



US01 1944649B2

2, Patente de Estados Unidos

(10) Patente n°: US 11.944.649 B2
(45) Fecha de Patente: 2 de abril de 2024

Castejón Semidey

(56) Referencias citadas

(54) **COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DEL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA**

DOCUMENTOS DE PATENTES EXTRANJERAS

(71) Solicitantes: **Immunotec Inc.**, Québec (CA); **AnaWO Maria Castejon Semidey**, Weston, FLWO(US)

2015'086789 6'2015
2018'057514 3'2018

(72) Inventor: **Ana Maria Castejon Semidey**, Weston, FL (US)

OTRAS PUBLICACIONES

(73) Cesionario: **IMMUNOTEC INC**, Vaudreuil-Dorion (CA)

Kern (Oral Tolerability of Cysteine-Rich Whey Protein Isolate in Autism-A Pilot Study, JANA vol. 11, n° 1, 2008). (Año: 2008).* Cassidy, A. (2013). Autism Behavior Checklist. en: Volkmar, F.R. (eds.) Enciclopedia de los Trastornos del Espectro Autista. Springer, Nueva York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1698-3_1367 (Año: 2013).*

(*) Aviso: Sin perjuicio de cualquier exención de responsabilidad, la duración de esta patente se proroga o ajusta en virtud de U.S.C. 154(b) en 456 días.

CUP (Asociación Comunidad-Universidad para el Estudio de la Infancia, la Juventud y las Familias (2011). Revisión de las Escalas de conducta adaptativa de Vineland-Segunda edición (Vineland-II). Edmonton, Alberta, Canadá. (Año: 2011).*

(21) N° de solicitud 16/634,946

Informe de búsqueda internacional y opinión escrita de la Administración encargada de la búsqueda internacional, de fecha 17 de octubre de 2018 en la solicitud internacional de patente n° PCT/US2018/044532.

31 de julio de 2018

(22) PCT presentado: **PCT/US2018/044532**

Anónimo: "Inmunocal para el autismo", www.immunocal.com, 26 de noviembre de 2016, pp. 1-4, XP002785177.

(86) PCT n°: § 371 (c)(1),

Al-Ayadhi et al., "La leche de camella como terapia potencial como

(2) Fecha: **29 de enero de 2020**

Antioxidante en el Trastorno del Espectro Autista (TEA)", Medicina Complementaria y Alternativa Basada en la Evidencia, 2013: 1-8 (2013).

(87) PCT Pub. No: **WO2019/027974**

Ozturk et al., "Desequilibrio oxidativo en niños y adolescentes con trastorno del espectro autista", Boletín de Psicofarmacología Clínica, 26(3): 257-264 (2016).

PCT Pub. Date: **7 de febrero de 2019**

Song et al., "Cysteine-rich whey protein isolate (Immunocal) ameliorates deficits in the GFAP.HM0X1 mouse model of schizophrenia", Free Radical Biology and Medicine, 110: 162-175 (2017).

(65) **Datos de publicación anteriores**

US 2020/0206270 A1 2 de julio de 2020

* citado por el examinador

Datos de aplicación relacionados en EE.UU.

(60) Solicitud provisional n° 62/599.079, presentada el 15 de diciembre de 2017, solicitud provisional n° 62/539.069, presentada el 31 de julio de 2017.

Examinador principal Terry A McKelvey
Jacob A Boeckelman

(51) **Int. Cl.** (2006.01)
A61K 35720 (2006.01)
A61K 38701 (2006.01)
A61P 25700

(74) *Abogado, Agente o Firma-* Wenderoth, Lind & Ponack, L.L.P.

(52) U.S. Cl. YPY *A61K 35720* (2013.01); *A61K 387018* (2013.01); **A61P 25700** (2018.01)

(57) **RESUMEN**

Se proporcionan composiciones, usos de las mismas y métodos para tratar el autismo o el trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, en el que las composiciones comprenden un aislado de proteína de suero y/o un concentrado de proteína de suero.

(58) **Campo de búsqueda de clasificación** CPC A61K 35/20
Consulta el expediente de solicitud para ver el historial de búsqueda completo.

4 reclamaciones, 6 hojas de dibujo

FIGURE 1

Intracellular ROS Production at Baseline in LCLs from Autistic Children vs Controls - Raw Data

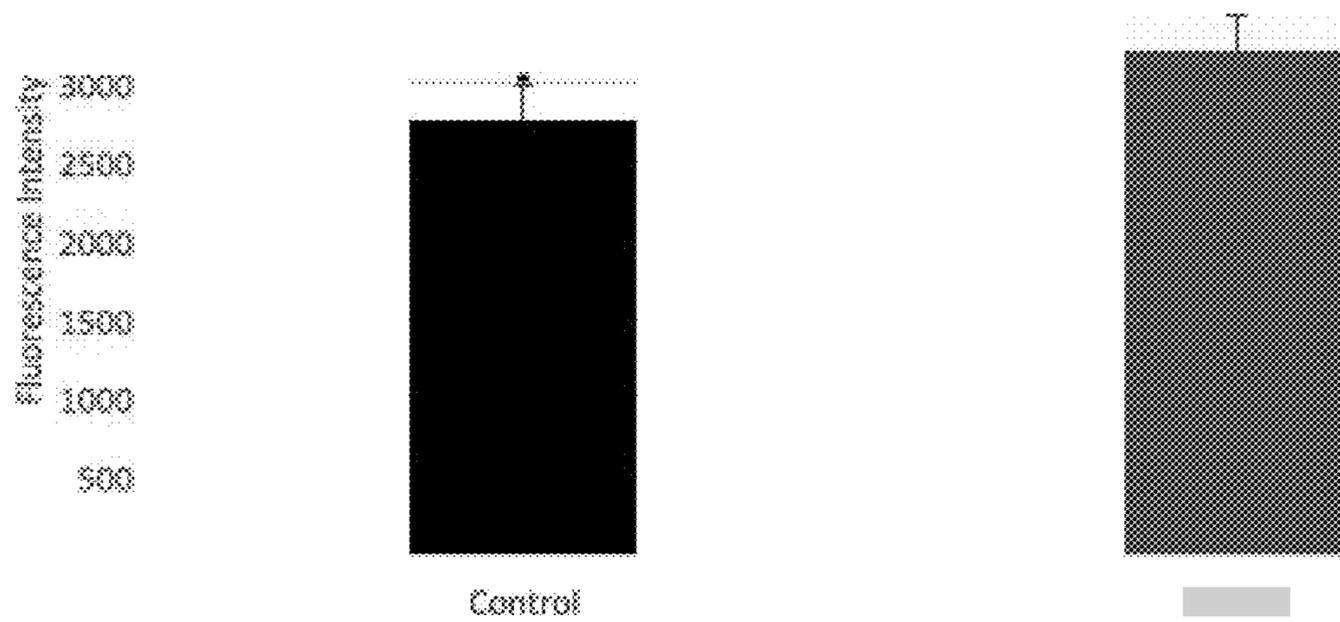


FIGURA 2

Producción ROS intracelular Tras Tratamiento con Peróxido de
Hidrógeno H₂O₂
LcSs de Autistic Children vs controls. Datos brutos

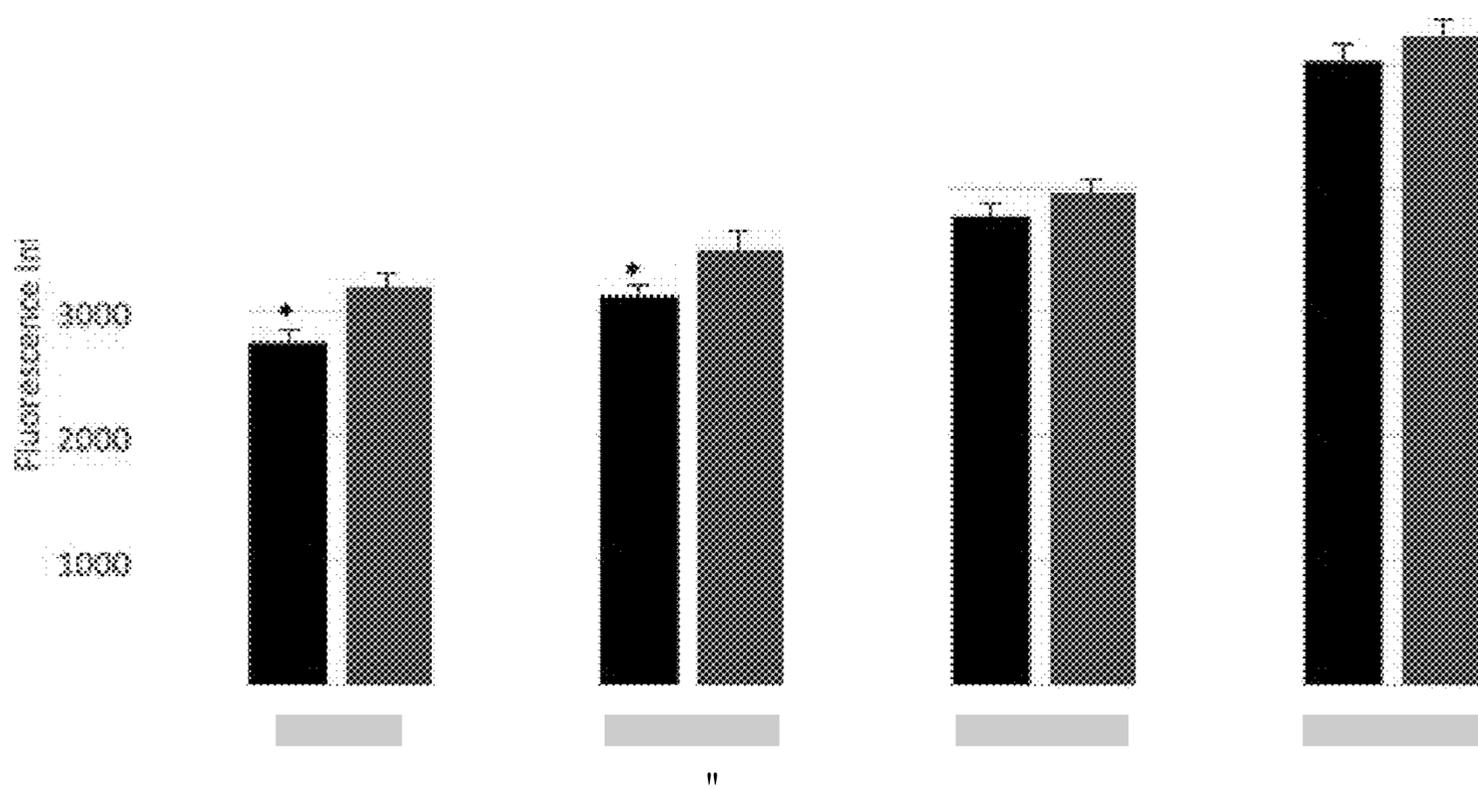


FIGURA 3

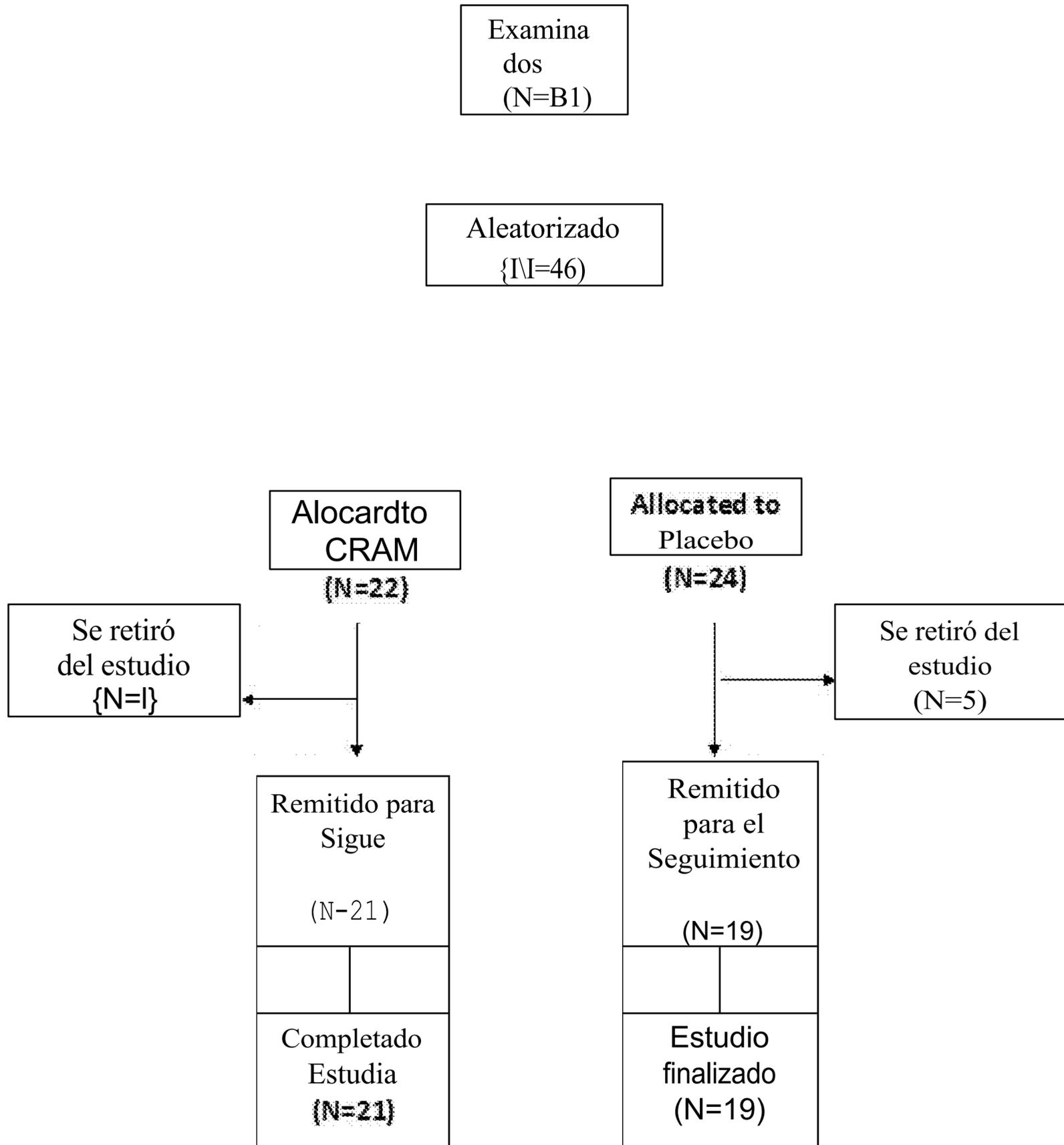


FIGURA 4

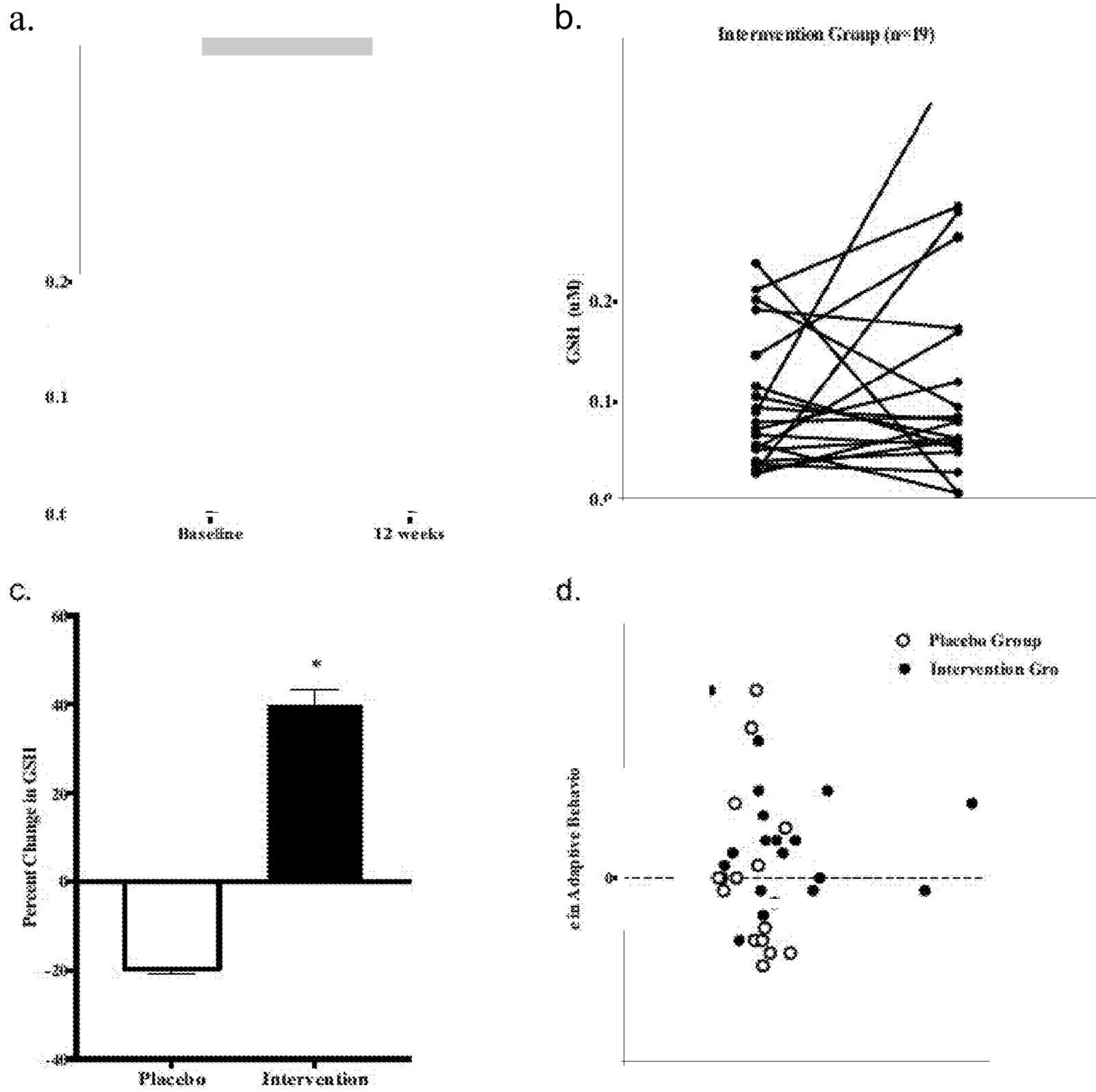


FIGURA 5

Cambio en las puntuaciones de la Escala de Comportamiento Adaptativo de Vineland en: los grupos no respondedores y respondedores

