

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 567**

51 Int. Cl.:

A23L 33/17 (2006.01)

A61K 38/01 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/US2014/023596**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14150556**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14717283 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 2986164**

54 Título: **Composiciones nutricionales que contienen un componente de péptido y sus usos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313832958

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

21.04.2021

73 Titular/es:

**MJN U.S. HOLDINGS LLC (100.0%)
2400 West Lloyd Expressway
Evansville, IN 47721, US**

72 Inventor/es:

**HONDMANN, DIRK;
VAN TOL, ERIC A.F.;
GROSS, GABRIELE;
SCHOEMAKER, MARIEKE H. y
LAMBERS, TEARTSE TIM**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 820 567 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones nutricionales que contienen un componente de péptido y sus usos

Campo técnico

5 La presente descripción se refiere a composiciones nutricionales que incluyen un componente de péptido que puede reducir la incidencia de una enfermedad autoinmunitológica. De modo más específico, la presente descripción se refiere al uso de una composición nutricional para su uso para reducir la incidencia de la diabetes mellitus, incluyendo la diabetes mellitus de tipo 1 ("T1D") y la diabetes mellitus de tipo 2 ("T2D"). Las composiciones nutricionales descritas en la presente son adecuadas para la administración a sujetos adultos y pediátricos. El componente de péptido de la composición nutricional incluye péptidos seleccionados descritos en la presente.

10 Antecedentes de la técnica

15 Las enfermedades autoinmunitológicas surgen de una respuesta inmunitológica inapropiada del cuerpo frente a ciertos tejidos presentes en el cuerpo. Esta respuesta autoinmunitológica puede estar restringida a ciertos órganos, por ejemplo, el páncreas en la diabetes mellitus, o puede afectar solo a ciertas membranas de ciertos tejidos y órganos. Una de las funciones del sistema inmunitológico es proteger al cuerpo respondiendo a un microorganismo invasor, tal como virus o bacterias, mediante la producción de anticuerpos o linfocitos sensibilizados. En condiciones normales, una respuesta inmunitológica no puede ser activada contra las células del propio cuerpo. Sin embargo, las enfermedades autoinmunitológicas se caracterizan porque el sistema inmunitológico del cuerpo puede cometer un error y atacar a las células que debe proteger. Por tanto, las enfermedades autoinmunitológicas incluyen una amplia categoría de enfermedades relacionadas, en las que el sistema inmunitológico del cuerpo ataca a sus propios tejidos.

20 Una enfermedad autoinmunitológica es cualquier enfermedad provocada por células inmunitológicas que se dirigen erróneamente a células y/o tejidos sanos del cuerpo. En la actualidad, las enfermedades autoinmunitológicas afectan al 3% de la población de EE. UU. y a un porcentaje similar de la población de los países industrializados. Las enfermedades autoinmunitológicas se caracterizan por linfocitos T y B que se dirigen aberrantemente a autoproteínas, autopolipéptidos, autopéptidos y/u otras automoléculas, provocando daños y/o fallos de un órgano, un tejido o un tipo de célula dentro del cuerpo. Por tanto, una enfermedad autoinmunitológica aparece cuando se produce alguna interrupción del proceso de control normal, que permite a los linfocitos evitar su supresión, o cuando se produce una alteración en algún tejido corporal de modo que ya no es reconocido como "propio" y, por tanto, se ataca. El mecanismo exacto que provoca una enfermedad autoinmunitológica puede diferir, pero puede ser activado por muchos factores que incluyen bacterias, virus, toxinas, fármacos y una predisposición genética.

30 Las enfermedades autoinmunitológicas incluyen enfermedades que afectan a tejidos específicos, así como enfermedades que pueden afectar a múltiples tejidos. La característica de la autoinmunitidad específica de tejido es que se dirige selectivamente a un único tejido o a un tipo de célula individual. Sin embargo, ciertas enfermedades autoinmunitológicas que se dirigen a autoproteínas ubicuas también pueden afectar a tejidos específicos.

35 Las enfermedades autoinmunitológicas concretas a menudo se clasifican en trastornos específicos de órganos y tipos no específicos de órganos. Por ejemplo, la enfermedad de Hashimoto afecta a la glándula tiroidea, la enfermedad de Addison afecta a las glándulas adrenales, y la diabetes mellitus de tipo 1 afecta al páncreas. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitológicas no específicas de órganos incluyen la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la dermatomiositis. En la actualidad, se conocen más de 30 enfermedades autoinmunitológicas, que incluyen artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de insulina, esclerosis múltiple, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico y escleroderma. Otros ejemplos no limitantes de enfermedades autoinmunitológicas incluyen: 40 encefalomiелitis diseminada aguda, enfermedad de Addison, esclerosis lateral amiotrófica, hepatitis autoinmunitológica, síndrome linfoproliferativo autoinmunitológico, enfermedad de Berger, síndrome de Blau, ciertos tipos de cánceres, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, osteomielitis multifocal recurrente crónica, síndrome de Churg-Strauss, síndrome de Cogan, enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, síndrome de Cushing, 45 diabetes mellitus de tipo 1, síndrome de Evan, enfermedad de Grave, encefalopatía de Hashimoto, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Meniere, esclerosis múltiple, neuromiotonia, penfigoide cicatricial ocular, psoriasis, artritis psoriática, fenómeno de Reynaud, síndrome de Reiter, síndrome de las piernas inquietas, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, arteritis temporal, mielitis transversa, vaculitis, y granulomatosis de Wegener.

50 La diabetes mellitus es una expresión genérica para los trastornos metabólicos que se caracterizan por la persistencia de un estado hiperglucémico debido a una deficiencia en la acción de la insulina. En general, la diabetes mellitus se clasifica a grandes rasgos en diabetes mellitus dependiente de insulina ("insulin-dependent diabetes mellitus", IDDM) y diabetes mellitus no dependiente de insulina ("non-insulin-dependent diabetes mellitus", NIDDM). Una forma de IDDM incluye la diabetes mellitus de tipo 1 ("T1D"), que es una forma de diabetes mellitus que surge de la destrucción autoinmunitológica de las células beta productoras de insulina del páncreas. 55

La insulina es un material biológico que reprime los niveles elevados de glucosa en sangre. La insulina es una hormona segregada por el páncreas que puede estimular el metabolismo de carbohidratos en el hígado y potenciar la captación de glucosa hacia las células musculares y las células grasas para disminuir el nivel elevado de glucosa

en sangre. Se observa una falta de insulina, que conduce a un aumento de la glucosa en sangre y en orina, cuando las células beta del páncreas se están destruyendo y cuando todas las células beta han sido destruidas. Así, la diabetes mellitus se caracteriza por una hiperglucemia recurrente o persistente.

5 La T1D puede ser inducida por muchos factores diferentes, que incluyen factores genéticos, factores ambientales, factores de la dieta, la susceptibilidad global de un individuo, por activadores diabetogénicos y/o por exposición a un antígeno impulsor. En la actualidad, se entiende que la T1D es una enfermedad poligénica, lo cual significa que diferentes genes pueden contribuir a la aparición de T1D.

10 Los síntomas típicos de la T1D incluyen poliuria (micción frecuente), polidipsia (aumento de la sed), xerostomía (boca seca), polifagia (aumento del hambre), fatiga y pérdida de peso. A menudo, una T1D no tratada puede conducir a una cetoacidosis diabética. La cetoacidosis diabética es una complicación potencialmente mortal que aparece cuando el cuerpo sufre una escasez de insulina y, así, comienza a degradar ácidos grasos para obtener energía. La degradación de los ácidos grasos produce cuerpos cetónicos ácidos que pueden provocar muchos de los síntomas descritos en la presente.

15 Otra forma de diabetes mellitus incluye la T2D, que es un tipo de diabetes mellitus en donde la hiperglucemia se manifiesta debido a una secreción insuficiente de insulina y una resistencia a la insulina provocada por factores diversos e imprecisos, tales como el envejecimiento, el estrés y la dieta. La T2D se caracteriza como NIDDM. En general, aproximadamente 90% de todos los individuos con diabetes mellitus se incluyen en NIDDM.

20 Se sabe que el aumento rápido de los niveles de glucosa en sangre después de las comidas y su persistencia durante muchos años exacerba la diabetes mellitus. La exacerbación de la diabetes mellitus a menudo viene acompañada de un estímulo de la angiopatía, que puede conducir al desarrollo de neurosis, nefropatía y retinopatía y a mayores complicaciones de infarto de miocardio y apoplejía.

Para los individuos propensos a desarrollar o padecer a menudo diabetes mellitus, se adoptan ciertos tipos de terapias de dieta y ejercicio. La adopción de ciertos patrones de ejercicio y dieta puede ayudar a estabilizar los niveles de glucosa en sangre y puede mejorar el metabolismo de carbohidratos global.

25 Las pruebas han demostrado que un estrecho control glucémico es un factor principal en la prevención de las complicaciones asociadas con la diabetes mellitus. Sin embargo, los agentes disponibles en la actualidad en general no pueden mantener un control glucémico adecuado a largo plazo, debido al deterioro progresivo de la hiperglucemia, como resultado de la pérdida progresiva de la función de las células pancreáticas. Por tanto, un control glucémico óptimo mediante fármacos, regímenes terapéuticos, suplementos nutricionales y/o composiciones nutricionales es una estrategia importante para el tratamiento de la diabetes mellitus. Aunque la diabetes mellitus puede ser tratada mediante insulina o mediante la administración de fármacos hipoglucémicos orales, es necesario un suplemento nutricional o una composición nutricional seguros y eficaces para reducir la incidencia de la diabetes mellitus.

