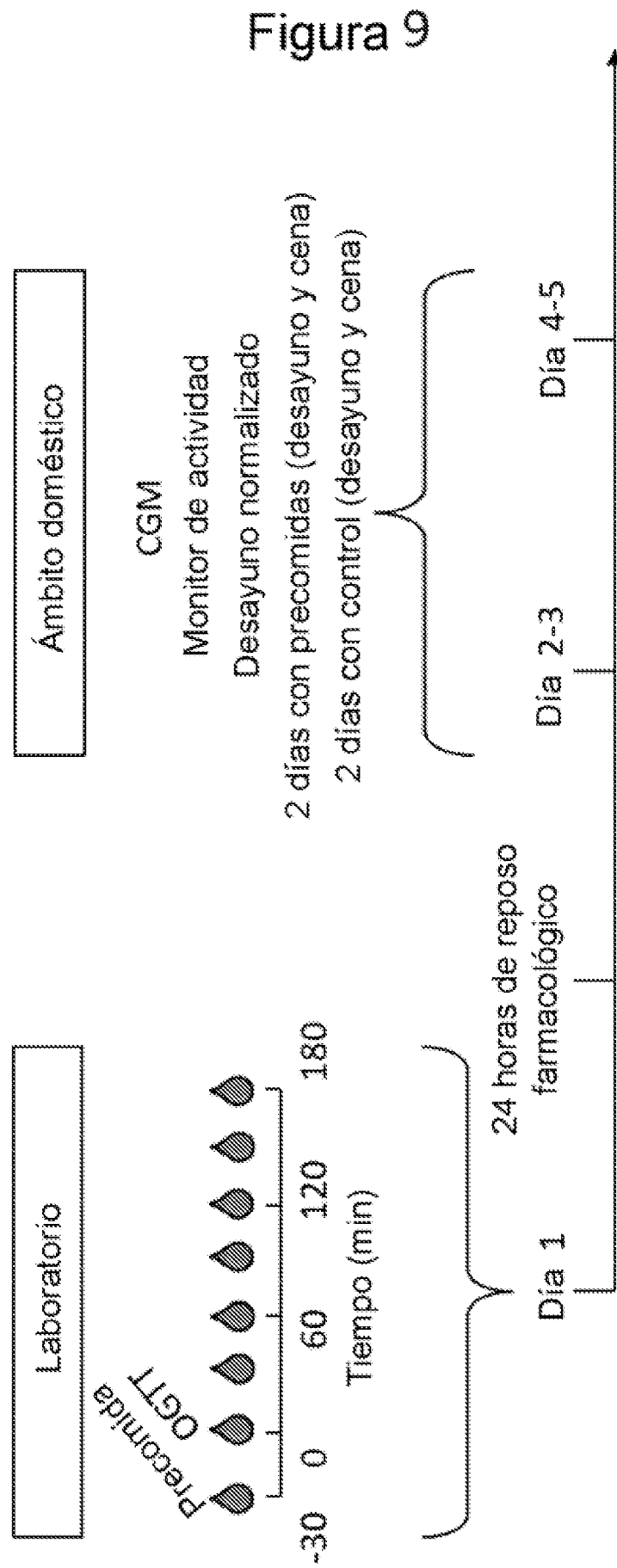


Figura 10 a

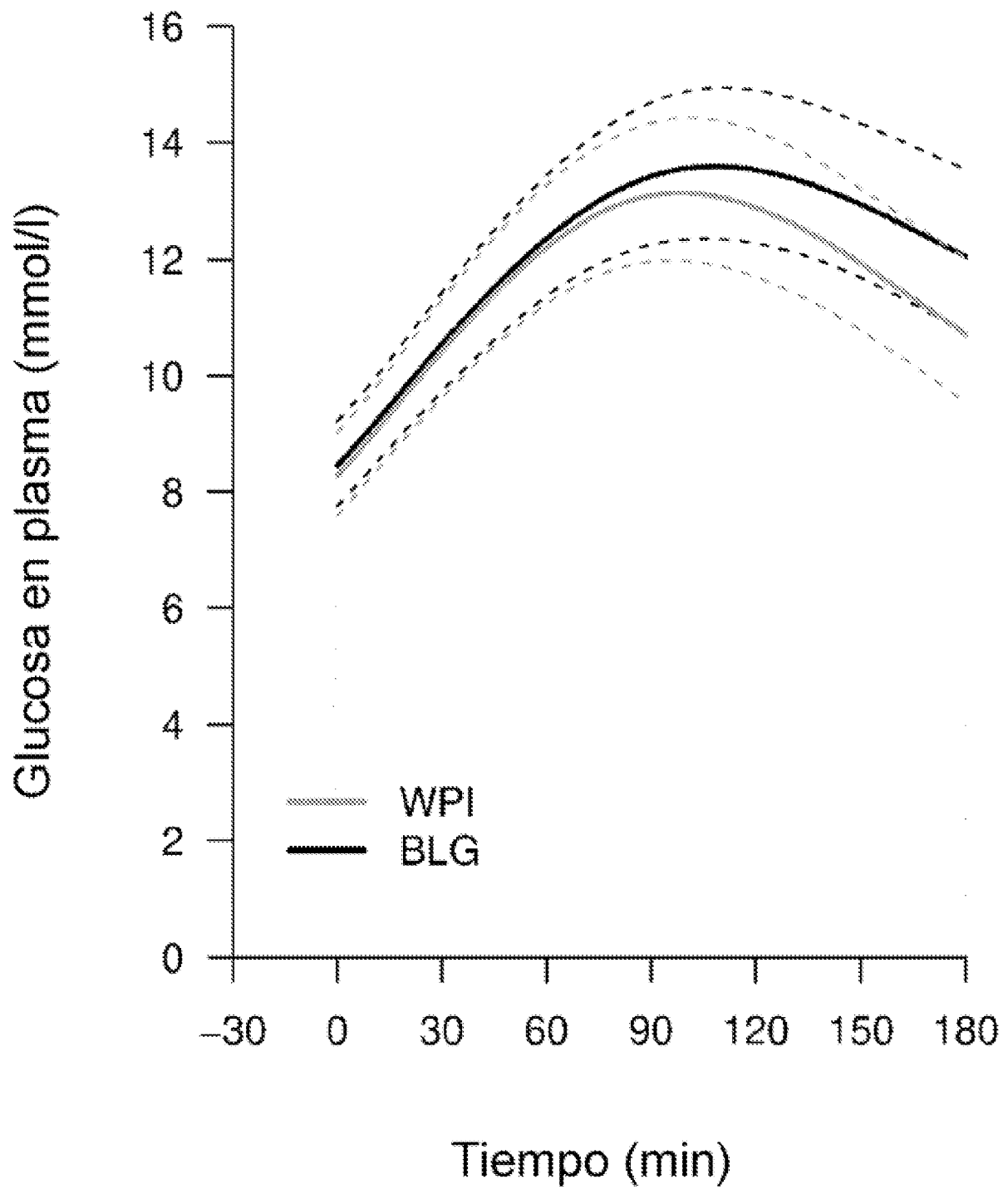


Figura 10 b

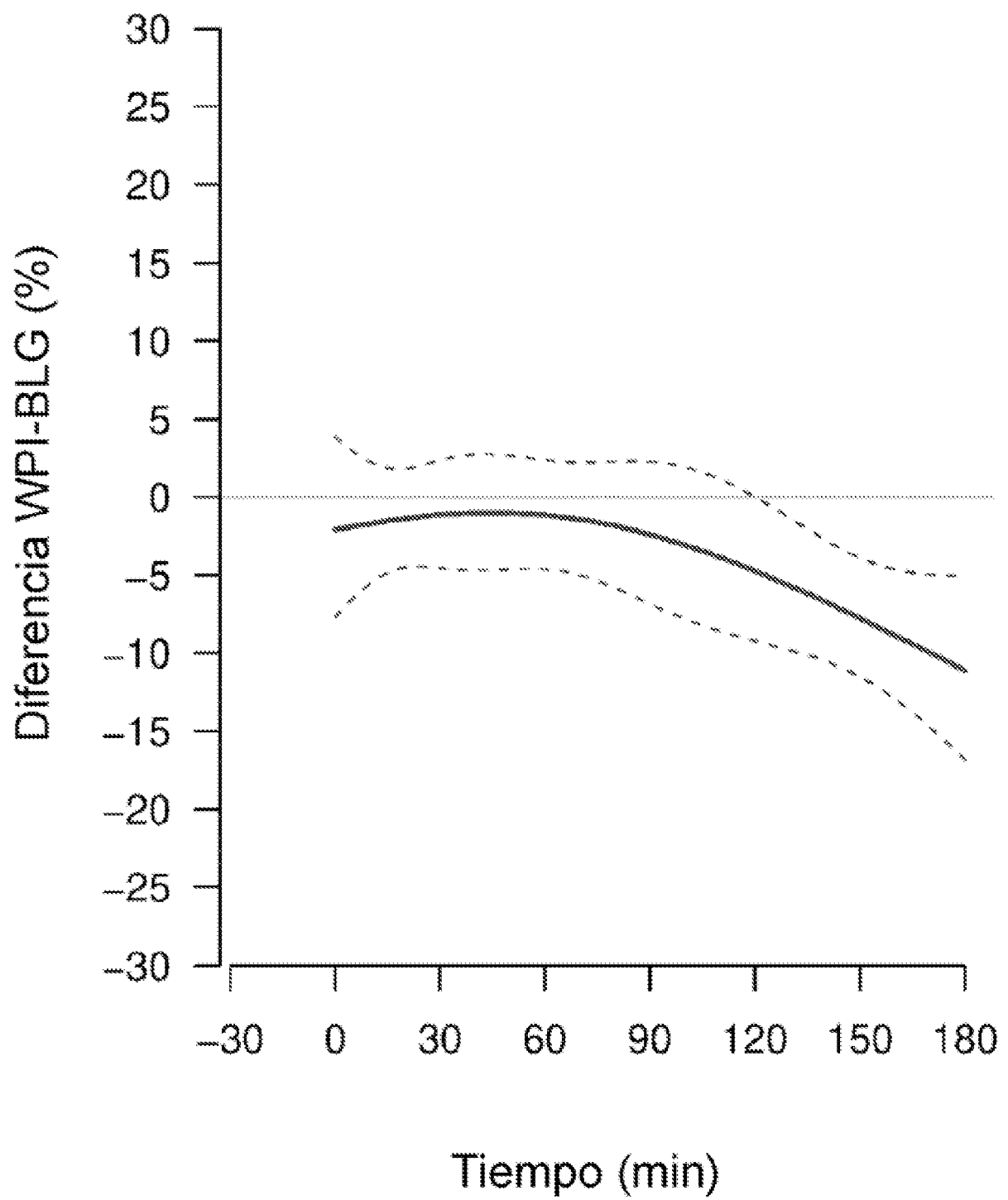


Figura 10 c

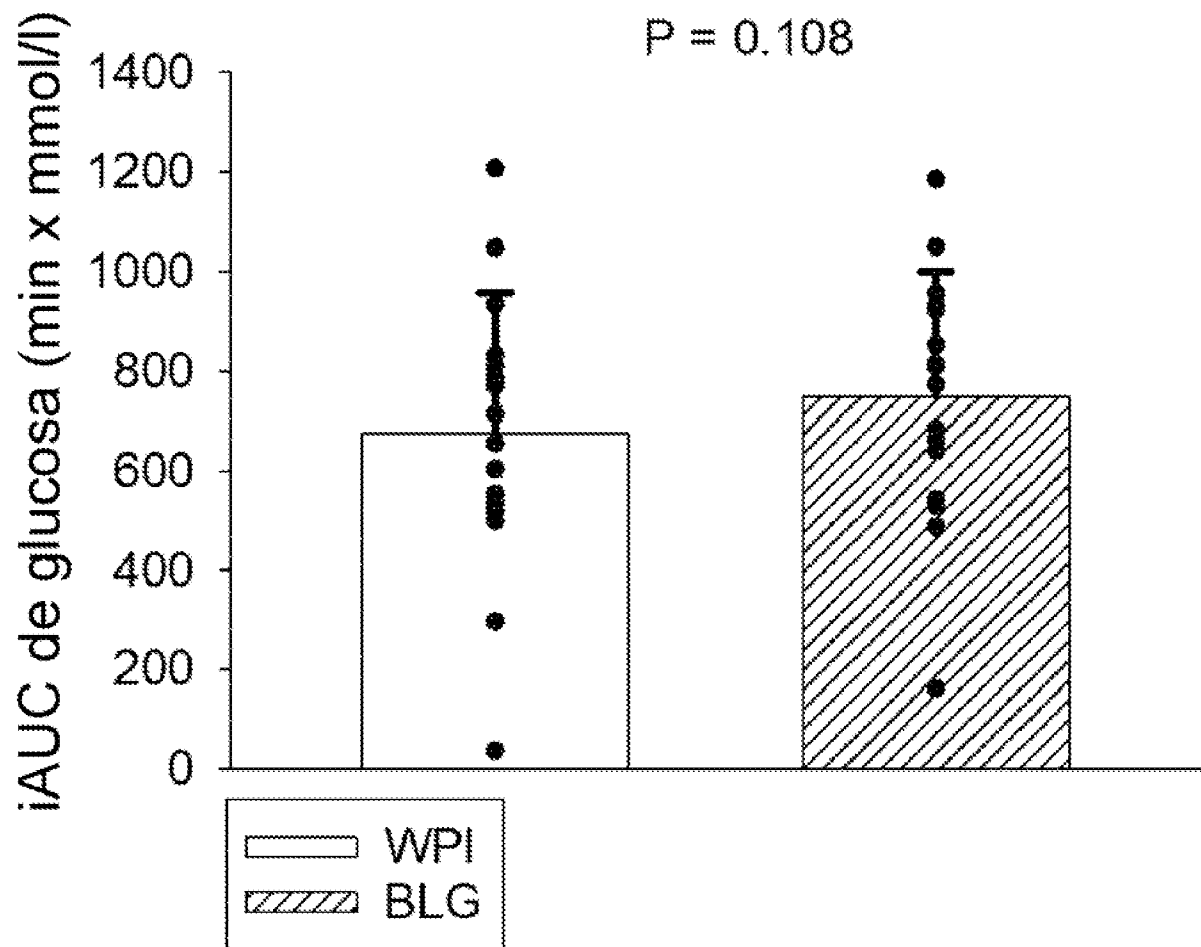


Figura 11 a

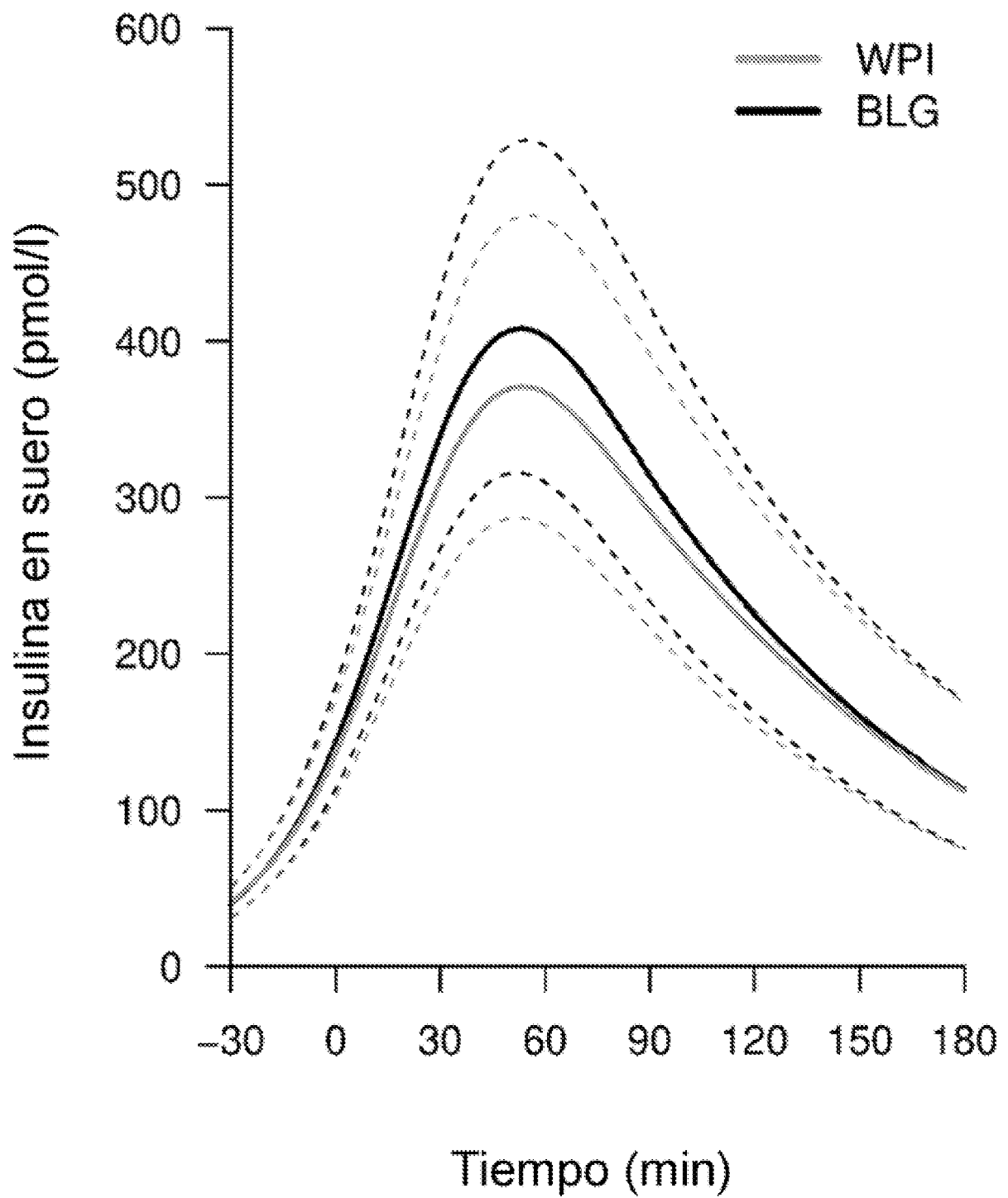


Figura 11 b