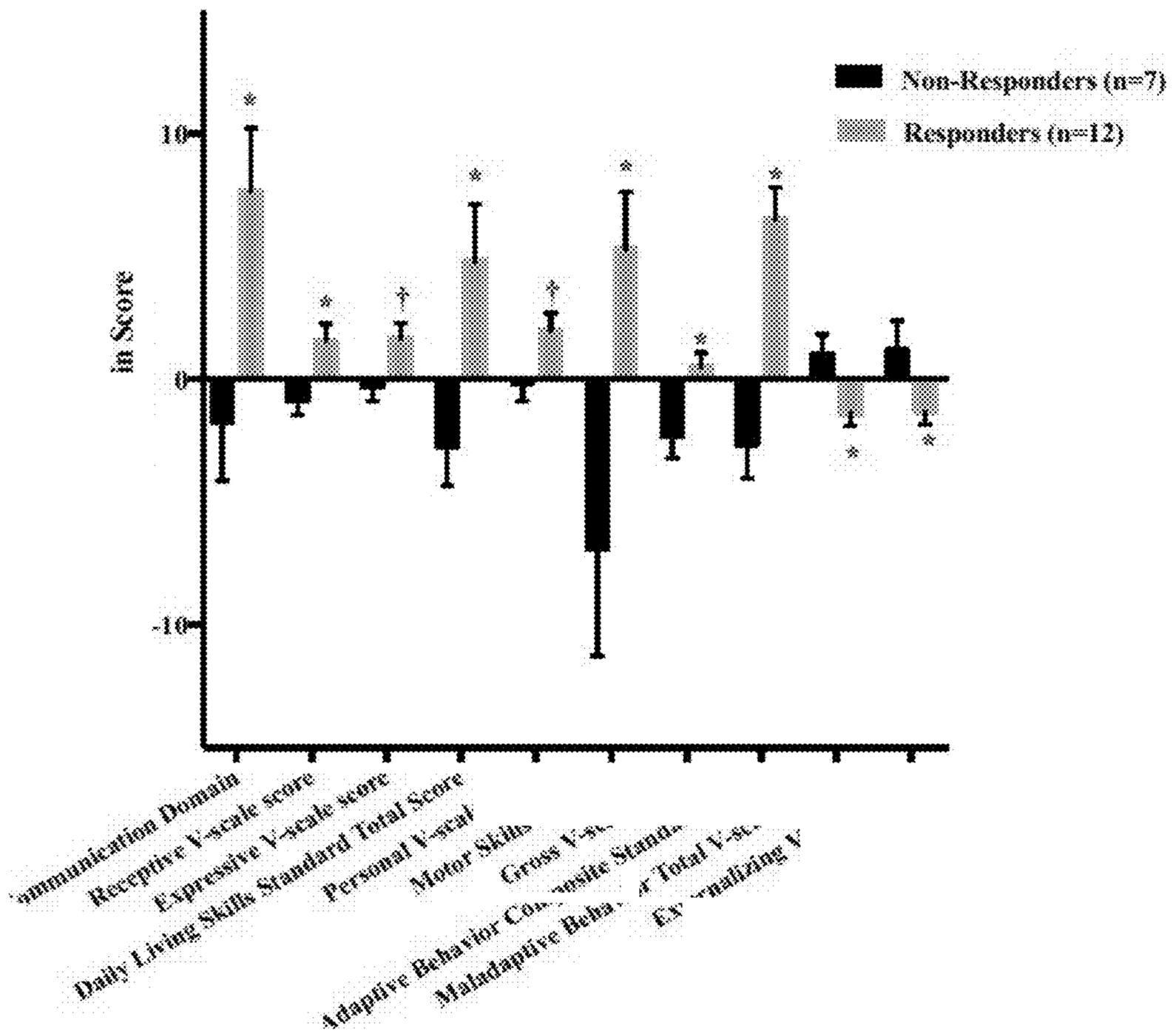
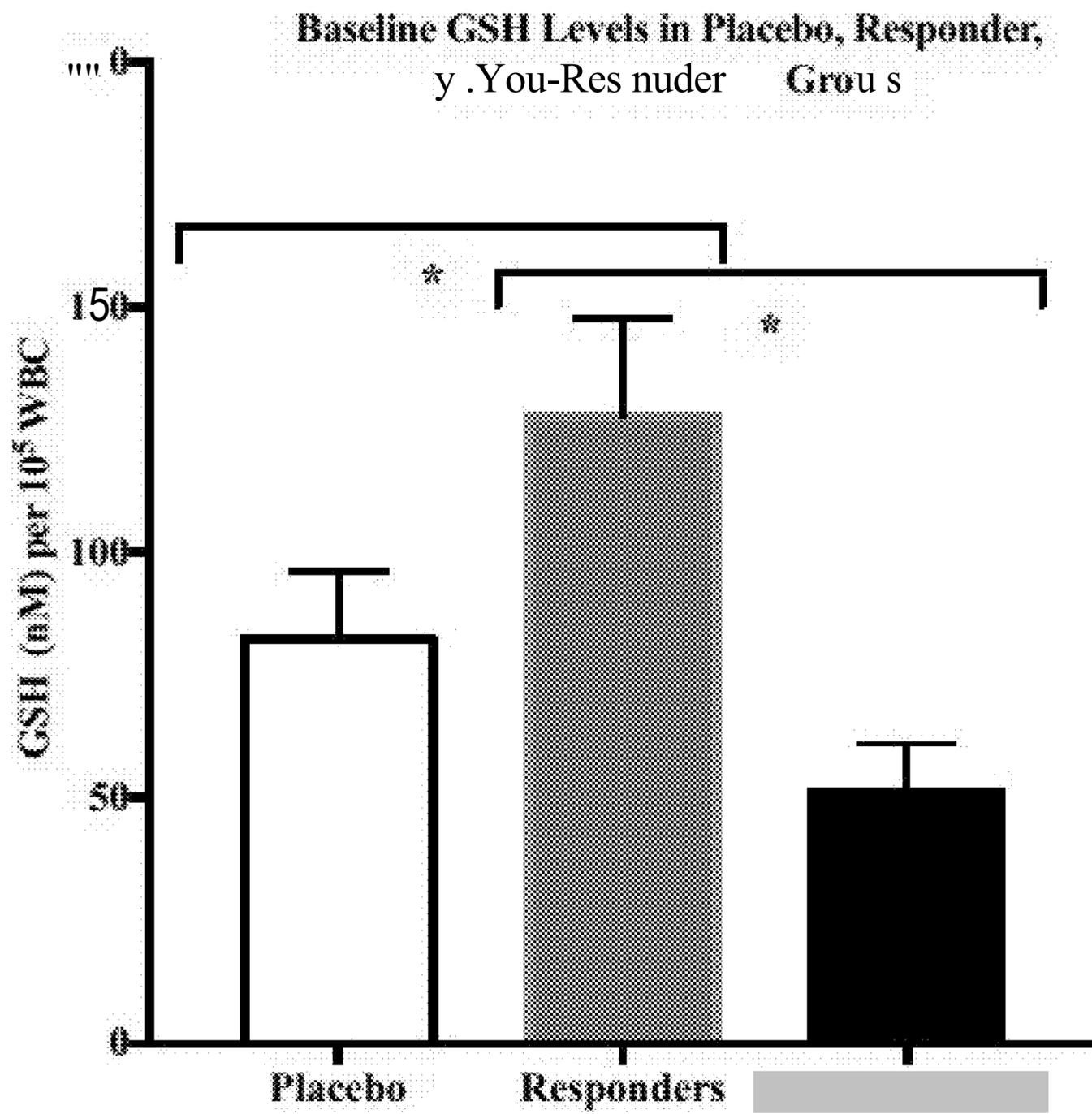


FIGURA 6



COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DEL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general al tratamiento del trastorno del espectro autista (TEA). Más concretamente, la presente invención se refiere a composiciones y métodos para tratar y/o prevenir y/o mejorar los síntomas del TEA y/o controlar el autismo y las afecciones relacionadas.

ANTECEDENTES

Los Trastornos del Espectro Autista (TEA) suelen asociarse a características de comportamiento que incluyen una interacción social limitada, falta de comunicación verbal y/o patrones de comportamiento estrechos y repetitivos. El autismo es uno de los trastornos del desarrollo de más rápido crecimiento en EE.UU., y se calcula que afecta a entre 1 y 1,5 millones de estadounidenses. La incidencia del TEA se estima en aproximadamente 1 de cada 68 niños, y los niños tienen aproximadamente cuatro veces más probabilidades de padecer autismo que las niñas. Actualmente se carece de técnicas para la detección médica del autismo, y no existe cura conocida.

El autismo es un trastorno complejo del neurodesarrollo que afecta a 1 de cada 68 niños en Estados Unidos, y el número de varones diagnosticados es cuatro veces superior al de mujeres (Christensen et al. 2016; CDC 2016). El espectro de deficiencias observadas en este trastorno ha acuñado el término general "Autismo Espec-
Trastorno del espectro autista" (TEA). La quinta edición del Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-V) define el TEA como la presencia de "déficits en la interacción social y la comunicación, junto con conductas e intereses restringidos y repetitivos" (Asociación Psiquiátrica Americana, 2013). Los síntomas clínicos se utilizan para diagnosticar a los niños con autismo en torno al inicio a los tres años de edad; se utiliza una miríada de evaluaciones conductuales con fines diagnósticos del autismo, con el Programa de Observación Diagnóstica del Autismo (ADOS) (Lord et al. 1989; 2000) como estándar. A pesar de la amplia investigación realizada, no se ha detectado ninguna ayuda definitiva para el diagnóstico o el tratamiento (Loke, Hannan y Craig 2015). Los programas de intervención temprana y la escolarización especial son los más eficaces para quienes padecen este trastorno del neurodesarrollo y, aunque los resultados de la intervención temprana varían, todos los niños se benefician (Alabdali, Al-Ayadhi y El-Ansary 2014). Una combinación de análisis conductual aplicado (ABA) junto con otras terapias educativas, de desarrollo, ocupacionales y del habla son habituales en los niños afectados, con resultados limitados (Frye et al. 2017). Existe una gran necesidad de otros tratamientos eficaces para los síntomas básicos del autismo.

El autismo se documentó por primera vez como trastorno mental en 1980 y aún no se ha determinado su etiología exacta. La heterogeneidad del TEA puede observarse en los sistemas neurológico, metabólico e inmunológico. Por tanto, se especula que es un trastorno multifactorial, en el que intervienen factores epigenéticos, genéticos y ambientales.

El estrés oxidativo se ha asociado a varias

25,5+/-8,9 en el control frente a 8,6+/-3,5 en el TEA). Estudios anteriores han sugerido que los niños con autismo pueden tener una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo, ya sea ambiental, intracelular o ambos (James et al., 2004; 2006; 2009;

⁵ Melynk et al., 2012; Rose et al., 2012; Frye et al., 2013).

Además, el deterioro de la capacidad de metilación puede estar relacionado con el desarrollo y/o la manifestación clínica del trastorno autista.

Los informes anecdóticos y la opinión pública sugerían que los no

¹⁰ aislado de proteína de suero desnaturalizado podría ser problemático para los niños con autismo debido a la presencia de cisteína y otros aminoácidos sulfurados. Para examinar mejor la tolerabilidad del aislado de proteína de suero no desnaturalizado en niños con autismo, Kern et al. (Oral Tolerability of Cysteine-Rich

¹⁵ Whey Protein Isolate in Autism-A Pilot Study, JANA, 11(1), 2008, 36-41; aquí incorporado por referencia en su totalidad) realizó un estudio que sugería que el aislado de proteína de suero no desnaturalizado (en este caso, ImmunocalB) puede utilizarse sin tasas elevadas de efectos secundarios. Aunque este

²⁰ estudio sugirió que el aislado de proteína de suero no desnaturalizado puede ser seguro y tener una tolerabilidad aceptable en niños

con autismo o TEA, el criterio de valoración principal examinado se limitaba a la tolerabilidad. Estos estudios no fueron suficientes para obtener datos estadísticamente significativos sobre los cambios en la conducta.

parámetros iourales o mejora del estado. Los datos recogidos eran insuficientes para el análisis estadístico. Kern et al. indican que debe tenerse precaución al interpretar los limitados datos sobre el comportamiento. En consecuencia, los efectos del aislado de proteína de suero no desnaturalizado sobre los niveles de GSH y el comportamiento

enfermedades/trastornos en humanos. El estrés oxidativo puede desempeñar un papel en el TEA, y algunas investigaciones se han centrado en los cambios en la vía de transulfuración metionina-glutación (James, S. J., et al., 2006, American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics), 141B: 947- 956).

Se ha observado deficiencia de glutación en el plasma de niños con autismo (GSH (Mmol/L): 7,6+/-1,4 en control frente a TEA; Glutación oxidado (nmol/L): 0,32+/-0,1 en control frente a 0,55+/-0,2 en TEA; Relación GSH:GSSG:

30 en niños con autismo o TEA seguía siendo desafiante. US 11:944.649 B2

Son deseables composiciones y métodos alternativos, adicionales y/o mejorados para el tratamiento de los trastornos del espectro autista, y de rasgos o síntomas particulares de los mismos.

2

35 RESUMEN DE LA INVENCION

Ahora se ha descubierto que el tratamiento con una composición que comprende aislado de proteína de suero y/o con- centrado de proteína de suero puede utilizarse para tratar el autismo en un sujeto que lo necesite.

40 del mismo. Los estudios descritos en detalle en el presente documento indican que el tratamiento con una composición que comprenda aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero, como Inmunocall, puede utilizarse para mejorar las puntuaciones de los sujetos en medidas de evaluación del autismo como Vineland (como Vineland

45 Puntuación del Comportamiento Adaptativo), CARS, SCQ, CBCL, y/o

ADI-R. En ciertas realizaciones, dichas mejoras pueden incluir, entre otras, la gravedad del autismo, la comunicación verbal, el estado de desarrollo y/o problemas de comportamiento como las reacciones emocionales.

50 En una realización, se proporciona en el presente documento un método para tratar el autismo o el trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, método que comprende:

administrar al sujeto una composición que comprenda aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

55 En otra realización, se proporciona en el presente documento un método para tratar, prevenir o mejorar los síntomas del autismo o del trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite:

composición de administración que comprende proteína de suero de leche

60isolato y/o concentrado de proteína de suero al sujeto. En otra realización, se proporciona aquí un uso de una composición para tratar el autismo o el trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, y dicha composición comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

65 concentrados.

En otra realización, se proporciona aquí un uso de una composición para tratar, prevenir o mejorar

síntomas de Autismo o Trastorno del Espectro Autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicha composición aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En otra realización, se proporciona aquí un uso de una composición para fabricar un medicamento para tratar el autismo o el trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, y dicha composición comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En otra realización, se proporciona aquí un uso de una composición para fabricar un medicamento para tratar, prevenir o mejorar los síntomas del autismo o del trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, y dicha composición comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En otra realización, se proporciona aquí una composición para tratar el Autismo o el Trastorno del Espectro Autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, dicha composición contiene aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En otra realización, se proporciona aquí una composición para tratar, prevenir o mejorar los síntomas del autismo o del trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, y dicha composición comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En algunas otras realizaciones, el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero pueden suministrarse a aproximadamente

0,5 g/kg para sujetos de menos de 18 kg de peso corporal, o a unos 10 g/día para sujetos de más de 18 kg de peso corporal. En otras realizaciones, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede proporcionar un aumento de los niveles de tGSH, de GSH o de ambos.

En otra realización, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede mejorar al menos un área conductual básica en el autismo o el TEA. En ciertas realizaciones, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede mejorar al menos una de las puntuaciones de Vineland, CARS, SCQ, CBCL o ADI-R en el sujeto. En ciertas realizaciones, el tratamiento puede repercutir en áreas de gravedad del autismo, comunicación verbal, comunicación expresiva, habilidades personales de la vida diaria, habilidades de afrontamiento o socialización, por ejemplo.

En otra realización, el tratamiento con la proteína de suero de leche aislada y/o suero de leche proteína concentrado pueden mejorar las puntuaciones de conducta adaptativa de Vineland en el sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto puede tener niveles bajos de GSH o tGSH. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto con niveles elevados de GSH o tGSH. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto que tiene niveles intermedios de GSH o tGSH.

En otra realización, el sujeto puede ser un niño. En otra realización de, el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero pueden comprender Inmuno- o su equivalente funcional.

En otra realización, la composición puede incluir además un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero pueden ser sustancialmente naturales.

En otra realización, el trastorno del espectro autista (TEA) puede ser autismo, síndrome de Asperger, trastorno

generalizado del desarrollo no especificado (TGD-NOS), trastorno desintegrativo infantil, autismo síndromico o autismo de etiología conocida, como el síndrome X frágil, el síndrome de macrocefalia PTEN, el síndrome RETT, el complejo de esclerosis tuberosa, el síndrome de Timothy y/o el síndrome de Joubert.

En otra realización, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede mejorar el comportamiento del sujeto.

En otra realización, el tratamiento con el suero de leche

5 aislado de proteína y/o concentrado de proteína de suero pueden proporcionar una mejora conductual en el sujeto en términos de gravedad del autismo, comunicación verbal, comunicación expresiva, habilidades personales de la vida diaria, habilidades de afrontamiento, socialización, o cualquier combinación de las mismas.

10 En otra realización, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede aumentar un nivel de tGSH, un nivel de GSH, o ambos, en el sujeto.

En otra realización, el sujeto puede ser un sujeto
15 que ha sido identificado como respondedor al tratamiento con la composición. En ciertas realizaciones, el sujeto

puede ser de unos 4,0 años de edad, 4,1 años de edad, 4,2 años de edad, 4,3 años de edad, 4,4 años de edad o 4,5 años de edad.

En ciertas realizaciones, el sujeto puede tener aproximadamente $4,23 \pm 0,22_{20}$ años. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto que tenga un nivel basal relativamente más alto de GSH plasmática y/o intracelular, de tGSH, o de ambas, en comparación con otros niños con autismo. En ciertas realizaciones, los respondedores pueden identificarse como niños con autismo o TEA

25 con niveles plasmáticos y/o intracelulares más bajos de GSH, tGSH, o ambos, en comparación con niños sin diagnóstico de autismo. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto con un nivel intracelular basal de GSH, tGSH, o ambos, en comparación con niños sin diagnóstico de autismo (it

30 se ha descubierto anteriormente que los niveles plasmáticos, intracelulares e incluso cerebrales de GSH pueden estar disminuidos en comparación con los niños de control sin autismo; véase la sección Antecedentes y la discusión del Ejemplo 1) de unos 100-150 nM/10' WBC, o

35 unos $127,8 \pm 19,8$ nM/10' CMB, o unos $127,8$ nM/10' CMB, medidos por el método de Tietze, por ejemplo. En

En determinadas realizaciones, se puede considerar que un sujeto responde cuando el tratamiento descrito en el presente documento le proporciona 2 puntos o más, o 1 punto estándar aproximadamente.

40 de desviación, en las puntuaciones compuestas del VABS-II. En ciertas realizaciones, un respondedor puede considerarse un sujeto para el que el tratamiento aquí descrito proporciona una mejora en uno o más dominios/subdominios del VABS-II, como: puntuación de comunicación, puntuación de la escala V receptiva,

45 puntuación en la escala v expresiva, habilidades de la vida diaria o personal

Puntuación de la escala v.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el sujeto que lo necesita puede ser un sujeto identificado como respondedor basándose en:

50 [1] el sujeto padece autismo o TEA y tiene niveles plasmáticos y/o intracelulares más bajos de GSH,

tGSH, o ambos, en comparación con un grupo de control sin diagnóstico de autismo o TEA; o bien

[2] el sujeto que padece autismo o TEA y tiene mayor
55 niveles plasmáticos y/o intracelulares de GSH, tGSH, o ambos, en comparación con un grupo de control con diagnóstico de autismo o TEA; o ambos [1] y [2].

En ciertas realizaciones, los sujetos y los grupos de control pueden ser niños.

60 En otra realización, se proporciona aquí un método para mejorar uno o más rasgos de comportamiento que se evalúan mediante uno o más de:

Puntuación T de conducta CARS; puntuación de Interacción Social Recíproca ADI-R y/o puntuación Total; puntuación de Comunicación SCQ;

65VABS II Compuesto de Conducta Adaptativa, Ámbito de Comunicación, Subdominio de Comunicación Expresiva, Subdominio de Habilidades Personales para la Vida Diaria, Ámbito Social.

puntuación(es) en el Dominio de Adaptación, Subdominio de Habilidades de Afrontamiento y/o Subdominio de Habilidades Motrices Finas; y/o Puntuación T del CBCL Emocionalmente Reactivo, en un sujeto que lo necesite y que tenga autismo o TEA, dicha

método que comprende:

administrar al sujeto una composición que comprenda aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En otra realización, se proporciona en el presente documento un uso de un aislado de proteínas de lactosuero y/o un aislado de proteínas de lactosuero para mejorar uno o varios rasgos de comportamiento que se evalúan mediante uno o varios de:

Puntuación T del comportamiento CARS; Inter- social recíproco ADI-R

acción y/o puntuación total; puntuación del SCQ Comunicación; puntuación del VABS II Compuesto de Comportamiento Adaptativo, Dominio de la Comunicación, Subdominio de Comunicación Expresiva, Subdominio de Habilidades de la Vida Diaria Personal, Dominio de Socialización, Subdominio de Habilidades de Enfrentamiento y/o Subdominio(s) de Habilidades de Motricidad Fina; y/o puntuación T del CBCL Emocionalmente Reactivo,

En ciertas realizaciones, los métodos y usos anteriores pueden incluir un paso inicial de identificación de un sujeto que necesita tratamiento, basado en que el sujeto tiene una alteración de uno o más rasgos de comportamiento que se evalúan mediante uno o más de los siguientes:

Puntuación T del comportamiento CARS; Inter- social recíproco ADI-R

acción y/o puntuación total; puntuación del SCQ Comunicación; puntuación del VABS II Compuesto de Comportamiento Adaptativo, Dominio de la Comunicación, Subdominio de Comunicación Expresiva, Subdominio de Habilidades de la Vida Diaria Personal, Dominio de Socialización, Subdominio de Habilidades de Enfrentamiento y/o Subdominio(s) de Habilidades de Motricidad Fina; y/o puntuación T del CBCL Emocionalmente Reactivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Estas y otras características y aspectos de la presente invención se comprenderán mejor en relación con la siguiente descripción y las Figuras que la acompañan, en las que: La FIG. 1 muestra el aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (radicales libres) en la línea de base de las líneas celulares linfoblastoides (LCL) de niños con autismo;

La FIG. 2 muestra la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS) tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno en LCL de niños autistas frente a controles;

La FIG. 3 muestra un Diagrama de Flujo que muestra la distribución de los sujetos en cada etapa del estudio descrito en el Ejemplo 1; la FIG. 4

muestra gráficos de dispersión de sujetos individuales para el glutatión reducido en a) el grupo placebo (n=16) y b) el grupo de intervención (n=19). c) Porcentaje de cambio respecto al valor basal de los niveles de glutatión reducido en los grupos placebo y de intervención, donde * denota un valor $p < 0,05$ mediante la prueba t de una cola.

d) Cambio en la puntuación del comportamiento adaptativo frente al cambio en los niveles de glutatión reducido para ambos grupos, según el estudio descrito en el Ejemplo 1;

La FIG. 5 muestra el cambio en las puntuaciones de la Escala de Comportamiento Adaptativo de Vineland,

edición 2[^], en no respondedores y respondedores, donde * denota un valor $p < 0,05$, según el estudio descrito en el Ejemplo 1; y

La FIG. 6 muestra la concentración intracelular de GSH al inicio del estudio en todos los grupos, donde * indica $p < 0,05$, según el estudio descrito en el Ejemplo 1.

* $p < 0,05$ indica que existe una diferencia estadísticamente significativa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se describen composiciones y métodos para el tratamiento del trastorno del espectro autista. Se apreciará

que las realizaciones y los ejemplos se proporcionan a título ilustrativo

destinados a los expertos en la materia, y no pretenden ser limitativos en modo alguno.

El Glutatión (GSH)/Disulfuro de Glutatión (GSSG) Se cree que el equilibrio redox regula la eliminación de radicales libres de nitrógeno y oxígeno, el estado redox de las proteínas y la actividad enzimática, la integridad de las membranas celulares y la transducción de señales, la unión de factores de transcripción y la expresión génica, la desintoxicación de fase II y la apoptosis (Dickinson, Moeller-, -).

10 ing, et al., 2003; Klatt y Lamas, 2000; Dickinson y Forman, 2002; y Deplancke y Gaskins, 2002).

Existen pruebas genéticas del estrés oxidativo, con genes rel- evantes que codifican para/están potencialmente asociados con la oxida-

15 tivos en niños autistas, entre los que se incluyen:

Portador reducido de folato (RFC 80G>A);
Transcobalamina II (TCN2 776G>C);

Catecol-O-metiltransferasa (COMT 472G EA);
Metil- enetetrahidrofolato reductasa (MTHFR 677C>T y 1298A>C); y Glutatión-S-Transferasa (GST MI)

20 (James, Melnyk et al., 2006). En los estudios de líneas celulares de lipoblastoides se ha observado anteriormente la siguiente información (véase la Tabla A).

TABLA A

25

Prev iónes Estudios de Líneas Celulares Linfobl astoides

30

35

Se ha observado una mayor cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS) al inicio del estudio en las LCL de niños con autismo (ver 40 FIG. 1). La producción intracelular de ROS tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno (es decir, la exposición al estrés oxidativo) en LCL de niños autistas frente a controles se muestra en la FIG. 2.