35 Las enfermedades autoinmunitarias pueden tratarse con agentes inmunosupresores, terapia de sustitución de hormonas o transfusión de sangre, en el caso de trastornos autoinmunitarios de la sangre. Estos tratamientos incluyen varios efectos secundarios no deseados y pueden ser costosos para el sujeto diana. En segundo lugar, cuando se administran agentes inmunosupresores, existe un delicado equilibrio entre disminuir la actividad del sistema inmunológico, al mismo tiempo que se permite que el sistema inmunológico desarrolle su capacidad para combatir a las enfermedades en general. Además, los agentes inmunosupresores pueden provocar efectos secundarios no deseados, tales como pérdida de hueso /o deterioro de tejidos y hueso.

40 Por consiguiente, la presente descripción proporciona una composición nutricional que comprende un componente de péptido para su uso para reducir la incidencia de la diabetes mellitus. Además, la presente descripción proporciona el uso de una composición nutricional que comprende un componente de péptido que puede reducir la incidencia de T1D y T2D proporcionando una composición nutricional que incluye el componente de péptido descrito en la presente a un sujeto diana. El documento US 2006/286252 describe una leche en polvo para bebés parcialmente hidrolizada y con bajo contenido en lactosa, que comprende un componente de proteína que comprende caseína y proteína del suero de la leche parcialmente hidrolizada, y el componente de proteína tiene un peso molecular concreto. El documento US 2006/286208 describe un proceso para preparar un hidrolizado parcial de proteínas que comprende el uso de proteasa N, para obtener un grado de hidrólisis de entre aproximadamente 45 4% y 10%.

Descripción de la invención

Brevemente, la presente descripción se dirige a una composición nutricional, tal como se define en la reivindicación 1, para su uso para reducir la incidencia de la diabetes mellitus.

55 La composición o composiciones nutricionales de la presente descripción pueden comprender además una leche en polvo para bebés. La composición o composiciones nutricionales de la presente descripción pueden comprender una composición nutricional pediátrica, un suplemento nutricional o una composición nutricional para adultos.

5 Debe entenderse que la anterior descripción general y la siguiente descripción detallada presentan realizaciones de la descripción y están previstas para proporcionar una visión general o marco para comprender la naturaleza y el carácter de la descripción según se reivindica. La descripción sirve para explicar los principios y las operaciones del contenido reivindicado. Otras características y ventajas de la presente descripción serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la siguiente descripción.

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria IL12p70 por células dendríticas humanas primarias activadas expuestas a caseína hidrolizada exhaustivamente.
- 10 La figura 2 ilustra la secreción de tratarán la citoquina proinflamatoria IL12p70 por células dendríticas humanas primarias activadas expuestas a la fracción mayor que 500 Da de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- La figura 3 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interferón-gamma por células dendríticas humanas activadas expuestas a caseína hidrolizada exhaustivamente.
- La figura 4 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interferón-gamma por células dendríticas humanas primarias activadas expuestas a la fracción mayor que 500 Da de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- 15 La figura 5 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-8 por células dendríticas humanas activadas expuestas a caseína hidrolizada exhaustivamente.
- La figura 6 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-8 por células dendríticas humanas primarias activadas expuestas a la fracción mayor que 500 Da de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- 20 La figura 7 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral-alfa por células dendríticas humanas activadas expuestas a caseína hidrolizada exhaustivamente.
- La figura 8 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral-alfa por células dendríticas humanas primarias activadas expuestas a la fracción mayor que 500 Da de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- La figura 9 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-6 por células dendríticas humanas activadas expuestas a caseína hidrolizada exhaustivamente.
- 25 La figura 10 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-6 por células dendríticas humanas primarias activadas expuestas a la fracción mayor que 500 Da de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- La figura 11 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-1β por células dendríticas humanas activadas expuestas a caseína hidrolizada exhaustivamente.
- 30 La figura 12 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-1β por células dendríticas humanas activadas expuestas a la fracción mayor que 500 Da de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- La figura 13 muestra la secreción del factor de necrosis tumoral-alfa de macrófagos humanos activados cuando se exponen a caseína hidrolizada exhaustivamente.
- La figura 14 ilustra la secreción del factor de necrosis tumoral-alfa de macrófagos humanos primarios activados cuando se exponen a la fracción mayor que 500 Da de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- 35 La figura 15 ilustra la secreción de interleuquina-1 (IL1) en el íleon de ratones NOD, ratones BALB/C y ratones NOD alimentados con una dieta de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- La figura 16 ilustra la secreción de interleuquina-18 (IL18) en el íleon de ratones NOD, ratones BALB/C y ratones NOD alimentados con una dieta de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- 40 La figura 17 ilustra la secreción de interleuquina-6 (IL6) en el íleon de ratones NOD, ratones BALB/C y ratones NOD alimentados con una dieta de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- La figura 18 ilustra la secreción de interleuquina-17 (IL17) en el íleon de ratones NOD, ratones BALB/C y ratones NOD alimentados con una dieta de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- La figura 19 ilustra la secreción de IFN-gamma de células T de nódulos linfáticos que drenan el intestino de ratones NOD, ratones BALB/C y ratones NOD alimentados con una dieta de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- 45 La figura 20 ilustra la secreción de interleuquina-4 de células T de nódulos linfáticos que drenan el intestino de ratones NOD, ratones BALB/C y ratones NOD alimentados con una dieta de caseína hidrolizada exhaustivamente.
- La figura 21 ilustra la secreción de interleuquina-17 de células T de nódulos linfáticos que drenan el intestino de ratones NOD, ratones BALB/C y ratones NOD alimentados con una dieta de caseína hidrolizada exhaustivamente.

La figura 22 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-12p40 desde macrófagos de ratón expuestos a caseína hidrolizada exhaustivamente, a caseína hidrolizada exhaustivamente no esterilizada mediante filtración, y a la fracción mayor que 500 Da de caseína hidrolizada exhaustivamente.

5 La figura 23 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-1 β desde macrófagos de ratón expuestos a caseína hidrolizada exhaustivamente, a caseína hidrolizada exhaustivamente no esterilizada mediante filtración, y a la fracción mayor que 500 Da de caseína hidrolizada exhaustivamente.

La figura 24 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-6 desde macrófagos de ratón expuestos a caseína hidrolizada exhaustivamente, a caseína hidrolizada exhaustivamente no esterilizada mediante filtración, y a la fracción mayor que 500 Da de caseína hidrolizada exhaustivamente.

10 La figura 25 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral-alfa desde macrófagos de ratón expuestos a caseína hidrolizada exhaustivamente, a caseína hidrolizada exhaustivamente no esterilizada mediante filtración, y a la fracción mayor que 500 Da de caseína hidrolizada exhaustivamente.

15 La figura 26 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-12p40, interleuquina-1 β , interleuquina-6, factor de necrosis tumoral-alfa desde macrófagos de ratón expuestos a caseína hidrolizada exhaustivamente, a caseína hidrolizada exhaustivamente no esterilizada mediante filtración, y a la fracción mayor que 500 Da de caseína hidrolizada exhaustivamente.

La figura 27 ilustra el efecto de la caseína hidrolizada exhaustivamente sobre la secreción de insulina (n = 4) tras la exposición a IL-1 β .

20 La figura 28 ilustra los correspondientes efectos de la secreción de insulina (n = 4) tras la exposición a IL-1 β para una fracción mayor que 500 Da de la caseína hidrolizada exhaustivamente.

La figura 29 ilustra el efecto de muestras de hidrolizado sobre la secreción de insulina (n = 4) tras la exposición a IFN- γ .

La figura 30 ilustra el efecto de la caseína hidrolizada exhaustivamente sobre la secreción de insulina (n = 4) tras la exposición a IL-23.

25 La figura 31 ilustra los correspondientes efectos con respecto a IL-17 para una fracción >500Da de la caseína hidrolizada exhaustivamente.

Mejor modo de realizar la invención

30 En este punto se tratarán en detalle las realizaciones de la presente descripción, exponiéndose uno o más ejemplos de estas a continuación. Cada ejemplo se proporciona como explicación de la composición nutricional de la presente descripción y no constituye una limitación. De hecho, será evidente para los expertos en la técnica que pueden realizarse modificaciones y variaciones en las indicaciones de la presente descripción sin apartarse del alcance de la descripción. Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de una realización pueden usarse con otra realización para producir otra realización distinta.

35 Así, se pretende que la presente descripción cubra dichas modificaciones y variaciones como si estuviesen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes. Otros objetos, características y aspectos de la presente descripción se describen en la siguiente descripción detallada o son evidentes a partir de esta. Los expertos en la técnica entenderán que el presente análisis es solo una descripción de ejemplos de las realizaciones y no pretende limitar los aspectos más amplios de la presente descripción.

40 La presente descripción se refiere, en general, a composiciones nutricionales que comprenden un componente de péptido. Además, la descripción se refiere a una composición nutricional que comprende un componente de péptido para su uso para reducir la incidencia de la diabetes mellitus, proporcionando a un sujeto diana una composición nutricional que comprende un componente de péptido descrito en la presente.