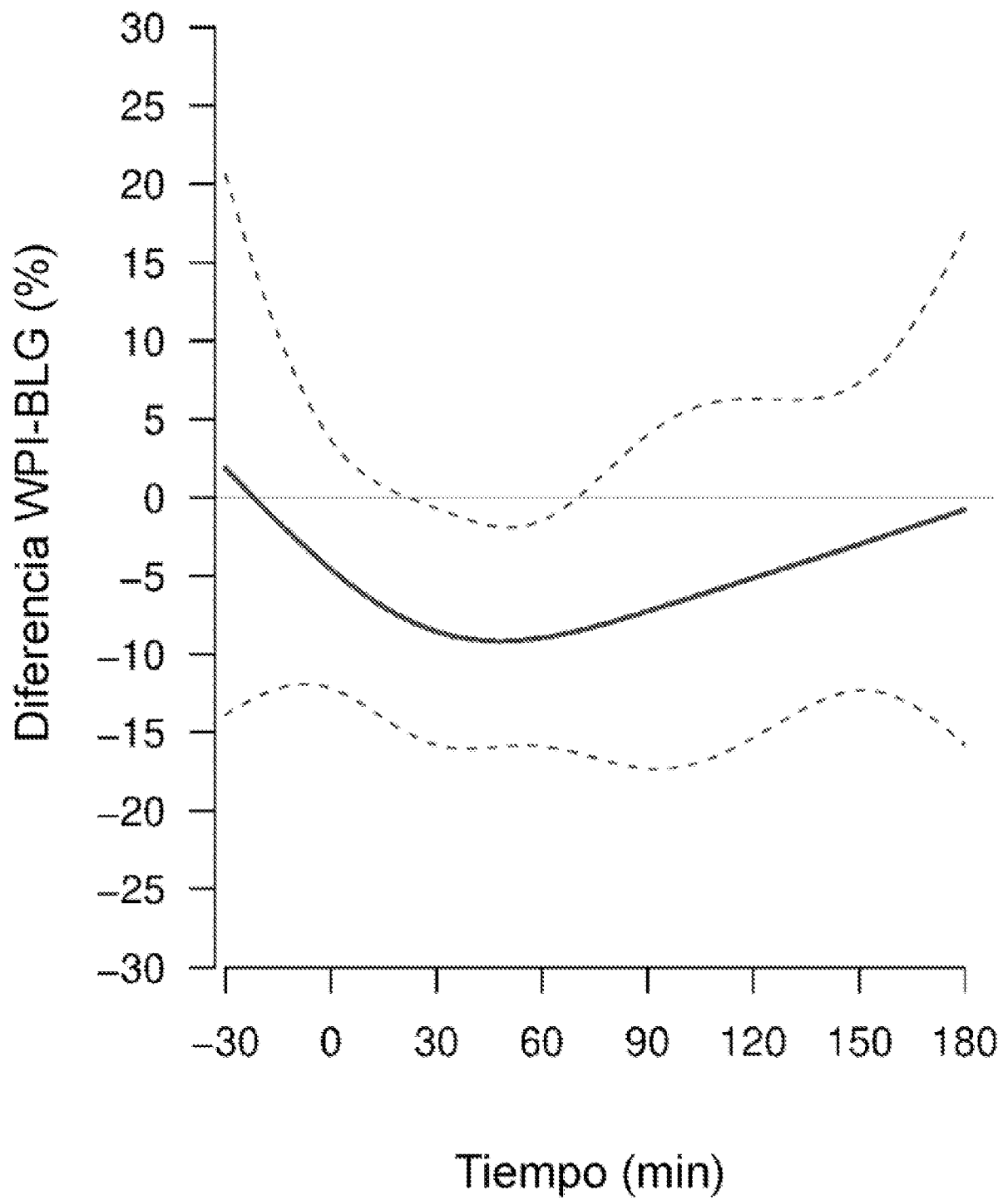


Figura 11 c

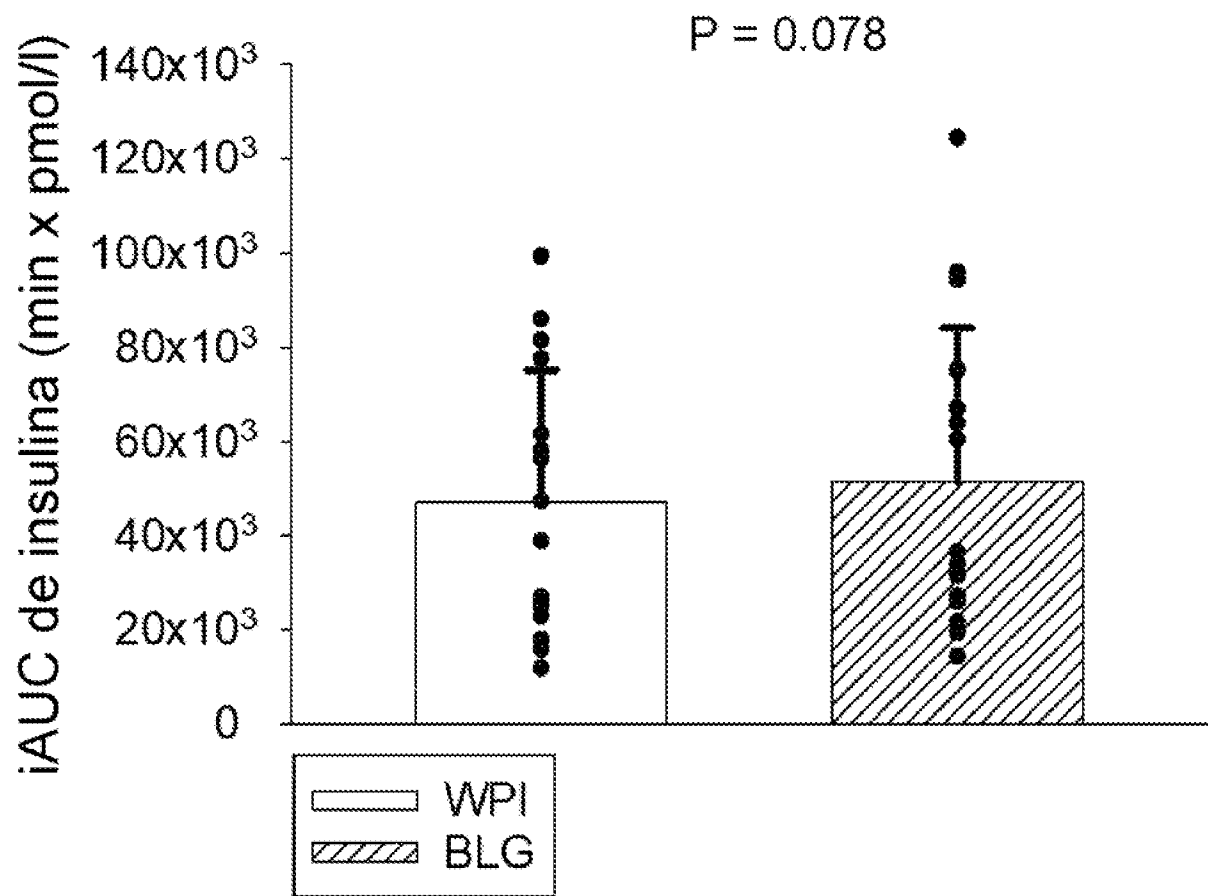


Figura 12 a

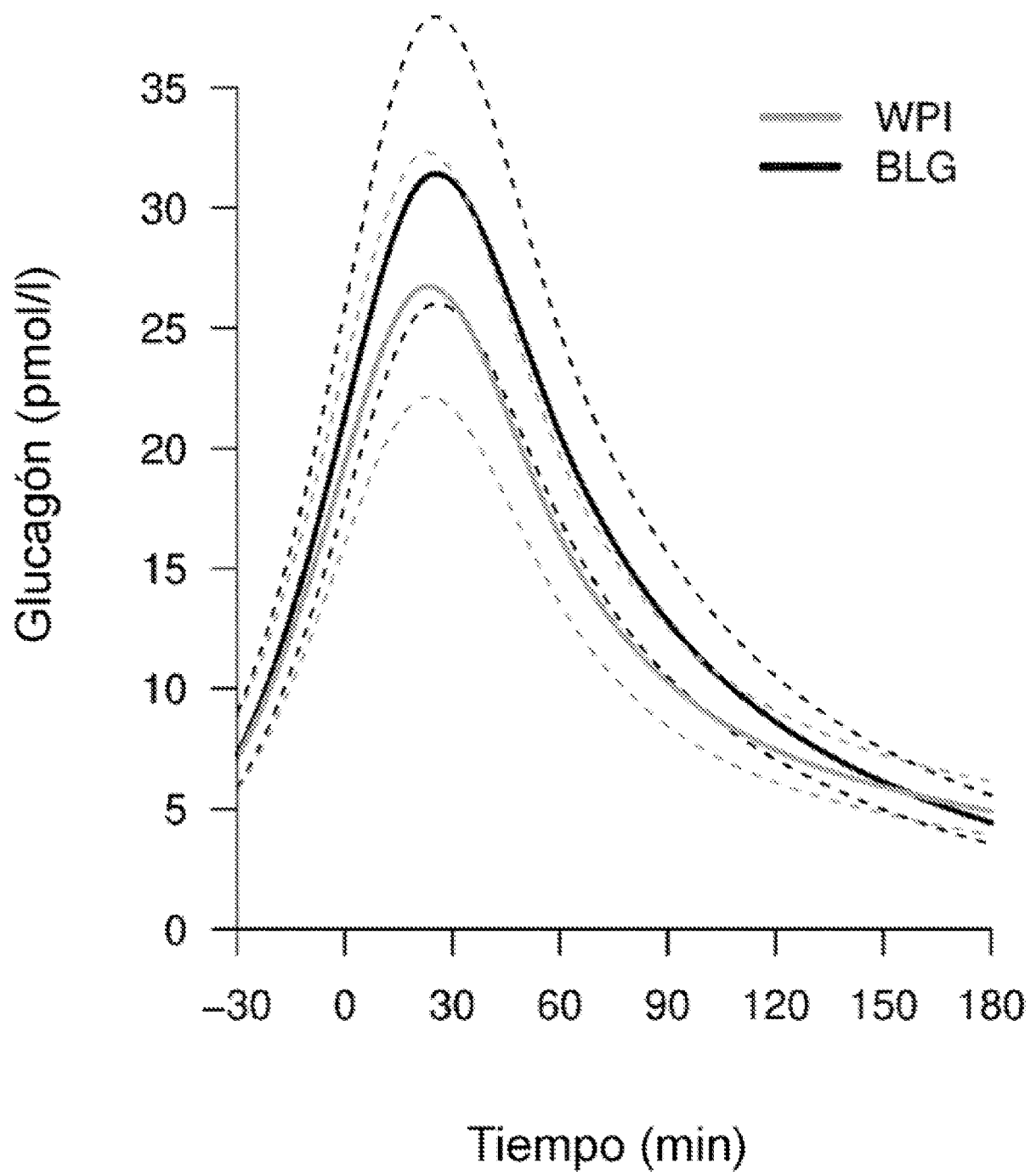


Figura 12 b

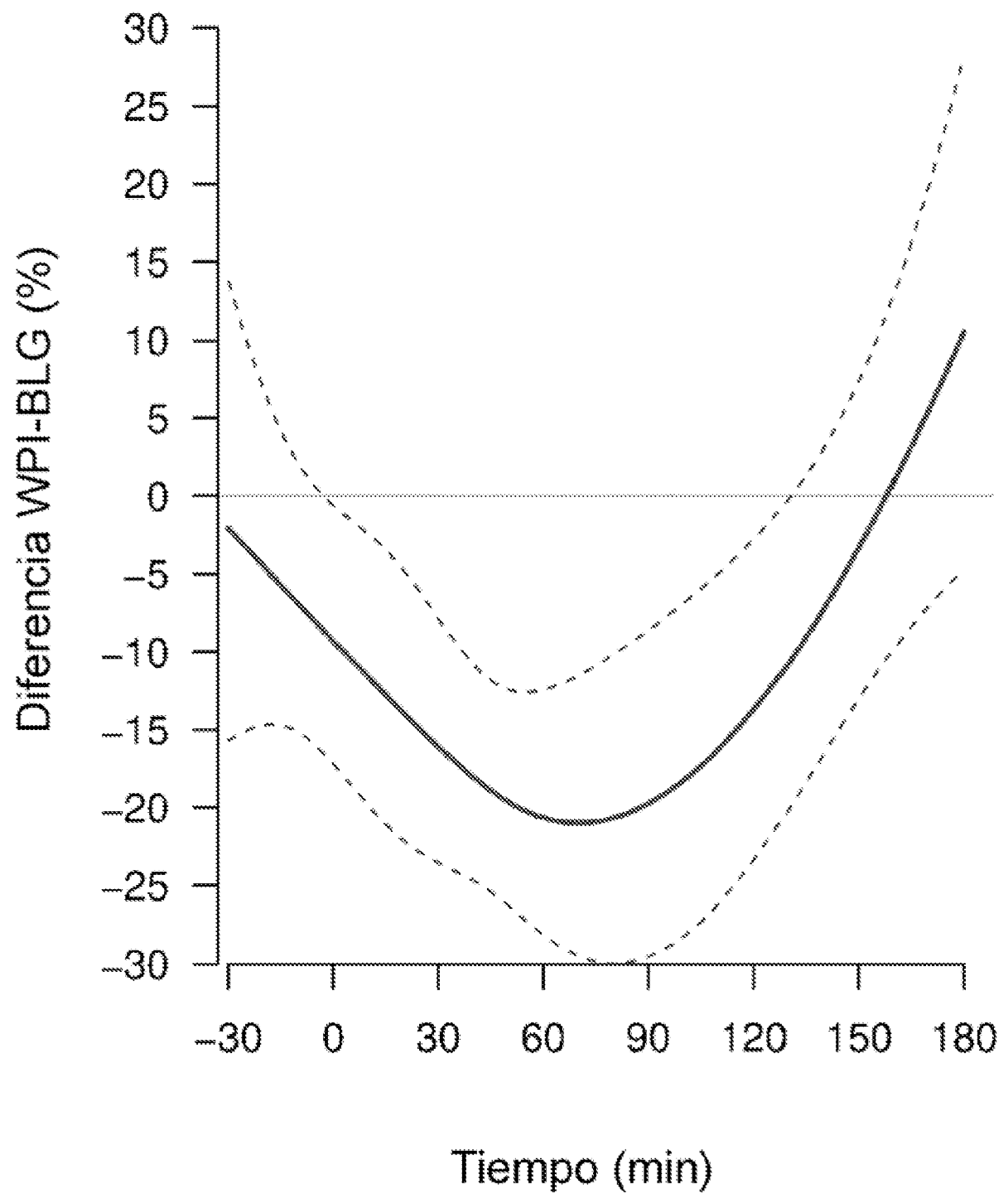


Figura 12 c

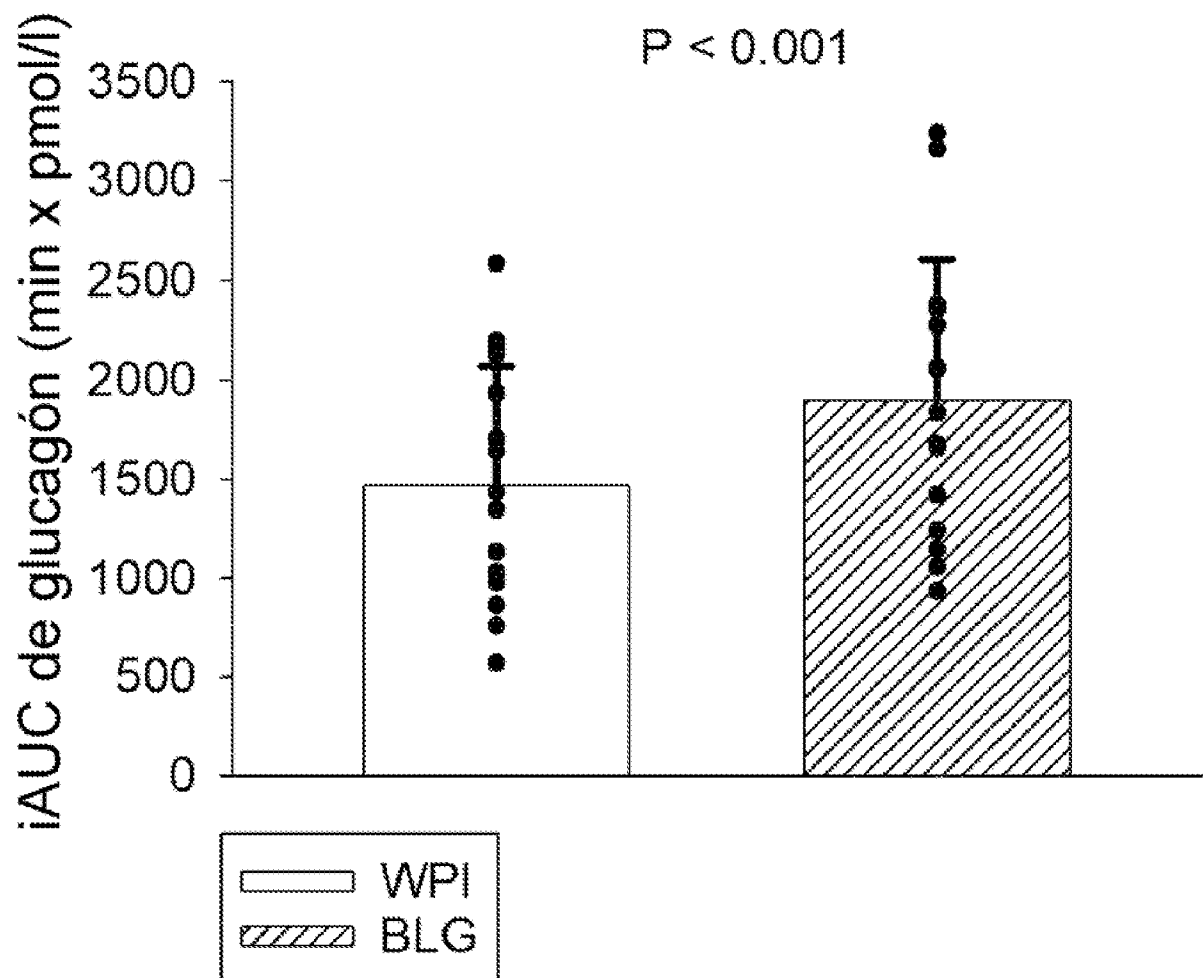


Figura 13 a

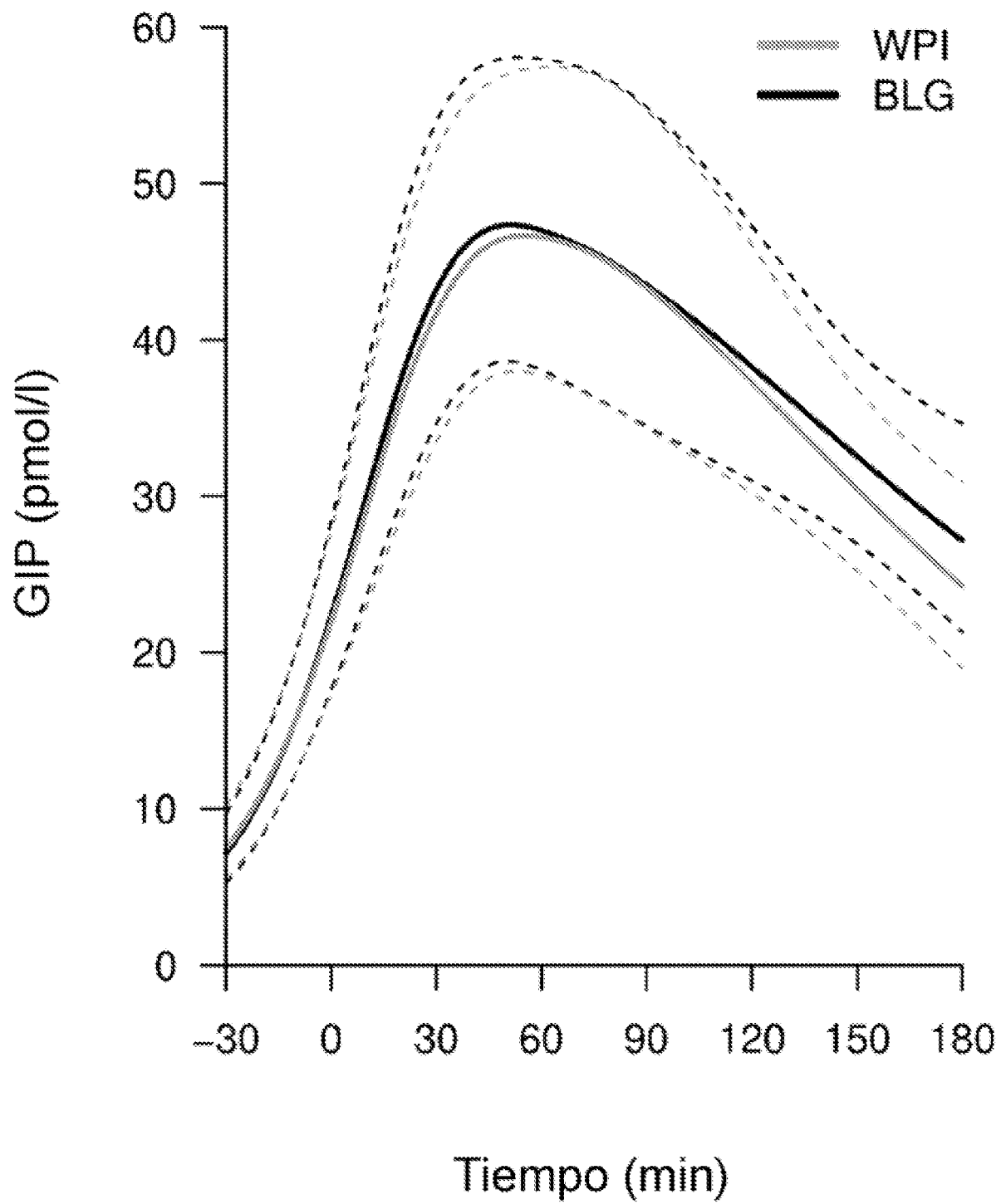