Se ha observado anteriormente que los niños con autismo

45 pueden tener niveles más bajos de GSH y ser más vulnerables al estrés oxidativo. Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que mejorar los niveles de glutatión puede proteger o mejorar, al menos parcialmente, a los autistas de al menos uno de los efectos negativos del estrés oxidativo elevado y, por tanto, puede prevenir

50 y/o mejorar al menos una manifestación clínica de este trastorno. En particular, los presentes inventores trataron de investigar los efectos de un aislado de proteína de suero y/o un concentrado de proteína de suero en sujetos con autismo. Los aislados de proteína de suero y los concentrados de proteína de suero pueden actuar como gluta-

55 precursores de thione, proporcionando una fuente

enriquecida de cisteína bio-disponible tras su administración.

Se realizó un estudio con el objetivo de establecer los efectos de una suplementación dietética de 90 días con un aislado de proteína de suero rico en cisteína (en este caso, disponible comercialmente

60 ImmunocalB) sobre el comportamiento autista. El estudio también pretendía investigar la correlación entre los niveles de glutatión en sangre y los cambios de comportamiento en niños autistas suplementados con una proteína de suero rica en cisteína. Además, el estudio se diseñó para evaluar la tolerabilidad de una proteína de suero rica en cisteína.

65 suplemento de proteína de suero (ImmunocalB) en niños con autismo, y observar los efectos adversos en los niños, si los hubiera. El estudio se describe con más detalle en el Ejemplo 1.

LCL autista (autismo genético) Repositorio Intercambio)	Edad	Control LCL (Corriel Cell Repositorio)	Edad
AU3964302	3.8	GM09659	4
AU1157303	3.1	GM08336	3
AU055104	5	GM11898	5
AU2140305	5.9	GM09380	6
AU3907302	4.4	GM09659	4
AU3912302	4.9	GM11898	5

En una realización, se proporciona en el presente documento un método para tratar el Autismo o el Trastorno del Espectro Autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, dicho método comprende:

administrar al sujeto una composición que comprenda aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En otra realización, se proporciona en el presente documento un método para tratar, prevenir o mejorar, al menos parcialmente, los síntomas del autismo o del trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite:

administrar al sujeto una composición que comprenda aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En otra realización, se proporciona aquí un uso de una composición para tratar el autismo o el trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, y dicha composición comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En otra realización, se proporciona aquí un uso de una composición para tratar, prevenir o mejorar, al menos parcialmente, los síntomas del autismo o del trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, y dicha composición comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En otra realización, se proporciona aquí un uso de una composición para fabricar un medicamento para tratar el autismo o el trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, y dicha composición comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En otra realización, se proporciona aquí un uso de una composición para fabricar un medicamento para tratar, prevenir o mejorar, al menos parcialmente, los síntomas del autismo o del trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, y dicha composición comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En otra realización, se proporciona aquí una composición para tratar el Autismo o el Trastorno del Espectro Autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, dicha composición contiene aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En otra realización, se proporciona en el presente documento una composición para tratar, prevenir o mejorar, al menos parcialmente, los síntomas del autismo o del trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que lo necesite, dicha composición comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero.

En ciertas realizaciones, el sujeto que lo necesita puede ser un sujeto con Autismo o Trastorno del Espectro Autista (TEA). En otras realizaciones, el sujeto que lo necesita puede ser un sujeto sospechoso de padecer, o en riesgo de padecer, un trastorno mental como el Autismo o el Trastorno del Espectro Autista (TEA). En ciertas realizaciones de los métodos y usos aquí descritos, puede llevarse a cabo un paso adicional consistente en someter al sujeto a pruebas para determinar si padece autismo o TEA, con el fin de identificar al sujeto que necesita tratamiento. En ciertas realizaciones, dicha etapa de diagnóstico del estado autista o TEA del sujeto puede realizarse antes de administrar al sujeto la composición que comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero. En otras realizaciones de los métodos y usos descritos en el presente documento, el paso adicional de someter al sujeto a pruebas para determinar su estado de autismo o TEA puede llevarse a cabo durante, después o

tanto durante como después del tratamiento del sujeto con la composición que comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero, a fin de determinar los efectos del tratamiento y/o informar sobre si sería interesante ajustar la dosis y/o el régimen de dosificación en el futuro.

En ciertas realizaciones, el sujeto que lo necesita puede ser un sujeto identificado como particularmente receptivo al tratamiento según los métodos aquí descritos, es decir, el sujeto puede ser un "respondedor". En ciertas realizaciones, el

5 el sujeto puede tener unos 4 años de edad, por ejemplo unos 4,0 años de edad, 4,1 años de edad, 4,2 años de edad, 4,3 años de edad,

4,4 años de edad, o 4,5 años de edad. En ciertas realizaciones, el sujeto puede tener unos 4,23+0,22 años. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto con una rela-

10 nivel basal de GSH plasmática o intracelular, de tGSH o de ambas, en comparación con otros niños autistas. En ciertas realizaciones, los respondedores pueden identificarse como niños con autismo o TEA con niveles plasmáticos o intracelulares más bajos de GSH, tGSH, o ambos, en comparación con otros niños con autismo o TEA con niveles plasmáticos o intracelulares más bajos de GSH, tGSH, o ambos, en comparación con otros niños con autismo o TEA.

15 sin diagnóstico de autismo. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto con un nivel intracelular basal de GSH, tGSH, o ambos, en comparación con niños sin diagnóstico de autismo (se ha descubierto previamente que los niveles plasmáticos, intracelulares e incluso cerebrales de GSH pueden ser

20 disminuido en comparación con los niños de control sin autismo; véase la sección Antecedentes y la discusión del Ejemplo 1) de unos 100-150 nM/10' CMB, o unos 127,8+19,8 nM/10' CMB, o unos 127,8 nM/10' WBC, medidos por el método de Tietze, por ejemplo. En ciertas realizaciones, un respondedor

25 puede considerarse como un sujeto para el que el tratamiento descrito en el presente documento proporciona igual o más de aproximadamente 2 puntos, o aproximadamente 1 desviación estándar, en las puntuaciones compuestas del VABS-II. En ciertas realizaciones, un respondedor puede considerarse un sujeto para el que el tratamiento descrito

30 La presente proporciona una mejora en uno o más dominios/subdominios de la VABS-II, como: puntuación en comunicación, puntuación en la escala V receptiva, puntuación en la escala V expresiva, habilidades de la vida diaria o puntuación en la escala V personal.

En ciertas realizaciones, el sujeto que lo necesite puede

35 ser identificado como respondedor, o como sujeto particularmente susceptible de beneficiarse del tratamiento, en función de que el sujeto tenga una puntuación anormal o deficiente en al menos una de las siguientes evaluaciones conductuales: Puntuación T del comportamiento CARS; puntuación de Interacción Social Recíproca y/o Total del ADI-R; SCQ Com-

40 Puntuación en comunicación; Compuesto de conducta adaptativa VABS II,

Puntuación en el Dominio de la Comunicación, Subdominio de la Comunicación Expresiva, Subdominio de las Habilidades de la Vida Diaria Personal, Dominio de la Socialización, Subdominio de las Habilidades de Enfrentamiento y/o Subdominio de las Habilidades Motrices Finas; y/o puntuación en el CBCL Emoción-

45 aliado Puntuación T reactiva.

En ciertas realizaciones, el sujeto que lo necesita puede ser un sujeto identificado como respondedor basándose en:

[1] el sujeto que padece autismo o TEA y tiene niveles plasmáticos y/o intracelulares más bajos de GSH, tGSH, o ambos,

50 en comparación con un grupo de control sin diagnóstico de autismo o TEA, o

[2] el sujeto padece autismo o TEA y tiene niveles plasmáticos y/o intracelulares más elevados de GSH, tGSH, o ambos, en comparación con un grupo de control con diagnóstico de autismo

55 o TEA; o ambos [1] y [2].

En ciertas realizaciones, los sujetos y los grupos de control pueden ser niños.

En ciertas realizaciones, los métodos y usos aquí descritos pueden incluir un paso de identificación de un sujeto como ser

60 un respondedor. En ciertas realizaciones, este paso puede incluir la medición de los niveles plasmáticos y/o intracelulares de GSH, tGSH, o ambos, y la comparación de los niveles medidos con los de un grupo de control adecuado. En ciertas realizaciones, dichas mediciones pueden utilizar, por ejemplo,

65 el método de Tietze (Tietze, F. (1969) Enzymatic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian

Sangre y Otros Tejidos. *Bioquímica Analítica*, 27:502-522", aquí incorporada por referencia en su totalidad).

En ciertas realizaciones, los métodos y usos aquí descritos pueden incluir un paso adicional de identificación del sujeto como respondedor, identificando así al sujeto como particularmente sensible al tratamiento aquí descrito. En ciertas realizaciones, esta etapa de identificación del sujeto como respondedor puede realizarse antes de administrar al sujeto la composición que comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero (es decir, antes del tratamiento). En ciertas realizaciones, este paso de identificación del sujeto como respondedor puede realizarse tras la administración de la composición que contiene aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero al sujeto (es decir, después del tratamiento), con el fin de identificar al sujeto como candidato para una ronda posterior de tratamiento. En ciertas realizaciones, el paso de identificar al sujeto como respondedor puede incluir la determinación de la edad del sujeto, la determinación del nivel basal de GSH del sujeto, la determinación de si el sujeto experimenta igual o más de aproximadamente 2 puntos o aproximadamente 1 desviación estándar en las puntuaciones compuestas VABS-II tras el tratamiento, o cualquier combinación de las mismas.

En consecuencia, en otra realización más, se proporciona en el presente documento un método para tratar el autismo o el trastorno espectral del autismo (TEA) en un sujeto que padece, se sospecha que padece o corre el riesgo de padecer autismo o TEA:

opcionalmente, someter al sujeto a pruebas para determinar

Autismo o TEA del sujeto, identificando así al sujeto como necesitado de tratamiento;

opcionalmente, identificar al sujeto como respondedor basándose en la edad y/o en los niveles basales de GSH;

administrar al sujeto una composición que comprenda aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero; opcionalmente, someter al sujeto a pruebas para determinar la mejora del estado de Autismo o TEA del sujeto como

un resultado de la administración de la composición; opcionalmente, identificar al sujeto como respondedor en función de si el sujeto experimenta más de aproximadamente 2 puntos o aproximadamente 1 desviación estándar en las puntuaciones compuestas del VABS-II tras la administración de la composición; y

opcionalmente, realizar una administración posterior de la composición que comprenda aislado de proteína de suero y/o concentración de proteína de suero al sujeto.

En otra realización, se proporciona en el presente documento un método para tratar, prevenir o mejorar, al menos parcialmente, los síntomas del autismo o del trastorno del espectro autista (TEA) en un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o corre el riesgo de desarrollar autismo o TEA:

opcionalmente, someter al sujeto a pruebas para determinar su estado de autismo o TEA, identificando así al sujeto como necesitado de tratamiento;

opcionalmente, identificar al sujeto como respondedor basándose en la edad y/o en los niveles basales de GSH;

administrar al sujeto una composición que comprenda aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero; opcionalmente, someter al sujeto a pruebas para determinar la mejora del estado de Autismo o TEA del sujeto como

un resultado de la administración de la composición; opcionalmente, identificar al sujeto como respondedor en función de si el sujeto experimenta más de aproximadamente 2 puntos o aproximadamente 1 desviación estándar en las puntuaciones compuestas del VABS-II tras la administración de la composición; y

opcionalmente, realizar una administración posterior de la composición que comprende aislado de proteína de suero y/o concentración de proteína de suero al sujeto.

En algunas otras realizaciones, el aislado de proteína de suero de leche

5 y/o concentrado de proteína de suero pueden suministrarse a una dosis de unos 0,5 g/kg para sujetos con menos de 18 kg de peso corporal, o a unos 10 g/día para sujetos de más de 18 kg de peso corporal. Se entenderá que estos ejemplos no pretenden ser limitativos, y que las dosis más altas y más bajas pueden variar de un sujeto a otro.

También se contemplan 10 dosis. En ciertas realizaciones no limitantes, por ejemplo, se contempla que las composiciones aquí descritas puedan administrarse por vía oral en una cantidad adecuada para conseguir el efecto deseado. En ciertas realizaciones no limitantes, las composiciones descritas

15 puede administrarse por vía oral en una dosis de unos 20-40 gramos al día, por ejemplo, y puede administrarse una o más veces al día, por ejemplo. En ciertas realizaciones, la dosis para sujetos de unos 18 kg o menos puede ser de unos 0,5 gramos por kilo de peso corporal, por ejemplo.

20 ejemplo.

En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser tratado durante un periodo de tiempo. A modo de ejemplo, el sujeto puede recibir tratamiento durante uno o más días, una o más semanas, uno o más meses, o uno o más años. Los tratamientos pueden ser

25 administrarse a intervalos regulares, o según se necesite o desee en función del estado del sujeto, por ejemplo. En ciertas realizaciones, los tratamientos pueden administrarse diariamente, quincenalmente o semanalmente, por ejemplo. En ciertas realizaciones, el sujeto puede recibir tratamiento durante un periodo de uno o más meses.

30 Por ejemplo, el sujeto puede recibir tratamiento durante al menos 3 meses, o durante al menos unos 90 días. Se entenderá que son posibles diversos calendarios y regímenes de tratamiento, y que estos ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos y no limitativos.

35 A modo de referencia, las formas de dosificación contempladas

y/o regímenes de dosificación se exponen a continuación en el Ejemplo 1. Como se comprenderá, puede ser posible una amplia variedad de dosificaciones y/o regímenes de dosificación, y los ejemplos proporcionados en el Ejemplo 1 no pretenden ser limitativos. Por ejemplo

40 se contempla que las dosis y/o los regímenes de dosificación puedan ser

superiores y/o inferiores a los utilizados en el Ejemplo 1.

En otras realizaciones, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede proporcionar un aumento de los niveles de tGSH, de GSH o de ambos.

45 En otra realización, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede mejorar al menos una de las puntuaciones de Vineland, CARS, SCQ, CBCL o ADI-R en el sujeto.

En otra realización, el tratamiento con suero de leche

50 proteína aislado y/o suero de leche proteína
55 mentos, el tratamiento con el aislado de proteína de

suero y/o el concentrado de proteína de suero puede proporcionar una mejora conductual en el sujeto en términos de gravedad del autismo, comunicación verbal, comunicación expresiva, habilidades personales de la vida diaria, habilidades de afrontamiento, socialización o cualquier combinación.

60 del mismo.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede proporcionar una mejora del comportamiento y/o la gravedad del autismo. En determinadas realizaciones, el tratamiento con aislado de proteína de suero y/o

65 concentrado de proteína de suero puede proporcionar una mejora en la puntuación total del ADI-R. En ciertas realizaciones, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero

puede proporcionar una mejora en la subpuntuación de Interacción Social Recíproca del ADI-R. En ciertas realizaciones, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede proporcionar una mejora en la puntuación t de comportamiento del CARS.

En determinadas realizaciones, el tratamiento con aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero puede mejorar la comunicación verbal. En ciertas realizaciones, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede proporcionar una mejora de la SCQ. En ciertas realizaciones, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede proporcionar una mejora del estado de desarrollo. En ciertas realizaciones, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede proporcionar una mejora en la puntuación compuesta del comportamiento adaptativo de Vineland, en el ámbito de la comunicación y/o en el ámbito de la socialización. En ciertos casos, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede proporcionar una mejora en el subdominio de comunicación expresiva de Vineland, en el subdominio de habilidades personales de la vida diaria y en el subdominio de habilidades de afrontamiento, y/o subdominio de motricidad fina.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero puede proporcionar una mejora en la puntuación compuesta del comportamiento adaptativo de Vineland, el dominio de socialización y/o las habilidades personales de la vida diaria.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con la proteína de suero de leche y/o concentrado de proteína de suero puede mejorar los problemas de comportamiento. En ciertas realizaciones, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede proporcionar una mejora en las puntuaciones t emocionalmente reactivas del CBCL.

En otra realización, el tratamiento con el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero puede aumentar un nivel de tGSH, un nivel de GSH, o ambos, en el sujeto.

En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto que tenga niveles bajos de GSH o tGSH; niveles intermedios de GSH o tGSH; o niveles altos de GSH o tGSH. Los estudios aquí descritos indican que la mejora del comportamiento no estaba limitada por los niveles de GSH en el sujeto. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, se contempla la posibilidad de observar beneficios conductuales en un sujeto tratado con aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero, independientemente de los niveles de GSH o tGSH.

Como se comprenderá, el sujeto a tratar puede ser cualquier sujeto adecuado que necesite dicho tratamiento. En ciertas realizaciones, se contempla que el sujeto no esté limitado a ninguna edad o rango de edad concreto, y puede ser, por ejemplo, un adulto o un niño. En determinadas realizaciones, el sujeto puede ser un niño. En ciertas realizaciones, el niño puede tener, por ejemplo, entre 0 y 15 años de edad, por ejemplo alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 años, o cualquier edad intermedia, o cualquier intervalo de edad entre dichas edades. En algunas otras realizaciones, el niño puede tener de 2 a 8 años, de 3 a 6 años, de 3 a 5 años o unos 4 años, por ejemplo.

Como se comprenderá, el Trastorno del Espectro Autista puede englobar varios trastornos o afecciones. El Trastorno del Espectro Autista (TEA) al que aquí se hace referencia puede considerarse según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, 5ª Edición (DSM-5), que aquí se incorpora por referencia en su totalidad. Como tal, en ciertas realizaciones, el Trastorno del Espectro Autista (TEA) puede incluir el autismo, el síndrome de Asperger, el trastorno generalizado del desarrollo no especificado (TGD-NOS) o el Trastorno Desintegrativo Infantil.

En ciertas realizaciones, el Trastorno del Espectro Autista puede englobar el autismo síndromico o el autismo de etiología conocida. En ciertas realizaciones, el Trastorno del Espectro Autista puede englobar el síndrome X frágil, la macrocefalia PTEN síndrome, síndrome de RETT, complejo de esclerosis tuberosa, Timoside, o síndrome de Joubert.

En ciertas realizaciones, el sujeto que necesita tratamiento mediante los métodos aquí descritos puede ser un sujeto que presenta una alteración en uno o más rasgos de comportamiento que son evaluado por uno o más de:

Puntuación T de la conducta CARS; puntuación total y/o de interacción social recíproca ADI-R; puntuación de comunicación SCQ; compuesto de conducta adaptativa VABS II, dominio de comunicación, subdominio de comunicación expresiva, Subdominio de Habilidades de la Vida Diaria Personal, Dominio de Socialización, Subdominio de Habilidades de Enfrentamiento y/o puntuación(es) del Subdominio de Habilidades de Motricidad Fina; y/o Puntuación T del CBCL Emocionalmente Reactivo.

En ciertas realizaciones, un respondedor como descrito en el presente documento puede definirse como un sujeto con una puntuación anormal en una o más de las evaluaciones conductuales anteriores.

En ciertas realizaciones, los métodos y usos anteriores pueden incluir un paso inicial de identificación de un sujeto que necesita tratamiento, basado en que el sujeto tiene una deficiencia en uno o más de los siguientes aspectos más rasgos de comportamiento que se evalúan mediante uno o más de:

Puntuación T en conducta CARS; puntuación en Interacción Social Recíproca ADI-R y/o puntuación Total; puntuación en Comunicación SCQ; puntuación en Conducta Adaptativa Compuesta VABS II, Dominio de la Comunicación, Subdominio de Comunicación Expresiva, Subdominio de Habilidades Personales de la Vida Diaria, Dominio de Socialización, Subdominio de Habilidades de Enfrentamiento y/o Subdominio(s) de Habilidades de Motricidad Fina; y/o puntuación T en Reactividad Emocional CBCL.

En algunas otras realizaciones, dichos métodos y usos pueden incluir un paso inicial para determinar la puntuación T de comportamiento CARS de referencia del sujeto; la puntuación de Interacción Social Recíproca y/o Total ADI-R; la puntuación de Comunicación SCQ; el Compuesto de Comportamiento Adaptativo VABS II, el Compuesto de Comunicación VABS II, el Compuesto de Comportamiento Adaptativo VABS II y el Compuesto de Comportamiento Adaptativo VABS II.

Dominio de la Comunicación, Subdominio de la Comunicación Expresiva,

Puntuación en el subdominio de habilidades personales de la vida diaria, dominio de socialización, subdominio de habilidades de afrontamiento y/o subdominio(s) de habilidades motoras finas; y/o puntuación T en el CBCL

Emotionally Reactive.

En otra realización, el aislado de proteína de suero lácteo y/o concentrado de proteína de suero pueden ser o comprender inmunoglobulina, o un equivalente funcional del mismo.

En otra realización, la composición puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable, un portador o un agente de transporte. de diluyente.

En otra realización, el aislado de proteína de suero y/o el concentrado de proteína de suero pueden ser sustancialmente naturales.

Las composiciones aquí descritas pueden comprender suero proteínico aislado y/o concentrado de proteína de suero, que es una fuente de cisteína, precursor del glutatión.

Las composiciones que comprenden aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero pueden comprender cualquier composición adecuada que comprenda aislado de proteína de suero y/o suero.

teína concentrada que puede servir como precursor del glutatión al proporcionar una fuente enriquecida de cisteína biodisponible tras su administración. Como se comprenderá, las proteínas del lactosuero pueden considerarse generalmente como un grupo de proteínas lácteas que permanecen solubles en el "suero de leche" o lactosuero tras la preadministración.

En ciertas realizaciones, la precipitación de caseínas a pH 4,6 y 20° C. Las principales proteínas del suero de la leche de vaca, por ejemplo, pueden ser la beta-lactoglobulina (βL), la alfa-lactalbúmina (αL), la inmunoglobulina-

lin, y albúmina sérica (SA). El producto de la separación industrial de esta mezcla de proteínas del suero suele denominarse aislado de proteína de suero (WPI; también conocido como concentrado de proteína de suero, WPC).

Las composiciones pueden, opcionalmente, comprender además una

o más excipientes, diluyentes y/o portadores farmacéuticamente aceptables, una o más vitaminas, aminoácidos esenciales o minerales, uno o más antioxidantes, uno o más precursores adicionales del glutatión y/o uno o más componentes nutricionales de suplementos dietéticos, por ejemplo.

En ciertas realizaciones, las composiciones y/o los medicamentos aquí descritos pueden comprender además, o pueden usarse en combinación (simultánea o secuencialmente) con una o más vitaminas típicamente utilizadas en el tratamiento del autismo y/o TEA.