45 Una "composición nutricional" significa una sustancia o una formulación que satisface al menos una porción de los requisitos de nutrientes de un sujeto. Los términos y expresiones "producto nutricional/productos nutricionales", "leche en polvo nutricional/leches en polvo nutricionales", "producto nutricional entérico/productos nutricionales entéricos", y "suplemento nutricional/suplementos nutricionales" se usan como ejemplos no limitantes de composición o composiciones nutricionales a lo largo de la presente descripción. Además, "composición nutricional/composiciones nutricionales" puede referirse a líquidos, polvos, geles, pastas, sólidos, concentrados, suspensiones, o formas listas para usar de leche en polvo entérica, leche en polvo oral, leche en polvo para bebés, 50 leche en polvo para sujetos pediátricos, leche de crecimiento y/o leche en polvo para adultos.

El término "entérico" significa que puede administrarse a través o dentro del tracto gastrointestinal o digestivo. La "administración entérica" incluye la alimentación oral, la alimentación intragástrica, la administración transpilórica o cualquier otra administración hacia el tracto digestivo. La "administración" es más amplia que la "administración entérica", e incluye la administración parenteral o cualquier otra vía de administración mediante la cual una sustancia

se introduce en el cuerpo de un sujeto.

El término "péptido", tal como se emplea en la presente, describe cadenas moleculares lineales de aminoácidos, que incluyen moléculas monocatenarias, o sus fragmentos. Los péptidos descritos en la presente no incluyen más de 50 aminoácidos en total. Los péptidos también pueden formar oligómeros o multímeros que consisten en al menos dos moléculas idénticas o diferentes. Las correspondientes estructuras de mayor orden de estos multímeros se denominan, de manera correspondiente, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc. Además, en el término "péptido" también se incluyen peptidomiméticos de estos péptidos, en los uno o más aminoácidos y/o uno o más enlaces peptídicos han sido reemplazados por análogos funcionales. Estos análogos funcionales pueden incluir, pero no se limitan a todos los aminoácidos conocidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por los genes, tales como selenocisteína.

El término "péptido" también puede indicar péptidos modificados en la naturaleza, en los que la modificación se realiza, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, fosforilación y modificaciones similares que son muy conocidas en la técnica. Además, los péptidos pueden producirse, por ejemplo, de modo recombinante, semisintético, sintético, o pueden obtenerse a partir de fuentes naturales, tales como después de la hidrólisis de proteínas, todo según métodos conocidos en la técnica.

La expresión "grado de hidrólisis" se refiere al grado hasta el cual los enlaces peptídicos son rotos mediante un método de hidrólisis. Los péptidos presentes después de la hidrólisis pueden estar hidrolizados hasta varios grados. Por ejemplo, la fuente de equivalentes de proteínas de la presente descripción, en algunas realizaciones, puede comprender una proteína que tiene un grado de hidrólisis no mayor que 40%. Esto significa que no más del 40% de los enlaces peptídicos de la proteína se han roto mediante un método de hidrólisis.

La expresión "parcialmente hidrolizado" significa que tiene un grado de hidrólisis que es mayor que 0%, pero menor que 50%.

La expresión "hidrolizado exhaustivamente" significa que tiene un grado de hidrólisis que es mayor o igual al 50%.

La expresión "distribución de masa molar", cuando se usa en referencia a una proteína hidrolizada o a un hidrolizado de proteínas, se refiere a la masa molar de cada péptido presente en el hidrolizado de proteínas. Por ejemplo, un hidrolizado de proteínas que tiene una distribución de masa molar mayor que 500 daltons significa que cada péptido incluido en el hidrolizado de proteínas tiene una masa molar de al menos 500 daltons. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los péptidos descritos en la tabla 1 y la tabla 2 se derivan de un hidrolizado de proteínas que tiene una distribución de masa molar mayor que 500 daltons. Para producir un hidrolizado de proteínas que tenga una distribución de masa molar mayor que 500 daltons, un hidrolizado de proteínas puede someterse a ciertos procedimientos de filtración o a cualquier otro procedimiento conocido en la técnica para retirar péptidos, aminoácidos y/u otro material proteico que tenga una masa molar menor que 500 daltons. Para los objetivos de esta descripción, puede usarse cualquier método conocido en la técnica para producir el hidrolizado de proteínas que tiene una distribución de masa molar mayor que 500 daltons.

La expresión "equivalentes de proteínas" o "fuente de equivalentes de proteínas" incluye cualquier fuente de proteínas, tales como soja, huevo, suero de leche o caseína, así como fuentes que no son proteínas, tales como péptidos o aminoácidos. La fuente de equivalentes de proteínas puede ser cualquiera empleada en la técnica, por ejemplo, leche desnatada, proteínas del suero de la leche, caseína, proteína de soja, proteínas hidrolizadas, aminoácidos y similares. Las fuentes de proteínas de la leche bovinas útiles en la práctica de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a polvos de proteínas de la leche, concentrados de proteínas de la leche, aislados de las proteínas de la leche, sólidos de la leche desnatada, leche desnatada, leche seca desnatada, proteínas del suero de la leche, aislados de proteínas del suero de la leche, concentrados de proteínas del suero de la leche, suero de la leche dulce, suero de la leche ácido, caseína, caseína ácida, caseinato (por ejemplo, caseinato de sodio, caseinato de calcio y sodio, caseinato de calcio), proteínas de soja y cualquiera de sus combinaciones. La fuente de equivalentes de proteínas puede comprender, en algunas realizaciones, proteínas hidrolizadas, incluyendo proteínas parcialmente hidrolizadas y proteínas hidrolizadas exhaustivamente. La fuente de equivalentes de proteínas puede incluir, en algunas realizaciones, proteínas intactas.

La expresión "fuente de equivalentes de proteínas" también incluye aminoácidos libres. En algunas realizaciones, los aminoácidos pueden comprender, pero no se limitan a histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, cisteína, fenilalanina, tirosina, treonina, triptófano, valina, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, serina, carnitina, taurina y sus mezclas. En algunas realizaciones, los aminoácidos pueden ser aminoácidos de cadena ramificada. En ciertas otras realizaciones, pueden incluirse péptidos de aminoácidos pequeños como componente de proteína de la composición nutricional. Estos péptidos de aminoácidos pequeños pueden ser naturales o haber sido sintetizados.

Un "sujeto pediátrico" significa un ser humano menor de 13 años. En algunas realizaciones, un sujeto pediátrico se refiere a un sujeto humano desde su nacimiento hasta los 8 años. En otras realizaciones, un sujeto pediátrico se refiere a un sujeto humano entre 1 y 6 años. En otras realizaciones, un sujeto pediátrico se refiere a un sujeto humano entre 6 y 12 años. La expresión "sujeto pediátrico" puede referirse a bebés (prematuros o a término) y/o

niños y niñas pequeños, según se describe a continuación.

5 Un "infante" significa un sujeto humano con una edad que varía desde el nacimiento o no más de un año e incluye infantes de 0 a 12 meses de edad corregida. La expresión "edad corregida" significa la edad cronológica del infante menos la cantidad de tiempo que el infante nació prematuro. Por tanto, la edad corregida es la edad del infante si hubiera nacido a término. El término infante incluye infantes con bajo peso al nacer, infantes con peso muy bajo al nacer e infantes prematuros. "Prematuro" significa un infante nacido antes del final de la 37ª semana de gestación. "A término" significa un infante nacido después del final de la 37ª semana de gestación.

10 Un "niño/niña" significa un sujeto con una edad que varía desde los 12 meses a aproximadamente 13 años. En algunas realizaciones, un niño es un sujeto entre 1 y 12 años. En otras realizaciones, los términos "niño/niña" o "niños/niñas" se refieren a sujetos de entre uno y aproximadamente seis años, o entre aproximadamente siete y aproximadamente 12 años. En otras realizaciones, los términos "niño/niña" o "niños/niñas" se refieren cualquier intervalo de edad entre 12 años y aproximadamente 13 años.

Un "producto nutricional para niños" se refiere a una composición que satisface al menos una porción de los requisitos de nutrientes de un niño. Una leche de crecimiento es un ejemplo de un producto nutricional para niños.

15 Una "leche en polvo para bebés" significa una composición que satisface al menos una porción de los requisitos de nutrientes de un infante. En EE. UU., el contenido de una leche en polvo para bebés viene dictado por las normas federales indicadas en 21 C.F.R. secciones 100, 106 y 107. Estas normas definen los niveles de macronutrientes, vitaminas, minerales y otros ingredientes para intentar imitar las propiedades nutricionales y otras propiedades de la leche materna.

20 La expresión "leche de crecimiento" se refiere a una amplia categoría de composiciones nutricionales previstas para ser usadas como parte de una dieta diversa para apoyar el crecimiento y el desarrollo normales de un niño entre las edades de aproximadamente 1 y aproximadamente 6 años.

25 "Nutricionalmente completa" significa una composición que puede usarse como única fuente de nutrición, que suministraría fundamentalmente todas las cantidades diarias necesarias de vitaminas, minerales y/u oligoelementos en combinación con proteínas, carbohidratos y lípidos. En efecto, "nutricionalmente completa" describe una composición nutricional que proporciona cantidades adecuadas de carbohidratos, lípidos, ácidos grasos esenciales, proteínas, aminoácidos esenciales, aminoácidos condicionalmente esenciales, vitaminas, minerales y energía necesarias para apoyar el crecimiento y el desarrollo normales de un sujeto.