Figura 13 b

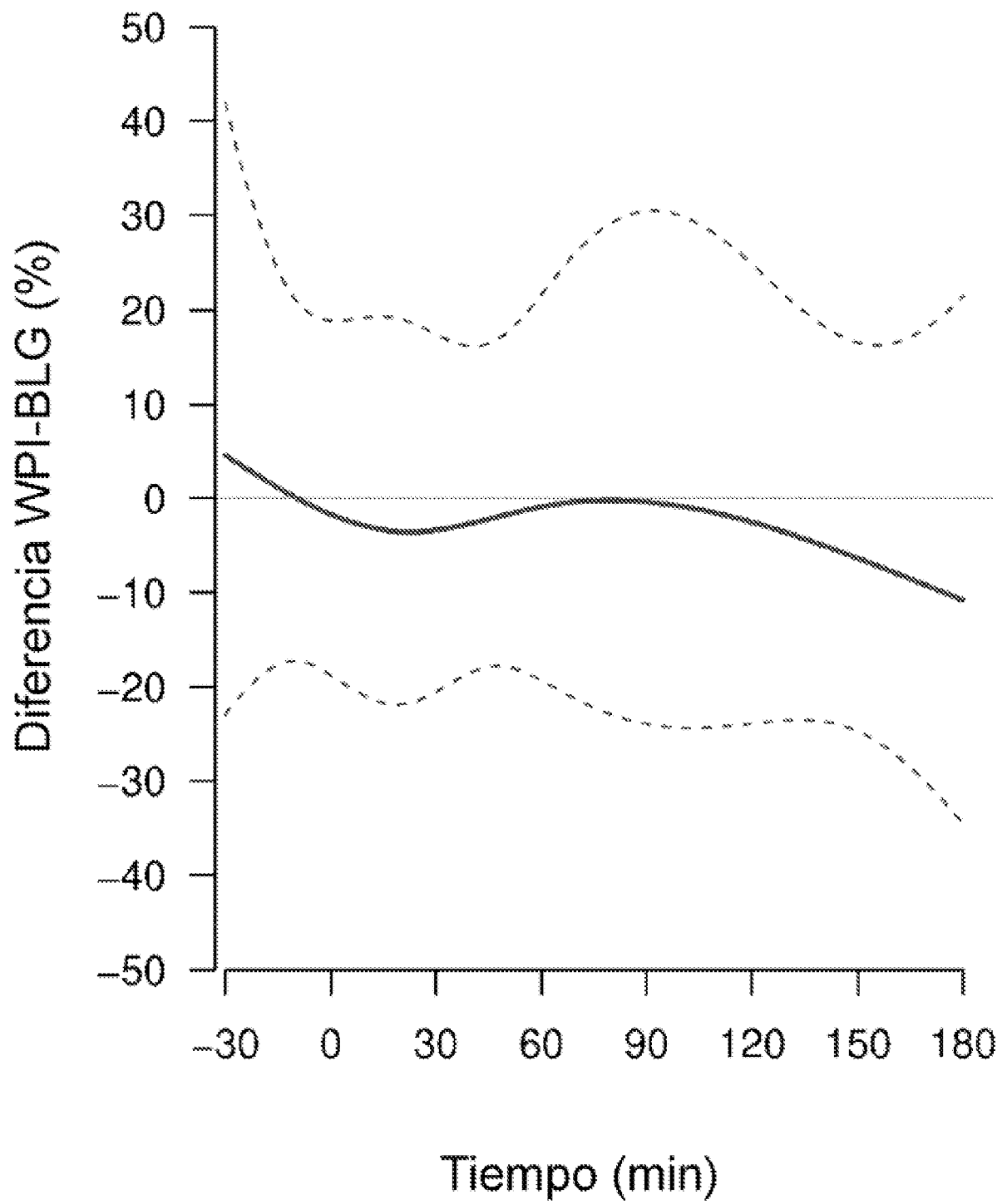


Figura 13 c

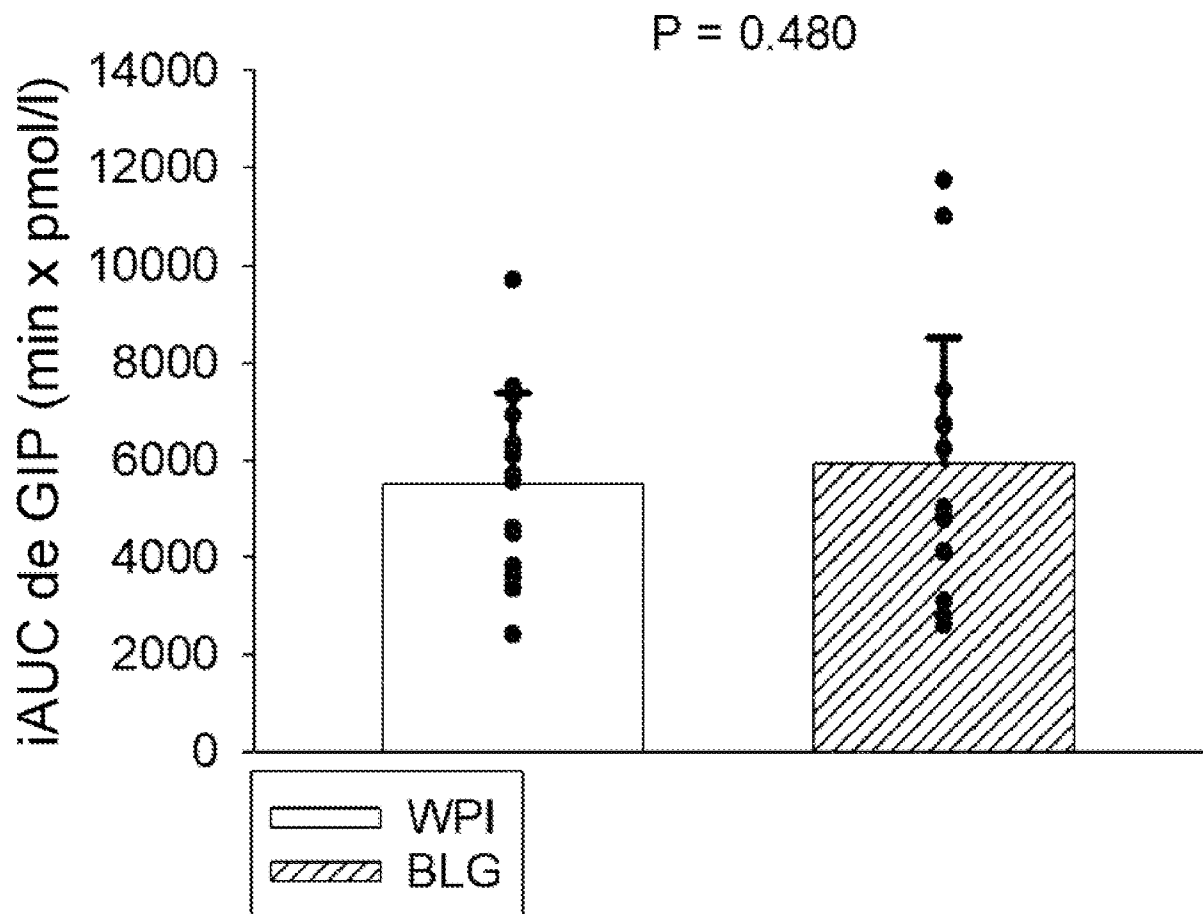


Figura 14 a

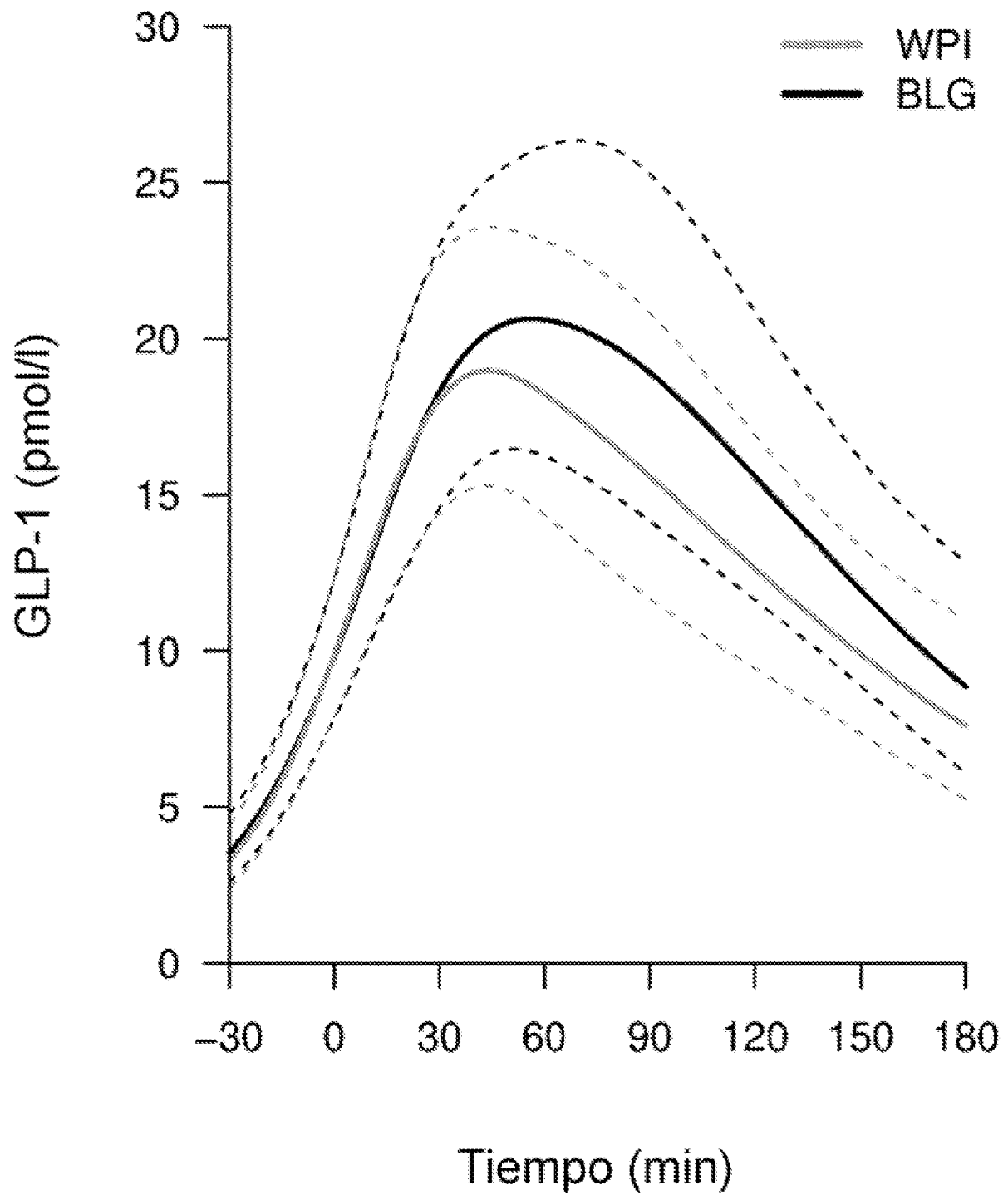


Figura 14 b

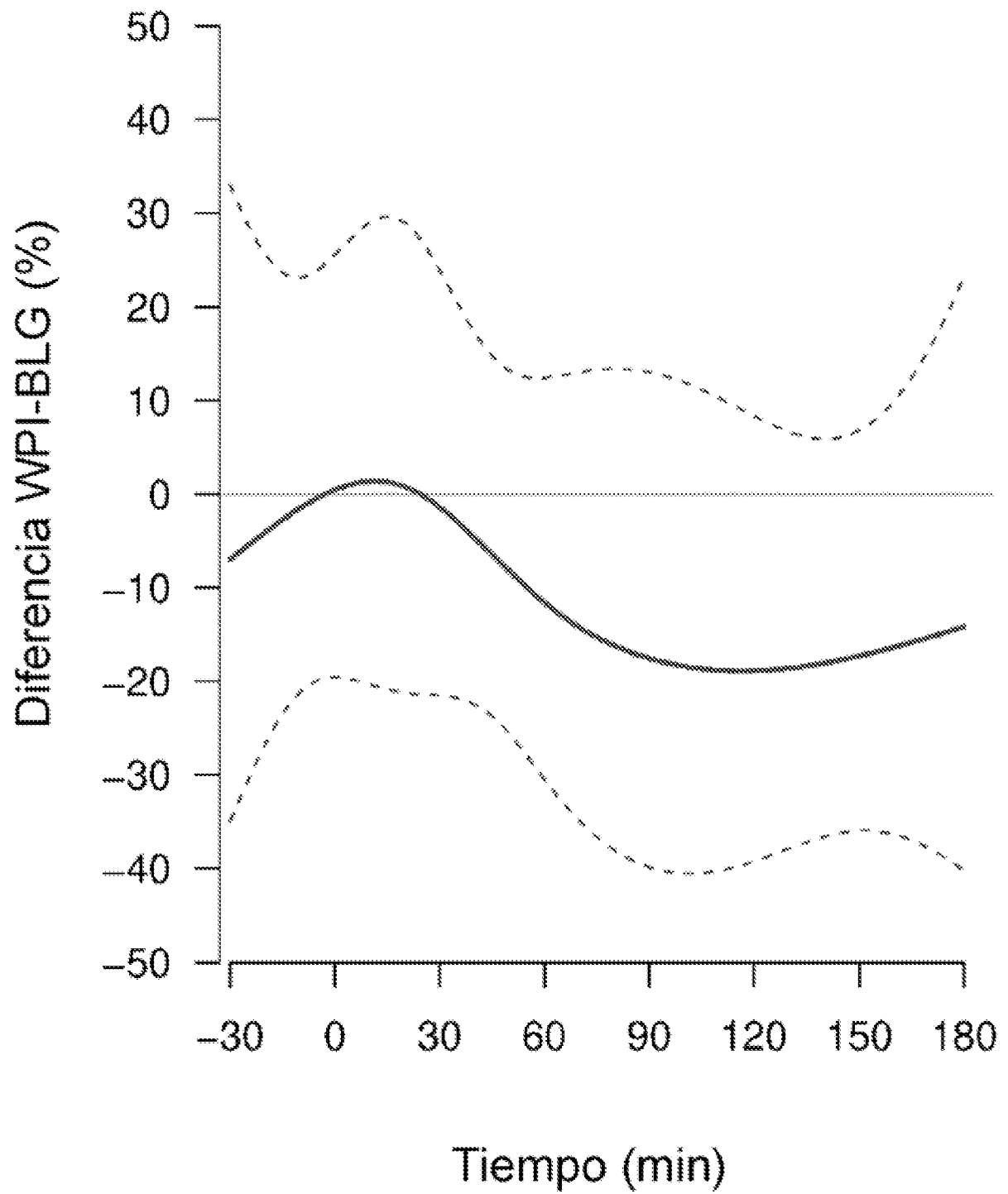


Figura 14 c

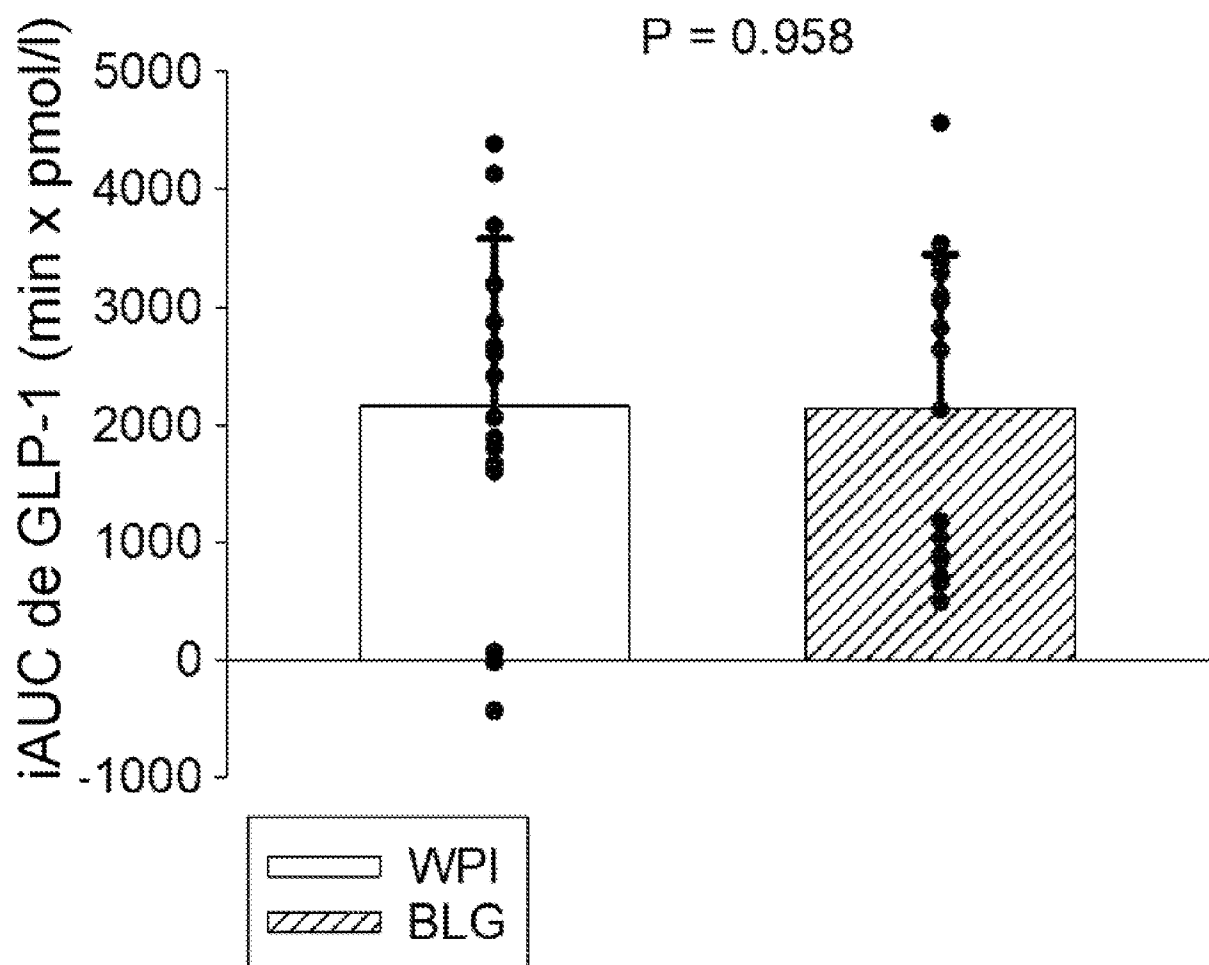