Las composiciones también pueden incluir y/o utilizarse en combinación simultánea o secuencial con uno o más fármacos, composiciones farmacéuticas o terapias utilizadas en el tratamiento o control del autismo, como sabrá la persona experta en la materia.

En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden suero de leche

El aislado de proteína y/o el concentrado de proteína de suero pueden contener además uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, que pueden incluir cualquier portador, diluyente o excipiente adecuado conocido por el experto en la materia. Ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser, entre otros, derivados de la celulosa, sacarosa y almidón. El experto en la materia reconocerá que los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir cargas, aglutinantes, lubricantes, tampones, deslizantes y disolventes adecuados conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2012); aquí incorporado por referencia en su totalidad). Pueden encontrarse ejemplos de soportes, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (200 20ª edición) y en la United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 40 NF35) publicada en 2017.

En determinadas realizaciones, un aislado de proteína de suero o un concentrado de proteína de suero, tal como se describe en el presente documento, puede incluir cualquier extracto, aislado, concentrado u otro producto adecuado que pueda obtenerse a partir de la proteína de suero. Como se comprenderá, la proteína de suero comprende una mezcla de proteínas lácteas que permanecen solubles en el suero de leche o lactosuero tras la precipitación de las caseínas, por ejemplo. El suero se encuentra a menudo como subproducto de la fabricación de queso o caseína. Los principales componentes de las proteínas del suero pueden ser, por ejemplo y sin ánimo limitativo, la beta-lactoglobulina, la alfa-lactalbumina, la inmunoglobulina y/o la albúmina sérica. Aunque la leche bovina se utiliza habitualmente para obtener proteína de suero, se entenderá que también se contemplan otras fuentes de leche. En general, se considera que el aislado de proteína de suero (WPI) tiene >90% de proteína, mientras que el concentrado de proteína de suero (WPC) puede tener concentraciones de proteína inferiores al 90%; sin embargo, a los efectos presentes, WPI y WPC pueden considerarse intercambiables en general, a menos que se especifique explícitamente lo contrario.

En determinadas realizaciones, un aislado de proteína de suero o un concentrado de proteína de suero tal como se describe en el presente documento es preferiblemente un aislado de proteína de suero o un concentrado de proteína de suero sustancialmente sin desnaturalizar. Los aislados y

concentrados no desnaturalizados son aquellos en los que uno o más de los componentes proteicos obtenibles a partir de proteína de suero permanecen sustancialmente desnaturalizados (es decir, la estructura proteica terciaria se mantiene sustancialmente y/o los enlaces disulfuro entre residuos de cisteína permanecen sustancialmente intactos) en el aislado o concentrado de proteína de suero.

Las proteínas del suero contienen aminoácidos azufrados como la cisteína (Cys). Estos residuos de aminoácidos Cys pueden presentarse como residuos libres (es decir, -SH; reducidos), o dos residuos Cys pueden formar enlaces disulfuro intramoleculares (S-S;

5 oxidado) para producir dímeros de cistina. Estos disulfuros

desempeñan un papel en el plegamiento de las proteínas. En ciertas realizaciones, los aislados de proteína de suero no desnaturalizados o los concentrados de proteína de suero aquí descritos pueden incluir los que tienen al menos un 2 % en peso de dímero de cistina. Ejemplos de suero no desnaturalizado

10 Los aislados de proteínas y los concentrados de proteínas de suero pueden incluir los que tienen aproximadamente un 2 % en peso de dímero de cistina, o más de aproximadamente un 2 % en peso de dímero de cistina. Por ejemplo, el % en peso de dímero de cistina puede ser de aproximadamente 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 o 4,0 % en peso, o bien

15 el % en peso de dímero de cistina puede situarse en un intervalo comprendido entre dos valores cualesquiera, o en un intervalo limitado en el extremo inferior por cualquiera de dichos valores.

Los aislados de proteína de suero y los concentrados de proteína de suero pueden obtenerse mediante cualquier técnica o técnicas adecuadas que se conozcan

20 a la persona experta en la materia teniendo en cuenta las enseñanzas del presente documento. Dichas técnicas pueden incluir la ultrafiltración mediante membranas, métodos de intercambio iónico y métodos de membrana, por ejemplo. Se puede encontrar información sobre técnicas adecuadas, por ejemplo, en Advanced Dairy Chemistry,

25 McSweeney y Mahony (Ed.), Volumen 1B: Proteínas: Applied Aspects, 4.^a edición, Springer, ISBN: 978-1-4939-2799-9 (aquí incorporado por referencia en su totalidad).

Ejemplos de composiciones adecuadas que comprenden aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero se describen en

30 Patentes canadienses nos. 1.333.471, 1.338.682, 2.142.277 y 2.090.186, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad. La CA 2.142.277, por ejemplo, proporciona procesos de preparación detallados y la caracterización analítica de composiciones particularmente preferidas que comprenden proteína de suero de leche

35 aislado, incluida la composición conocida como ImmunocalB.

Esta composición ejemplar de aislado de proteína de suero tal como se describe en CA 2.142.277 puede caracterizarse por tener un índice de solubilidad de aproximadamente 99,5% a pH 4,6; aproximadamente 58% de composición de proteína β L (beta-lactoglobulina), aproximadamente 11% de

40 (alfa-lactoalbúmina) composición proteica, aproximadamente 10% de suero

composición proteica de albúmina (es decir, BSA), y aproximadamente un 22% de composición proteica de inmunoglobulina (es decir, Ig). En CA 2.142.277 también se describe en detalle un proceso para preparar dicha composición. ImmunocalB

(Número de producto natural
45 (NPN) 80004370 emitido con Health Canada) es ahora un composición comercial de aislado de proteína de suero disponible en ImmunotecB.

En el ejemplo 2 se describen con más detalle los aislados y concentrados de proteína de suero.

50 En una realización, las composiciones aquí descritas pueden administrarse por vía oral. Por ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento pueden reconstituirse o incluir un portador líquido (por ejemplo, agua o zumo), lo que permite una administración oral directa. El experto en
55 el arte teniendo en cuenta las enseñanzas del presente documento podrá seleccionar una administración adecuada para adaptarse a un sujeto concreto y/o a una aplicación terapéutica concreta.

En ciertas realizaciones no limitantes, se contempla que las composiciones aquí descritas puedan administrarse

60 por vía oral en una cantidad adecuada para conseguir el efecto deseado. En ciertas realizaciones no limitantes, las composiciones aquí descritas pueden administrarse por vía oral en una dosis de unos 20-40 gramos al día, por ejemplo, y pueden administrarse una o más veces al día, por ejemplo.

65 Se entenderá que las composiciones aquí descritas pueden administrarse como parte de un régimen de tratamiento que incluya otros fármacos, composiciones farmacéuticas o

terapias utilizadas en el tratamiento del autismo. Las composiciones aquí descritas pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente, en combinación con otros fármacos, composiciones farmacéuticas o terapias, o por separado de ellos.

Como se comprenderá, las composiciones que comprenden aislado de proteína de suero⁵

y/o concentrado de proteína de suero, tal como se describen aquí, pueden servir como precursor de glutatión al proporcionar una fuente enriquecida de cisteína biodisponible tras su administración.

Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan **por** ¹⁰ referencia en su totalidad.

Se apreciará que las realizaciones y los ejemplos son se proporcionan aquí con fines ilustrativos destinados a los expertos en la materia, y no pretenden ser limitativos en modo alguno.

Se han descrito una o varias realizaciones ilustrativas a modo de ejemplo. Los expertos en la materia comprenderán que pueden realizarse numerosas variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

EJEMPLO 1

Efectos de un aislado de proteína de suero rico en cisteína (InmunocalB) sobre las Áreas Básicas del Comportamiento Autista y la Capacidad Antioxidante: Un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado

Se utilizó un estudio doble ciego controlado con placebo para evaluar la eficacia de una proteína de suero rica en cisteína, conocida por elevar los niveles de glutatión, sobre los comportamientos autistas en niños de 3 a 5 años. Se utilizaron varias pruebas conductuales (un total de 8 pruebas conductuales validadas) para evaluar distintas áreas de la conducta. Este estudio investigó además la correlación entre las mejoras en los comportamientos y los cambios en los niveles de GSH.

En este estudio, los sujetos del grupo de intervención, de suplemento de proteína de suero, y del grupo de control eran niños. En el grupo de control, se utilizó como placebo un polvo de proteína de arroz, que imita la cantidad de proteína obtenida del suero de leche. En este estudio, como se describe detalladamente a continuación, tanto el grupo placebo (n=19) como el de intervención (n=21) demostraron mejoras desde el inicio hasta el seguimiento en algunas áreas del comportamiento autista. Sin embargo, al comparar los cambios entre los dos grupos, el asignado a la intervención demostró mejoras significativas en varias puntuaciones de las Escalas de Comportamiento Adaptativo de Vineland valoradas por los padres: comportamiento adaptativo (p=0,03), socialización (p=0,03), mala adaptación maladaptativo (p=0,04) e internalización (p=0,02). Se observaron aumentos significativos de los niveles de glutatión en el grupo de intervención en comparación con los cambios en el grupo placebo (p=0,04). Sorprendentemente, las mejoras individuales en el brazo de intervención no se correlacionaron con los aumentos de los niveles de glutatión (p=0,50). Se identificó un grupo de respondedores dentro del grupo de intervención (60%). La edad media de los respondedores era de unos 4,28 años, lo que indica que estos niños eran mayores (unos 9,0 meses, p=0,03) que los no respondedores, y tenían unos niveles basales más altos niveles de GSH en comparación con en comparación

Métodos

Este estudio fue aprobado por la Junta Internacional de Revisión de la Universidad Nova Southeastern de Fort Lauderdale, Florida, EE.UU., con el número de identificador de ensayo NCT01366859 de clinicaltrials.gov.

Población del estudio

Los participantes fueron reclutados en el sur de Florida por el Mail- man Segal Center, mediante un muestreo de bola de nieve. El diagnóstico de TEA autoinformado por los padres se confirmó tras la inclusión en el estudio según el Manual Estadístico de Diagnóstico (DSM-IV y DSM-V) por psicólogos clínicos mediante la prueba ADOS en la línea de base. Los criterios de inclusión incluían que los participantes tuvieran TEA y tuvieran entre 3 y 5 años de edad al inicio y durante el periodo de prueba.

Los criterios de exclusión incluían: (i) alergias a la leche, el arroz o los frutos secos; (ii) problemas médicos importantes, como enfermedades cardíacas, hepáticas, endocrinas o renales; (iii) antecedentes de trastornos convulsivos o déficit neurológico grave; (iv) tratamiento concomitante con medicación psiquiátrica; (v) suplementación actual de la dieta con N-acetilcisteína, ácido alfa lipoico, proteína de suero o dosis multivitamínicas de vitamina B12 o ácido fólico superiores a las habituales; (vi) diagnóstico comórbido: Síndrome del cromosoma X frágil, esclerosis tuberosa, fenilcetonuria o síndrome alcohólico fetal o (vii) enfermedad aguda. Los diagnósticos comórbidos de síndrome X frágil, esclerosis tuberosa, fenilcetonuria o

con los de no respondedores (127,8±19,8 frente a 51,3±9,87 nM/10' CMB, p=0,01). En la página

La incidencia de reacciones adversas fue similar en los grupos de intervención y de placebo. Según los resultados de este estudio, la suplementación con proteína de suero rica en cisteína puede proporcionar un tratamiento seguro y eficaz para mejorar una o más áreas centrales de las conductas autistas, al tiempo que, opcionalmente, también aumenta los niveles de GSH.

- 25 síndrome alcohólico fetal se excluyeron por que estos niños presentan algunos rasgos conductuales autistas, pero se conoce su origen. Los investigadores no realizaron pruebas genéticas para confirmar los diagnósticos de exclusión, pero los pediatras de los niños confirmaron la exclusión y la inclusión.
- 30 **c r i t e r i o s**. Los sujetos de ambos grupos pudieron seguir tomando multivitamínicos, probióticos y otros medicamentos/suplementos siempre que no se mencionaran como criterios de exclusión (conocidos por elevar significativamente los niveles de glutatión).
- Visitas de estudio
- 35 La visita 1 (Centro Mailman Segal) consistió en una evaluación inicial de los criterios de inclusión y exclusión. Se recopiló una historia clínica detallada, la ingesta actual de alimentos/suplementos y algunos datos demográficos sobre el niño y los padres.
- 40 La cita de la Visita 2 consistió en un examen de bienestar conducido por pediatras de la Universidad Nova Southeastern para confirmar que, por lo demás, el niño estaba sano. En esta visita se obtuvo una muestra de sangre para evaluar los biomarcadores de estrés oxidativo. Se recogieron muestras separadas para evaluar el hígado y
- 45 la función renal, así como el recuento sanguíneo celular. Las visitas 3 y 4 para las mediciones basales consistieron en todas las evaluaciones conductuales realizadas por psicólogos clínicos de la Universidad Nova Southeastern. Estas visitas consecutivas se realizaron a más tardar 15 días después de la visita 2. Las ocho
- 50 (8) evaluaciones conductuales (véase más adelante) se repartieron entre estas dos visitas, que duraron una media de dos horas. Cuando era necesario, se programaba una tercera cita para evitar sobrecargar al niño con pruebas excesivas y minimizar los errores de evaluación. Estas dos visitas se programaron dentro de un
- 55 ventana de 15 días. Al final de esta visita, se aleatorizó a los niños al placebo (proteína de arroz) o a la intervención (CRWP; (ImmunocalB, Immunotec Inc.)) y se entregó a los padres un diario para medir los efectos adversos y/o acontecimientos inusuales junto con el bote que contenía el producto del estudio.
- 60 uc. en polvo con cuchara dosificadora. La visita 5 se programó entre las semanas 6 y 7 (visita intermedia) sólo para recoger el polvo restante en el bote, los diarios de los padres y proporcionar un nuevo bote para el siguiente periodo. El objetivo principal de esta visita era evaluar el cumplimiento y
- 65 registrar los acontecimientos adversos. Las visitas 6 y 7 para la evaluación de seguimiento en la semana 12 se realizaron como se indicó para las visitas basales 3 y 4. Las mismas

Los psicólogos clínicos realizaron las pruebas conductuales en la misma secuencia que la basal. Se instruyó a los padres para que continuaran con la dosis diaria del producto del estudio hasta la siguiente y última visita 8.

La visita de seguimiento/final de la visita 8 se programó a más tardar el 7 días después de la visita 7 (semanas 12-13). La visita 8 se realizó como se indicó anteriormente para la visita 2. En este momento se recogieron el bote final y los diarios de los padres.

El periodo de prueba fue de 90 días. Intervención y placebo

El grupo de intervención recibió aislado de proteína de suero rica en cisteína (CRWP), disponible comercialmente como Immuno-call, que fue suministrado por Immunotec Inc. (Montreal, Quebec, Canadá). Debe tenerse en cuenta que ImmunocalB está incluido en el Physician's Desk Reference ("Immunocal", 2013). La proteína de arroz se utilizó como placebo para imitar la carga proteica del grupo de intervención y se obtuvo de Thera-Plantes Inc. (Montreal, Quebec, Canadá). Tanto el tratamiento con CRWP (ImmunocalB) como el placebo (proteína de arroz) se proporcionaron a los padres y cuidadores en forma de polvo en botes. Los niños de ambos brazos del estudio tomaron una dosis diaria de 0,5 gramos/kg para los niños de menos de 20 kg o una dosis de 10 gramos para los de más de 20 kg durante al menos 90 días. Se dieron instrucciones claras a los padres y cuidadores sobre cómo reconstituir los polvos utilizando líquidos y/o alimentos, evitando el uso de batidora o calor. Se indicó a los padres cómo medir la dosis utilizando cucharas dosificadoras proporcionadas por el personal del estudio. La mitad de la dosis (con algún exceso) se administró en un bote en la visita 4 tras la aleatorización. La mitad restante se suministró en la visita 5 (visita intermedia). Se pidió a los padres que devolvieran los botes al personal del estudio para evaluar el cumplimiento.

Medidas de resultado

Todos los resultados primarios (mediciones conductuales) y secundarios (niveles de glutatión intracelular y acontecimientos adversos) se obtuvieron al inicio y al final del estudio. Los diarios entregados a los padres en las visitas 4 y 5 y diseñados para recoger cualquier efecto secundario y/o acontecimiento inusual, también se solicitaron después de que el participante finalizara el estudio. Todo el personal del estudio, los participantes y los padres/tutores legales no conocían la asignación al tratamiento.

Resultados primarios

Se realizaron análisis conductuales en las áreas de conducta y gravedad del autismo, comunicación, estado de desarrollo y problemas de conducta en las visitas basales 3 y 4, así como al final del estudio durante las visitas de seguimiento 6 y

7. Evaluadores formados administraron la batería de evaluaciones, 8 pruebas diferentes en total, durante un periodo consecutivo de dos días. Los evaluadores alcanzaron la fiabilidad entre sí antes de iniciar el proceso de evaluación y, para minimizar las fuentes de error, el mismo evaluador se encargó de administrar toda la batería a un participante (línea de base y seguimiento). Además, los equipos de evaluación conductual no conocían los resultados de los demás.

Se realizaron tres evaluaciones conductuales en el ámbito de las conductas autistas y la gravedad: 1) Programa de Observación Diagnóstica del Autismo (ADOS), 2) Escala de Valoración del Autismo Infantil (CARS) y 3) Entrevista Diagnóstica del Autismo - Revisada (ADI-R). La ADOS y la ADI-R se utilizaron únicamente como

mediciones de los criterios de inclusión. La ADOS es una evaluación semiestructurada que consiste en diversas actividades que permiten observar conductas sociales y de comunicación relacionadas con el diagnóstico de TEA (Lord et al. 1989). En este estudio, a los participantes se les administró el Módulo 1 o el 2. El Módulo 1 está destinado a quienes no utilizan sistemáticamente el habla fraseada, mientras que el Módulo 2 se utiliza para quienes muestran habla fraseada pero no tienen fluidez verbal. El CARS es una escala de calificación del comportamiento de 15 ítems que se utiliza para identificar a los niños con

autismo y distinguir la gravedad del trastorno (Schopler, Reichler, DeVellis y Daly 1980). El ADI-R es una entrevista exhaustiva administrada a los padres que proporciona una evaluación completa de las personas con TEA

- ⁵ (Lord, Le Couteur y Rutter 1994). Se centra en tres dominios funcionales: Lenguaje/Comunicación; Interacciones Sociales Recíprocas, y Comportamientos e Intereses Restringidos/Repetitivos y Estereotipados. La comunicación verbal fue evaluada por el Preescolar ¹⁰ Escala de Lenguaje - Quinta edición (PLS-5) y el Cuestionario de Comunicación Social Cuestionario (SCQ). En preescolares con TEA, el PLS-5 puede utilizarse para obtener un índice general de sintaxis temprana y habilidad semántica (Volden et al. 2011). El SCQ ¹⁵ es un instrumento breve que evalúa las habilidades de comunicación y el funcionamiento social en niños con TEA (Rutter y Lord 2003). La cumplimenta el cuidador principal del niño. El estado de desarrollo de cada participante se midió mediante las Escalas Mullen de Aprendizaje Temprano (MSEL) y ²⁰ la Escala de Comportamiento Adaptativo de Vineland, 2ª edición (VABS- II). La MSEL es un sistema integrado de desarrollo que evalúa las capacidades lingüísticas, motoras y perceptivas de los niños desde el nacimiento hasta los 68 meses de edad (Mullen 1995). Contiene cinco escalas: Motricidad gruesa, Recepción visual, Fina ²⁵ Motricidad, Lenguaje Expresivo y Lenguaje Receptivo. Esta evaluación identifica los puntos fuertes y débiles del niño y evalúa su desarrollo intelectual temprano y su preparación para la escuela. El VABS-II lo cumplimenta el cuidador principal del niño y es una medida administrada individualmente de ³⁰ comportamiento adaptativo, especialmente en aquellos con trastornos del desarrollo (Manohari, Raman y Ashok 2013; Sparrow, Balla y Cicchetti 1984). Puede administrarse desde el nacimiento hasta la edad adulta y consta de los siguientes dominios: Comunicación (Receptiva, Expresiva, Escrita); Diaria ³⁵ Habilidades para la vida (personal, doméstica, comunitaria); Socializa- (Relaciones interpersonales, Juego y tiempo libre, Habilidades de afrontamiento); Habilidades motoras (Finas, Gruesas); y un Índice opcional de Conductas Maladaptativas (Internalizantes, Externalizantes y Otras). El VABS-II se utiliza para evaluar el comportamiento personal y ⁴⁰ suficiencia social con estos cuatro ámbitos principales. Los problemas de conducta se midieron con el Child Behavior Checklist 1½-5 LDS (CBCL). El CBCL es un instrumento utilizado para evaluar las conductas problemáticas y las competencias de un niño (Achenbach 1991; Achenbach y Rescorla 2000). ⁴⁵ cumplimentado por el cuidador del niño. Mediciones de glutatión Los niveles intracelulares de glutatión y los marcadores de estrés oxidativo se tomaron en células sanguíneas de muestras de tratamiento y control recogidas durante las semanas 0 (basal) y 12 ⁵⁰ (seguimiento). Un flebotomista pediátrico entrenado realizó todos los procedimientos de extracción de

sangre. Las muestras de sangre se recogieron por venopunción en tubos de preparación de células mononucleares BD VacutainerB CPT*[^], con heparina sódica, se colocaron inmediatamente en agua helada y se centrifugaron a 2.000 g a 4 °C.

- ⁵⁵ durante 10 minutos. Las cantidades de glutatión total, reducido y oxidado se cuantificaron mediante el método de Tietze (Tietze 1969). Se utilizaron estándares que contenían la forma reducida de glutatión (GSH) o la forma oxidada de glutatión (GSSG) de 20 a 0,015 uM en ácido sulfosalicílico al 2,5% como ⁶⁰ estándares para las curvas de calibración de GSH y GSSG. La diferencia de absorbancia registrada a 412 nm antes y 6 minutos después de la adición de NADPH en presencia de glutatión reductasa se utilizó para calcular la cantidad de glutatión total. La GSSG se cuantificó en presencia de ⁶⁵ vinilpiridina y trietanolamina utilizando el mismo procedimiento. El glutatión reducido se calculó restando la concentración de GSSG del contenido total de glutatión.