30 Por tanto, una composición nutricional que es "nutricionalmente completa" para un infante prematuro proporcionará, por definición, cantidades cualitativa y cuantitativamente adecuadas de carbohidratos, lípidos, ácidos grasos esenciales, proteínas, aminoácidos esenciales, aminoácidos condicionalmente esenciales, vitaminas, minerales y energía necesarias para el crecimiento del infante prematuro.

35 Una composición nutricional que es "nutricionalmente completa" para un infante a término proporcionará, por definición, cantidades cualitativa y cuantitativamente adecuadas de todos los carbohidratos, lípidos, ácidos grasos esenciales, proteínas, aminoácidos esenciales, aminoácidos condicionalmente esenciales, vitaminas, minerales y energía necesarias para el crecimiento del infante a término.

40 Una composición nutricional que es "nutricionalmente completa" para un niño proporcionará, por definición, cantidades cualitativa y cuantitativamente adecuadas de todos los carbohidratos, lípidos, ácidos grasos esenciales, proteínas, aminoácidos esenciales, aminoácidos condicionalmente esenciales, vitaminas, minerales y energía necesarias para el crecimiento de un niño.

45 Aplicado a los nutrientes, el término "esencial" se refiere a cualquier nutriente que no puede ser sintetizado por el cuerpo en cantidades suficientes para el crecimiento normal y para mantener la salud y que, por tanto, debe ser suministrado por la dieta. La expresión "condicionalmente esencial", aplicada a los nutrientes, significa que el nutriente debe ser suministrado por la dieta bajo condiciones en las que unas cantidades adecuadas del compuesto precursor no están disponibles para el cuerpo para que se produzca una síntesis endógena.

Un "prebiótico" significa un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al hospedante estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o de un número limitado de bacterias en el tracto digestivo que pueden mejorar la salud del hospedante.

50 Un "probiótico" significa un microorganismo con baja o ninguna patogenicidad que ejerce al menos un efecto beneficioso sobre la salud del hospedante.

55 La expresión "probiótico inactivado" significa un probiótico en donde la actividad metabólica o la capacidad reproductiva del organismo probiótico mencionados se ha reducido o destruido. Sin embargo, el "probiótico inactivado" sigue manteniendo, a nivel celular, al menos una porción de su estructura de ADN/ARN y de glicol-proteínas biológica. Tal como se emplea en la presente, el término "inactivado" es sinónimo de "no viable". De modo más específico, un ejemplo no limitante de un probiótico inactivado es *Lactobacillus rhamnosus* GG ("LGG")

inactivado o "LGG inactivado".

Todos los porcentajes, partes y proporciones empleados en la presente son en peso de la formulación total, a menos que se indique lo contrario.

5 La composición nutricional de la presente descripción puede estar sustancialmente exenta de cualquier ingrediente opcional o seleccionado descrito en la presente, con la condición de que el resto de la composición nutricional siga conteniendo todos los ingredientes o características necesarios descritos en la presente. En este contexto, y a menos que se indique lo contrario, la expresión "sustancialmente exenta" significa que la composición seleccionada puede contener menos de una cantidad funcional del ingrediente opcional, generalmente menos del 0,1% en peso, y también incluyendo un porcentaje en peso cero de dicho ingrediente opcional o seleccionado.

10 Todas las referencias a una característica o una limitación en singular de la presente descripción incluirán la correspondiente característica o limitación en plural, y viceversa, a menos que se especifique lo contrario o que el contexto en donde se realiza la referencia dé a entender lo contrario.

15 Todas las combinaciones de etapas del método o proceso, tal como se emplean en la presente, pueden realizarse en cualquier orden, a menos que se especifique lo contrario o que el contexto en donde se realiza la referencia a la combinación dé a entender lo contrario.

Los métodos y las composiciones de la presente descripción, incluyendo sus componentes, pueden comprender, consistir o consistir fundamentalmente en los elementos y limitaciones fundamentales de las realizaciones descritas en la presente, así como cualquier ingrediente, componente o limitación adicional u opcional descritos en la presente o útiles de otro modo en las composiciones nutricionales.

20 Tal como se emplea en la presente, el término "aproximadamente" debe entenderse que se refiere a ambos números especificados como el límite de cualquier intervalo. Debe considerarse que cualquier referencia a un intervalo proporciona respaldo a cualquier subconjunto dentro de ese intervalo.

25 Las enfermedades autoinmunitarias, que incluyen la diabetes mellitus, son enfermedades extendidas y crónicas que no tienen cura. La incidencia y la prevalencia de las enfermedades autoinmunitarias está aumentando exponencialmente. Por ejemplo, la diabetes mellitus se encuentra entre los trastornos metabólicos más habituales en los países desarrollados y en desarrollo. Además, los agentes inmunosupresores usados para tratar las enfermedades autoinmunitarias tienen efectos secundarios no deseados y pueden disminuir la capacidad del sistema inmunológico para combatir una infección.

30 La diabetes mellitus está asociada con hiperglucemia, hipercolesterolemia e hiperlipidemia. Una hiperglucemia descontrolada está asociada con una mayor mortalidad y con una mortalidad prematura debido a un mayor riesgo de enfermedades microvasculares y macrovasculares, que incluyen nefropatía, neuropatía, retinopatía, hipertensión, ictus y enfermedad cardíaca.

35 Por consiguiente, la presente descripción se refiere, en general, a una composición nutricional según se define en la reivindicación 1. El componente de péptido puede comprender péptidos adicionales descritos en la tabla 1. Por ejemplo, la composición puede incluir al menos 10 péptidos adicionales descritos en la tabla 1. En algunas realizaciones, el término "adicional" significa seleccionar péptidos diferentes a los enumerados.

40 Del 20% al 80% de la fuente de equivalentes de proteínas puede incluir un componente de péptido que comprende al menos 5 péptidos seleccionados de la tabla 1 y al menos 3 péptidos adicionales seleccionados de la 2; y del 20% al 80% de la fuente de equivalentes de proteínas comprende una proteína intacta, una proteína parcialmente hidrolizada o sus combinaciones.

45 Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, el componente de péptido que comprende péptidos identificados en la tabla 1 y/o la tabla 2 puede evitar la elevación de los niveles de glucosa en sangre, estimular el almacenamiento de glucógeno, potenciar la fuerza física y/o estimular el almacenamiento de glucógeno. Además, el suministro de una composición nutricional que incluye ciertos péptidos de la tabla 1 y/o la tabla 2 puede prevenir o reducir la incidencia de enfermedades autoinmunitarias y/o diabetes mellitus.

La siguiente tabla 1 identifica las secuencias de aminoácidos específicas de los péptidos que pueden incluirse en el componente de péptido descrito en la presente.

Tabla 1

SEQ ID	Secuencia de aminoácido								(aa)
1	Ala	Ile	Asn	Pro	Ser	Lys	Glu	Asn	8
2	Ala	Pro	Phe	Pro	Glu				5

ES 2 820 567 T3

3	Asp	Ile	Gly	Ser	Glu	Ser						6
4	Asp	Lys	Thr	Glu	Ile	Pro	Thr					7
5	Asp	Met	Glu	Ser	Thr							5
6	Asp	Met	Pro	Ile								4
7	Asp	Val	Pro	Ser								4
n/a	Glu	Asp	Ile									3
n/a	Glu	Leu	Phe									3
n/a	Glu	Met	Pro									3
8	Glu	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Leu					7
9	Phe	Pro	Gly	Pro	Ile	Pro						6
10	Phe	Pro	Gly	Pro	Ile	Pro	Asn					7
11	Gly	Pro	Phe	Pro								4
12	Gly	Pro	Ile	Val								4
13	Ile	Gly	Ser	Glu	Ser	Thr	Glu	Asp	Gln			9
14	Ile	Gly	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Ser				8
15	Ile	Gly	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Ser	Ala			9
16	Ile	Asn	Pro	Ser	Lys	Glu						6
17	Ile	Pro	Asn	Pro	Ile							5
18	Ile	Pro	Asn	Pro	Ile	Gly						6
19	Ile	Pro	Pro	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Val			9
20	Ile	Thr	Ala	Pro								4
21	Ile	Val	Pro	Asn								4
22	Lys	His	Gln	Gly	Leu	Pro	Gln					7
23	Leu	Asp	Val	Thr	Pro							5
24	Leu	Glu	Asp	Ser	Pro	Glu						6
25	Leu	Pro	Leu	Pro	Leu							5
26	Met	Glu	Ser	Thr	Glu	Val						6
27	Met	His	Gln	Pro	His	Gln	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	11
28	Asn	Ala	Val	Pro	Ile							5
29	Asn	Glu	Val	Glu	Ala							5
n/a	Asn	Leu	Leu									3
30	Asn	Gln	Glu	Gln	Pro	Ile						6
31	Asn	Val	Pro	Gly	Glu							5
32	Pro	Phe	Pro	Gly	Pro	Ile						6
33	Pro	Gly	Pro	Ile	Pro	Asn						6