Figura 15 a

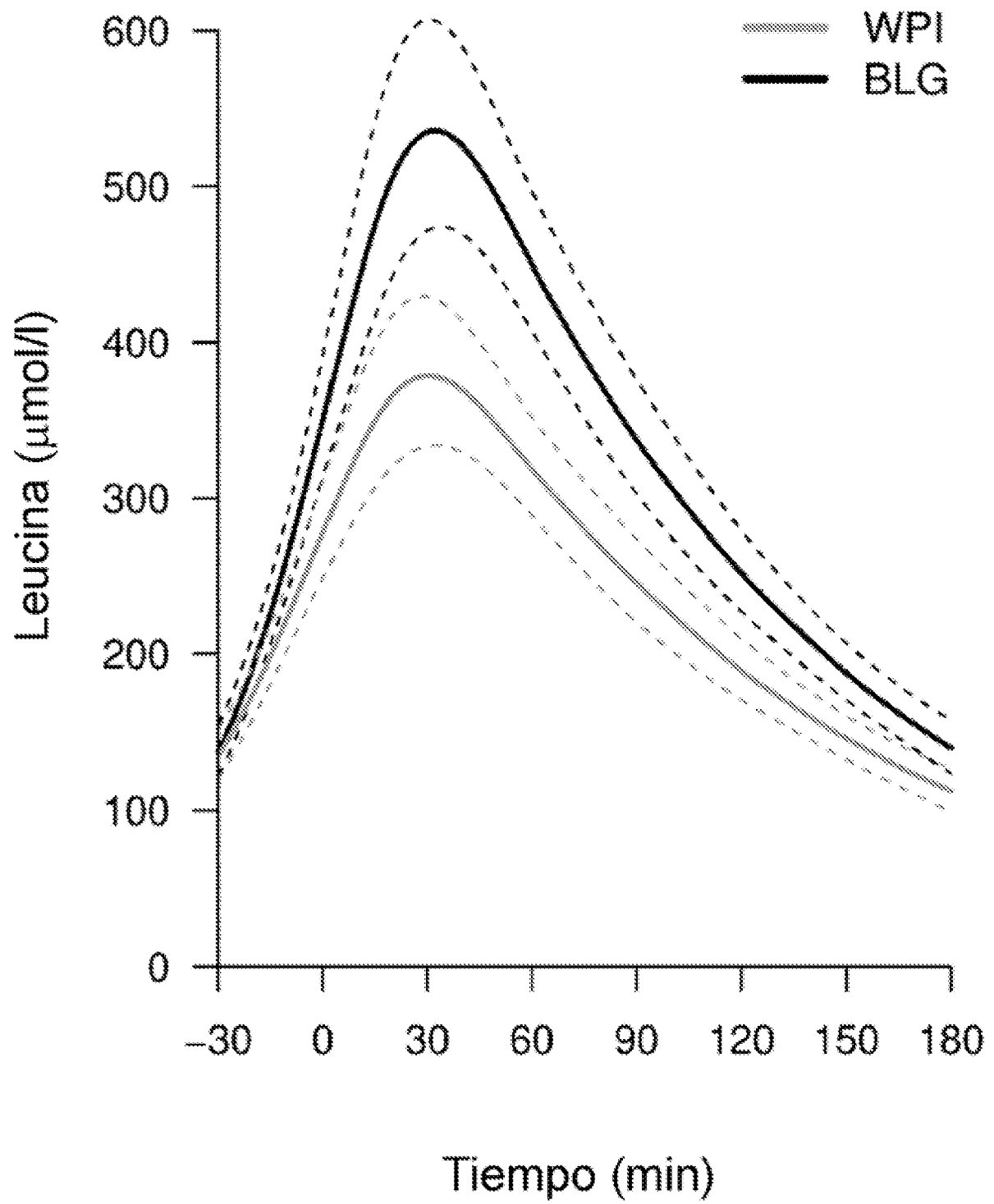


Figura 15 b

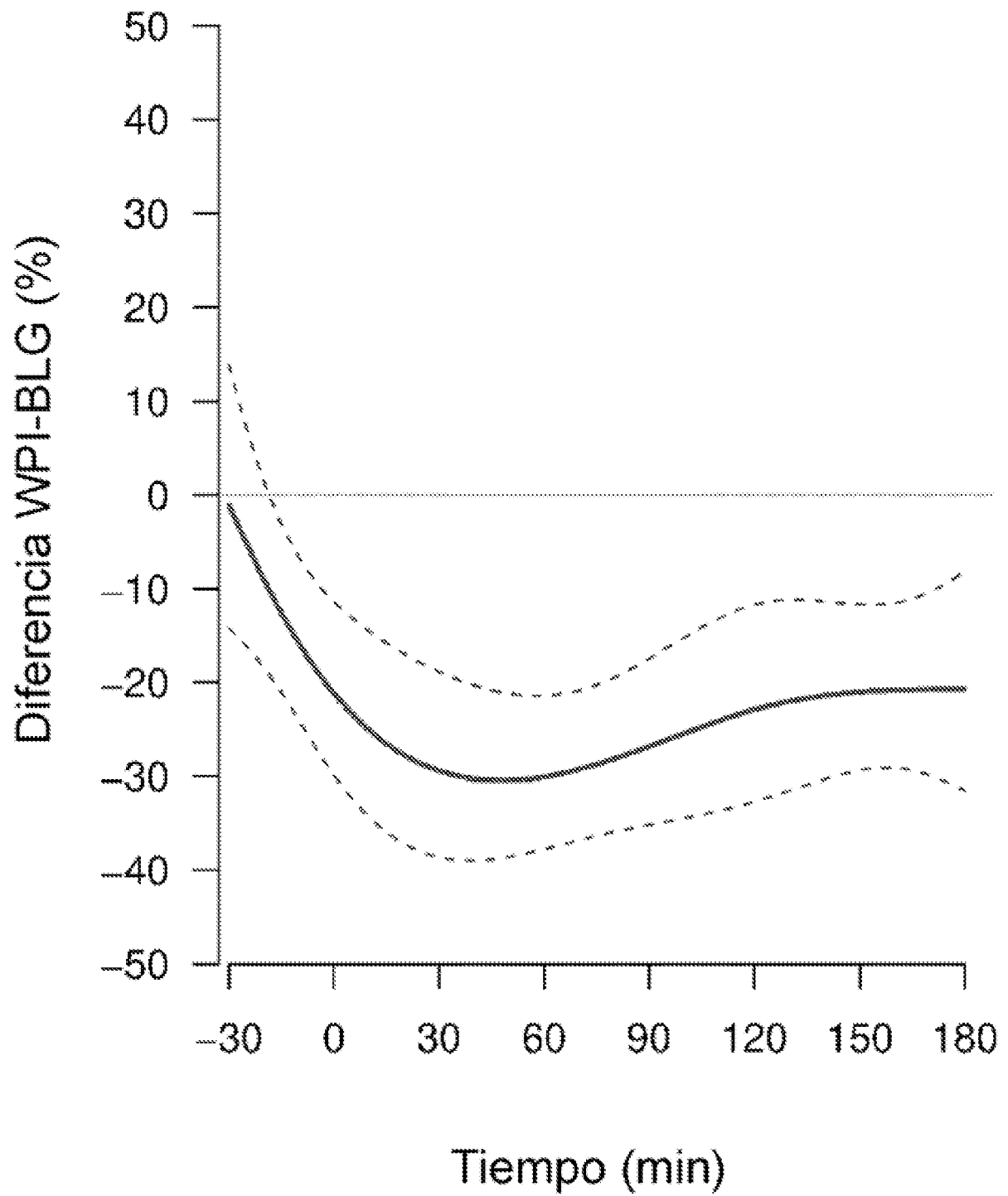


Figura 15 c

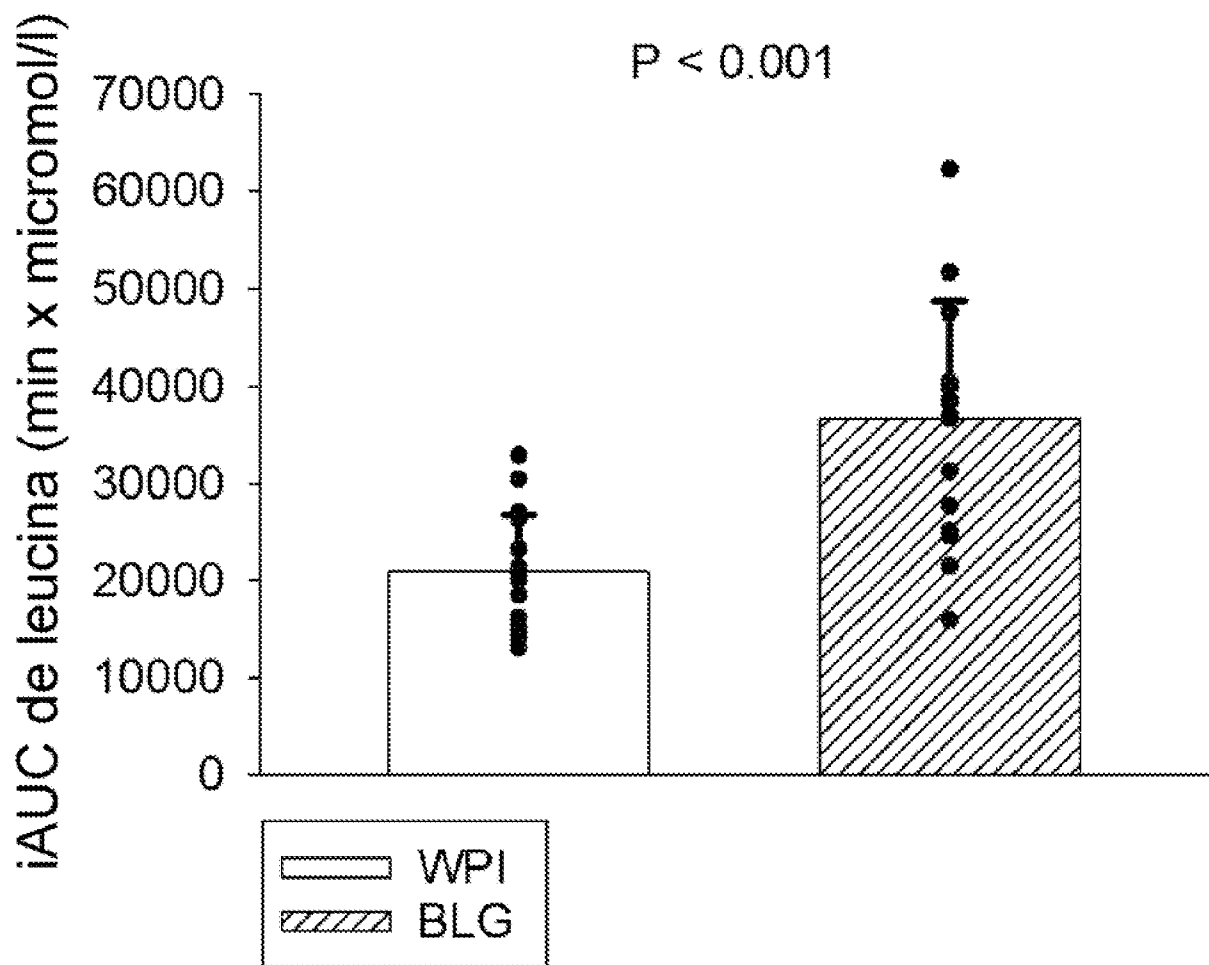


Figura 16 a

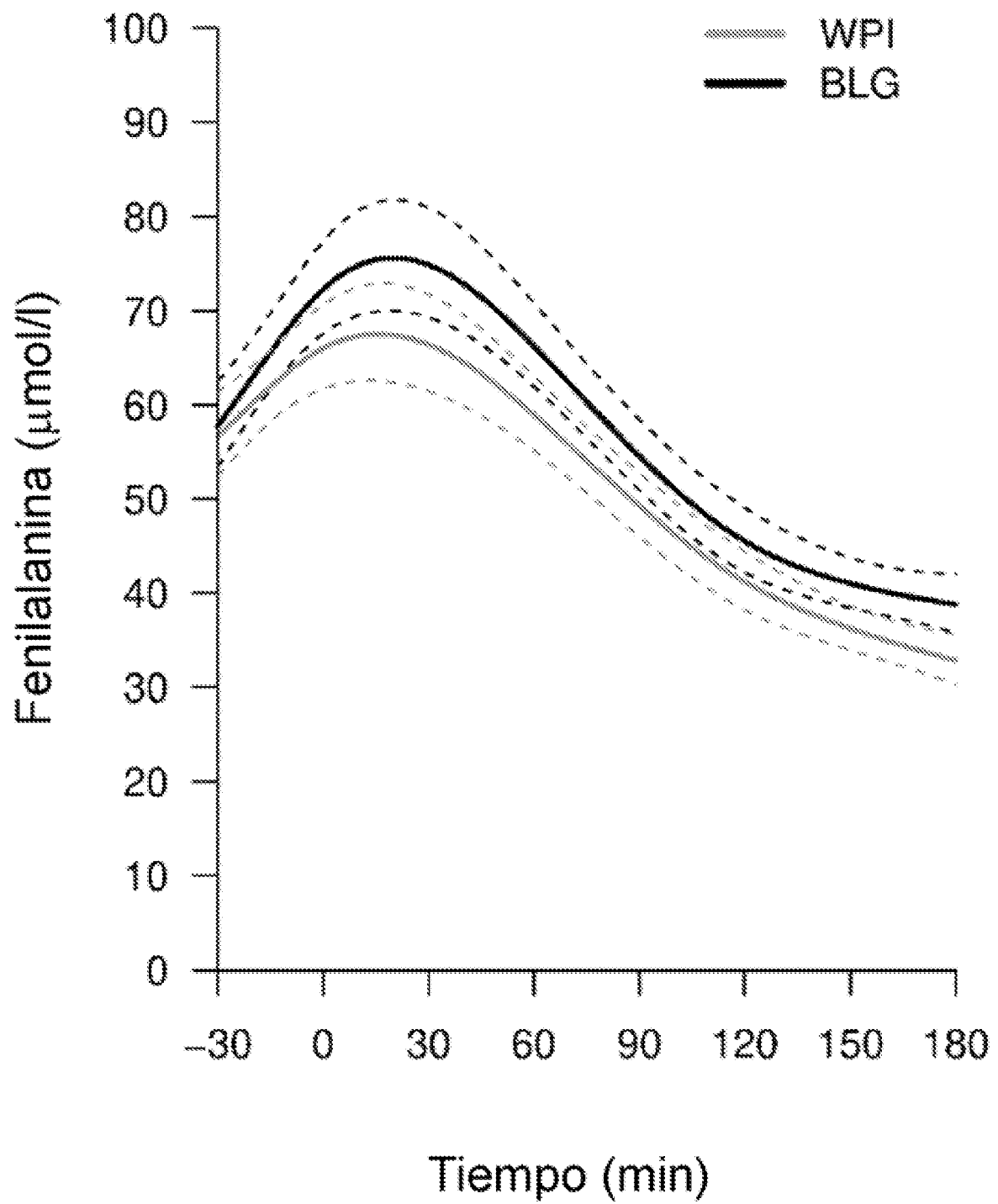


Figura 16 b

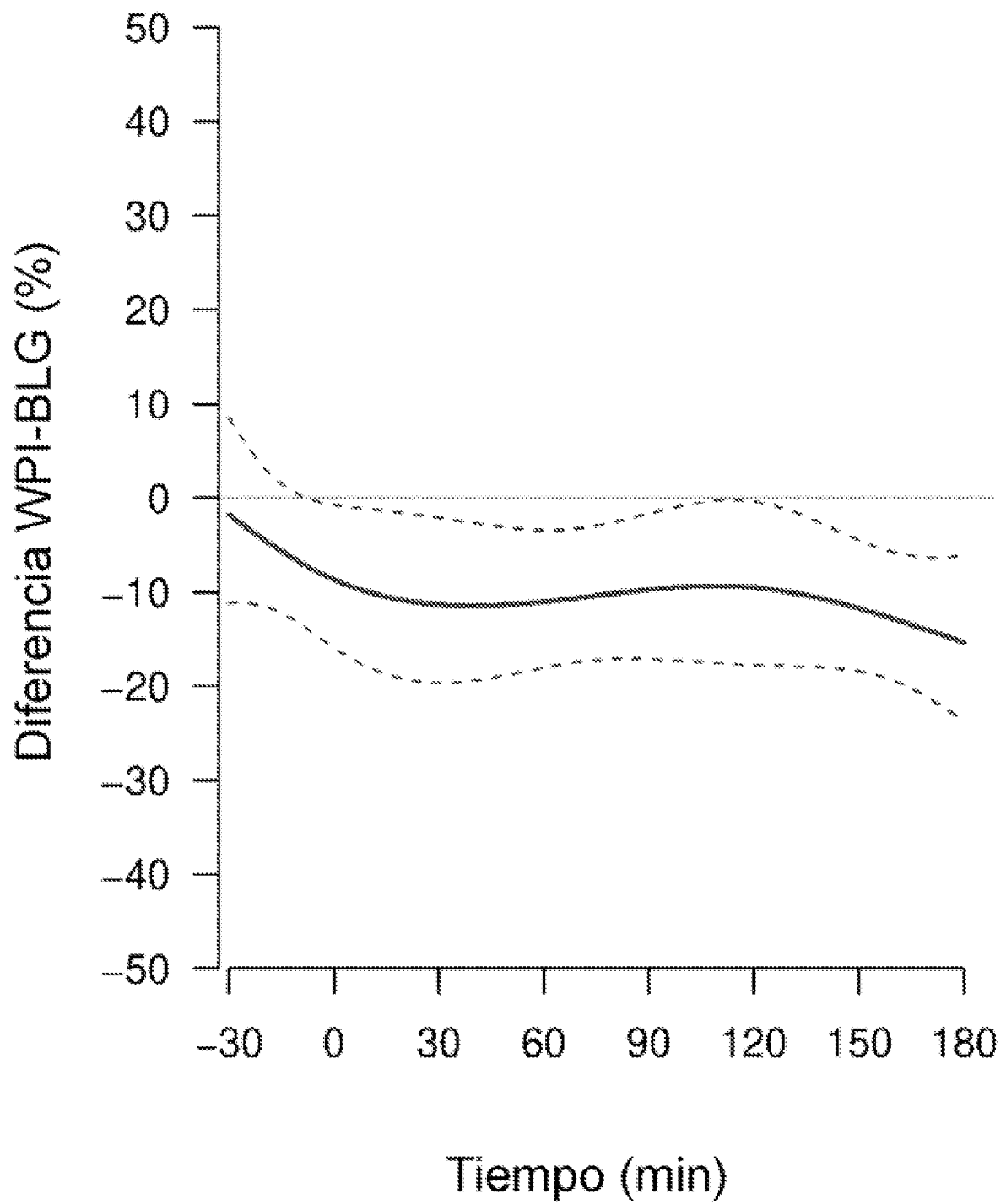


Figura 16 c