Resultados secundarios

Cualquier acontecimiento adverso durante el transcurso del estudio se controló y se comunicó al personal del estudio en la semana 6 (visita 5) o en la semana 12 (visita 8) en la clínica o directamente al principio del estudio. Los acontecimientos adversos fueron ⁵ considerados relacionados con el tratamiento si comenzaron o empeoraron tras el inicio del ensayo. Si eran persistentes o grave, se ofreció a los padres la opción de interrumpir el estudio.

Además, se evaluó la función hepática y renal, así como un recuento de células sanguíneas en sangre y orina en las semanas 0 y 12. El perfil metabólico completo fue revisado por los médicos y comparado con los rangos de referencia conocidos.

El tutor del niño recibió el CRWP o el placebo aleatorizado en forma de polvo en botes en dos visitas diferentes, en la semana 0 (basal) y en la semana 6, y se le pidió que llevara los botes usados al personal del estudio después de las semanas 6 y 12 (seguimiento) para pesarlo. El peso del y el formulario del diario de los padres se tuvieron en cuenta para evaluar el cumplimiento.

Análisis estadístico

En el análisis estadístico de este estudio se utilizó un enfoque de intención de tratar. Se calcularon estadísticas descriptivas para todas las variables del estudio. Esto incluyó medias y desviaciones estándar para los datos continuos, recuentos y porcentajes para medidas categóricas. Evaluamos las diferencias en las medidas demo-
gráficas entre los dos grupos al inicio del estudio mediante pruebas de chi-cuadrado.

Para buscar diferencias entre los grupos CRWP y Placebo en las evaluaciones fisiológicas, se utilizó una serie de métodos lineales generalizados mixtos. lineal generalizado mixtos se mixtos generalizados. Todos los modelos ³⁵ incluían el sexo, la edad, la edad de la madre, la edad del padre y la raza de los sujetos como covariables. Se realizaron pruebas post-hoc utilizando un ajuste de Bonferroni. Para buscar diferencias entre los grupos CRWP y placebo, se realizaron una serie de pruebas t emparejadas y no emparejadas con un ajuste de Bonferroni. Se utilizó la D de Cohen para determinar el tamaño del efecto entre los dos grupos. Se utilizó RStudio y R 3.2.2 para todos los análisis estadísticos, y la significación se aceptó a $p < 0,05$.

Resultados

En este estudio se seleccionó a un total de 81 participantes; 46 fueron aleatorizados (CRWP: 21 y 24 a placebo). Un total de 40 participantes completaron el periodo de tratamiento de 90 días/3 meses (CRWP: 21 y 19 a placebo). (FIG. 3).

En el inicio del estudio, las características demográficas de los sujetos eran similares en ambos grupos (Tabla 1). La edad media de los sujetos en ambos grupos fue $t_{placebo} = 3,9 \pm 0,73$ y $CRWP = 3,9 \pm 0,77$ años de edad. La mayoría de los sujetos eran varones ($placebo = 83\%$ y $CRWP = 90\%$). En el estudio estaba representada una amplia ⁵⁵ variedad de razas, lo que es indicativo de la diversidad existente en la comunidad del sur de Florida. La información demográfica de los padres también fue similar en todos los grupos, con ⁵⁵ ningunas diferencias significativas en ⁵⁵ diferencia en edad ⁵⁵ edad entre los

grupos. Sin embargo, el porcentaje de mujeres que sólo se graduaron en la escuela secundaria fue significativamente ⁶⁰ diferente en el grupo placebo en comparación con el grupo CRWP ($p = 0,04$).

Tampoco hubo diferencias entre los grupos al inicio del estudio en cuanto a criterios diagnósticos o puntuaciones en las evaluaciones ADI-R y ADOS (Tabla 1). Por último, no hubo ⁶⁵ diferencias significativas en los medicamentos/suplementos tomados

	placebo	CRWP	
Edad (años)	3,9	3,9	0,72
10 Varones, N (%)	20 (83)	19 (90)	0,48
<u>Origen étnico, N (%)</u>			
Hispano	5 (21)	10 (48)	0,11
No hispano o latino	6 (25)	3 (14)	0,37
<u>Raza, N (%)</u>			
15 Asiático	0 (0)	1 (5)	0,28
Nativo de Hawai u otra región del Pacífico	1 (4)	0 (0)	0,34
Isleño			
Negro o afroamericano	7 (29)	3 (14)	0,23
Blanco	11 (46)	12 (57)	0,45
Otros	0 (0)	2 (10)	0,12
<u>Información paterna</u>			
20 Edad paterna al nacer (años)	35,9	36,2	0,77
Graduado en educación secundaria, N (%)	3 (14)	6 (32)	0,18
Algún nivel universitario/Técnico, N (%)	4 (19)	5 (26)	0,55
Universitario/Profesional, N (%)	14 (67)	8 (42)	0,18
<u>Información materna</u>			
25 Edad materna al nacer (años)	34,1	34,8	0,77
Graduado en educación secundaria, N (%)	4 (17)	0 (0)	0,04*
Algún nivel universitario/Técnico, N (%)	3 (13)	4 (20)	0,55
Universitario/Profesional, N (%)	17 (70)	16 (80)	0,69
<u>Información de los hijos</u>			
30 Puntuación compuesta Módulo 1:	13,5 + 1,10	14,3 + 1,92	0,73
Puntuación ADOS Comunicación	5,07 + 0,62	6,00 + 0,80	0,23
ADOS Puntuación de interacción social	8,47 + 0,83	8,25 + 1,35	0,66
ADOS Puntuación de la jugada	2,73 + 0,42	2,58 + 0,43	0,61
ADOS Comportamientos estereotipados	2,47 + 0,51	2,92 + 0,68	0,41
<u>Intereses Restringidos Total</u>			
45 Puntuación			
Puntuación compuesta Módulo 2:	10,7 + 1,66	11,2 + 1,85	0,85
ADOS Puntuación de comunicación	4,33 + 0,83	4,78 + 0,92	0,69
ADOS Puntuación de interacción social	6,33 + 1,01	6,44 + 1,08	0,24
ADOS Puntuación de la jugada	1,11 + 0,31	0,89 + 0,45	0,66
50 ADOS Comportamientos estereotipados	2,11 + 0,35	1,67 + 0,47	0,60

TABLA 1

Grupos de	Información demográfica de placebo y intervención tomados al inicio
Información temática:	

	Placebo (n = 24)	Intervention (n = 21)	p-value
--	---------------------	--------------------------	---------

Características	diagnósticas: Entrevista diagnóstica del autismo		
Revisado			
ADI-R (Social Recíproco Interacción)	12.9 + 1.54	11.7 + 1.47	0.41
ADI-R (Verbal)	9.11 + 1.02	10.2 + 1.31	0.22
ADI-R (No verbal)	8.40 + 1.12	9.58 + 1.16	0.42
ADI-R (Comportamiento restringido)	6.05 + 0.55	5.26 + 0.49	0.80
Total	29.0 + 1.71	26.11 + 2.19	0.24
Observación diagnóstica del autismo			

e Intereses Restringidos
Puntuación Total

Las evaluaciones conductuales al inicio del estudio se realizaron con éxito en 24 sujetos del grupo placebo y en 20 sujetos del grupo CRWP (Tabla 2). En general, las puntuaciones medias de los grupos fueron similares en la mayoría de las evaluaciones conductuales; sin embargo, se observaron algunas diferencias. En el VABS-II, el grupo placebo tuvo una puntuación significativamente mayor en el dominio de habilidades de la vida diaria ($p=0,04$), habilidades de afrontamiento ($p=0,02$), dominio de habilidades motoras ($p=0,04$) y habilidades motoras finas ($p=0,03$) en comparación con el grupo CRWP. Puntuaciones más altas en el VABS-II equivalen a conductas más adaptativas, lo que sugiere que el grupo placebo estaba menos afectado. En el Child Behavior Checklist, el grupo CRWP tuvo puntuaciones más altas en problemas de estrés (puntuación T $p=0,04$).

TABLA 2

Cambios en las Evaluaciones Comportamentales en el Grupo de Placebo y CRWP desde el inicio de Basilea hasta el Follow-up										
Evaluaciones del comportamiento:	Placebo				CRWP				Baselin* placebo vs. Baselin*	p-valor de A contra A
	Línea de base (n - 24)	12 wttks (n - 21)	A	p-valut	Línea de base (n - 21)	12 semanas (n - 19)	Ap-valut	intrvtción p-valut		
<u>Escala de valoración del autismo infantil</u>										
CARS y comportamiento T-scor	40.0=	37.4 <	-2.61	0.02°	40.2=	38.4 <	-1.80	0.04'	0.9'i	0.47
	1.87	1.89			2.'i8	2.83				
<u>Preschool Language Scales</u>										
Scort lingüístico total	67.3=	66.71=	-0.'i4	0.46	73.38=	68.80=	-4.'i8	0.30	0.27	0.17
	3.39	3.68			4.48	'i.67				
Clasificación estándar	139=	130.30=	-8.70	0.17	149.0Ei=	14'i.	40=-3.60	0.89	0.3'i	0.80
	6.28	7.70			8.'i9	9.6'i				
Comprensión auditiva	66.9=	68.33=	!4'i	0.47	7'i.76=74	,9'i	<-0,	81-0,77	0.23	0.93
	3.'i9	4.'i'i			¡4.'i!	'i.01				
Comunicación Enprtsivt	69.7=	68.76=	-0.9'i	0.46	73.10=	71.63=	-1.47	0.91	0.'i2	0.46
	3.12	3.16			4.28	4.72				
SOGtal COMmttOtG8ttOD	16.4 <	!4.4 <	-!1.99	0.02°	16.'i7=	!4.4	<-2.22	0.04}	¡0.4!	0.88
	!! 7	!4.3			!1.2	1.04				
<u>Múltiples Escalas de Aprendizaje Temprano T</u>										
Compuesto de aprendizaje Scort temprano	61.0 z	63.3 z	2.33	0.12	67.1 z	68.6 z	1.55	0.44	0.20	0.20
	2.82	3.84			3.95	4.53				
Rtctpción visual	30.8 z	33.1 z	2.34	0.21	35.1 z	35.0 z	-0.05	0.69	0.25	0.15
	2.67	3.49			2.49	3.30				
Fine Motor	27.3=	28.7=	!4.7	¡0.3!	32.4 <	33.2=	0.81	0.62	0.3ô	0.4'i
	2.12	2.80			3.13	4.10				
Lengua Rectptivt	2'i.3=	28.3=	2.91	0.08	28.4=	28.2=	-0.28	0.97	0.27	0.63
	1.'i7	2.'i0			¡2.4!	2.69				
<u>Escalas de Comportamiento Adaptativo de Vntland</u>										
Adaptivt Bthavior Composite Scort	82.8	82.9	0.i3	0.47	7 is	74.4	2.8s	0,0st	0.08	0.03{
	¡3.4!	3.97			2.8'i	3.47				
COMmttOtG8ttOD DOM8iD	79.9=	79.76=	-0.16	0.4'i	7'i.1=	77.2=	2.07	0.0'i°	0.40	0.15
	3.'i6	¡4.4!			4.47	'i.02				
Rec*ptiv*	10.3=	10.81=	0.'i6	¡0.3!	9.43 <	9.63=	0.20	0.23	0.43	0.80
	0.66	0.98			0.80	0.84				
Enpr*ssiv*	9.38=	9.90'i=	0.'i3	0.17	9.38=	9.9'i=	0.'i7	0.0'i°	0.87	0.57
	0.67	0.69			0.81	1.09				
Written	1'i.'i=	1'i.2=	-0.27	0.28	!4.48=	!4.39 <	-0.09	0.17	0.43	0.24
	0.86	0.87			0.87	0.80				
Dominio de las habilidades de la vida diaria	82.9=	83.0=	0.12	0.24	74.'i2 <	74.84 <	-0.32	0.26	0.04°	0.25
	3.42	3.42			2.99	3.39				
PSFSO ü	TL4-	TL -	0 i 0	0 4	99 -	TL00-	10	003\	022	0.06°
	0.76	0.83			0Üô	0.79				
Domestic	13Ü*	13.7 *	0.2i	0.47	1i10*	1L42 *	-0.68	0.37	0.11	0.74
	0.63	0.56			0.54	0.50				
COMmttOt/	12.2 z	12.3 z	0.16	0.46	10.95 z	10.68 z	-0.27	0.74	0.16	0.d0
	0.64	0.69			0.54	0.59				
SOGt&tZ8ttOD DOM8iB	79.1 z	78.7 z	-0.32	0.35	71.24 z	73.89 z	2.65	0.04-	0.06	0.04-
	2.30	3.2			2.84	3.69				
Interpersonal	10.4 z	10.2 z	-0.23	0.26	9.33 z	9.632 z	0.30	0.27	0.20	0.14
	0.57	0.79			0.60	0.78				
Jugar y Ltisurt Timt	10.5 z	10.4 z	-0.12	0.20	9.33 z	9.579 z	0.25	0.33	0.20	0.28
	0.58	0.55			0.61	0.70				
Habilidades COQiflg	13.1 z	13.4 z	0.27	0.46	11.20 z	11.95 z	0.75	0.04-	0.02-	0.23
	0.47	0.74			0.50	0.67				
MOtOr Skills Domaña	86.4 <	87.0=	0.'i7	0.61	78.62=	77.68=	-0.94	0.74	0.04°	0.'i9
	3.33	4.27			2.85	2.89				
Bruto	12.7 z	12.5 z	-0.19	0.83	11.81 z	11.16 z	-0.65	0.34	0.34	0.88
	0.69	0.84			0.51	0.44				
Fin*	118*	132*	0.36	0d6	1d0*	1L47*	0.37	0.03°	0.03°	0.63
	0.63	0.75			0.61	0.64				
Comportamiento Dominio inadaptado	19.2 z	19.2 z	-0.05	0.47	20.05 z	19.44 z	-0.61	0.16	0.26	0.04-
	0.52	0.55			0.50	0.56				
Internalizing	19.3 z	19.5 z	0.16	0.17	20.20 z	19.53 z	-0.67	0.12	0.29	0.02°
	0.56	0.60			0.43	0.69				
Ent*malizante	16.9 z	17.0 z	0.05	0.99	18.05 z	17.58 z	-0.47	0.40	0.21	0.48
	0.66	0.73			0.59	0.39				

TABLA 2-continuación

Cambios en las evaluaciones conductuales en el grupo placebo y en el grupo CRWP desde Basilea ine hasta el seguimiento.										
Evaluaciones del comportamiento:	Placebo				CRWP				Línea de base placebo vs. Línea de base intervención	
	semanas (n = 24)	Inicio 12 (n = 21)	A	Valor p	Línea de base (n = 21)	12 semanas (n = 19)	A	Valor p	Valor p	Valor p de A contra A
<u>Lista de control del comportamiento infantil</u>										
Problemas totales ⁶¹	.8 z60 2.20	.3 z 2.40	-1.50	0.02*	62.60 z 2.00	59.00 z 2.24	-3.60	0.30	0.82	0.52
Reactividad emocional Puntuación T61	.0 z60 2.08	.3 z 1.78	-0.71	0.61	62.79 z 2.07	58.28 z 1.92	-4.51	0.04*	0.55	051
Ansioso/Deprimido Puntuación T55	.9 z56 1.30	.2 z 1.72	0.28	0.95	58.00 z 1.74	54.94 z 1.51	-3.06	0.11	0.46	021
Quejas somáticas Puntuación T58	.7 z57 1.68	.2 z 1.77	-1.46	0.12	58.0 z 0.54	56.3 z 1.81	-1.67	0.35	0.65	0.70
Retirada Puntuación T69	.2 z67 1.85	.3 z 2.51	-1.88	0.04†	.0 z 1.82	66.1 z 2.28	-2.89	0.51	0.93	0.54
Problemas del sueño Puntuación T58	.1 z 2.24	56.6 z 1.88	-1.46	0.4959	.9 z 2.25	59.2 z 1.84	-0.67	0.43	0.42	021
Problemas de atención Puntuación T62	.2 z62 1.50	.8 z 2.12	0.59	0.5562	.2 z 1.95	62.2 z 1.71	-0.04	0.79	0.86	0.63
Comportamiento agresivo Puntuación T59	.5 z57 2.61	.7 z 1.91	-2.31	0.04* ⁵⁷	.7 z 1.96	56.4 z 1.81	-1.29	0.22	0.98	0.80
<u>Puntuaciones de la Escala Orientada DSM:</u>										
Problemas afectivos Puntuación T59	.6 z58 1.91	.6 z 2.01	-0.99	0.2762	.1 z 2.18	59.3 z 2.18	-2.72	0.62	0.86	0.78
Ansiedad Problemas Puntuación T57	.3 z55 1.37	.6 z 1.48	-1.64	0.4759	.3 z 2.18	57.9 z 2.04	-1.64	0.42	0.64	0.82
Problemas generalizados del desarrollo ⁷⁰ Puntuación T	.4 z69 1.63	.7 z 2.15	-0.72	0.2470	.6 z 1.83	66.8 z 2.19	-3.80	0.21	0.95	0.78
Déficit de atención/hiperactividad ⁵⁸ Puntuación T	.9 z57 1.42	.9 z 1.49	-1.05	0.1758	.1 z 1.56	57.2 z 1.46	-0.88	0.42	0.58	0.98
Oposicionista Desafiante Puntuación T57	.9 z57 1.97	.3 z 1.67	-0.54	0.1156	.8 z 2.19	56.3 z 1.80	-0.51	0.99	0.98	0.50
<u>Sustos totales:</u>										
Problemas internalizadores Puntuación T62	.4 z60 1.84	.3 z 2.17	-2.06	0.04*	6.00 z59 1.98	.40 z 2.05	-3.60	0.13	0.82	0.95
Problemas externalizadores Puntuación T58	.8 z57 2.44	.8 z 2.24	-1.02	0.16	.4 z 1.91	56.4 z 1.83	-1.97	0.21	0.90	0.91
Problemas de estrés Puntuación T61	.8 z62 2.01	.3 z 1.78	0.42	0.41	.6 z61 2.63	.7 z 3.33	-1.90	0.65	0.04*	0.38

*p-value < 0.05 using two tail t-test;

†p-value < 0.05 using one tail t-test

Además, al inicio del estudio, la cantidad de glutatión total, glutatión oxidado, glutatión reducido y la proporción de glutatión oxidado a reducido en los leucocitos de cada sujeto. La Tabla 3 muestra estas mediciones basales para 24 sujetos del grupo placebo y 20 sujetos en el grupo CRWP. No hubo diferencias significativas en

cualquiera de las mediciones de glutatión base y después de la intervención en el entre ambos grupos (Tabla 3).

Resultados primarios

Al comparar los cambios en la línea de base con los del

grupos CRWP y placebo, las mejoras conductuales fueron observados en ambos grupos, como se muestra en la Tabla 2 valores tp en las columnas placebo y CRWP), sin embargo el grupo CRWP mejoró en más áreas que el grupo placebo. En las áreas de conductas y gravedad del autismo, no se observaron mejoras significativas en el grupo placebo.

medidas tomadas en las diferencias entre la línea de

ADOS para los grupos Placebo y CRWP. En el ADI-R,

TABLA 3

Cambio en los niveles de glutatión desde el inicio hasta el seguimiento en los grupos placebo y de intervención										
Niveles de glutatión: (nM/10*5 CMB)	Placebo (Media - SEM)				Intervention (Hombres:n - SEM)				Línea de base placebo vs. línea de base intervención	
	Línea de base (n = 24)	12 semanas (n = 16)	A	Valor p	Línea de base (n = 20)	12 semanas (n = 20)	A	Valor p	Valor p	Valor p de A contra A
tGSH	104.2 z 15.8	88.0 z 12.79	-16.22	0.50	113.1 z 16.1	166.7 z 37.2	3.60	0.17	0.77	0.02*

GSSG	10.9 z 1.57	8.99 z 1.36	-18.66	0.78	7.96 z 1.34	12.88 z 2.70	4.93	0.22	0.14	0.12
GSH	82.5 z 13.9	66.3 z 9.8	-16.16	0.53	97.2 z 15.0	136.0 z 34.4	38.8	0.47	0.13	0.04"

23

24

US 11,944,649 B2

el grupo CRWP mejoró significativamente en el dominio de interacción social recíproca ($p=0,04$). Ambos grupos mejoraron significativamente en la puntuación total del ADI-R (Placebo $p=0,04$, CRWP $p=0,05$). En la evaluación CARS de los comportamientos autistas, los del grupo CRWP mejoraron en la puntuación de comportamiento ($p=0,04$), pero también lo hicieron los del grupo placebo ($p=0,02$). En las evaluaciones de comunicación, no hubo cambios significativos en el PLS en ninguno de los grupos. Sin embargo, hubo mejoras en el SCQ tanto en el CRWP ($p=0,04$) como en el grupo placebo ($p=0,02$). El grupo de intervención también mostró mejoras en la parte emocionalmente reactiva del CBCL ($p=0,04$), mientras que el grupo placebo tuvo una disminución de los problemas totales ($p=0,02$), de la conducta agresiva ($p=0,04$) y un empeoramiento de los problemas internalizantes ($p=0,04$). Al evaluar la conducta adaptativa, las mejoras más significativas se produjeron en la VABS-II (Tabla 2). El grupo CRWP mostró mejoras significativas desde el inicio hasta el seguimiento en la puntuación compuesta del comportamiento adaptativo ($p=0,05$), el dominio de la comunicación ($p=0,05$), el dominio de la socialización ($p=0,04$) y el dominio de las habilidades de la vida diaria ($p=0,03$). También tuvieron mejoras significativas desde el inicio hasta el seguimiento en múltiples subdominios, como la comunicación expresiva ($p=0,05$), las habilidades personales de la vida diaria ($p=0,03$), las habilidades de afrontamiento ($p=0,04$) y la motricidad fina

($p=0,03$). El grupo placebo no mostró ningún cambio en su estado de desarrollo según la VABS-II. La Tabla 2 también muestra las mejoras conseguidas en ambos grupos en el CARS, SCQ y CBCL.