ES 2 820 567 T3

34	Pro	His	Gln	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr				8
35	Pro	Ile	Thr	Pro	Thr							5
36	Pro	Asn	Pro	Ile								4
37	Pro	Asn	Ser	Leu	Pro	Gln						6
38	Pro	Gln	Leu	Glu	Ile	Val	Pro	Asn				8
39	Pro	Gln	Asn	Ile	Pro	Pro	Leu					7
40	Pro	Val	Leu	Gly	Pro	Val						6
41	Pro	Val	Pro	Gln								4
42	Pro	Val	Val	Val	Pro							5
43	Pro	Val	Val	Val	Pro	Pro						6
44	Ser	Ile	Gly	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Ser	Ala	Glu	11
45	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu					7
46	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Ile	Val	Pro	Asn	11
47	Ser	Lys	Asp	Ile	Gly	Ser	Glu					7
48	Ser	Pro	Pro	Glu	Ile	Asn						6
49	Ser	Pro	Pro	Glu	Ile	Asn	Thr					7
50	Thr	Asp	Ala	Pro	Ser	Phe	Ser					7
51	Thr	Glu	Asp	Glu	Leu							5
52	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Val						6
53	Val	Leu	Pro	Val	Pro							5
54	Val	Pro	Gly	Glu								4
55	Val	Pro	Gly	Glu	Ile	Val						6
56	Val	Pro	Ile	Thr	Pro	Thr						6
57	Val	Pro	Ser	Glu								4
58	Val	Val	Pro	Pro	Phe	Leu	Gln	Pro	Glu			9
59	Val	Val	Val	Pro	Pro							5
60	Tyr	Pro	Phe	Pro	Gly	Pro						6
61	Tyr	Pro	Phe	Pro	Gly	Pro	Ile	Pro				8
62	Tyr	Pro	Phe	Pro	Gly	Pro	Ile	Pro	Asn			9
63	Tyr	Pro	Ser	Gly	Ala							5
64	Tyr	Pro	Val	Glu	Pro							5

La siguiente tabla 2 identifica también un subconjunto de secuencias de aminoácidos específicas de la tabla 1 que pueden incluirse y/o comprenden el componente de péptido descrito en la presente.

Tabla 2

SEQ ID	Secuencia de aminoácido									(aa)
4	Asp	Lys	Thr	Glu	Ile	Pro	Thr			7
13	Ile	Gly	Ser	Glu	Ser	Thr	Glu	Asp	Gln	9
17	Ile	Pro	Asn	Pro	Ile	Gly				6
21	Ile	Val	Pro	Asn						4
24	Leu	Glu	Asp	Ser	Pro	Glu				6
30	Asn	Gln	Glu	Gln	Pro	Ile				6
31	Asn	Val	Pro	Gly	Glu					5
32	Pro	Phe	Pro	Gly	Pro	Ile				6
51	Thr	Glu	Asp	Glu	Leu					5
57	Val	Pro	Ser	Glu						4
60	Tyr	Pro	Phe	Pro	Gly	Pro				6
63	Tyr	Pro	Ser	Gly	Ala					5

5 En algunas realizaciones, el componente de péptido puede estar presente en la composición nutricional en una cantidad de aproximadamente 0,2 g/100 kcal a aproximadamente 5,6 g/100 kcal. El componente de péptido puede estar presente en la composición nutricional en una cantidad de aproximadamente 1 g/100 kcal a aproximadamente 4 g/100 kcal. El componente de péptido puede estar presente en la composición nutricional en una cantidad de aproximadamente 2 g/100 kcal a aproximadamente 3 g/100 kcal.

10 El componente de péptido puede formularse con otros ingredientes en la composición nutricional para proporcionar los niveles apropiados de nutrientes para el sujeto diana. El componente de péptido puede incluirse en una leche en polvo nutricionalmente completa que sea adecuada para apoyar el crecimiento normal.

El componente de péptido puede comprender un suplemento nutricional que puede añadirse a otras formulaciones nutricionales, productos alimentarios o bebidas. Para los fines de esta descripción, un "suplemento nutricional" incluye una fuente concentrada de nutriente, por ejemplo, los péptidos identificados en la presente o, como alternativa, otras sustancias con un efecto nutricional o fisiológico cuyo objetivo sea suplementar la dieta normal.

15 El componente de péptido puede proporcionarse como un elemento de una fuente de equivalentes de proteínas. Los péptidos identificados en la tabla 1 y 2 pueden ser proporcionados por una fuente de equivalentes de proteínas obtenida a partir de las proteínas de la leche de vaca, que incluyen, pero no se limitan a caseína bovina y suero de la leche bovina. La fuente de equivalentes de proteínas comprende caseína bovina hidrolizada o suero de la leche bovina hidrolizado. Por consiguiente, los péptidos identificados en la tabla 1 y 2 pueden ser proporcionados por un hidrolizado de caseína. Estos péptidos pueden obtenerse mediante hidrólisis o pueden sintetizarse *in vitro* mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

25 En la presente se describe un ejemplo no limitante de un método de hidrólisis. En algunas realizaciones, este método puede usarse para obtener el hidrolizado de proteínas y los péptidos de la presente descripción. Las proteínas se hidrolizan usando una enzima proteolítica, la proteasa N. La proteasa N "Amano" está disponible en el mercado en Amano Enzyme U.S.A. Co., Ltd., Elgin, Ill. La proteasa N es una preparación de enzimas proteolíticas que se derivan de la especie bacteriana *Bacillus subtilis*. Se indica que el polvo de proteasa "no tiene menos de 150.000 unidades/g", lo cual significa que una unidad de proteasa N es la cantidad de enzima que produce un aminoácido equivalente a 100 microgramos de tirosina durante 60 minutos a un pH de 7,0. Para producir la leche en polvo para bebés de la presente invención, la proteasa N puede usarse a unos niveles de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1,0% en peso de la proteína total que se está hidrolizando.

35 La hidrólisis de proteínas por la proteasa N generalmente se realiza a una temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C. La hidrólisis se produce durante un periodo de tiempo para obtener un grado de hidrólisis de entre aproximadamente 4% y 10%. La hidrólisis puede producirse durante un periodo de tiempo para obtener un grado de hidrólisis de entre aproximadamente 6% y 9%. La hidrólisis puede producirse durante un periodo de tiempo para obtener un grado de hidrólisis de aproximadamente 7,5%. Este nivel de hidrólisis puede tardar en alcanzarse en aproximadamente media hora a aproximadamente 3 horas.

Durante la hidrólisis debe mantenerse un pH constante. En el método de la presente invención, el pH se ajusta a entre 6,5 y 8 y se mantiene en este intervalo. El pH puede mantenerse a aproximadamente 7,0.

5 Para mantener el pH óptimo de la disolución de proteínas del suero de la leche, caseína, agua y proteasa N, puede usarse una disolución cáustica de hidróxido de sodio y/o hidróxido de potasio para ajustar el pH durante la hidrólisis. Si se emplea hidróxido de sodio para ajustar el pH, la cantidad de hidróxido de sodio añadida a la disolución debe controlarse hasta un nivel que comprenda menos de aproximadamente 0,3% de los sólidos totales en el hidrolizado de proteínas terminado. También puede utilizarse una disolución de hidróxido de potasio al 10% para ajustar el pH de la disolución al valor deseado, antes de añadir la enzima o durante el proceso de hidrólisis para mantener el pH óptimo.

10 La cantidad de disolución cáustica añadida a la disolución durante la hidrólisis de las proteínas puede ser controlada por un pH-estado o añadiendo la disolución cáustica de modo continuo y proporcional. El hidrolizado puede fabricarse mediante procesos discontinuos convencionales o mediante procesos continuos.

15 Para asegurar mejor la calidad constante del hidrolizado parcial de proteínas, el hidrolizado se somete a la desactivación de enzimas para finalizar el proceso de hidrólisis. La etapa de desactivación de enzimas puede incluir un tratamiento con calor a una temperatura de aproximadamente 82 °C durante aproximadamente 10 minutos. Como alternativa, la enzima puede desactivarse calentando la disolución hasta una temperatura de aproximadamente 92 °C durante aproximadamente 5 segundos. Después de terminar la desactivación de las enzimas, el hidrolizado puede conservarse en estado líquido a una temperatura menor que 10 °C.

Ejemplo 1

20 El ejemplo 1 ilustra más a fondo un método para producir un hidrolizado parcial de proteínas. En un principio, se mezclaron 60,3 kg de sólidos no lácteos (polvo de leche) y 37,4 kg de concentrado de proteínas del suero de la leche (al 60%) en un tanque que contenía agua a 54 °C. La suspensión tenía un contenido total en sólidos de entre 20% y 23%. Después se midió el pH de la suspensión. Se añadieron hidróxido de sodio y potasio a la suspensión para ajustar el pH de la suspensión a 7,0. Después de ajustar el pH, se añadieron 0,5 kg de la enzima Amano N a la suspensión. Tras la adición de Amano N a la suspensión, el pH se ajustó continuamente a un pH de 7,0 usando hidróxido de sodio e hidróxido de potasio. La cantidad total de hidróxido de sodio añadida a la suspensión fue de 0,3 kg. La cantidad total de hidróxido de potasio añadida a la suspensión fue de 1,5 kg.

30 Se dejó que la hidrólisis se desarrollase durante 90 minutos, y el tiempo comienza a contar desde la adición de la enzima Amano N a la suspensión. Al final de los 90 minutos, la suspensión se trató con calor para inactivar la enzima. El tratamiento con calor consistió en aumentar la temperatura de la suspensión hasta 82 °C durante 10 minutos. El grado de hidrólisis obtenido en este ejemplo fue de entre 6% y 9%. Después la suspensión se enfrió y se secó por pulverización para obtener un hidrolizado en polvo.