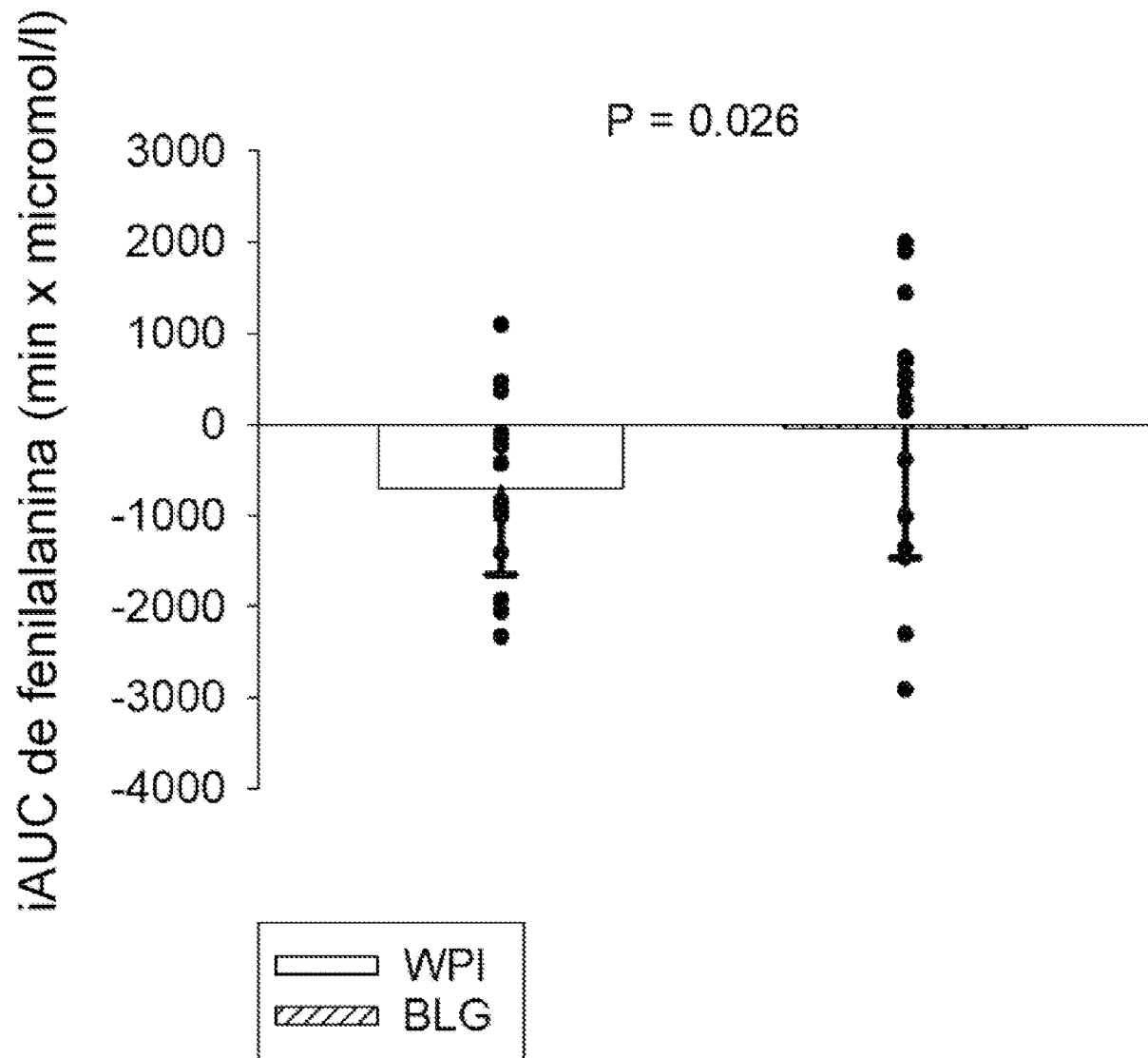


Figura 17 a

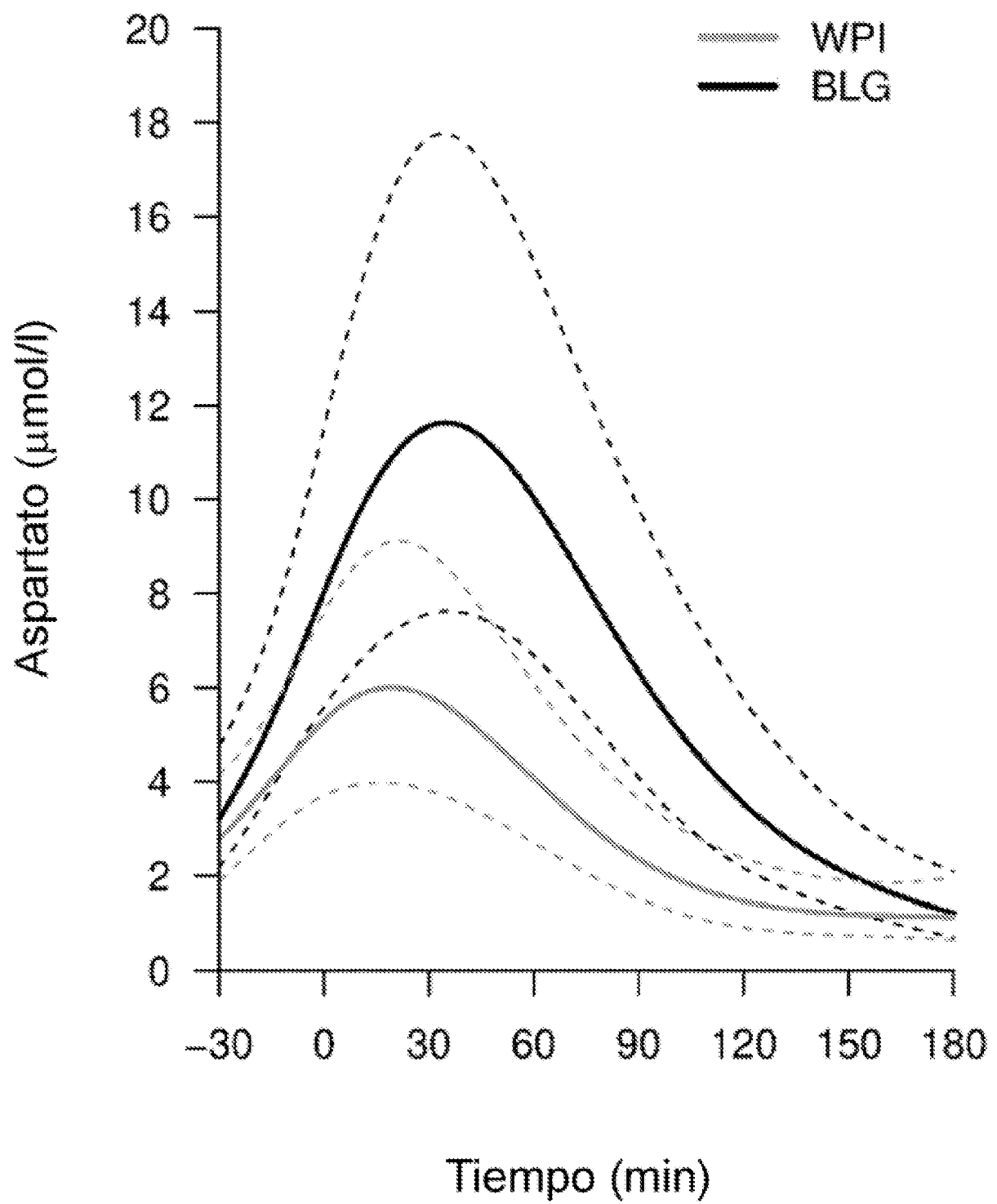


Figura 17 b

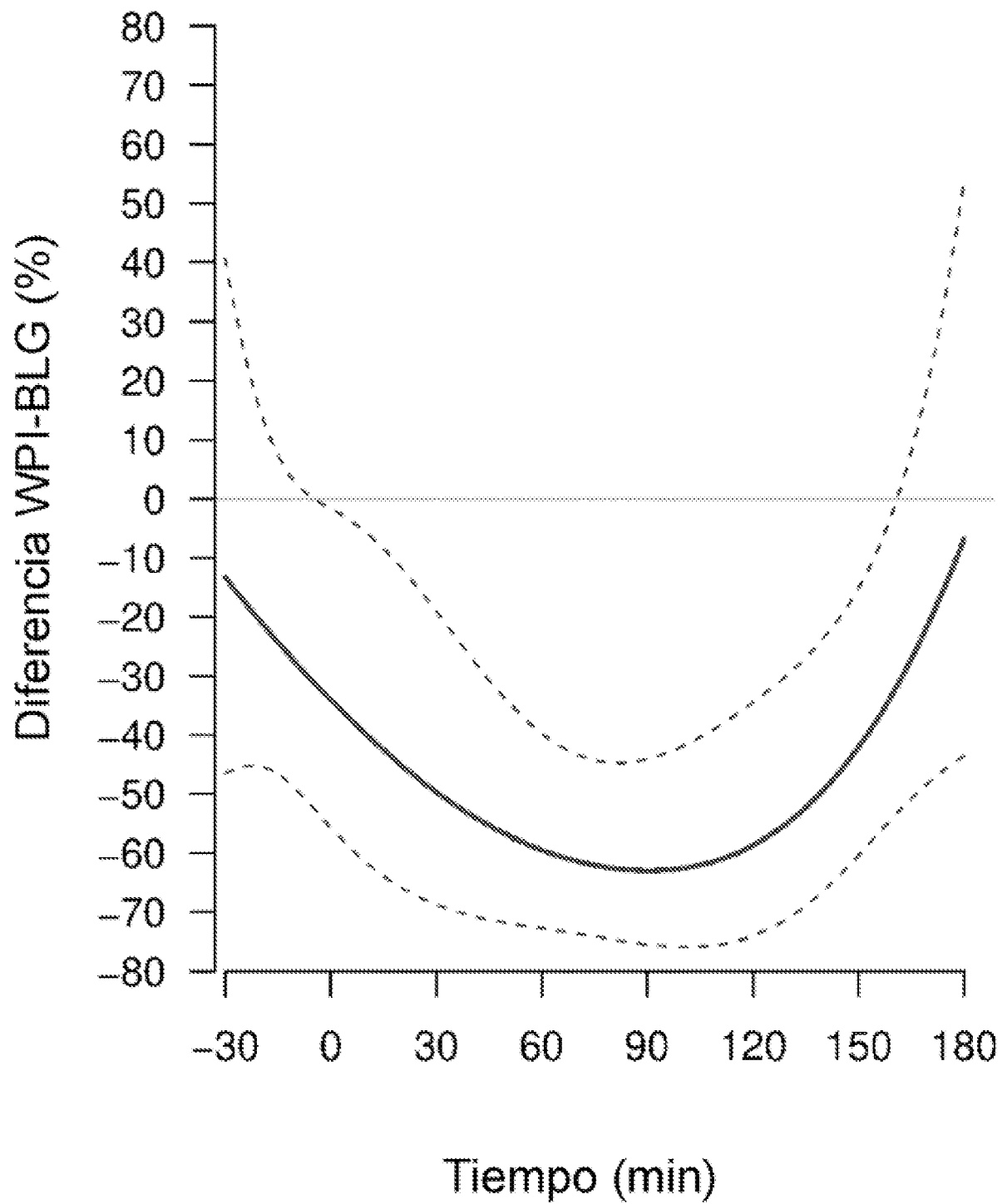


Figura 17 c

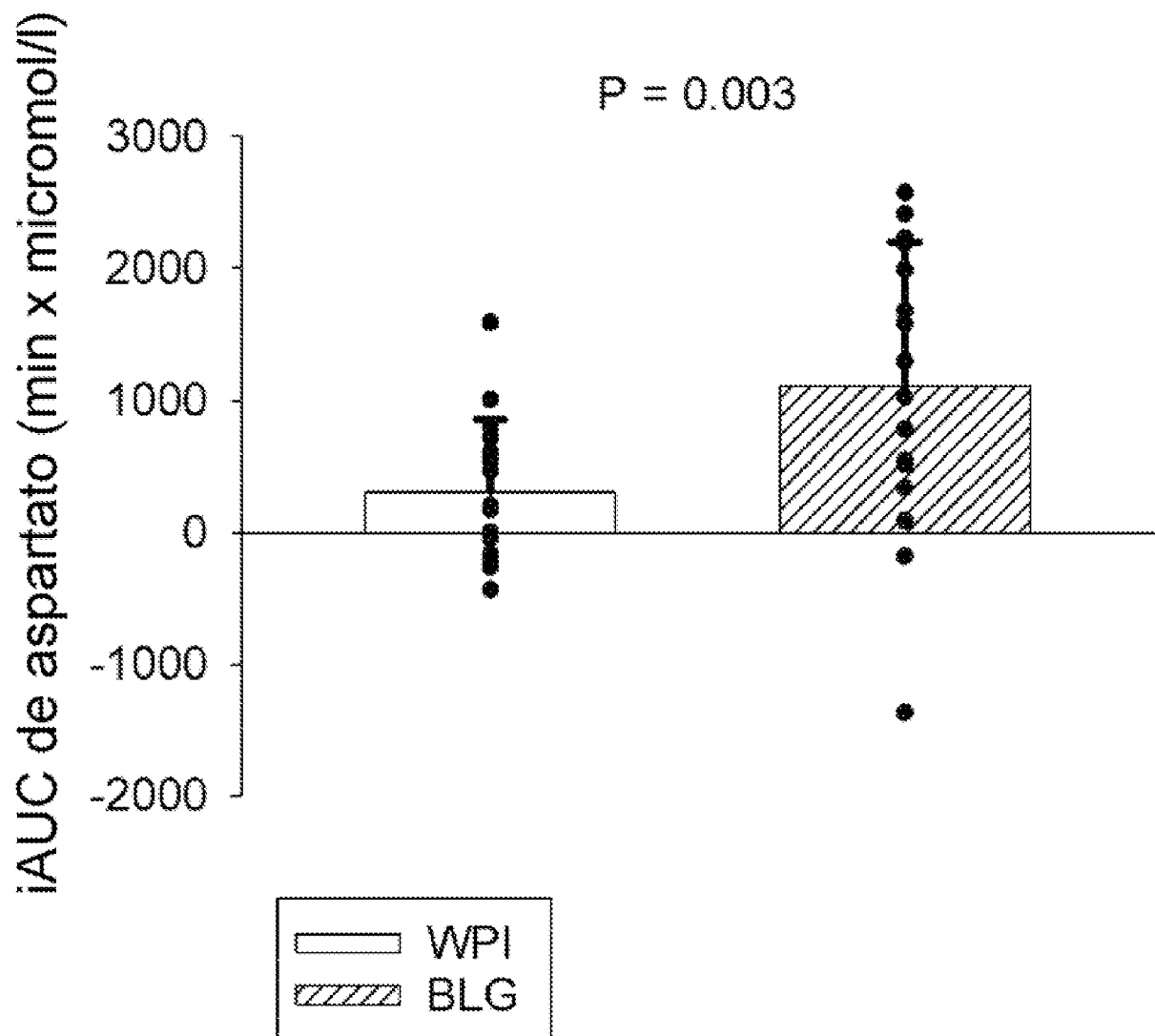


Figura 18 a

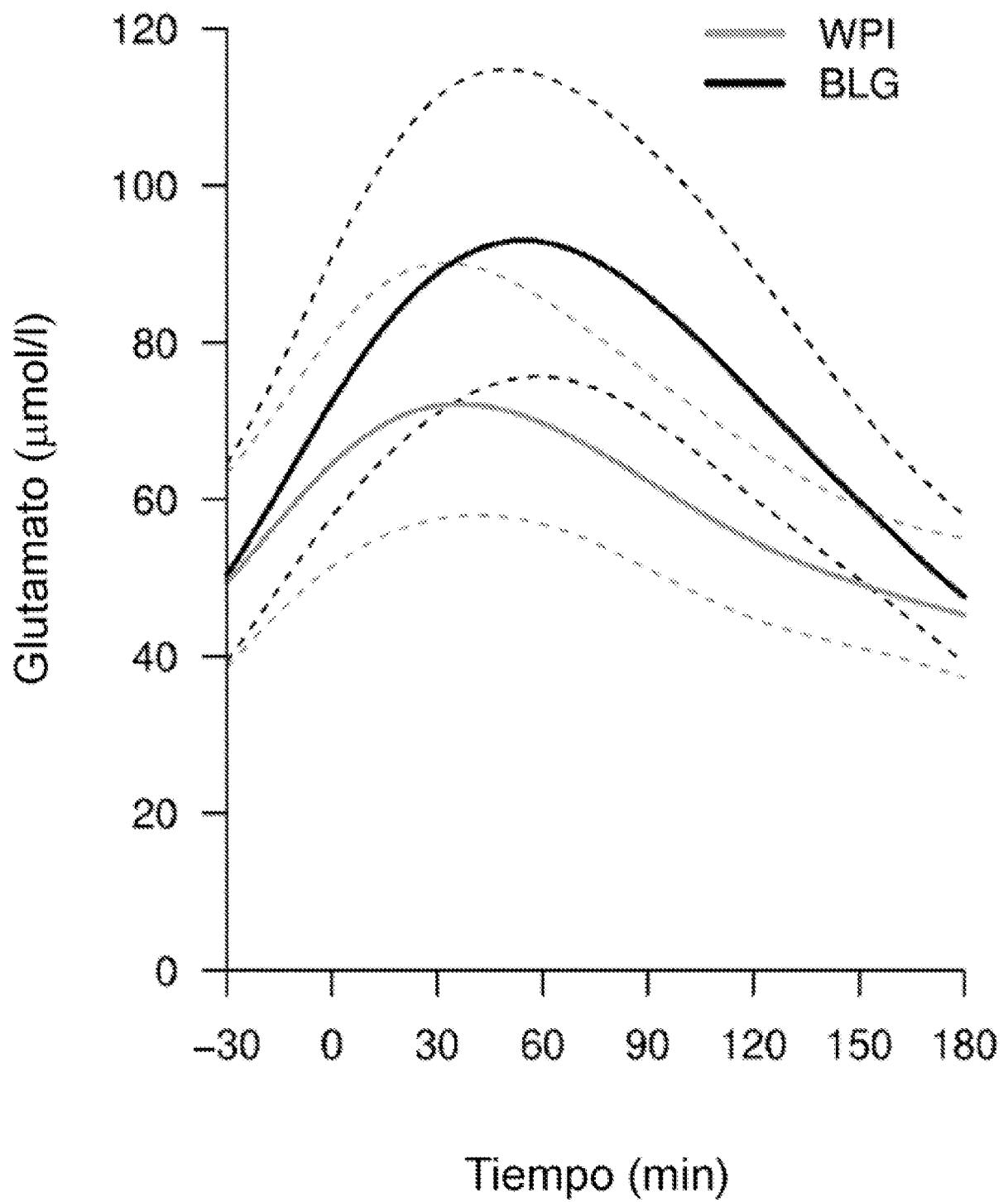


Figura 18 b