Tras la intervención de 3 meses, el VABS-II valorado por los padres era el instrumento que mostró estadísticamente significativa mejora en la PCR en comparación con los cambios en el grupo placebo (tamaño del efecto 0,98; intervalo de confianza [IC] del 95%: 1,42 a 4,02; $p=0,031$) con un tamaño del efecto medio-grande. Así pues, se produjo una mejora significativa en la puntuación compuesta del VABS-II, así como cambios importantes en múltiples dominios/subdominios que representan diferentes aspectos de los síntomas del autismo en el grupo de intervención. En concreto, el dominio de socialización (tamaño del efecto 1,07; IC del 95%: 1,82 a 4,28; $p=0,04$), las habilidades domésticas de la vida diaria (tamaño del efecto 0,73; IC del 95%: 0,34 a 1,55; $p=0,05$), dominio de conducta inadaptada (tamaño del efecto 0,54; IC del 95%: 0,12 a 0,10; $p=0,04$) y el subdominio de internalización (tamaño del efecto 0,73; IC del 95%: -1,40 a 0,34; $p=0,02$) mostró mejoras significativas. Al utilizar un análisis similar, no se observaron cambios significativos

observado en otras evaluaciones realizadas en este estudio (ADOS, ADI-R, CARS, CBCL, PLS, SCQ y MSEL).

Se observaron niveles más altos de glutatión total y reducido desde el inicio hasta el seguimiento en el grupo CRWP (FIG. 4). En cambio, en el grupo placebo no se observaron cambios significativos en los niveles de glutatión total, reducido u oxidado. Las mejoras en los niveles de glutatión también fueron evidentes al observar los cambios individuales desde el inicio hasta el seguimiento en el grupo CRWP mediante gráficos de dispersión con líneas conectadas (FIGS. 4A y 4B). Tras la suplementación de 90 días, los cambios tanto en el glutatión total ($p=0,02$) como en el reducido ($p=0,04$) en el CRWP fueron significativamente mayores en comparación

el suplemento) y se identificaron qué variables eran comunes entre los de este grupo. Observamos que entre los del grupo de intervención (CRWP), había varios niños (60%) que mostraban mejoras significativas en el

- 5 VABS mientras que otros no. Cambios en más de 2 puntos o 1 desviación estándar en las puntuaciones compuestas del VABS-II se utilizaron para discriminar a los respondedores. Se identificaron 12 "respondedores" de los 19 que completaron las evaluaciones conductuales en el grupo CRWP, frente a sólo 5 de los 19 que completaron las evaluaciones conductuales en el grupo placebo.
- 10 21 (los que completaron las evaluaciones de conducta) fueron identificados como respondedores en el grupo placebo ($p=0,03$). Al comparar los respondedores del grupo CRWP ($n=12$) con los no respondedores del mismo grupo ($n=7$), hubo una diferencia significativa en la edad ($p=0,03$). Los respondedores eran
- 15 significativamente mayores (4,23+0,22 años) que los no respondedores (3,48+0,18 años). Además, el grupo de respondedores tenía niveles significativamente más altos de glutatión total ($p=0,01$) y glutatión reducido ($p=0,01$) al inicio del estudio, en comparación con el grupo de no respondedores (FIG. 5). Sin embargo, no
- 20 Se encontraron diferencias entre los dos grupos al comparar los cambios en los niveles de glutatión total, reducido y oxidado (respondedores $p=0,05$, no respondedores $p=0,06$) (Tabla 4).

TABLA 4

Demographics and Glutathione Levels of Responders (n = 12) and Non-Responders (n = 7)			
Características de los encuestados y No respondedores del Grupo de Intervención:	Respondedores (n = 12)	No respondedores (n = 7)	valor p
Edad, (Media + SEM)	4.23 + 0.22	3.48 + 0.18	0.03*
Información de los padres + (Media SEM)			
Edad paterna al nacer (años)	34.3 + 3.84	39.5 + 5.2	0.45
Edad materna al nacer (años)	33.1 + 2.47	36.9 + 3.0	0.35
<u>Niveles basales de glutatión</u>			
tGSH (nM/10*5 CMB)	144.8 + 21.4	65.6 + 11.7	0.01*
GSH (nM/10*5 CMB)	127.8 + 19.8	51.3 + 9.87	0.01*
<u>Cambio en los niveles de glutatión</u>			
tGSH (nM/10*5 CMB)	46.1 + 60.8	64.9 + 49.2	0.83
GSH (nM/10*5 CMB)	36.8 + 56.1	41.7 + 37.2	0.95

con los cambios en el grupo placebo ($p=0,04$). Mediante la VABS-II, analizamos los cambios en el comportamiento frente a los cambios en el glutatión; sin embargo, las mejoras en el comportamiento observadas mediante esta evaluación no se correlacionaron significativamente con los cambios en los niveles de glutatión (FIG. 4D).

Análisis de los respondedores

Dado que había un número significativo de sujetos dentro del grupo CRWP que mejoraron en la conducta adaptativa medida por el VABS-II, se exploraron las características comunes de los que se encontraban entre este grupo de respondedores. En este análisis, las diferencias en las respuestas dentro del CRWP (a

45 Se utilizó un análisis adicional del VABS para comparar la

25 cambios conductuales en los respondedores frente a los no respondedores del grupo de intervención (FIG. 6). Los "respondedores" mostraron una mejora mucho mayor en los dominios/subdominios determinados de la VABS-II, como: adap-

50 tivo ($p < 0,0001$, $p = 0,0003$ en comparación con los no respondedores y el placebo, respectivamente), puntuación en comunicación ($p = 0,008$, $p = 0,01$ en comparación con los no respondedores y el placebo, respectivamente), puntuación en la escala V receptiva ($p = 0,01$ en comparación con los no respondedores), puntuación en la escala V expresiva

55 ($p = 0,03$ en comparación con los no respondedores), las habilidades de la vida diaria ($p = 0,008$, $p = 0,007$ en comparación con los no respondedores y el placebo, respectivamente) y la puntuación de la escala v personal ($p = 0,03$, $p = 0,004$ en comparación con los no respondedores y el placebo, respectivamente) (Tabla 5). También se observaron mejoras en los respondedores

60 en socialización estándar total ($p = 0,04$, $p = 0,02$ en comparación con los no respondedores y el placebo respectivamente), juego y tiempo libre ($p = 0,03$, $p = 0,04$ en comparación con los no respondedores y el placebo respectivamente), habilidades de afrontamiento ($p = 0,03$, $p = 0,04$ en comparación con los no respondedores y el placebo respectivamente), habilidades motoras

65 puntuación total estándar ($p = 0,02$ en comparación con los no respondedores), y la puntuación motora gruesa ($p = 0,01$ en comparación con los no respondedores). Además, disminuyó la internalización ($p = 0,04$, $p = 0,0003$)

en comparación con los no respondedores y el placebo, respectivamente), externalizantes (p=0,02, p=0,008 en comparación con los no respondedores y el placebo, respectivamente) y de conducta desadaptativa (p=0,01, p=0,003 en comparación con los no respondedores y el placebo respectivamente) también se observaron en el grupo de respondedores

muestran-5, de un efecto favorable (Tabla 5).

Resultados secundarios

No se notificaron acontecimientos adversos graves en ninguno de los dos grupo de tratamiento. La Tabla 6 detalla una lista de todos los acontecimientos adversos notificados en el transcurso de este estudio. El cumplimiento fue evaluado por el peso de los botes antes y después de los tratamientos y no mostró diferencias significativas entre los grupos (90,5% en el grupo placebo frente a 89,9% en el CRWP; p=0,91). Además, hubo más abandonos en el grupo placebo en comparación con el grupo CRWP. Según los diarios de los padres y los registros de la visita intermedia (Visita 5), se informó sobre todo de náuseas en las primeras semanas del ensayo en cada grupo, pero tendieron a mejorar a medida que los padres adaptaban su técnica para reconstituir el suplemento en polvo con distintos zumos/comidas. Tampoco hubo cambios significativos en ninguno de los valores del hemograma completo y del panel metabólico completo obtenidos a lo largo del estudio.

TABLA 5

Respondedores frente a no respondedores en Escala de Comportamiento Adaptativo de Vineland				
		No Respondedores (n = 8)	Respondedores (n = 12)	Valor p
Comportamiento adaptativo de Vineland	Total	-1.71 + 2.40	7.67 + 2.55	0.02*
Escala:				
Norma de comunicación	Total	-1.71 + 2.40	7.67 + 2.55	0.02*
Puntuación				
Puntuación en la escala V receptiva		-0.86 + 0.59	1.58 + 0.69	0.02*
Puntuación expresiva en la escala V		-0.29 + 0.60	1.67 + 0.63	0.02*
Puntuación total en la escala V		0.29 + 0.52	0.64 + 0.47	0.63
Estándar de habilidades para la vida diaria		-2.7 + 1.6	2.31 + 4.83	0.03*
Puntuación personal en la escala V		-0.14 + 0.77	2 + 0.71	0.03*
Puntuación de la escala V doméstica		-0.71 + 0.60	-0.08 + 0.57	0.48
Puntuación de la escala V comunitaria		-0.43 + 0.62	0.33 + 0.45	0.32
Socialización Estándar Total		-0.43 + 2.17	6.67 + 3.04	0.12
Puntuación Relaciones interpersonales		0.29 + 0.57	0.83 + 0.82	0.64
Juego y tiempo libre V-escala		-0.43 + 0.37	0.92 + 0.58	0.12
scots				
Puntuación en la escala V de Habilidades		0.51 + 0.86	2.58 + 1.18	0.11
Habilidades motrices Estándar de afrontamiento		-0.15 + 4.4	5.33 + 2.32	0.02*
Comportamiento inadaptado		1 + 0.84	-1.4 + 0.47	0.01*
Puntuación bruta en la escala V		-2.29 + 0.92	0.5 + 0.57	0.01*
Puntuación de la escala V fina		0 + 0.62	1.33 + 0.54	0.14
Comportamiento de Comportamiento adaptativo		-2.69 + 0.40	-1.63 + 0.92	0.08*
Puntuación estándar en la escala V de externalización		1.2 + 1.20	-1.33 + 0.51	0.03*

TABLA 6

Acontecimientos adversos notificados durante el estudio	
---	--

TABLA 6-continuación

Acontecimientos adversos notificados durante el estudio			
Acontecimientos adversos, N (%)	p ¹ b9)	' ' (n =*21	valor p
Erupción	0 (0)	1 (5)	0.34
Otros/Etc.	5	4 (19)	0.77
	(15)		

10 Debate

La heterogeneidad de los TEA puede observarse en la neuro-sistemas lógico, metabólico e inmunológico. Por tanto, se especula que es un trastorno multifactorial, en el que intervienen factores epi- genéticos, genéticos y ambientales. Oxidativa

15 el estrés puede servir de nexo entre los distintos sistemas afectados en esta afección. El estrés oxidativo se produce cuando hay un desequilibrio entre las especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante. El glutatión, el principal antioxidante endógeno, es la principal defensa del organismo contra los daños causados por

20 ROS y es baja en los autistas (Zoroglu et al. 2004; James et al. 2004, 2006, 2008; Kern y Jones 2006; Chauhan y Chauhan 2006; Geier y Kern 2009; Geier et al. 2010; Ghanizadeh et al. 2012; Chauhan et al. 2012). Metabolitos de la transmetilación y la transulfuración

25 vías, responsables de la producción de glu- tione, están desequilibradas en quienes padecen este trastorno. Se observó que los niños autistas presentaban una disminución significativa de los niveles de metionina y de la relación entre la S-adenosilme-tionina (SAM) y la S-adenosilhomocisteína (SAH) plasmáticas (SAM:

30 SAH), un índice de la capacidad de metilación (James et al. 2004; Rose et al. 2011; 2012).

Y lo que es más importante, los sujetos también tenían una cantidad disminuida de glutatión total y de glutatión reducido, o forma activa. La cisteína, el aminoácido limitante de la tasa de glutatión sin-

35 tesis, estaba significativamente disminuida en relación con los niños control, lo que sugiere que la síntesis de glutatión era insuficiente para mantener la homeostasis redox en el autismo (James et al. 2004). Estas disminuciones significativas del glutatión plasmático total y libre, así como de los cocientes redox (GSH:GSSG) en autistas

40 niños es especialmente preocupante debido a la importancia de esta

para el funcionamiento normal de las células.

Aunque intervenciones nutricionales anteriores dirigidas a la capacidad antioxidante han conseguido mejorar con éxito los niveles de glutatión, la asociación entre estos cambios y el comportamiento autista ha sido menos convincente. Por ejemplo, la N-acetilcisteína (NAC), que tiene un mecanismo de acción similar al del suplemento utilizado en este estudio, fue eficaz para mejorar la irritabilidad en niños autistas (Hardan et al. 2012). Sin embargo, en un estudio más reciente en el que se utilizó NAC, la gluta-

50 se incrementó la producción de tiones, pero no se observó una mejora signifi- cativa de las habilidades sociales en jóvenes con TEA (Wink et al. 2016). También se han investigado otros suplementos, como la metilcobalamina, el ácido fólico, el ácido folínico y tratamientos combinados para mejorar la capacidad antioxidante y/o

55 conductas autistas; estas intervenciones se basan en

anomalías en las vías de transmetilación/transulfuración (Bertoglio et al., 2011; Frye et al. 2013a; Hendren et al. 2016; Frye et al. 2013b; James et al., 2009; Adams y Holloway, 2004), y su eficacia sigue sin estar clara.

Acontecimientos adversos, N (%)	b9)	(n =*21	valor p
Bronquitis/Tos/Respiratorio	2 (8)	4 (19)	0.45
Síntomas del resfriado	7 (29)	9 (43)	0.70
Estreñimiento	3 (13)	1 (5)	0.25
Diarrea	1 (4)	4 (19)	0.19
Emesis/Náuseas	p (p)	7 (33)	0.01
Fiebre	2 (8)	4 (19)	0.45

60 Por otra parte, los ácidos grasos omega 3, la vitamina C y el sulforafano también se han estudiado en las personas con este trastorno para combatir el estrés oxidativo mediante distintos mecanismos de acción, con resultados dispares (Bent et al., 2014; 2011; Mankad et al. 2015; Politi et al. 2008; Singh et al. 2014; Voigt et al. 2014). Las limitadas alternativas farmacológicas que sólo se dirigen a afecciones comórbidas específicas son limitadas y con una carga significativa de efectos secundarios; lo que justifica la necesidad de

más estudios que utilicen la medicina complementaria y alternativa (MCA) en el tratamiento del autismo.

Existe en el mercado un suplemento nutricional compuesto por aislado de proteína de suero rico en cisteína (CRWP) que sirve como potente precursor del glutatión, el ImmunocalB. Las proteínas específicas de este suplemento, como la lactoferina, la albúmina sérica, la alfa-lactoalbúmina y las inmunoglobulinas, son ricas en residuos de cisteína y cistina, biodisponibles para la absorción celular y la posterior síntesis de glutatión. En ensayos clínicos anteriores, este CRWP fue capaz de elevar los niveles de glutatión en personas con enfermedad pulmonar obstructiva (Lothian, Grey, Kimoff y Lands, 2000), disfunción hepática en pacientes con hepatitis B crónica (Watanabe et al. 2000), atletas sanos (Lands, Grey y Smountas 1999; 2013) y fibrosis quística (Grey, Mohammed, Smountas, Bahloul y Lands 2003). Este suplemento de proteína de suero rica en cisteína resultó seguro y tolerable en un estudio abierto de 6 semanas de duración en niños con autismo (Kern y Grannemann 2008; Oral Tolerability of Cysteine-Rich Whey Protein Isolate in Autism-A Pilot Study, JANA, 11(1), 2008, 36-41, descrito en la sección anterior de antecedentes).

En el presente estudio, se utilizó un diseño doble ciego controlado con placebo para determinar la eficacia de una intervención de 90 días con un suplemento nutricional que contenía un aislado de proteína de suero rico en cisteína sobre los síntomas conductuales centrales del autismo y los niveles de glutatión en niños preescolares con autismo. El presente estudio también investigó si las mejoras en el glutatión intracelular se correlacionaban con los cambios conductuales. Se utilizó una evaluación conductual exhaustiva y específica para cada edad que utilizaba un total de ocho pruebas diferentes para evaluar qué áreas centrales del autismo podían verse afectadas con esta intervención en niños de 3 a 5 años.

En parte, los presentes estudios pretendían determinar si la suplementación con aislado de proteína de suero rico en cisteína mejoraría el comportamiento y/o los niveles intracelulares de glutatión en niños autistas de 3 a 5 años. Se utilizó una evaluación conductual exhaustiva para evaluar plenamente el impacto de esta suplementación, lo que hace que este enfoque sea único a la hora de evaluar múltiples aspectos conductuales en esta afección. Además, se utilizó como placebo un polvo de proteína de arroz, que imita la cantidad de proteína obtenida del suero. Los presentes resultados sugieren un efecto beneficioso de dicho suplemento en varios aspectos del comportamiento autista, así como una mejora de la capacidad antioxidante demostrada por el aumento de los niveles de glutatión.

Se observaron avances significativos en ambos grupos al comparar las puntuaciones conductuales iniciales con las de seguimiento en CARS, SCQ y ADI-R. Era de esperar que todos los niños participantes en este estudio experimentaran alguna mejora conductual, sobre todo porque durante el estudio tuvieron acceso a una atención estándar consistente en centros preescolares y terapias que prestan servicios especiales a esta población. Sin embargo, al comparar la magnitud de los cambios entre los dos grupos después de los 3 meses (A frente a A), se observaron mejoras conductuales significativas con tamaños del efecto medio-grandes en el grupo de intervención en la evaluación VABS-II y sus subdominios, a saber: puntuación compuesta de conducta adaptativa, socialización y habilidades personales de la vida diaria, así como en la parte emocionalmente reactiva del CBCL. Pueden utilizarse estudios aleatorizados doble ciego controlados con placebo para revelar mejoras precisas con intervenciones específicas. Cabe señalar que los niños del grupo de

intervención tuvieron que mejorar más que los del grupo placebo para observar resultados significativos, ya que sus valores basales indicaban que estaban más gravemente afectados por este trastorno.

En niños con autismo, se han asociado varias mejoras conductuales a las intervenciones nutricionales. La suplementación con NAC se asoció a una disminución de la irritabilidad utilizando la Lista de Comprobación de Conductas Aberrantes ABC y en 5 conductas repetitivas utilizando la Escala de Conductas Repetitivas-Revised (RBS-R) y la Social Responsiveness Scale (SRS) en un estudio piloto (Hardan et al. 2012). En cambio, Wink et al. (2016) no hallaron mejoras conductuales en un diseño de estudio similar. La administración de suplementos de vitamina B6 se asocia con cambios positivos en el sueño y los problemas gastrointestinales en un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de 3 meses de duración, en 20 niños con autismo, utilizando una escala valorada por los padres (Adams y Holloway, 2004). Otros suplementos estrechamente relacionados con la transmetilación y la transulfuración 15 vía también se asociaron con una mejora de las habilidades motoras, en un estudio de casos (Moretti et al. 2005) y en múltiples áreas (Bertoglio et al. 2010) cuando se centraron en un subgrupo de sujetos. En cierto modo, el presente estudio se relaciona con los resultados de Frye et al. (2013a), que mostraron una significativa 20 aumentos en algunas de las mismas puntuaciones VABS-II tras la suplementación con metilcobalamina más ácido folínico. Cada estudio utilizó escalas del clínico, de los padres o una combinación de escalas para evaluar los cambios de comportamiento. El hecho de que los distintos estudios utilicen diversas escalas y diseños de estudio para evaluar 25 cambios de comportamiento, dificulta la comparación de los resultados con la mayoría de los estudios anteriores que utilizan otras intervenciones nutricionales.

Un total de 12 de 20 (60%) niños fueron reconocidos como respondedores a la intervención debido a la puntuación superior a 2 puntos 30 mejora en el VABS-II. Recientemente, Chatham et al. (2017) demostraron que la diferencia mínima clínicamente importante en niños con autismo oscilaba entre 2 y 3,75 puntos, lo que respalda nuestro planteamiento de identificar a estos niños como "respondedores" Además, el hecho de que los padres estuvieran cegados a la intervención 35 declararon significativas en diferencias en la capacidad de adaptación de sus hijos comportamiento (VAB-II) en escalas que evalúan varios dominios afectados más las actividades de la vida diaria, es muy potente. También se observaron mejoras en el VABS-II de 4-5 puntos en el ensayo clínico de fase II de balovaptán en adultos autistas.

40 Aunque la medición de la conducta adaptativa no era un objetivo principal resultado de este ensayo clínico, las mejoras en esta evaluación obtuvieron la etiqueta de terapia innovadora de la FDA (Hoffmann-La Roche 2018). Dado que el trastorno del espectro autista engloba un fenotipo amplio en cuanto a su comportamiento 45 ioral sin etiología conocida, es de esperar que que no todos los pacientes responderán igual a una intervención. Por lo tanto, los niños diagnosticados de autismo y con alteraciones del comportamiento en áreas que demostraron mejoras significativas con

esta **intervención**, pueden estar indicados como buenos 50 candidatos a tal suplementación nutricional.

Otros han observado que el aumento de la capacidad antioxidante mediante diferentes intervenciones, como la metilcobalamina, el ácido fólico (Frye et al. 2013a; James et al. 2009) o la n-acetil-cisteína (Ghanizadeh y Moghimi-Sarani 2013; Hardan et al. 2009), puede reducir la capacidad antioxidante. 55 al. 2012) pueden ser beneficiosas en un subgrupo de niños con esta afección. Hasta ahora, sin embargo, no había genotipos ni fenotipos asociados a los que respondían a estas intervenciones. Los médicos y cuidadores podrían beneficiarse significativamente de la identificación de pacientes que puedan responder potencialmente a 60 estos tratamientos. También es posible que se encuentren efectos beneficiosos aditivos al combinar estas terapias, como en el caso de la metilcobalamina más ácido folínico (Frye et al. 2013a; James et al. 2009).

Mejoras significativas en los niveles de glutatión de los autistas

En el presente estudio piloto se confirmó que 65 niños utilizaban un enfoque nutricional conocido por aumentar la biosíntesis de glutatión. Como era de esperar, los niños asignados al suplemento

experimentaron un aumento significativo del 40% en la forma reducida de glutatión, ya que este suplemento proporciona una fuente natural de cisteína, el paso limitador de la velocidad en la biosíntesis de glutatión, que en última instancia conducirá a un aumento intracel-niveles lulares.