Ejemplo 2

35 El ejemplo 2 proporciona un método no limitante para determinar la distribución de peso molecular de los péptidos del hidrolizado.

40 Se usó una cromatografía de exclusión molecular ("size exclusion chromatography", SEC) para determinar la distribución de peso molecular de los péptidos del hidrolizado creados mediante el proceso de hidrólisis descrito en la presente. De modo específico, se pesó una cantidad suficiente de leche en polvo para bebés para proporcionar 0,5 gramos de proteínas en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml. Se añadió agua para llevar el volumen del tubo a 45 ml. La mezcla se colocó en un mezclador Sarstedt D-5223 y se mezcló durante una hora. Después de mezclar, se creó una disolución de proteínas al 1% añadiendo 5 ml más de agua al tubo. Se preparó una disolución madre patrón y también se mezcló durante una hora.

45 Por otra parte, se añadieron 14,91 gramos de cloruro de potasio (KCl) a un vaso de precipitado de 1000 ml. El KCl se disolvió añadiendo 700 ml de agua al vaso de precipitado. Después se añadieron 250 ml de acetonitrilo y 1,0 ml de ácido trifluoroacético a la disolución de KCl (eluyente). El pH se ajustó a 3,0 usando una disolución de K₂HPO₄ 0,2 M.

Se rellenó una botella de reactivos de HPCL, y la botella se lavó con eluyente, reservando aproximadamente 50 ml para la dilución de las muestras y los patrones. Se purgaron los conductos de una bomba Hitachi L-6200 A Intelligent Pump con eluyente, y las columnas se equilibraron con eluyente durante una hora.

50 Después de mezclar las muestras durante una hora, se pipetearon 5,0 ml de cada muestra en tubos con tapón de rosca de vidrio. También se pipetearon 5,0 ml de diclorometano en cada tubo. Los tubos se cerraron y se mezclaron mediante inversión cuatro veces. Después las muestras se centrifugaron durante cinco minutos a 200xg.

55 Mientras las muestras se encontraban en la centrifuga, las disoluciones madre patrón 1-5 se diluyeron con eluyente (800 ul+3200 ul). Se pipeteó aproximadamente 1 ml de cada patrón en cada uno de los dos viales del automuestreador y se cerraron.

La capa superior (acuosa) de las muestras centrifugadas 1-10 se diluyó con eluyente (100 ul+900 ul). Los viales se cargaron en la bandeja del automuestreador como sigue: blanco, patrón, muestras y segundo patrón. La bandeja se colocó en el automuestreador Hitachi. El número total de viales que se van a ensayar se introduce en el programa del automuestreador usando las teclas en la parte delantera del automuestreador y se ensayaron las muestras. Los resultados indican el perfil de peso molecular de las proteínas.

En algunas realizaciones, la fuente de equivalentes de proteínas comprende una proteína parcialmente hidrolizada, tal como caseína. La fuente de equivalentes de proteínas puede comprender una proteína hidrolizada, que incluye péptidos que tienen una distribución de masa molar mayor que 500 daltons. La proteína hidrolizada puede comprender péptidos que tienen una distribución de masa molar en el intervalo de aproximadamente 500 daltons a aproximadamente 1.500 daltons. No obstante, la proteína hidrolizada puede comprender péptidos que tienen una distribución de masa molar en el intervalo de aproximadamente 500 daltons a aproximadamente 2.000 daltons.

En algunas realizaciones, la fuente de equivalentes de proteínas puede comprender el componente de péptido, proteínas intactas, proteínas hidrolizadas, que incluyen proteínas parcialmente hidrolizadas, y sus combinaciones. En algunas realizaciones, del 20% al 80% de la fuente de equivalentes de proteínas comprende el componente de péptido descrito en la presente. Del 40% al 70% de la fuente de equivalentes de proteínas puede comprender el componente de péptido descrito en la presente. Del 50% al 60% de la fuente de equivalentes de proteínas puede comprender el componente de péptido.

En algunas realizaciones, del 20% al 80% de la fuente de equivalentes de proteínas comprende proteínas intactas, proteínas parcialmente hidrolizadas, o sus combinaciones. Del 40% al 70% de la fuente de equivalentes de proteínas puede comprender proteínas intactas, proteínas parcialmente hidrolizadas, o sus combinaciones. Del 50% al 60% de la fuente de equivalentes de proteínas puede comprender proteínas intactas, proteínas parcialmente hidrolizadas, o sus combinaciones.

En algunas realizaciones, la fuente de equivalentes de proteínas comprende proteínas parcialmente hidrolizadas que tienen un grado de hidrólisis menor que 40%. La fuente de equivalentes de proteínas puede comprender proteínas parcialmente hidrolizadas que tienen un grado de hidrólisis menor que 25%, o menor que 15%.

La composición nutricional puede comprender entre aproximadamente 1 g y aproximadamente 7 g de una fuente de equivalentes de proteínas por 100 kcal. La composición nutricional puede comprender entre aproximadamente 3,5 g y aproximadamente 4,5 g de una fuente de equivalentes de proteínas por 100 kcal.

La fuente de equivalentes de proteínas que incluye el componente de péptido puede añadirse o incorporarse en la composición nutricional mediante cualquier método conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el componente de péptido puede añadirse a una composición nutricional para suplementar la composición nutricional. Por ejemplo, el componente de péptido puede añadirse a una leche en polvo para bebés disponible en el mercado. Por ejemplo, Enfalac, Enfamil®, leche en polvo para bebés prematuros Enfamil®, Enfamil® con hierro, Enfamil® LIPIL®, Lactofree®, Nutramigen®, Pregestimil®, y ProSobee® (disponible en Mead Johnson & Company, Evansville, IN, EE. UU.) pueden suplementarse con niveles adecuados del componente de péptido y emplearse en la práctica de la presente descripción.

La composición o composiciones nutricionales de la presente descripción pueden administrarse en una o más dosis diarias. La presente descripción contempla cualquier forma de dosificación oralmente aceptable. Los ejemplos de dichas formas de dosificación incluyen, pero no se limitan a píldoras, comprimidos, cápsulas, geles blandos, líquidos, concentrados de líquidos, polvos, elixires, disoluciones, suspensiones, emulsiones, pastillas para chupar, esferas, sellos y sus combinaciones.

La fuente de equivalentes de proteínas que incluye el componente de péptido descrito en la presente puede añadirse un producto nutricional más completo. La composición nutricional puede contener componentes de proteínas, grasas y carbohidratos, y puede usarse para suplementar la dieta o puede usarse como única fuente de nutrición.

La composición nutricional comprende al menos una fuente de carbohidratos. La fuente de carbohidratos puede ser cualquiera empleada en la técnica, por ejemplo, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas, sacarosa, almidón, sólidos de jarabe de arroz y similares. La cantidad del componente de carbohidratos en la composición nutricional generalmente puede variar de entre aproximadamente 5 g/100 kcal y aproximadamente 25 g/100 kcal. La cantidad de carbohidratos puede estar entre aproximadamente 6 g/100 kcal y aproximadamente 22 g/100 kcal. La cantidad de carbohidratos puede estar entre aproximadamente 12 g/100 kcal y aproximadamente 14 g/100 kcal. Pueden preferirse los sólidos de jarabe de maíz. Además, pueden resultar deseables carbohidratos hidrolizados, parcialmente hidrolizados y/o hidrolizados exhaustivamente para su inclusión en la composición nutricional debido a su fácil digeribilidad. De modo específico, es menor probable que los carbohidratos hidrolizados contengan epitopos alérgicos.

Los ejemplos no limitantes de materiales de carbohidratos adecuados para su uso en la presente incluyen almidones hidrolizados o intactos, modificados en la naturaleza o de modo químico, procedentes de maíz, tapioca, arroz o patata, en formas cerosas o no cerosas. Los ejemplos no limitantes de carbohidratos adecuados incluyen diversos

almidones hidrolizados que se caracterizan como almidón de maíz hidrolizado, maltodextrina, maltosa, jarabe de maíz, dextrosa, sólidos del jarabe de maíz, glucosa, y diversos otros polímeros de la glucosa y sus combinaciones. Los ejemplos no limitantes de otros carbohidratos adecuados incluyen los denominados a menudo sacarosa, lactosa, fructosa, jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, oligosacáridos indigeribles, tales como fructo-
5 oligosacáridos, y sus combinaciones.

En algunas realizaciones, la composición nutricional puede estar exenta de proteínas y comprender aminoácidos libres como elemento de la fuente de equivalentes de proteínas. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos de cadena ramificada. Pueden incluirse péptidos de aminoácidos pequeños como componente de proteína de la composición nutricional. Estos péptidos de aminoácidos pequeños pueden ser naturales o haber sido sintetizados.
10 La cantidad de aminoácidos libres en la composición nutricional puede variar de aproximadamente 1 g/100 kcal a aproximadamente 5 g/100 kcal.