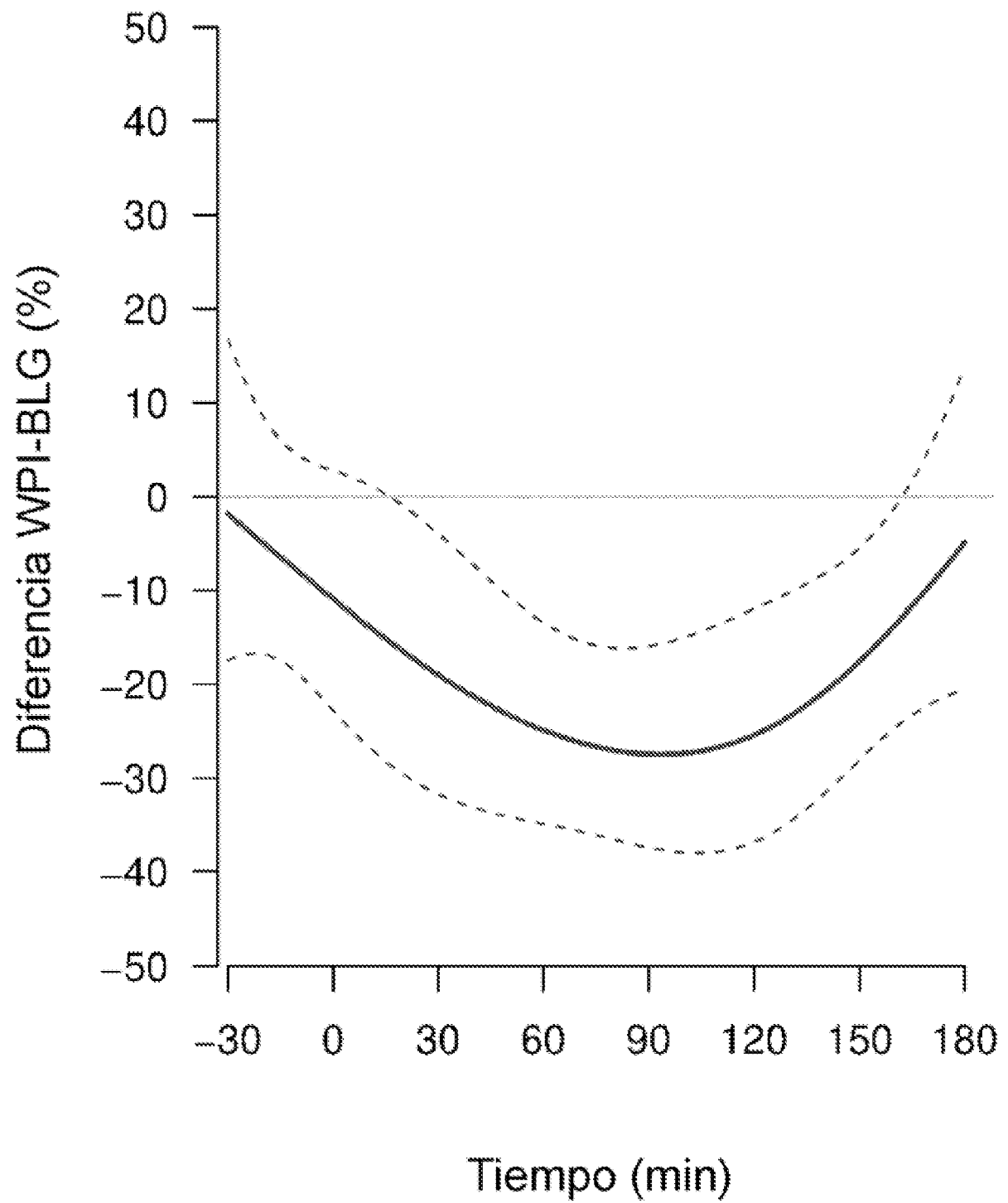


Figura 18 c

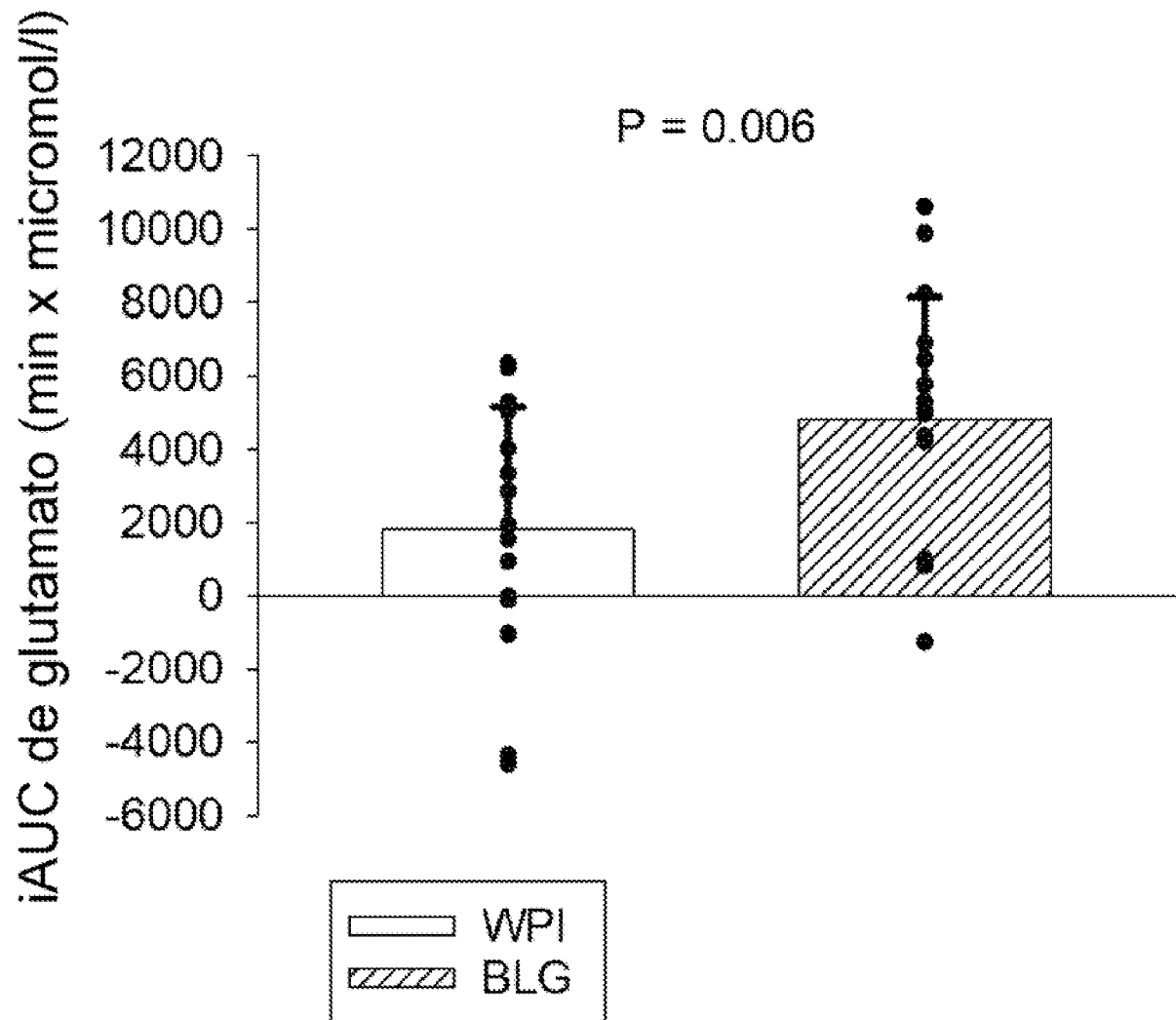


Figura 19 a

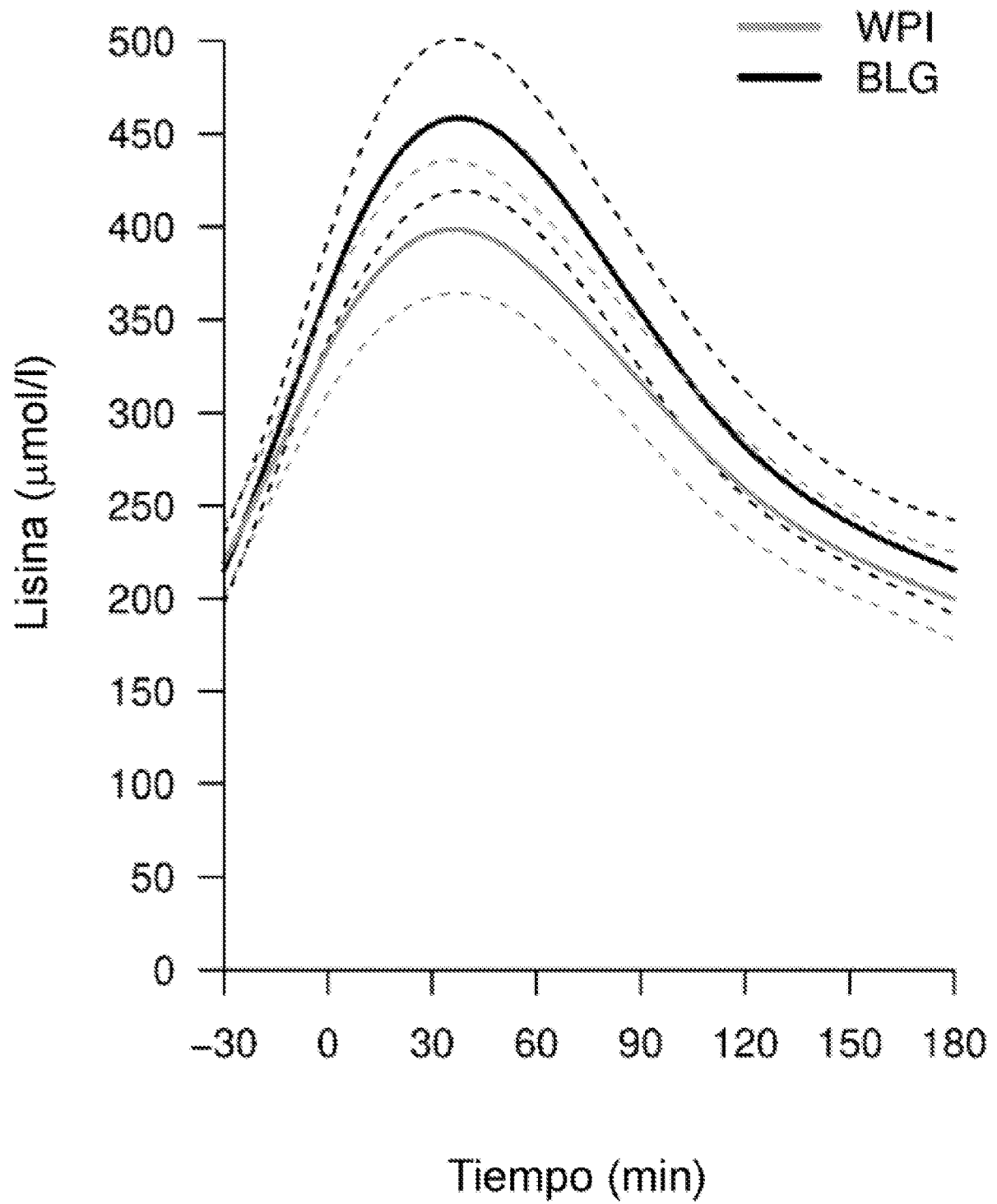


Figura 19 b

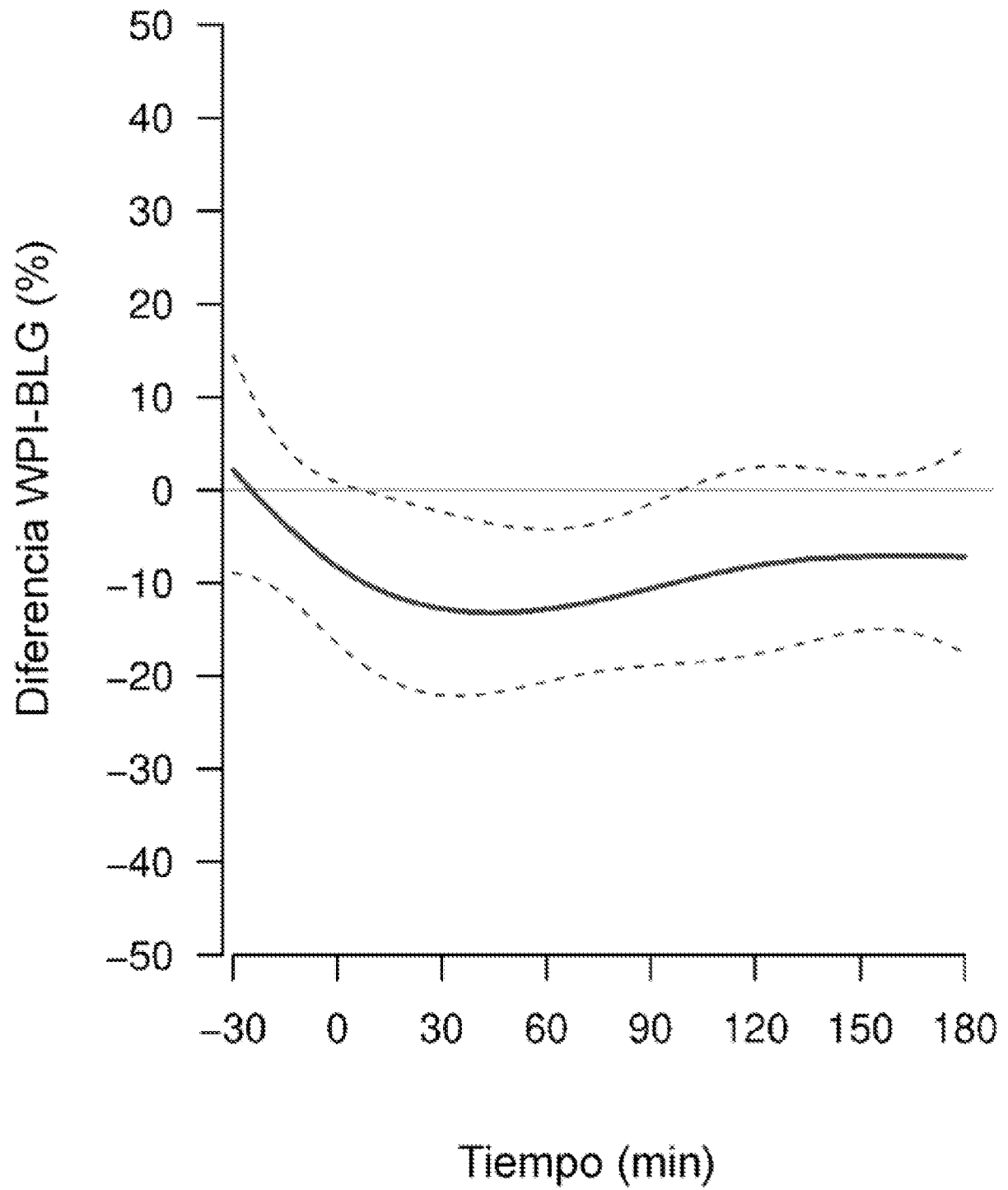


Figura 19 c

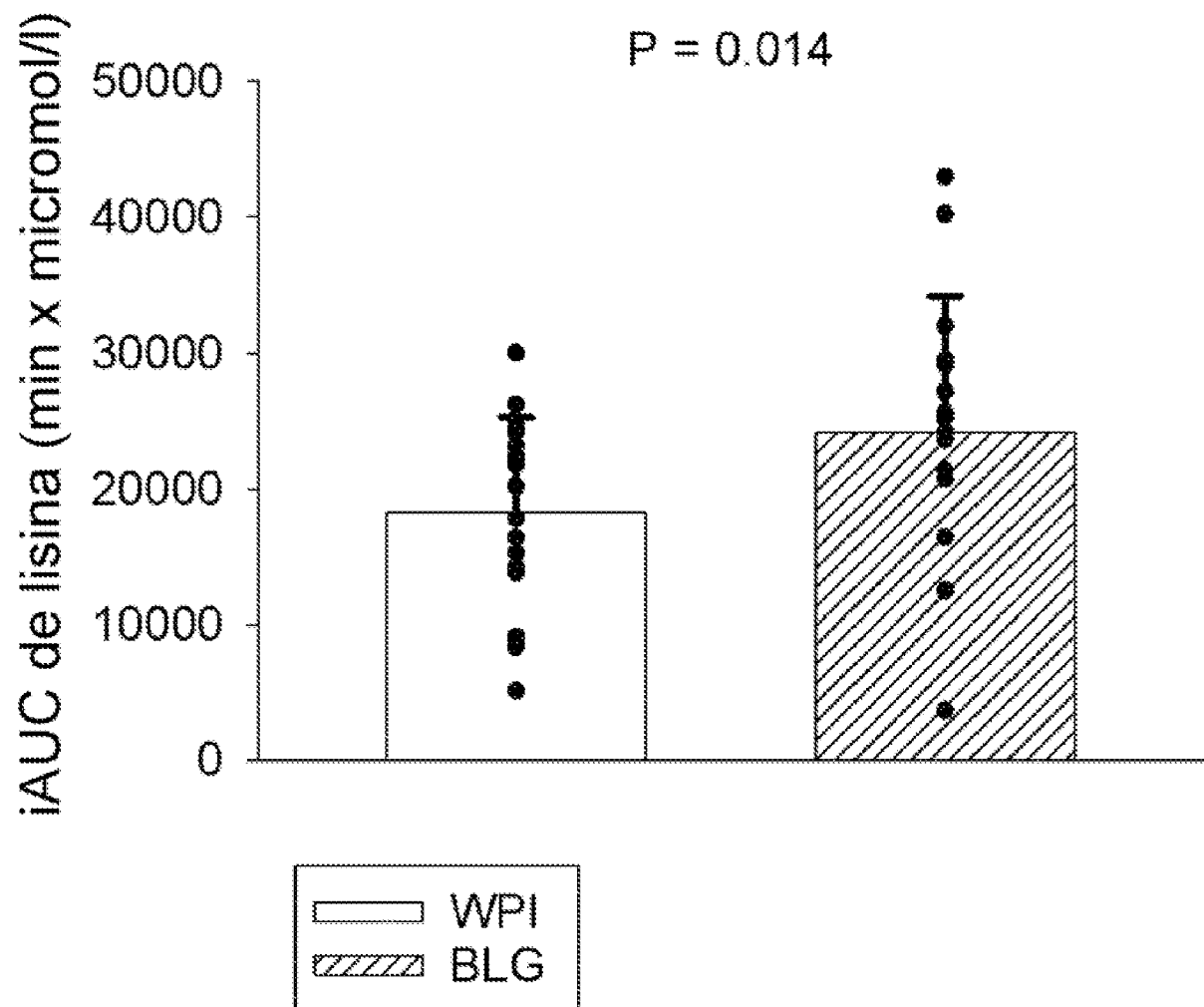


Figura 20 a

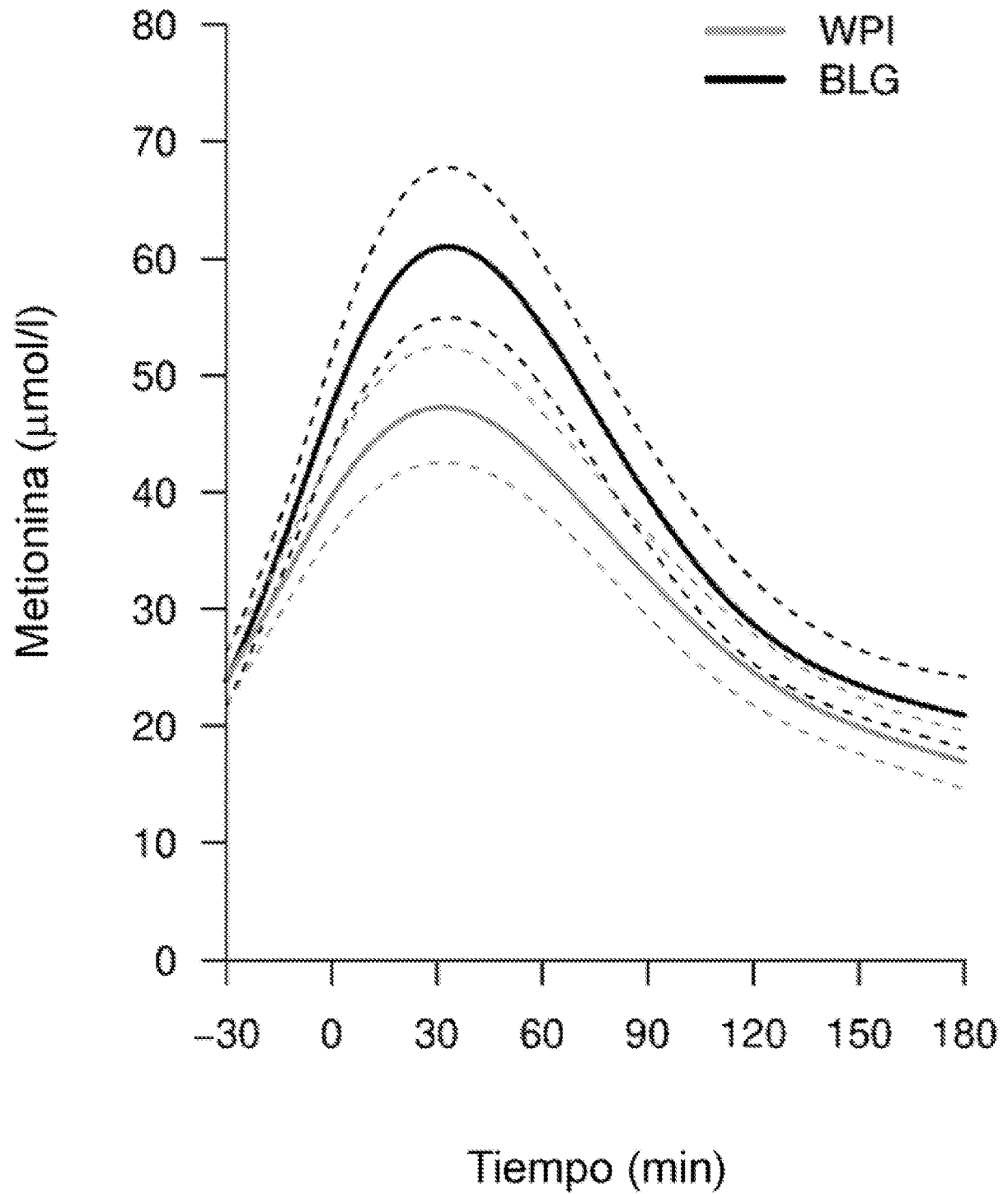