Otras intervenciones han demostrado aumentos de glutatión comparables a los del presente grupo de intervención. La combinación de metilcobalamina y ácido folínico mostró aumentos del 15% en el glutatión total y del 20%.

glutatión reducido, respectivamente (Frye et al., 2013a), mientras que el tratamiento con NAC ha mostrado un aumento del 60% respecto al valor basal (Wink et al., 2016). La importancia de centrarse en los niveles de glutatión en esta afección es relevante, ya que se han encontrado diferencias significativas en el glutatión y sus metabolitos relacionados en el plasma (James et al. 2004, 2006), los glóbulos blancos (Ghezze et al. 2013; Melnyk et al. 2012) y los cerebros post mortem (Chauhan et al. 2012; Rose et al. 2012) de sujetos con autismo. Este hallazgo también se ve respaldado por varias variaciones genéticas observadas en pacientes con TEA relacionadas con la vía de transmetilación/transulfuración, en la que el glutatión es uno de los subproductos (James et al., 2004, 2006, 2008). La hipótesis de que los niveles bajos de glutatión están relacionados con los síntomas del TEA puede estar parcialmente respaldada por el hecho de que ciertos tratamientos dirigidos a esta deficiencia han demostrado ser eficaces para modificar ciertos síntomas conductuales en niños con esta afección (Frye et al. 2y 013a; Ghezze et al. 2013).

Los presentes estudios investigaron además la correlación entre las mejoras conductuales y los cambios en las concentraciones intracelulares de glutatión. Aunque los presentes inventores plantearon inicialmente la hipótesis de que la magnitud de los aumentos de glutathione estaría correlacionada con las mejoras conductuales, como en otros estudios (Frye et al. 2013a; Hardan et al. 2012), los presentes estudios no hallaron ninguna correlación entre los cambios en los niveles de glutathione y la mejora en el VABS-II. Sin embargo, está bastante claro que tanto las áreas centrales en las conductas autistas como la capacidad antioxidante se vieron afectadas positivamente por la presente intervención. Puede que el beneficio del CRWP no se limite a su eficacia en aumentar la capacidad antioxidante, sino su capacidad para mejorar la salud en general.

Al examinar la relación entre los niveles basales de glutatión niveles, los respondedores (n=12) tenían concentraciones basales significativamente más altas tanto de glutatión total como reducido en comparación con los niveles basales y los no respondedores-45 (n=8), lo que sugiere que estos sujetos estaban más cerca de obtener un umbral en sus niveles de glutatión que condujera a cambios positivos en el comportamiento. Es posible que los niños con niveles basales de glutatión más bajos, necesiten una dosis más alta o

una intervención más larga para conseguir resultados similares en el comportamiento.

Intervenciones eficaces y seguras basadas en pruebas en los TEA

son muy solicitadas para aliviar algunos de los problemas de comportamiento que se observan en este trastorno. Se ha informado de que el uso de la medicina complementaria y alternativa se sitúa en torno al 74% en niños con autismo (Hanson et al. 2007; Lofthouse et al. 2012; Perrin et al. 2012; Rossignol et al. 2009). Al evitar los tratamientos

niños con autismo, mejoró algunos dominios conductuales afectados por el TEA y fue bien tolerado.

EJEMPLO 2

5 Características de la producción de aislado de proteína de suero de leche

Un ejemplo de producción de aislado de proteína de suero es pro-

10 vidadas a continuación con fines ilustrativos destinados a la persona experta en la materia.

Como se comprenderá, el suero de leche puede considerarse un subproducto de la fabricación del queso o de la caseína. El lactosuero contiene típicamente proteínas solubles de la leche, llamadas lactosuero

15 proteínas. El suero del queso, por ejemplo, suele contener 5-8 g/l de proteínas (Nx6,38), entre las cuales la β -lactoglobulina (β -lg) y la ct-lactoalbúmina (ct-la) son las más abundantes (representan el 50-55% y el 15-20% del total de proteínas del suero, respectivamente) y la albúmina sérica bovina (BSA), la lactoferrina

20 (LF) y las inmunoglobulinas (IgG) se consideran proteínas menores del lactosuero (con un 3-5% cada una). El lactosuero también puede contener fragmentos proteínicos o polipéptidos, como las llamadas proteopetonas (PP-4, PP-5, PP-8f), resultantes de la proteólisis de las proteínas lácteas por los fermentos lácticos en la quesería.

25 ing o por bacterias psicotrópicas durante el almacenamiento en frío de la leche cruda. Estos compuestos proteínaceos no están completamente caracterizados, y su concentración en el suero es muy variable. Por último, el grupo del nitrógeno no proteico (NPN) puede comprender un gran número de moléculas en el suero, entre las que destacan

30 en el que la urea puede suponer el 50-60%.
A título ilustrativo, en la Tabla 7 se indican algunas características de algunas de las principales proteínas y polipéptidos que se encuentran en una muestra ejemplar de suero (en este caso, suero dulce bovino).

TABLA 7

Algunas características de las principales proteínas y Polipéptidos en una Muestra Ejemplar de Suero de Leche

Proteína o polipéptido	Aportación de peso (g/l) (aprox.)	Molecular weight
9- lactoglobulina	3.0	18 400
ct- lactalbumina	1.2	14 200
BSA	0.3	69 000
Lactoferrina	0.2	77 000
IgG	0.2	160 000
PP-3	0.6	22 000
PP-5 PP-8f	1.6	14 300
NPN		4 100

50

farmacológicos tradicionales que pueden producir importantes efectos secundarios, los padres intentan aliviar los problemas de conducta y las condiciones comórbidas asociadas utilizando tratamientos alternativos. Por tanto, existe una gran necesidad de investigar la eficacia de las terapias complementarias y alternativas y su tolerabilidad en niños con autismo, así como de identificar a

los que responden a estas intervenciones.

Los resultados experimentales descritos en este Ejemplo identifican que la intervención nutricional con un aislado de proteína de suero rico en cisteína mejoró eficazmente los niveles de glutatión en

US 11.944.649 B2. Por ejemplo, el aislado de proteína de suero puede obtenerse a partir de suero, como el suero ejemplificado anteriormente en la Tabla 7. Como se comprenderá, los pasos del proceso implicados en la manu-

55 La fabricación de aislado de proteína de suero (WPI) puede dar lugar a diferencias composicionales en cuanto al perfil proteínico entre los aislados de proteína de suero. Por tanto, los componentes específicos y su abundancia no deben considerarse limitantes en modo alguno. Factores que influyen en el carácter del aislado de proteína de suero

60 isticas pueden incluir, por ejemplo:

[1] Fuente de las proteínas del lactosuero: Por ejemplo, puede utilizarse suero dulce o ácido como material de partida para la fabricación de WPI;

65 [2] La pasteurización: Por ejemplo, las proteínas del queso ingredientes derivados de la leche pueden someterse a dos (2) tratamientos de pasteurización (es decir, 72-75° C.-12-16 seg.) en una planta quesera donde se pasteurice la leche (Canadá y

normativa estadounidense) antes de la fabricación del queso, o en la planta de fabricación del ingrediente, o antes del transporte del suero escurrido a esta planta, con el fin de reducir el recuento bacteriano antes del procesado por membrana o de la cromatografía de intercambio iónico; y

- [3] Desengrasado: Por ejemplo, la clarificación centrífuga es suele utilizarse para reducir el contenido de grasa del suero a 0,8-1,2%. Sin embargo, a menudo se realiza un paso adicional de desgrasado para reducir aún más el contenido de grasa hasta el 0,3-0,5%, con el fin de aumentar el rendimiento de separación de las membranas o evitar un ensuciamiento irreversible o la obstrucción de las resinas de intercambio iónico con lípidos polares. El desengrasado suele consistir en mantener el suero a 50-55° C. durante 30-90 min. para favorecer la agregación de las partículas de grasa (opcionalmente en presencia de CaCl₂ añadido). A continuación, el producto se someterá a separación centrífuga o MF para eliminar el material aglomerado.

En este ejemplo, el aislado de proteína de suero de alta concentración proteica (>90% base seca) puede prepararse típicamente a partir de

suero como el ejemplificado en la Tabla 7 mediante uno de los dos métodos siguientes: procesamiento por membrana o cromatografía de intercambio iónico. En el tratamiento por membrana, pueden utilizarse membranas de microfiltración (MF) y/o ultrafiltración (UF) para concentrar el lactosuero. En la cromatografía de intercambio iónico, puede utilizarse la cromatografía de intercambio cat iónico y/o aniónico para purificar las proteínas del lactosuero.

En este ejemplo, las muestras obtenidas pueden enviarse a

condiciones de secado por pulverización. Cuando se vaya a preparar un aislado sustancialmente no desnaturalizado, el líquido concentrado obtenido puede pulverizarse, por ejemplo, en una corriente de aire caliente (T° de entrada 180-200° C., T° de salida: 80-100° C.) que circule en una torre de secado por pulverización. Una combinación de deshidratación y gravedad puede permitir la recogida de partículas secas (4-8% de humedad) en el fondo del secador por pulverización. Las estimaciones obtenidas a partir del modelado matemático de tales procesos de secado sugieren que la temperatura de las gotas no supera unos 80-85° C. durante los pocos segundos utilizados para la deshidratación, lo que constituye un ejemplo de secado por pulverización de bajo impacto que puede no desnaturalizar sustancialmente la proteína del suero.

Como se comprenderá, los ingredientes con alto contenido en proteínas pueden ser generalmente más difíciles de rehidratar (posiblemente debido a su bajo contenido en lactosa y minerales). Para determinadas aplicaciones en las que se desea una rehidratación rápida del polvo obtenido mediante secado por pulverización, el polvo puede someterse a aglomeración. Tales pasos pueden implicar un secado final del polvo (de 12-15% a 4% de humedad) en un lecho fluido, generando partículas aglomeradas que tengan una mejor hundibilidad en el agua. En los productos que contienen grasa (lo que no suele ser el caso de los ingredientes ricos en proteínas), puede inyectarse lecitina durante el secado en lecho fluido. La lecitina puede cubrir las gotitas de grasa y mejorar su humectabilidad. También pueden utilizarse pasos de instanciación, aunque dichos pasos suelen ser

poco común en la fabricación de ingredientes ricos en proteínas. Como resultado de los pasos anteriores, puede prepararse un ejemplo de aislado de proteína de suero a partir del material de partida de proteína de suero ejemplificado en la Tabla 7. Se entenderá que este ejemplo se proporciona con fines ilustrativos y no limitativos, y que muchas fuentes de proteína de suero alternativas, sustituidas o modificadas y/o pasos de procesamiento conocidos por el experto en la materia

aislado de proteína de suero (ImmunocalB). Se realizó un análisis detallado de los datos recogidos, que permitió identificar los dominios de comportamiento en los que el tratamiento demostró una mejora especialmente notable.

Como se desprende de

5 Tabla 2, se mejoraron varios índices de comportamiento específicos.

En ciertas realizaciones, los métodos aquí descritos pueden utilizarse para mejorar, en particular, uno o más rasgos de comportamiento de un sujeto evaluados mediante una o más de las evaluaciones de comportamiento de la Tabla 2, para las que se ha establecido una mejora.

Se identificó a 10 ment.

La Tabla 8 identifica ejemplos de evaluaciones y medidas conductuales concretas en las que el tratamiento con ImmunocalB en el estudio proporcionó una mejora notable de las puntuaciones.

TABLA 8

Ámbitos conductuales en los que el tratamiento proporcionó una mejora notable				
Comportamiento	Δ	Evaluación	Puntuación	Interpretación
Evalúa- ment: Scores	CRWP Grupo	Puntuación Umbrales		
COCHES	Comport T- amiento scots	-1.80	15 -29,5 = mínimo- oo sx 30-36,5 = leve mod sx >37 = sx grave	Puntuaciones más bajas son mejores.
ADI-R	Recíproco	-0.82	>10, "Autismo"	Puntuaciones más bajas son mejores.
	Social Interacción Total	-3.81	No hay umbral para total	
SCQ	Comunicación	-2.22	>15 = Autismo	Puntuaciones más bajas son mejores.
VABS-II	SCO1'B Adaptativo	2.85	Puntuaciones estándar M = 100, SD 15.	Más alto
	Comportamiento			las puntuaciones son mejor.
	Composite		Por tanto, cualquier	
	Comunicación Dominio	2.07	puntuación <85 es umbral para	
	Expresivo Comunicación Subdominio	0.57	compuesto y dominios. Subdominios	
	Diario personal	1.05	puntuaciones M = 15, DE = 3.	
	Habilidades para la vida			
	Socialización de subdominios	2.65	Por lo tanto, cualquier puntuación <12 es umbral.	
	Dominio Coping Skills Subdominio	0.75		
	Motricidad fina Subdominio	0.37		
CBCL	Habilidades Emocionalmente	-4.51	>65, Línea de base Nivel	Puntuaciones más bajas son mejores.
	Reactivo Puntuación T		>73, Clínica Nivel.	teniendo en cuenta

las enseñanzas aquí contenidas.

EJEMPLO 3

Mejoras del dominio conductual en sujetos con autismo

En el ejemplo 1 se describe un amplio estudio clínico en el que

se investigó el tratamiento del autismo con un medicamento no desnaturalizado.

33

US 10,944,649 B2

En consecuencia, los resultados experimentales sugieren que el aislado de proteína de suero no dentada, como ImmunocalB, puede ser particularmente útil para mejorar uno o más comportamientos

55 rasgos evaluados mediante uno o más de los siguientes: Puntuación T de la conducta CARS; Puntuación total y/o de interacción social recíproca ADI-R; Puntuación de comunicación SCQ; Compuesto de conducta adaptativa VABS II, Dominio de comunicación, Subdominio de comunicación expresiva, Subdominio de habilidades personales de la vida diaria.

60 principal, Dominio de Socialización, Subdominio de Habilidades de Afrontamiento y/o Puntuación del Subdominio de Habilidades Motrices Finas; y/o Puntuación T del CBCL Emocionalmente Reactivo, en un sujeto que lo necesite y que tenga autismo o TEA.

En resumen, en el Ejemplo 1 descrito anteriormente, una cantidad significativa de

Se observaron 65 aumentos de tGSH y GSH en el grupo tratado con ImmunocalB, y también se observaron mejoras significativas en los totales de Vineland, CARS, SCQ y ADI-R en el grupo tratado con ImmunocalB.

grupo tratado con nocalB. Mediante un análisis de covariables, se observaron mejoras significativas en comparación con el placebo en las puntuaciones de conducta adaptativa de Vineland, que se considera una de las pruebas de conducta más sensibles. Los niños con niveles muy bajos de GSH mostraron menos mejoría con ImmunocalB que los que tenían niveles más altos. Además, ImmunocalB se toleró bien y no mostró efectos secundarios significativos en los niños con TEA.

Se han descrito a modo de ejemplo una o varias realizaciones ilustrativas. Los expertos en la materia comprenderán que pueden realizarse numerosas variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

REFERENCIAS

1. <http://medicalhomeinfo.org/health/Autism%20downloads/AutismAlarm.pdf>, C., Autism Alarm. 2005, CDC.
2. Folstein, S. E. y B. Rosen-Sheidley, Genética del autismo: etiología compleja para un trastorno heterogéneo. *Nat Rev Genet*, 2001. 2(12): p. 943-55.
3. Keller, F. y A. M. Persico, El contexto neurobiológico del autismo. *Mol Neurobiol*, 2003. 28(1): p. 1-22.
4. Homig, M. y W. I. Lipkin, Enfermedades infecciosas e inmunitarias factores en la patogénesis de los trastornos del neurodesarrollo: epidemiología, hipótesis y modelos animales. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2001. 7(3): p. 200-10.
5. Horvath, K. y J. A. Perman, Trastorno autista y enfermedad gastrointestinal. *Curr Opin Pediatr*, 2002. 14(5): p. 583-7.
6. Krause, I., et al., Informe breve: factores inmunitarios en el autismo: una revisión crítica. *J Autism Dev Disord*, 2002. 32(4): p. 337-45.
7. Bauman, M. L. y T. L. Kemper, La neuropatología de los trastornos del espectro autista: ¿qué hemos aprendido? *Novartis Found Symp*, 2003. 251: p. 112-22; discusión 122-8, 281-97.
8. White, J. F., Fisiopatología intestinal en el autismo. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. 228(6): p. 639-49.
9. James, S. J., et al., El endofenotipo metabólico y los genotipos relacionados se asocian con el estrés oxidativo en niños con autismo. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2006. 141(8): p. 947-56.
10. Schafer, F. Q. y G. R. Buettner, Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, 2001. 30(11): p. 1191-212.
11. Dickinson, D. A., et al., Citoprotección contra el estrés oxidativo y regulación de la síntesis de glutatión. *Biol Chem*, 2003. 384(4): p. 527-37.
12. Klatt, P. y S. Lamas, Regulación de la función proteica por la S-glutatioación en respuesta al estrés oxidativo y nitrosativo. *Eur J Biochem*, 2000. 267(16): p. 4928-44.
13. Dickinson, D. A. y H. J. Forman, El glutatión en la defensa y la señalización: lecciones de un pequeño tiol. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 973: p. 488-504.
14. Deplancke, B. y H. R. Gaskins, Control redox de las vías de transulfuración y biosíntesis del glutatión. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2002. 5(1): p. 85-92.
15. Pastore, A., et al., Análisis del glutatión: implicación en
17. Griflith, O. W., Regulación biológica y farmacológica de la síntesis de glutatión en mamíferos. *Free Radic Biol Med*, 1999. 27(9-10): p. 922-35.
18. Konstantareas, M. M., Niños autistas expuestos a 5 entrenamiento en comunicación simultánea: un seguimiento. *J Autism Dev Disord*, 1987. 17(1): p. 115-31.
19. Zimmerman, A. W., et al., Marcadores de inflamación en líquido cefalorraquídeo y suero en el autismo. *Pediatr Neurol*, 2005. 33(3): p. 195-201.
- 10 20. Jyonouchi, H., et al., Respuestas inmunitarias innatas desreguladas en niños pequeños con trastornos del espectro autista: su relación con los síntomas gastrointestinales y la intervención dietética. *Neuropsychobiología*, 2005. 51(2): p. 77-85.
- 1521 . Yorbik, O., et al., Investigación de enzimas antioxidantes en niños con trastorno autista. *Prostaglandinas Leucot Ácidos Grasos Esenciales*, 2002. 67(5): p. 341-3.
22. Chauhan, A., et al., Estrés oxidativo en el autismo: aumento de la peroxidación lipídica y reducción de los niveles séricos de ceruloplasmina y transferrina: las proteínas antioxidantes. *Vida Sci*, 2004. 75(21): p. 2539-49.
23. Witschi, A., et al., La disponibilidad sistémica del glutatión oral. *Eur J Clin Pharmacol*, 1992. 43(6): p. 667-9.
24. Flagg, E. W., et al., Ingesta dietética de glutatión en humanos 25 y la relación entre la ingesta y el nivel de glutatión total en plasma. *Nutr Cáncer*, 1994. 21(1): p. 33-46.
25. PDR (Referencia de Escritorio del Médico). 2008, Montvale, N.J.: Thomson Healthcare Inc.
26. Lands, L. C., Y L. Grey y A. A. Smountas, Efecto de la suplementación con un donante de cisteína sobre el rendimiento muscular. *J Appl Physiol*, 1999. 87(4): p. 1381-5.
- 30 27. Kern, J., Grannemann B. D., Gutman, J. y Trivedi M., Tolerabilidad oral del aislado de proteína de suero rico en cisteína en el autismo: un estudio piloto. *JANA*, 2008. 11(1): p. 36-41.
- 35 28. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales. 4ª ed. Asociación A.P. 1994, Washington: American Psychiatric Press.
29. Le Couteur, A., Lord, C y Rutter, M., Autismo Diag- la redox y la desintoxicación. *Clin Chim Acta*, 2003. 333(1): p. 19-39.
16. Hall, A. G., Revisión: El papel del glutatión en la regulación de la apoptosis. *Eur J Clin Invest*, 1999. 29(3): p. 238-45.