La composición nutricional comprende una fuente de grasas. Las fuentes de grasas o lípidos adecuadas para la composición nutricional de la presente descripción pueden ser cualquiera conocida o usada en la técnica que incluyen, pero no se limitan a fuentes animales, por ejemplo, grasa de la leche, mantequilla, grasa de mantequilla, lípidos de la yema de huevo; fuentes marinas, tales como aceites de pescado, aceites marinos, aceites de organismos unicelulares; aceites vegetales y de plantas, tales como aceite de maíz, aceite de canola, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de oleína de palma, aceite de coco, aceite de girasol con alto contenido en oleico, aceite de onagra, aceite de colza, aceite de oliva, aceite de semillas de lino, aceite de semillas de algodón, aceite de cártamo con alto contenido en oleico, estearina de palma, aceite de nuez de palma, aceite de germen de trigo; aceites y emulsiones de triglicéridos de longitud de cadena intermedia y ésteres de ácidos grasos; y cualquiera de sus combinaciones.
15
20

La composición nutricional puede comprender entre aproximadamente 1,3 g/100 kcal y aproximadamente 7,2 g/100 kcal de una fuente de grasas. La fuente de grasas puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 2,5 g/100 kcal a aproximadamente 6,0 g/100 kcal. La fuente de grasas puede estar presente en la composición nutricional en una cantidad de aproximadamente 3,0 g/100 kcal a aproximadamente 4,0 g/100 kcal.
25

La composición nutricional de la presente descripción también puede contener una fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ("long chain polyunsaturated fatty acids", LCPUFA). Los LCPUFA adecuados incluyen, pero no se limitan a DHA, ácido eicosapentaenoico ("EPA"), ARA, ácidos linoleico (18:2 n-6), γ -linolénico (18:3 n-6), dihomo- γ -linolénicos (20:3 n-6) en la vía de n-6, α -linolénico (18:3 n-3), estearidónico (18:4 n-3), eicosatetraenoico (20:4 n-3), eicosapentaenoico (20:5 n-3), y docosapentaenoico (22:6 n-3).
30

La cantidad de LCPUFA en la composición nutricional puede ser, de modo ventajoso, de al menos aproximadamente 5 mg/100 kcal, y puede variar de aproximadamente 5 mg/100 kcal a aproximadamente 100 mg/100 kcal, más preferiblemente de aproximadamente 10 mg/100 kcal a aproximadamente 50 mg/100 kcal.

Las fuentes de LCPUFA incluyen productos lácteos, tales como huevos y grasa de mantequilla; aceites marinos, tales como bacalao, *Brevoortia*, sardina, atún y muchos otros pescados; ciertas grasas animales, manteca, sebo, y aceites microbianos, tales como aceites fúngicos y de algas, o procedentes de cualquier recurso fortificado o no, a partir del cual puede obtenerse LCPUFA y usarse en una composición nutricional. Los LCPUFA pueden ser parte de una mezcla compleja obtenida mediante una tecnología de separación conocida en la técnica dirigida al enriquecimiento de LCPUFA y los derivados o precursores de LCPUFA en dichas mezclas.
35

Los LCPUFA pueden proporcionarse en la composición nutricional en forma de ésteres de ácidos grasos libres; mono-, di- y triglicéridos; fosfoglicéridos, que incluyen lecitinas y/o sus mezclas. Además, los LCPUFA pueden proporcionarse a la composición nutricional en forma de fosfolípidos, en especial fosfatidilcolina.
40

En una realización, en especial si la composición nutricional es una leche en polvo para bebés, la composición nutricional se suplementa con DHA y ARA. En esta realización, la proporción en peso de ARA:DHA puede estar entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 9:1. La proporción en peso de ARA:DHA puede ser de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 4:1.
45

El DHA puede estar presente de modo ventajoso en la composición nutricional desde al menos aproximadamente 17 mg/100 kcal, y puede variar de aproximadamente 5 mg/100 kcal a aproximadamente 75 mg/100 kcal. El DHA puede estar presente de aproximadamente 10 mg/100 kcal a aproximadamente 50 mg/100 kcal.

La composición nutricional puede suplementarse con aceites que contienen DHA y/o ARA usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Por ejemplo, DHA y ARA pueden añadirse a la composición reemplazando una cantidad equivalente de un aceite, tal como aceite de girasol con alto contenido en oleico, normalmente presente en la composición. Como otro ejemplo, los aceites que contienen DHA y ARA pueden añadirse a la composición reemplazando una cantidad equivalente del resto de la mezcla de grasas global normalmente presente en la composición sin DHA ni ARA.
50
55

Si se utiliza, la fuente de DHA y/o ARA puede ser cualquier fuente conocida en la técnica, tal como aceite marino, aceite de pescado, aceite de organismos unicelulares, lípidos de la yema de huevo y lípidos cerebrales. El DHA y el

ARA pueden obtenerse de aceites de organismos unicelulares de Martek, DHASCO® y ARASCO®, o sus variaciones. El DHA y el ARA pueden estar en forma natural, con la condición de que el resto de la fuente de LCPUFA no produzca ningún efecto perjudicial en el infante. Como alternativa, el DHA y el ARA pueden usarse en forma refinada.

- 5 Las fuentes de DHA y ARA pueden ser aceites de organismos unicelulares, tal como se indica en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.374.567; 5.550.156; y 5.397.591. Sin embargo, la presente descripción no se limita solo a estos aceites.

Además, algunas realizaciones de la composición nutricional pueden imitar ciertas características de la leche materna humana. Sin embargo, para satisfacer los requisitos específicos de nutrientes de algunos sujetos, la composición nutricional puede comprender una cantidad mayor de algunos componentes nutricionales que la leche humana. Por ejemplo, la composición nutricional puede comprender una cantidad mayor de DHA que la leche materna humana. El mayor nivel de DHA de la composición nutricional puede compensar un déficit de DHA nutricional existente.

10 La composición nutricional también puede contener uno o más prebióticos (también denominados fuente de prebióticos) en ciertas realizaciones. Los prebióticos pueden estimular el crecimiento y/o la actividad de microorganismos probióticos ingeridos, reducir selectivamente los patógenos que se encuentran en el intestino, e influir favorablemente en el perfil de ácidos grasos de cadena corta del intestino. Estos prebióticos pueden ser naturales, sintéticos o desarrollados a través de la manipulación genética de organismos y/o plantas, tanto si dicha fuente nueva se conoce en la actualidad como si se desarrolla en el futuro. Los prebióticos útiles en la presente descripción pueden incluir oligosacáridos, polisacáridos y otros prebióticos que contienen fructosa, xilosa, soja, galactosa, glucosa y manosa.

15 De modo más específico, los prebióticos útiles en la presente descripción pueden incluir povidex, polvo de povidex, lactulosa, lactosacarosa, rafinosa, gluco-oligosacáridos, inulina, fructo-oligosacáridos, isomalto-oligosacáridos, oligosacáridos de soja, lactosacarosa, xilo-oligosacáridos, quito-oligosacáridos, mano-oligosacáridos, arabinos-oligosacáridos, sialil-oligosacáridos, fuco-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos y gentio-oligosacáridos. La cantidad total de prebióticos presente en la composición nutricional puede ser de aproximadamente 0,1 g/100 kcal a aproximadamente 1g/100 kcal. La cantidad total de prebióticos presente en la composición nutricional puede ser de aproximadamente 0,3 g/100 kcal a aproximadamente 0,7 g/100 kcal. Además, la composición nutricional puede comprender un componente de prebiótico que comprende povidex ("PDX") y/o galacto-oligosacárido ("GOS"). El componente prebiótico comprende al menos 20% de GOS, PDX o una de sus mezclas.

20 Si se usa PDX en la composición de prebióticos, la cantidad de PDX en la composición nutricional puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 g/100 kcal a aproximadamente 1 g/100 kcal. La cantidad de povidex puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,2 g/100 kcal a aproximadamente 0,6 g/100 kcal. La cantidad de PDX en la composición nutricional puede ser de aproximadamente 0,1 mg/100 kcal a aproximadamente 0,5 mg/100 kcal.

35 Si se usa GOS en la composición de prebióticos, la cantidad de GOS en la composición nutricional puede ser de aproximadamente 0,1 g/100 kcal a aproximadamente 1 g/100 kcal. La cantidad de GOS en la composición nutricional puede ser de aproximadamente 0,2 g/100 kcal a aproximadamente 0,5 g/100 kcal. La cantidad de GOS en la composición nutricional puede ser de aproximadamente 0,1 mg/100 kcal a aproximadamente 1,0 mg/100 kcal, o de aproximadamente 0,1 mg/100 kcal a aproximadamente 0,5 mg/100 kcal.

40 En una realización concreta de la composición nutricional, la PDX se administra en combinación con GOS. La PDX y el GOS pueden administrarse en una proporción de PDX:GOS de entre aproximadamente 9:1 y 1:9. La proporción de PDX:GOS puede estar entre aproximadamente 5:1 y 1:5. La proporción de PDX:GOS puede estar entre aproximadamente 1:3 y 1:3. La proporción de PDX a GOS puede ser de aproximadamente 5:5. La proporción de PDX a GOS puede ser de aproximadamente 8:2.

45 En una realización concreta, el GOS y la PDX se suplementan a la composición nutricional en una cantidad total de al menos aproximadamente 0,2 mg/100 kcal o aproximadamente 0,2 mg/100 kcal a aproximadamente 1,5 mg/100 kcal. La composición nutricional puede comprender GOS y PDX en una cantidad total de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 0,8 mg/100 kcal.