Figura 20 b

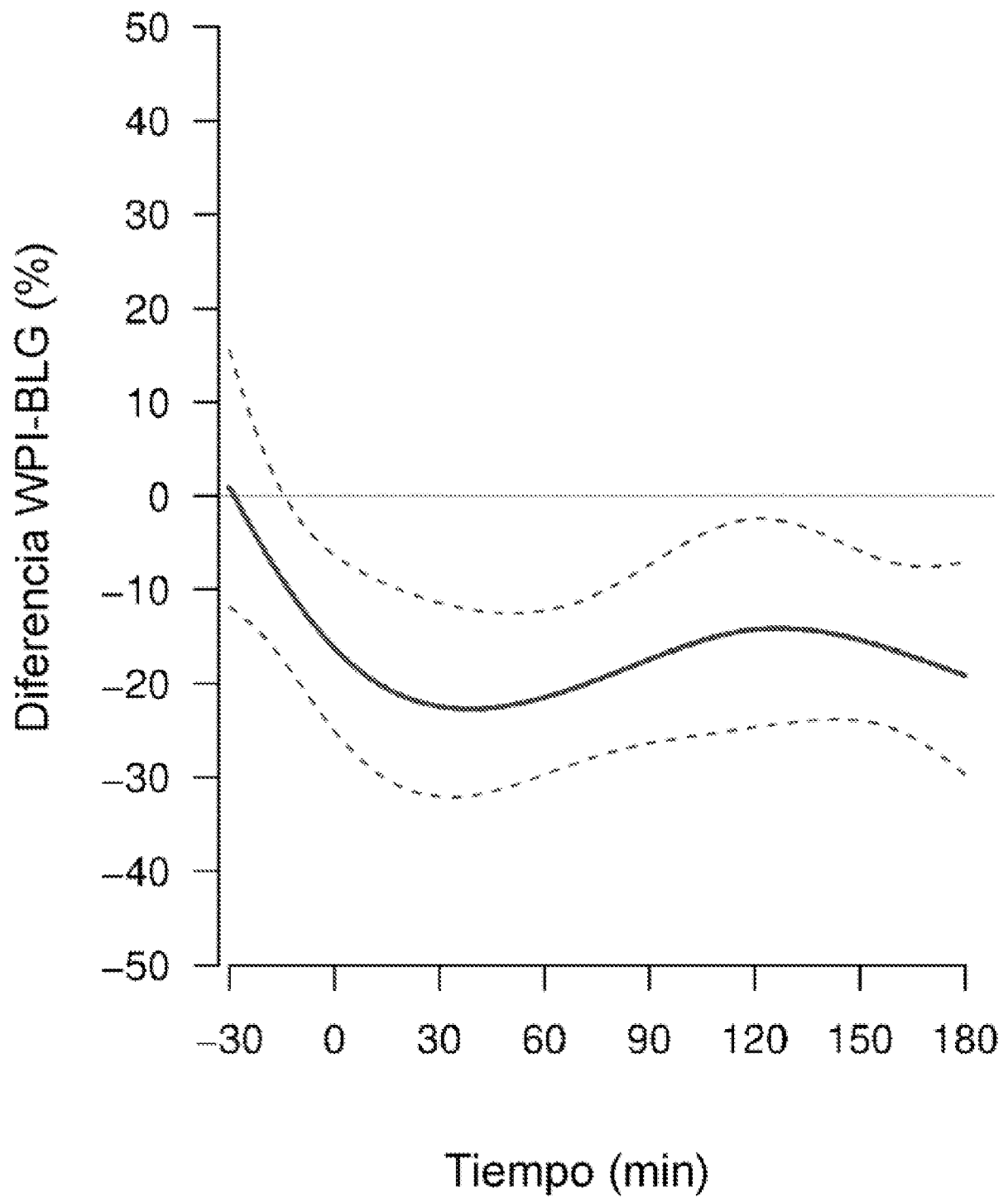


Figura 20 c

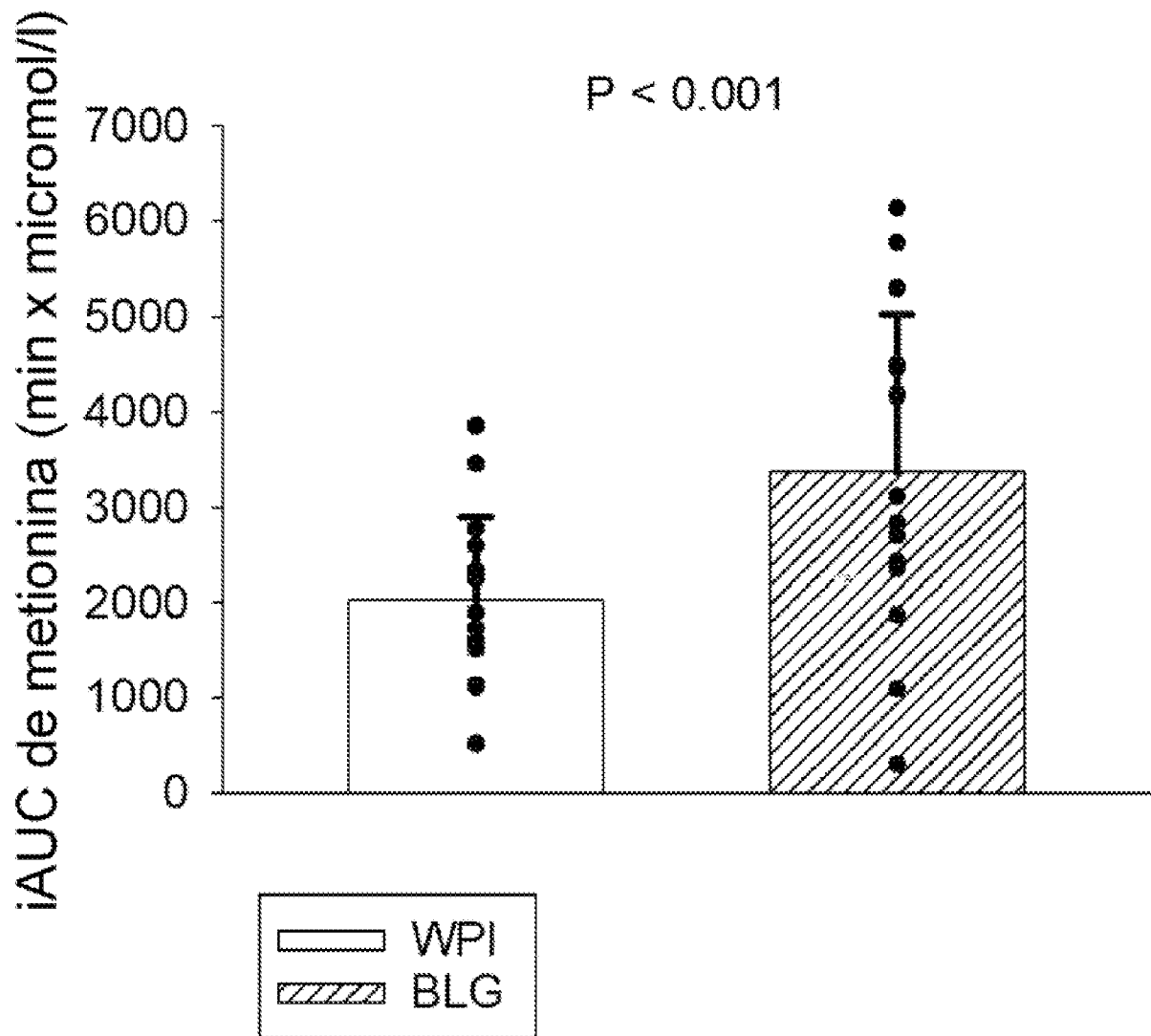


Figura 21 a

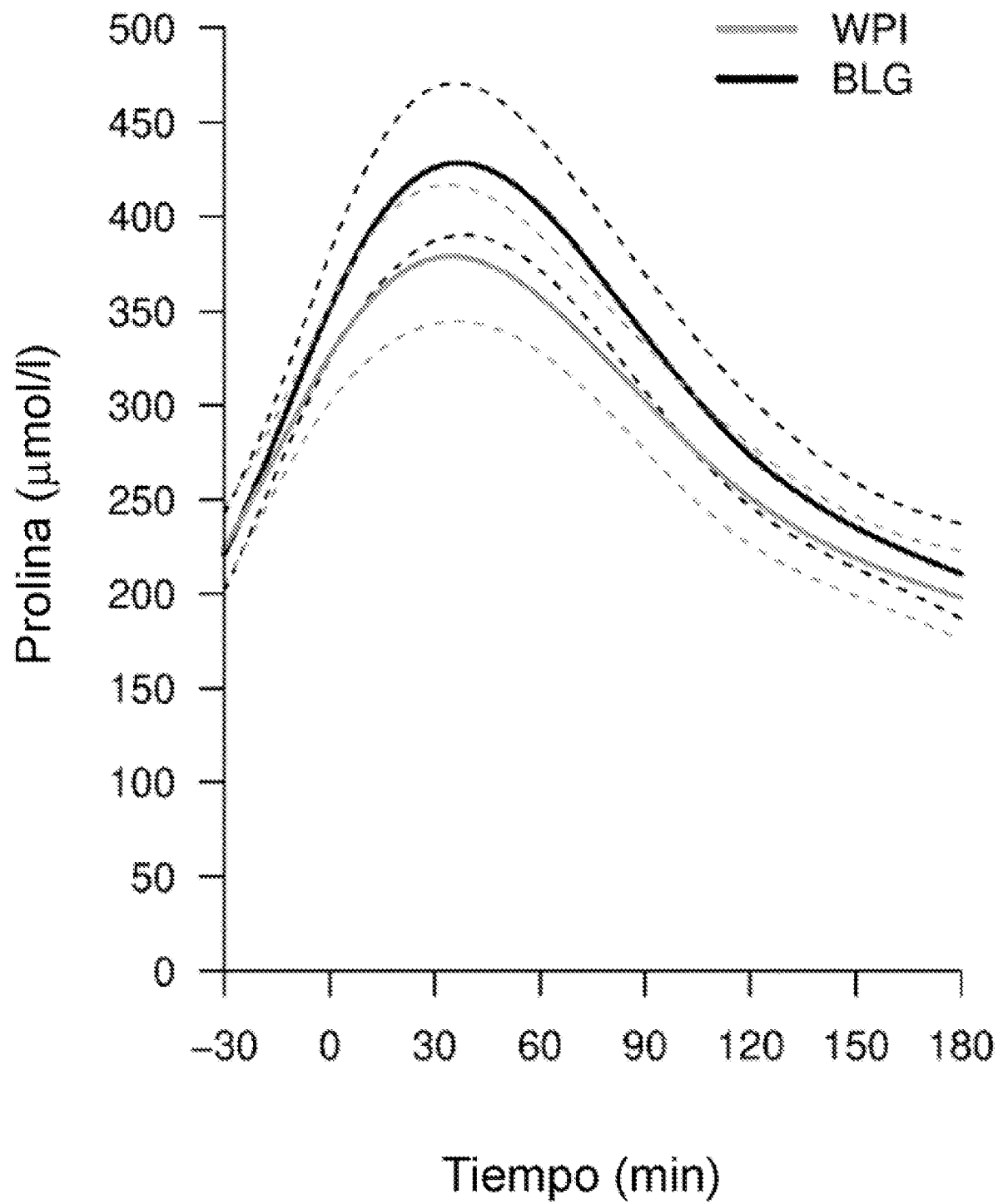


Figura 21 b

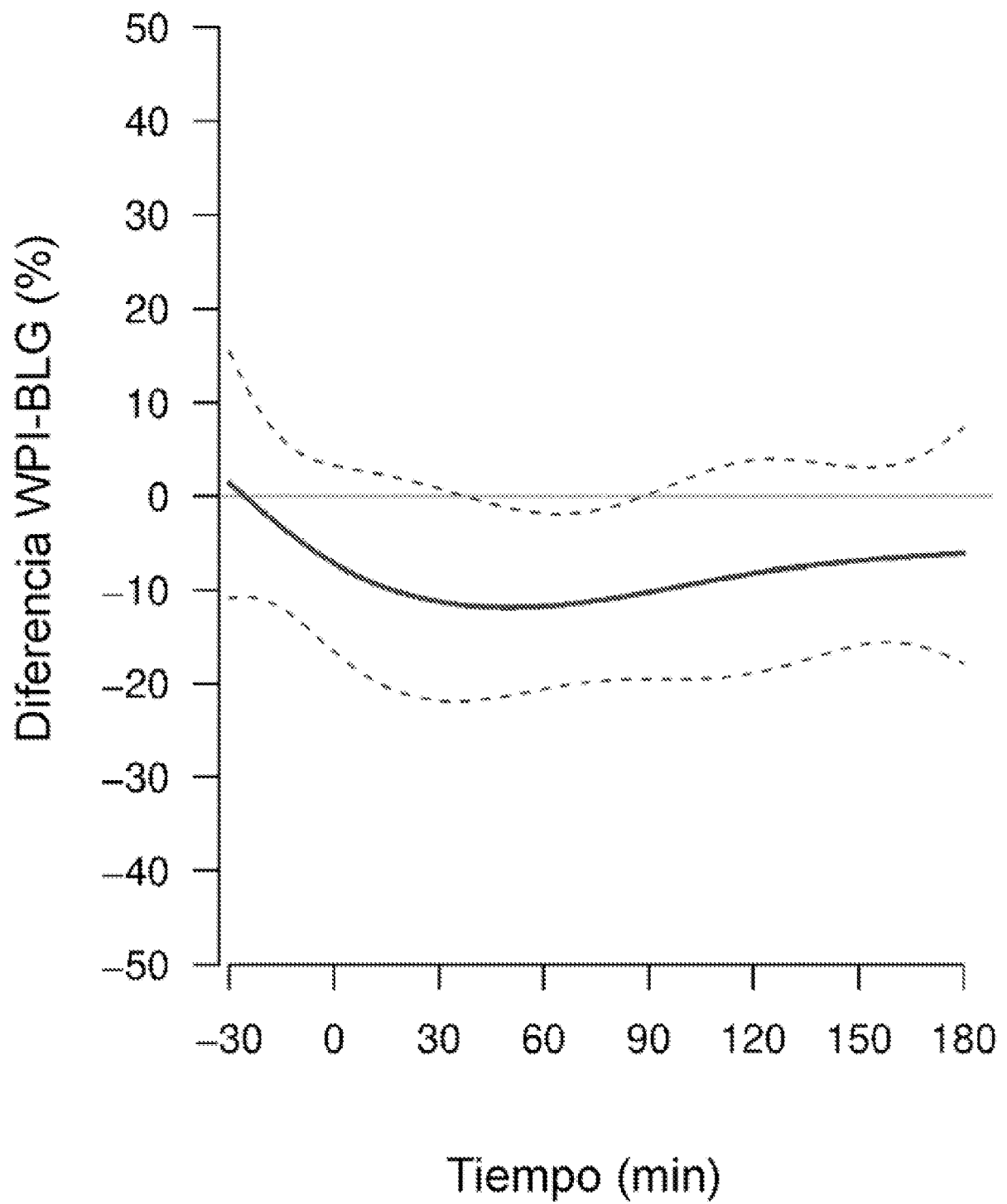


Figura 21 c

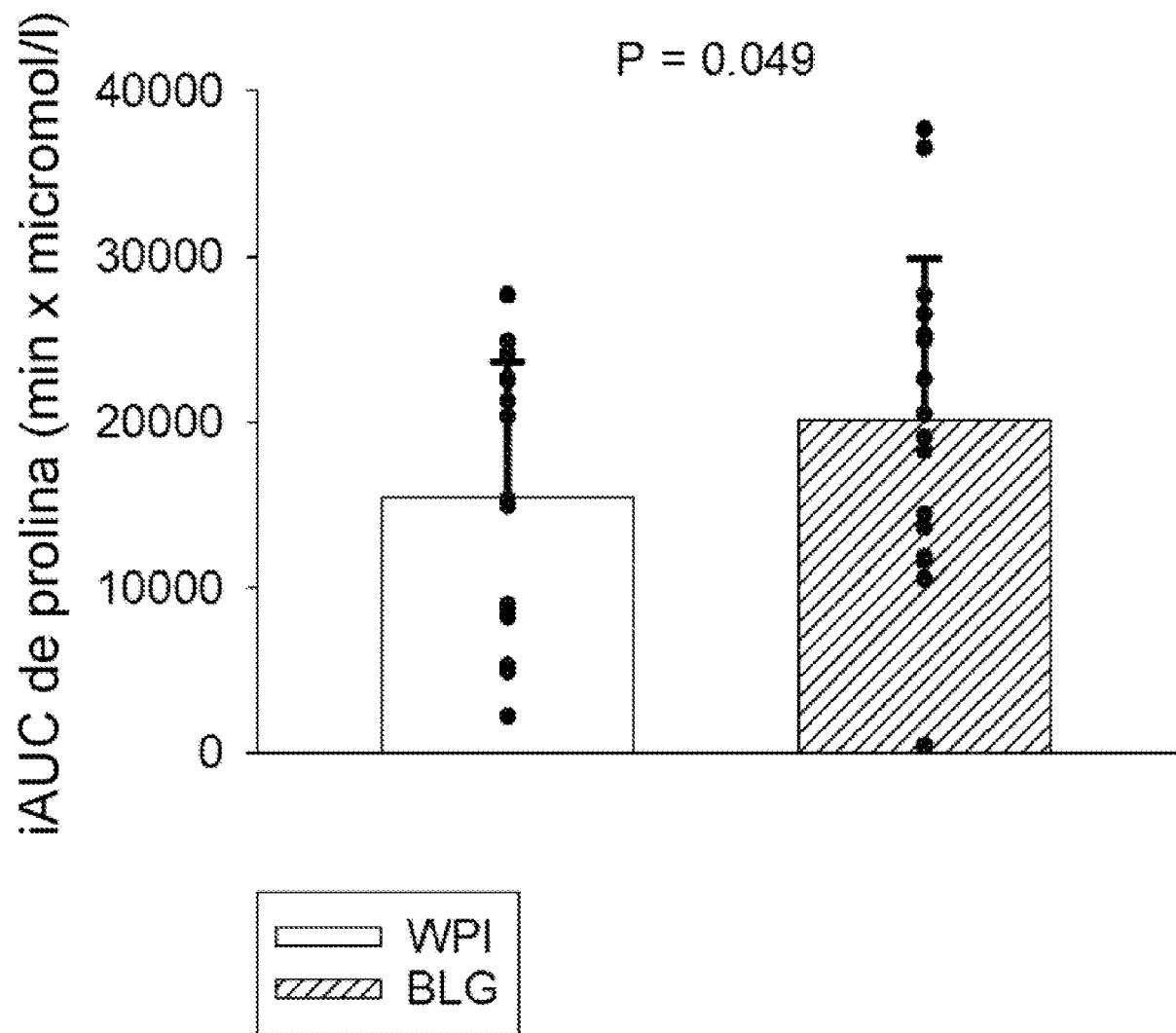