- 40 nostic Interview-Revised (ADI-R). Westm
Psychologi- cal Services, 2003. U.S. 11.944.649 B2
30. Zimmerman, I., Steiner, V G y Pond, R E,
Escala de lenguaje preescolar-4 (PLS-4). The
Psychological Corpora- tion 2002.
- 45 31. Rutter, M., Bailey, A, y Lord, C. Servicios
Psicológicos Wester, Cuestionario de
Comunicación Social (SCQ). 2003.
32. Mullen, E. A. G. S., Escalas Mullen de
Aprendizaje Temprano. 1995.
- 50 33. Sparrow, S., Cicchetti, D V, y Balla, D A.,
Escala de conducta adaptativa de Vineland,
segunda edición. 2005.
34. Achenbach, T., Lista de control del
comportamiento infantil para niños de 1/c a 5
años (CBCL 1/c-5 LDS) ASEBA, 2000.
35. NIH. Cuestiones a tener en cuenta en la
investigación con niños
55 [citado 2008 7/23/2008]; Disponible en:
[http://www.cc-](http://www.cc-nih.gov/cc/pedweb/pedsstaff/pedprocheck.pdf)
[.nih.gov/cc/pedweb/pedsstaff/pedprocheck.pdf](http://www.cc-nih.gov/cc/pedweb/pedsstaff/pedprocheck.pdf).
36. FDA. Conversión de la Petición GRAS nº
1G0371 en una Notificación GRAS para el
Aislado de Proteína de Suero y Sólidos de
Productos Lácteos. 2000 Febrero 2010];
Disponible en:
60 <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras>
[avisos/ grn000037.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras).
37. James S J, Rose S, Melnyk S, et al.
Desequilibrio redox del glutatión celular y
mitocondrial en células linfo- blastoides
derivadas de niños con autismo. FASEB
65 J. 2009; 23(8):2374-2383. doi:10.1096/fj.08-128926.
38. Frye R E, Delatorre R, Taylor H, et al.
Anomalías del metabo- lismo redox en niños
autistas asociadas a la

- enfermedad mitocondrial. *Transl Psychiatry*. 2013; 3(6): e273. doi:10.1038/tp.2013.51.
39. Dickinson D a, Moellering D R, Iles K E, et al. La citoprotección contra el estrés oxidativo y la regulación de la síntesis del glutatión. *Biol Chem*. 2003; 384(4): 527- 537. doi:10.1515/BC.2003.061.
40. Klatt P, Lamas S. Regulación de la función proteica por la S-glutatiolación en respuesta al estrés oxidativo y nitrosativo. *Eur J Biochem*. 2000; 267(16):4928-4944. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931175>.
41. Dickinson, D A. Y Forman, H. J. (2002), El glutatión en la defensa y la señalización. *Anales de la Academia de Ciencias de Nueva York*. 2000:973: 488-504. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04690.x
42. DeplanckeB R. Control redox de la vías de transulfuración y biosíntesis del glutatión. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002; 1:85-92.
43. Achenbach, T. M. (1991). Manual para la Lista de Comprobación del Comportamiento Infantil/4-18. *Revista de Psicología Infantil Anormal*, 15, 629-650.
44. Achenbach, T. M., y Rescorla, L. A. (2000). Lista de comprobación del comportamiento infantil. Burlington, Vt: ASEBA.
45. Adams, J. y H. C. (2004). Estudio piloto de una dosis de suplemento multivitamínico/mineral para niños con trastorno del espectro autista. *J Altern Complement Med*, 10(6), 1033-9. <http://doi.org/10.1089/acm.2004.10.1033>
46. Adams, J. B., Audhya, T., McDonough-Means, S., Rubin, R. a, Quig, D., Geis,, Lee, W. (2011). Estado nutricional y metabólico de niños autistas frente niños neurotípicos, y asociación con la gravedad del autismo. *Nutrición y Metabolismo*, 8(1), 34. <http://doi.org/10.1186/1743-7075-8-34>
47. Alabdali, A., Al-Ayadhi, L., y El-Ansary, A. (2014). Asociación del deterioro social y cognitivo y los marcadores biológicos en los trastornos del espectro autista. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 4. <http://doi.org/10.1186/1742-2094-11-4>
48. Asociación Americana de Psiquiatría. (2013). Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales. Arlington. [http://doi.org/10.1176/appi-books.9780890425596.744053](http://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.744053)
49. Bent, S., Bertoglio, K., Ashwood, P., Bostrom, A., & Hendren, R. L. (2011). Ensayo piloto aleatorizado y controlado de ácidos grasos omega-3 para el trastorno del espectro autista. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 41(5), 545-554. <http://doi.org/10.1007/s10803-010-1078-8>
50. Bent, S., Hendren, R. L., Zandi, T., Law, K., Choi, J. y Widjaja, F. (2014). Internet-based, randomized, controlled trial of omega-3 fatty acids for hyperactivity in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 53. <http://doi.org/10.1016/j.jaac.2014.01.018>
51. Bertoglio, K., James, J. S., Deprey, L., Brule, N. y Hendren, R. L. (2010). Estudio piloto del efecto del tratamiento con metil B12 en medidas conductuales y biomarcadores en niños con autismo. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16(5), 555-60. <http://doi.org/10.1089/acm.2009.0177>

53. Chauhan, A., Audhya, T., & Chauhan, V. (2012). Desequilibrio redox del glutatión específico de cada región cerebral en el autismo. *Investigación Neuroquímica*, 37(8), 1681-9. <http://doi.org/10.1007/s11064-012-0775-4>
54. Chauhan, A., & Chauhan, Y (2006). Estrés oxidativo en el autismo. *Fisiopatología: Revista Oficial de la Sociedad Internacional de Fisiopatología/ISP*, 13(3), 171-81. <http://doi.org/10.1016/j.pathophys.2006.05.007>
55. Christensen, D. L., Baio, J., Braun, K. Y N., Bilder, D., Charles, J., Constantino, J. N., . Yeargin-Allsopp, M. (2016). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years-Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. Informe Semanal sobre Morbilidad y Mortalidad. *Resúmenes de Vigilancia*, 65(3), 1-23. <http://doi.org/10.15585/mmwr.ss6503al>
56. Frye, R E, Slattery, J., & Quadros, E. (2017). Anomalías del metabolismo del folato en el autismo: biomarcadores potenciales. *Biomarcadores en Medicina*. <http://doi.org/10.2217/bmm-2017-0109>
57. Frye, R. E., Melnyk, S., Fuchs, G., Reid, T., Jemigan, S., Pavliv,, James,S.J. (2013). Estudio clínico Eficacia del tratamiento con metilcobalamina y ácido fólico-
52. Chatham, C. H., Taylor, K. I., Charman, T., Liogier D'ardhuy, X., Eule, E., Fedele,, F. (2017). Comportamiento adaptativo en el autismo: Diferencias mínimas clínicamente importantes en el Vineland-11. *Investigación sobre el autismo: Revista oficial de la Sociedad Internacional de Investigación sobre el Autismo*. <http://doi.org/10.1002/aur.1874>

58. Frye, R. E., Sequeira, J. M., Quadros, E. V., James, S. J., & Rossignol, D. a. (2013). Autoanticuerpos cerebrales del receptor de folato en el trastorno del espectro autista. *Molecular Psychiatry*, 18(3), 369-81. <http://doi.org/10.1038/mp.2011.175>
59. Geier, D. A., y Jkerndfwairnet, J. K. K. (2009). Estudio prospectivo de los biomarcadores del estrés oxidativo en los trastornos autistas, 5(1), 2-10.
60. Geier, D. a, Audhya, T., Kern, J. K., & Geier, M. R. (2010). Niveles de mercurio en sangre en el trastorno del espectro autista: ¿Existe un nivel umbral? *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 70(2), 177-86. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20628441>
61. Ghanizadeh, A., & Derakhshan, N. (2012). N-acetilcisteína para el tratamiento del autismo, informe de un caso. *Revista de Investigación en Ciencias Médicas: Revista Oficial de la Universidad de Ciencias Médicas de Isfahan*, 17(10), 985-7. Obtenido de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3698662&tool=pmcentrez&rendertype=abstracto>
62. Ghanizadeh, A., y Moghimi-Sarani, E. (2013). Ensayo clínico doble ciego controlado con placebo de N-acetilcisteína añadida a la risperidona para el tratamiento del autismo. *BMC Psiquiatría*, 13(1), 196. <http://doi.org/10.1186/1471-244X-13-196>
63. Ghanizadeh, a, Akhondzadeh, S., Hormozi, M., Maka-rem, a, Abotorabi-Zarchi, M., & Firoozabadi, a. (2012). Factores relacionados con el glutatión y estrés oxidativo en el autismo, una revisión. *Química Medicinal Actual*, 19(23), 4000-5. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22708999>
64. Ghezzi, A., Visconti, P., Abruzzo, P. M., Bolotta, A., Ferreri, C., Gobbi, G., ... Mazzanti, L. (2013). Oxidativo
65. Grey, Y, Mohammed, S. R., Smountas, A. a, Bahloul, R., & Lands, L. C. (2003). Mejora del estado del glutatión en pacientes adultos jóvenes con fibrosis quística suplementados con proteína de suero. *Revista de Fibrosis Quística: Oficial*

- Revista de la Sociedad Europea de Fibrosis Quística, 2(4), 195-8. [http://doi.org/10.1016/S1569-1993\(03\)00097-3](http://doi.org/10.1016/S1569-1993(03)00097-3)
66. Hanson, E., Kalish, L. A., Bunce, E., Curtis, C., McDaniel, S., Ware, J., & Petry, J. (2007). Uso de medicina complementaria y alternativa entre niños diagnosticados de trastorno del espectro autista. *Revista de Autismo y Trastornos del Desarrollo*, 37(4), 628-636.
67. Hardan, A. Y, Fung, L. K., Libove, R. a, Obukhanych, T. V, Nair, S., Herzenberg, L. a, Tirouvanziam, R. (2012). Ensayo piloto controlado y aleatorizado de N-acetilcisteína oral en niños con autismo. *Psiquiatría Biológica*, 71(11), 956-61. <http://doi.org/10.1016/j.bio-psych.2012.01.014>
68. Hendren, R., James, J. S., Widjaja, F., & Brittany, Rosenblatt Abram, y B. S. (2016). Estudios aleatorizados, placebo-ensayo cebo-controlado de metil B12 para niños con autismo. *Revista de Psicofarmacología Infantil y Adolescente*, 26(9). <http://doi.org/10.1089/cap.2015.0159>
69. Inmunocal. (2013). En *Physician's Desk Reference*.
70. James, S. J., Cutler, P., Melnyk, S., Jernigan, S., Janak, L., Gaylor, D. W., & Neubrandner, J. a. (2004). Biomarcadores metabólicos de mayor estrés oxidativo y capacidad de metilación alterada en niños con autismo. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6), 1611-7. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585776>
71. James, S. J., Jill James, S., Melnyk, S., Jernigan, S., Hubanks, A., Rose, S., & Gaylor, D. W. (2008). Metabolismo anormal de transmetilación/transulfuración e hipometilación del ADN entre los padres de niños con autismo. *Revista de Autismo y Trastornos del Desarrollo*, 38(10), 1966-75. <http://doi.org/10.1007/s10803-008-0591-5>
72. James, S. J., Melnyk, S., Fuchs, G., Reid, T., Jernigan, S., Pavliv, Gaylor, D. W. (2009). Eficacia del tratamiento con metilcobalamina y ácido fólico sobre el estado redox glutatiónico en niños con autismo 1-3, 425-430. <http://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26615>. Am
73. James, S. J., Melnyk, S., Jernigan, S., Cleves, M. a, Halsted, C. H., Wong, D. H., ... Gaylor, D. W. (2006). El endofenotipo metabólico y los genotipos relacionados se asocian con el estrés oxidativo en niños autistas. *Revista Americana de Genética Médica. Parte B, Genética Neuropsiquiátrica: La publicación oficial de la Sociedad Internacional de Genética Psiquiátrica*, 141B(8), 947-56. <http://doi.org/10.1002/ajmg.b.30366>
74. Kern, J., y Grannemann, B. (2008). Tolerabilidad oral del aislado de proteína de suero rico en cisteína en el autismo: un estudio piloto. *J Am Nutraceut ...*, 11(1), 36-41. Obtenido de <http://forums.immunolead.com/post?id=2254077>
75. Kern, J. K., y Jones, A. M. (2006). Pruebas de toxicidad, estrés oxidativo e injuria neuronal en el autismo. *Revista de Toxicología y Salud Medioambiental. Parte B, Revisiones críticas*, 9(6), 485-99. <http://doi.org/10.1080/10937400600882079>
76. Lands, L. C., Grey, Y L., & Smountas, A. A. (2013). Efecto de la suplementación con un donante de cisteína en el rendimiento muscular Efecto de la suplementación con un donante de cisteína en el rendimiento muscular, 1381-1385.
77. Lands, L. C., Grey, Y L., & Smountas, a a. (1999). Efecto de la suplementación con un donante de cisteína en el rendimiento muscular. *Revista de Fisiología Aplicada*, 87(4), 1381- 1385.

79. Loke, Y J., Hannan, A. J., & Craig, J. M. (2015). El papel del cambio epigenético en los trastornos del espectro autista. *Frontiers in Neurology*, 6(mayo), 107. <http://doi.org/10.3389/fneur.2015.00107>
80. Lord, C., Le Couteur, A., y Rutter, M. (1994). Autismo Entrevista Diagnóstica-Revisada: Una versión revisada de una entrevista diagnóstica para cuidadores de personas con posibles trastornos generalizados del desarrollo. *Revista de Autismo y Trastornos del Desarrollo*, 24(5), 659-685.
81. Lord, C., Risi, S., Lambrecht, L., Cook, E. H., Leventhal, B. L., & DiLavore, P. C. (2000). The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. *J Autism Dev Disord.*, 30. <http://doi.org/10.1023/A:1005592401947>
82. Lord, C., Rutter, M., Goode, S., Heemsbergen, J., Jordan, H., Mawhood, L., & Schopler, E. (1989). Esquema de observación diagnóstica del autismo: Una observación estandarizada de la conducta comunicativa y social. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 19(2), 185-212. <http://doi.org/10.1007/BF02211841>
83. Lothian, B., Grey, Y, Kimoff, R. J., & Lands, L. C. (2000). Tratamiento de la enfermedad obstructiva de las vías respiratorias con un suplemento proteico donante de cisteína: informe de un caso. *Tórax*, 57(3), 914-6. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713031>
84. Mankad, D., Dupuis, A., Smile, S., Roberts, W., Brian, J., Lui, T., . Anagnostou, E. (2015). Ensayo aleatorizado controlado con placebo de ácidos grasos omega-3 en el tratamiento de niños pequeños con autismo. *Molecular Autism*, 6(1), 18. <http://doi.org/10.1186/s13229-015-0010-7>
85. Manohari, S. M., Raman, Y, & Ashok, M. Y (2013). Utilización de la Escala de Conducta Adaptativa Vineland-11 en niños con Autismo: una experiencia india. *Revista de la Asociación India para la Salud Mental de Niños y Adolescentes*, 9(1), 5-12.
86. Melnyk, S., Fuchs, G. J., Schulz, E., López, M., Kahler, S. G., Fussell, J. J., . James, S. J. (2012). Metabólico desequilibrio asociado a la desregulación de la metilación y al daño oxidativo en niños con autismo. *Revista de Autismo y Trastornos del Desarrollo*, 42(3), 367-77. <http://doi.org/10.1007/s10803-011-1260-7>
87. Moretti, P., Sahoo, T., Hyland, K., Bottiglieri, T., Peters, S., Gaudio, Scaglia, F. (s.f.). Deficiencia cerebral de folato con retraso del desarrollo, autismo y respuesta al ácido fólico, 3-5.
88. Mullen, E. M. (1995). Escalas Mullen de Aprendizaje Temprano (AGS). Circle Pines, Minnesota: Servicio Americano de Orientación.
89. Perrin, J. M., Coury, D. L., Hyman, S. L., Cole, L., Reynolds, A. M. y Clemons, T. (2012). Uso de medicina complementaria y alternativa en una amplia muestra pediátrica de autismo. *Pediatrics*, 130(Suplemento 2), S77S82. <http://doi.org/10.1155/2012/870391>

90. Politi, P., Cena, H., Comelli, M., Marrone, G., Allegri, C., & Emanuele, E. (2008). Efectos conductuales de la suplementación con ácidos grasos omega-3 en adultos jóvenes con autismo grave: un estudio abierto. *Arch Med Res.*, 39. <http://doi.org/10.1016/j.arcmed.2008.06.005>
91. Rose, S., Melnyk, S., Pavliv, O., Bai, S., Nick, T. G., Frye, R. E., y James, S. J. (2012). Evidencia de daño oxidativo e inflamación asociados a un bajo estado redox del glutatión en el cerebro autista. *Psiquiatría Traslacional*, 2(7), e134. <http://doi.org/10.1038/tp.2012.61>
92. Rose, S., Melnyk, S., Trusty, T. a, Pavliv, O., Seidel, L., Li, J., ... James, S. J. (2011). Intracelular y extracelular

- lular y la generación de radicales libres en células inmunitarias primarias de niños con autismo. *Investigación y Tratamiento del Autismo*, 2012, 986519. <http://doi.org/10.1155/2012/986519>
93. Rossignol, D. A. (2009). Tratamientos novedosos y emergentes para los trastornos del espectro autista: una revisión sistemática. *Anales de Psiquiatría Clínica: Revista Oficial de la Academia Americana de Psiquiatras Clínicos*, 21(4), 213- 236.
94. Rutter Bailey, A., y Lord, C., M. (2003). *Cuestionario de Comunicación Social*. Los Ángeles, Calif.
95. Schopler, E., Reichler, R. J., DeVellis, R. F., y Daly, K. (1980). Hacia una clasificación objetiva del autismo infantil: Escala de Clasificación del Autismo Infantil (CARS). *Revista de Autismo y Trastornos del Desarrollo*, 10(1), 91-103.
96. Singh, K., Connors, S. L., Macklin, E. a, Smith, K. D., Fahey, J. W., Talalay, P. y Zimmerman, A. W. (2014). Tratamiento con sulforafano del trastorno del espectro autista (TEA). *Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América*, 111(43), 15550-5. <http://doi.org/10.1073/pnas.1416940111>
97. Sparrow, S., Balla, D., y Cicchetti, D. (1984). *Escalas de conducta adaptativa de Vineland*. Circle Pines, Minnesota: American Guidance Service Inc.
98. Tietze, F. (1969). Método enzimático para la determinación cuantitativa de cantidades nanométricas de glutatión total y oxidado: aplicaciones a la sangre de mamíferos y otros tejidos. *Bioquímica Analítica*, 27, 502-522.
99. Voigt, R. G., Mellon, M. W., Katusic, S. K., Weaver, A. L., Matem, D., Mellon, B., ... Barbaresi, W. J. (2014). Suplementación dietética con ácido docosahexaenoico en niños con autismo. *Revista de Gastroenterología y Nutrición Pediátricas*, 58(6), 715-722.
100. Volden, J., Smith, I. M., Szatmari, P., Bryson, S., Fombonne, E., Mirenda, P., Thompson, A. (2011). *Utilización de la Escala de Lenguaje Preescolar-IV para Caracterizar*
- El lenguaje en preescolares con TEA. *Am J Speech Lang Pathol*, 20(Agosto), 200-208. <http://doi.org/1058-0360/2011/10-0035> [pii]10.1044/1058-0360(2011/10-0035)
101. Watanabe, A., Okada, K., Shimizu, Y, Wakabayashi, H., Higuchi, K., Niiya, K., . Kohri, H. (2000). Terapia nutricional de la hepatitis crónica mediante proteína de suero (no calentada). *Revista de Medicina*, 31(5-6), 283-302.
102. Wink, L. K., Adams, R., Wang, Z., Klaunig, J. E., Plawecki, M. H., Posey, D. J., ... Erickson, C. A. (2016). Estudio piloto aleatorizado controlado con placebo de N-acetil-cisteína en jóvenes con trastorno del espectro autista. *Molecular Autism*, 7, 26. <http://doi.org/10.1186/s13229-016-0088-6>
103. Zoroglu, S. S., Armutcu, F., Ozen, S., Gurel, A., Sivasli, E., Yetkin, O., & Meram, I. (2004). Aumento del estrés oxidativo y alteración de las actividades de las enzimas de eliminación de radicales libres eritrocitarios en el autismo. *Archivo Europeo de Psiquiatría Clínica y*

Lo que se reclama es:

1. Un método para probar, tratar y medir una mejora en uno o más rasgos de comportamiento de un sujeto con Autismo o Trastorno del Espectro Autista (TEA), dicho método que comprende:
- programar 8 visitas distintas con un profesional sanitario para el sujeto y realizar los siguientes pasos en cada una de las respectivas visitas programadas:
- la visita 1 comprende la realización de una evaluación inicial de ¹ del sujeto, la evaluación inicial consistente en recibir información sobre la ingesta actual de fármacos/suplementos del sujeto, en el que el sujeto mide 4,23+/-? 0,22 años de edad;
- la visita 2 comprende la obtención de 4 muestras de sangre del sujeto y la determinación del nivel de estrés oxidativo biomarcadores, la función hepática, la función renal y el recuento de células sanguíneas; los biomarcadores de estrés oxidativo comprenden los niveles intracelulares de glutatión;
- 2las visitas 3 y 4 comprenden colectivamente la realización de 8 evaluaciones conductuales , durando cada una de dichas visitas 3 y 4 una media de 2 horas y realizándose dentro de una ventana de 15 días y a más tardar 15 días después de la visita 2; las evaluaciones conductuales consisten en 251) Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS), 2) Childhood Autism Rating Scale (CARS), 3) Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R), 4) Pre-school Language Scale-Fifth Edition (PLS-5), 5) Cuestionario de Comunicación Social (SCQ), 6) Escalas Mullen de Aprendizaje Temprano (MSEL), 7) Escala de Comportamiento Adaptativo Vineland, Segunda Adición (VABS-II) y 8) Lista de Comprobación del Comportamiento Infantil 1'/c-5 LDS (CNCL);
- la visita 5 comprende el registro de acontecimientos adversos alrededor de 6-7 35 semanas después de la visita 4, los acontecimientos adversos seleccionados del grupo que comprende bronquitis, tos, infección respiratoria, síntomas de resfriado, estreñimiento, diarrea, emesis, náuseas, fiebre y erupción cutánea;
- las visitas 6 y 7 comprenden colectivamente la repetición de las 8 evaluaciones conductuales a las 12 semanas de la visita 4, durando cada una de dichas visitas 6 y 7 una media de 2 horas y realizándose en un plazo de 15 días, siendo las evaluaciones realizadas por el mismo psicólogo clínico. chólogos que realizaron las 8 evaluaciones conductuales-
- Neurociencia, 254, 143-147. <http://doi.org/10.1007/s00406-004-0456-7>
104. Roche, H.-L. (2018). Estudio de RG7314 para investigar la eficacia y la seguridad en personas con trastornos del espectro autista (TEA). <https://clinicaltrials.gov/ct2> (N.º de id.: NCT0179344). Consultado el 13 de mayo de 2018.
- Estas referencias, y las citadas en otras partes de la especificación, se incorporan por referencia en su totalidad.

- 45ments en las semanas 3 y 4, y en la ~~US~~ ~~1.944.649 B2~~ ~~41~~ secuencia que se realizó en las semanas 3 y 4;
- la visita 8 comprende la obtención de otras 4 muestras de sangre para evaluar por separado los biomarcadores de estrés oxidativo, la función hepática, la función renal y el recuento de células sanguíneas, la
- 50 Biomarcadores de estrés oxidativo que comprenden una segunda medición del nivel de glutatión intracelular, en la que la visita 8 se programa a más tardar 7 días después de la visita 7;
- administrar al sujeto una composición que comprende aislado de proteína de suero y/o concentrado de proteína de suero
- 55como tratamiento que comienza al final de la visita 4, en una cantidad de 0,5 gramos/kg para los sujetos de menos de 20 kg o de 10 g para los sujetos de 20 kg o más, y que dura al menos 90 días; y
- medir una mejora en uno o más comportamientos
- 60 rasgos del sujeto evaluados por la Escala Compuesta de Comportamiento Adaptativo II de Vinland; en la que uno o más rasgos de comportamiento comprenden la socialización, las habilidades domésticas de la vida diaria, el comportamiento desadaptativo y la internalización, determinados por el dominio de socialización, la vida diaria
- 65Dominio de habilidades, dominio de conducta desadaptativa y subdominio de internalización de la Escala Compuesta de Conducta Adaptativa II de Vinland, respectivamente.