Figura 22 a

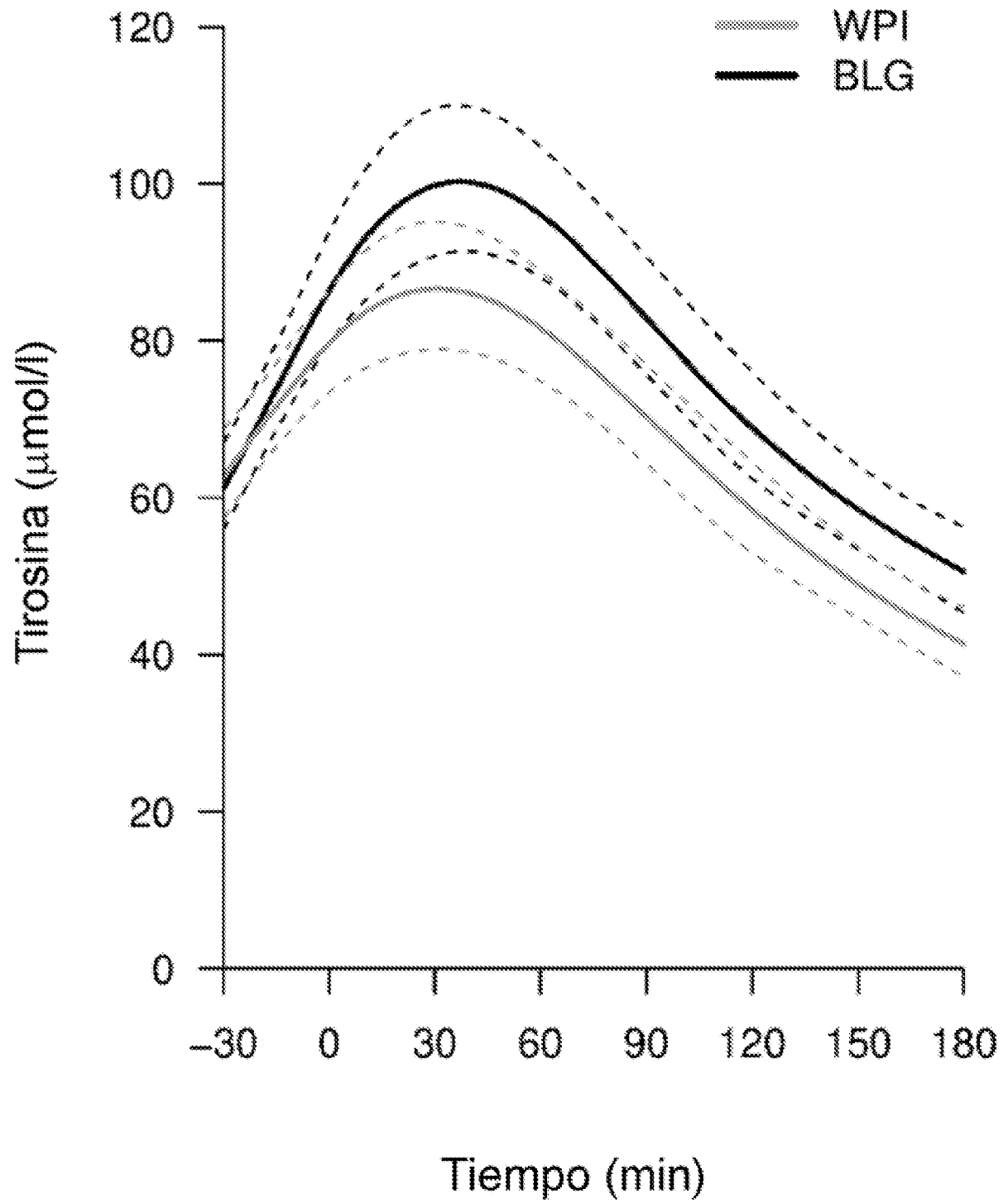


Figura 22 b

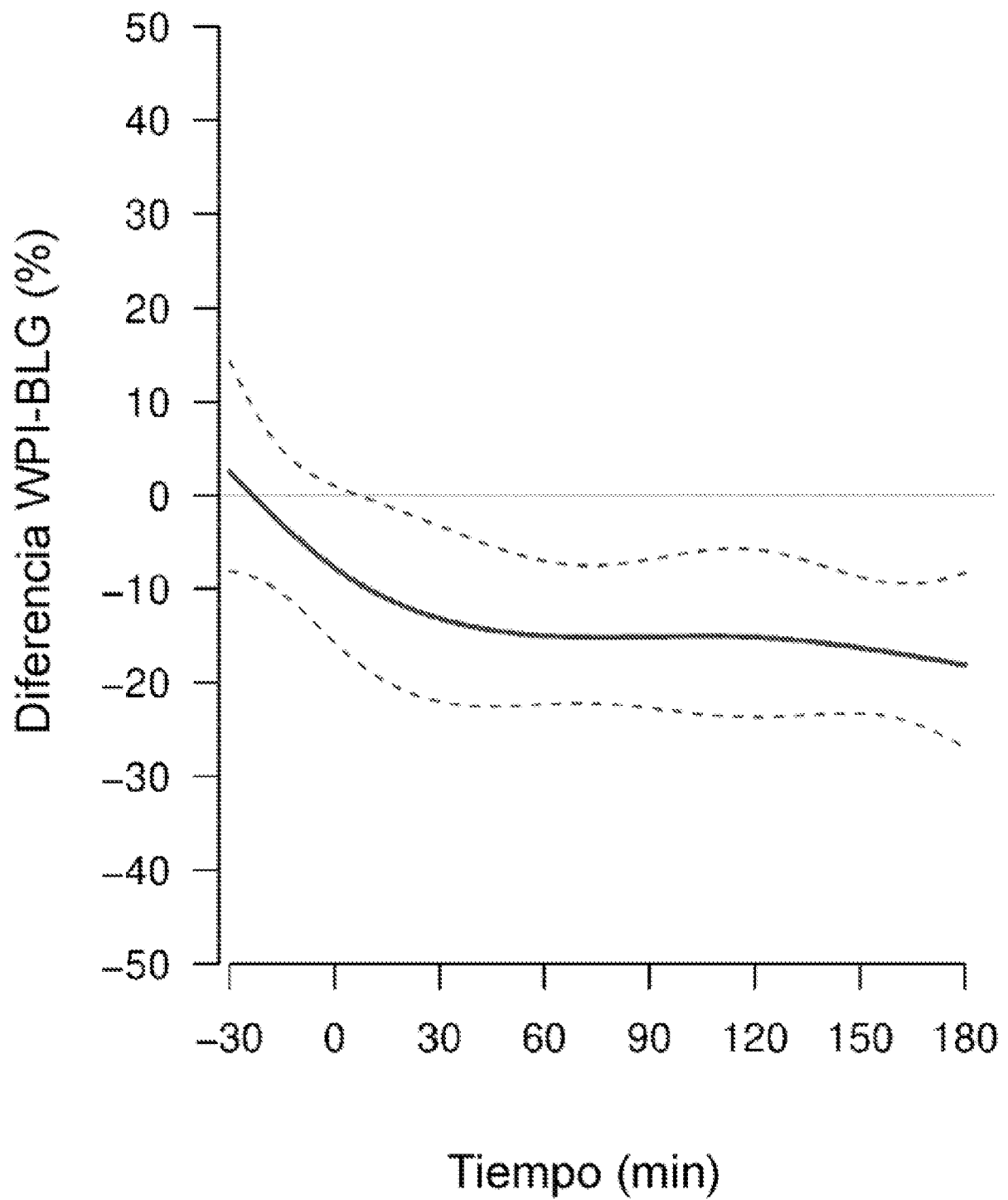


Figura 22 c

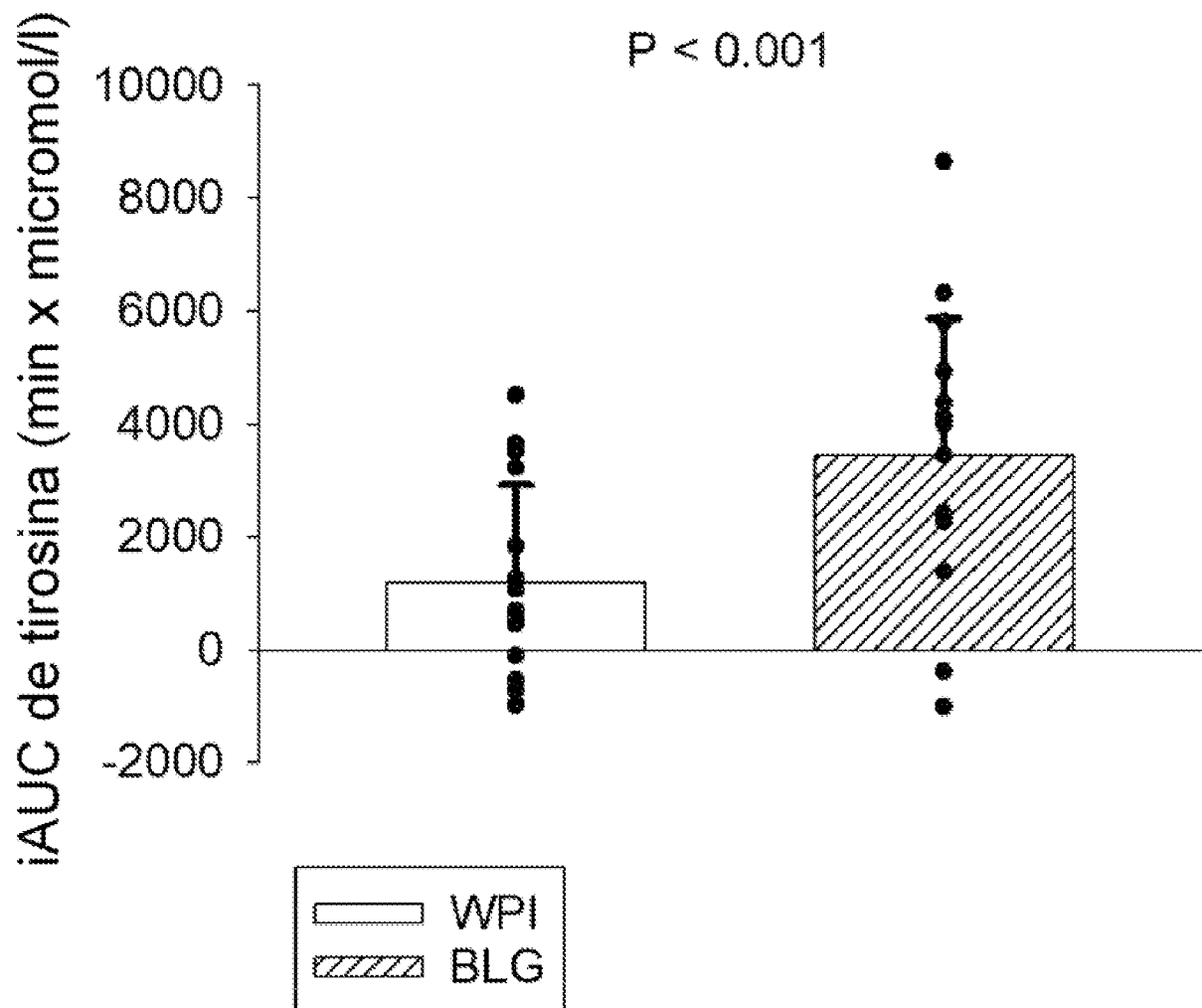


Figura 23 a

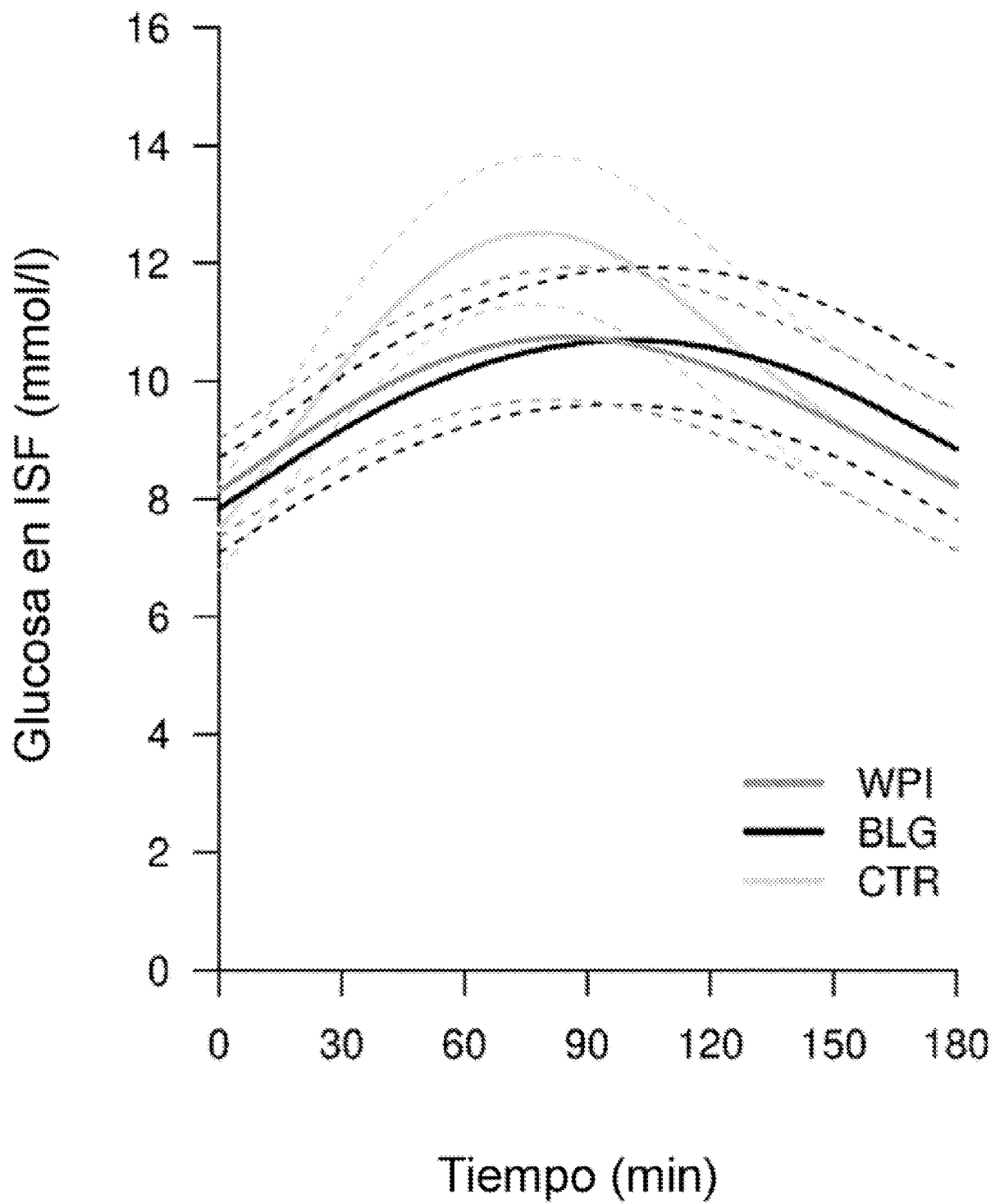


Figura 23 b

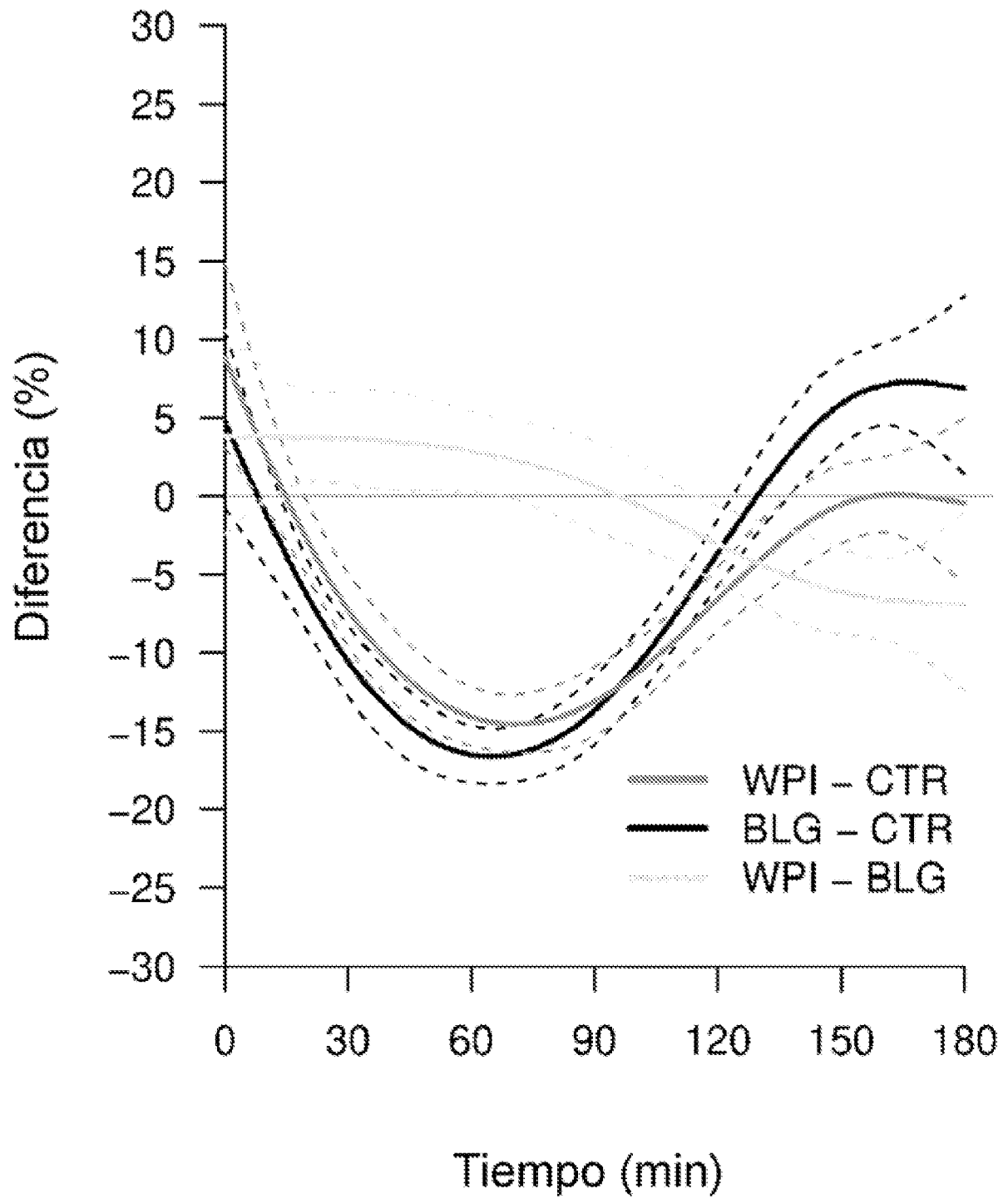


Figura 23 c