50 En una realización, la composición nutricional puede contener uno o más probióticos. En esta realización puede ser aceptable cualquier probiótico conocido en la técnica. El probiótico puede seleccionarse de cualquier especie de *Lactobacillus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC n.º 53103), especies de *Bifidobacterium*, *Bifidobacterium longum* BB536 (BL999, ATCC: BAA-999), *Bifidobacterium longum* AH1206 (NCIMB: 41382), *Bifidobacterium breve* AH1205 (NCIMB: 41387), *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB: 41003), y *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 (DSM n.º 10140) o cualquiera de sus combinaciones.

55 Si se incluye en la composición, la cantidad del probiótico puede variar de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente $1,5 \times 10^{10}$ cfu de probióticos por 100 kcal, más preferiblemente de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 cfu de probióticos por 100 kcal. La cantidad del probiótico puede variar de aproximadamente 1×10^7 cfu/100 kcal a aproximadamente 1×10^8 cfu/100 kcal.

- 5 El probiótico o probióticos pueden ser viables o no viables. Tal como se emplea en la presente, el término "viable" se refiere a microorganismos vivos. Las expresiones "no viable" o "probiótico no viable" significan microorganismos probióticos no vivos, sus componentes celulares y/o metabolitos. Estos probióticos no viables pueden haber sido matados por calor o inactivados de otro modo, pero conservan la capacidad para influir favorablemente en la salud del hospedante. Los probióticos útiles en la presente descripción pueden ser naturales, sintéticos o desarrollados a través de la manipulación genética de organismos, tanto si dicha fuente se conoce en la actualidad como si se desarrolla en el futuro.
- 10 La composición o composiciones nutricionales de la presente descripción pueden comprender un sobrenadante de cultivo procedente de una fase de crecimiento exponencial tardía de un proceso de cultivo discontinuo de probióticos (en lo sucesivo denominado "sobrenadante de cultivo"); el probiótico puede ser LGG. El sobrenadante del cultivo discontinuo (que también puede denominarse "medio gastado") puede poseer protección frente a una infección por patógenos, incluyendo una infección por *C. sakazakii*. De modo específico, el sobrenadante de cultivo recolectado puede evitar la invasión de *C. sakazakii* en órganos tales como el cerebro, y reducir la mortalidad asociada a *C. sakazakii*.
- 15 La composición nutricional comprende un sobrenadante de cultivo procedente de una fase de crecimiento exponencial tardía de un proceso de cultivo discontinuo de probióticos, para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por patógenos. El probiótico puede ser LGG, y el patógeno puede ser *C. sakazakii*.
- 20 Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que la actividad del sobrenadante de cultivo puede atribuirse a la mezcla de componentes (que incluye materiales proteicos y, probablemente, incluye materiales de (exo)polisacáridos), tal como se encuentran liberados hacia el medio de cultivo en una etapa tardía de la fase exponencial (o "logarítmica") de LGG. Se cree que la composición química del sobrenadante de cultivo es una mezcla de una pluralidad de aminoácidos, oligo- y polipéptidos, y proteínas de diversos pesos moleculares. El sobrenadante de cultivo puede comprender además estructuras de polisacáridos y/o nucleótidos. El sobrenadante de cultivo se refiere al sobrenadante de cultivo no fraccionado, es decir, entero. Además, el sobrenadante de cultivo puede referirse al sobrenadante de cultivo no fraccionado, es decir, entero.
- 25 Las etapas reconocidas en el cultivo discontinuo de bacterias son conocidas por los expertos en la técnica. Estas son la fase de "latencia", "logarítmica" o "exponencial", "estacionaria" y de "muerte" (o "declinación logarítmica"). En todas las fases en las que están presentes bacterias vivas, las bacterias metabolizan nutrientes del medio, y segregan (expelen, liberan) materiales hacia el medio de cultivo. La composición del material segregado en un momento concreto de las etapas de crecimiento en general no es predecible.
- 30 Una composición puede obtenerse mediante un proceso que comprende las etapas de (a) someter un probiótico, tal como LGG, a un cultivo en un medio de cultivo adecuado usando un proceso discontinuo; (b) recolectar el sobrenadante del cultivo en una fase de crecimiento exponencial tardía de la etapa de cultivo, y dicha fase se define remitiéndose a la segunda mitad del tiempo entre la fase de latencia y la fase estacionaria del proceso de cultivo discontinuo; (c) opcionalmente, retirar los constituyentes de bajo peso molecular del sobrenadante para retener los constituyentes con un peso molecular mayor que 5 kilodaltons (kDa) o incluso mayor que 6 kDa; (d) retirar el contenido líquido del sobrenadante del cultivo para obtener la composición.
- 35 Los materiales segregados pueden recolectarse de una fase exponencial tardía. La fase exponencial tardía aparece en el tiempo después de la fase exponencial intermedia (que constituye la mitad de la duración de la fase exponencial, por tanto, se indica que la fase exponencial tardía es la segunda mitad del tiempo entre la fase de latencia y la fase estacionaria). En particular, la expresión "fase exponencial tardía" se emplea en la presente para remitir al último cuarto de porción de tiempo entre la fase de latencia y la fase estacionaria del proceso de cultivo discontinuo. La recolección del sobrenadante del cultivo puede realizarse en un punto del tiempo del 75% al 85% de la duración de la fase exponencial, y lo más preferiblemente se realiza cuando ha transcurrido aproximadamente 5/6 del tiempo de la fase exponencial.
- 40 El término "cultivo" o "cultivar" se refiere a la propagación de microorganismos, en este caso LGG, sobre o dentro de un medio adecuado. Este medio de cultivo puede ser de una diversidad de tipos y, en particular, es un caldo de cultivo líquido, tal como es habitual en la técnica. Un caldo de cultivo preferido, por ejemplo, es el caldo de cultivo MRS que se emplea en general para el cultivo de lactobacilos. El caldo de cultivo MRS en general comprende polisorbato, acetato, magnesio y manganeso, que se sabe que actúan como factores de crecimiento especiales para lactobacilos, así como una base rica en nutrientes. Una composición típica comprende (cantidades en g/litro): peptona de caseína, 10,0; extracto de carne, 8,0; extracto de levadura, 4,0; D(+)-glucosa, 20,0; bifosfato de dipotasio, 2,0; Tween® 80, 1,0; citrato de triamonio, 2,0; acetato de sodio, 5,0; sulfato de magnesio, 0,2; sulfato de manganeso, 0,04.
- 45 El sobrenadante de cultivo puede incluirse en una composición nutricional que es una leche en polvo para bebés. La recolección de los productos bacterianos segregados plantea el problema de que no es fácil despojar al medio de cultivo de los componentes no deseados. Esto se relaciona, específicamente, con los productos nutricionales para sujetos relativamente vulnerables, tales como una leche en polvo para bebés o la nutrición clínica. Este problema no aparece si componentes específicos de un sobrenadante de cultivo primero se aíslan, se purifican y después se
- 55

aplican a un producto nutricional. Sin embargo, se desea utilizar un sobrenadante de cultivo más completo. Esto proporcionaría una composición que refleja mejor la acción natural del probiótico (concretamente, LGG). Sin embargo, no se puede simplemente usar el sobrenadante de cultivo en sí mismo como base para materiales probióticos no viables para ser utilizados específicamente en una leche en polvo para bebés y similares.

5 El sobrenadante de cultivo recolectado de un cultivo de LGG puede no contener componentes (que pueden estar presentes en el medio de cultivo) que no sean deseados, o en general aceptados, en composiciones nutricionales, tales como una leche en polvo para bebés. Con referencia al polisorbato, que habitualmente está presente en el caldo de cultivo MRS, el medio para cultivar las bacterias puede incluir un tensioactivo no iónico emulgente, por ejemplo, basado en sorbitano polietoxilado y ácido oleico (generalmente disponible como polisorbatos Tween®, tal como Tween® 80). Aunque estos tensioactivos se encuentran con frecuencia en productos alimentarios, por ejemplo, helados, y en general se reconocen como seguros, en todas las jurisdicciones no se consideran deseables o incluso aceptables para su uso en productos nutricionales para sujetos relativamente vulnerables, tales como una leche en polvo para bebés o la nutrición clínica.

15 La presente descripción puede utilizar medios de cultivos en los que pueden evitarse los polisorbatos mencionados anteriormente. Para este fin, un medio de cultivo de la descripción está exento de polisorbatos, tales como Tween 80. El medio de cultivo puede comprender un ingrediente oleoso seleccionado del grupo que consiste en ácido oleico, aceite de semillas de lino, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de girasol y sus mezclas. Se entenderá que el beneficio completo del ingrediente oleoso se logra si la presencia de un tensioactivo de polisorbato se evita fundamentalmente o por completo.

20 El sobrenadante de cultivo puede tener un pH neutro, tal como un pH entre pH 5 y pH 7, preferiblemente pH 6.

Además de lo anterior, debe advertirse que el cultivo discontinuo de lactobacilos, que incluyen LGG, es un conocimiento general común disponible para los expertos en la técnica. Por tanto, no es necesario aclarar estos métodos en la presente. El sobrenadante de cultivo puede recolectarse mediante cualquier técnica conocida para la separación del sobrenadante de cultivo de un cultivo bacteriano. Estas técnicas son muy conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, centrifugación, filtración, sedimentación y similares.

25 La composición o composiciones nutricionales descritas pueden proporcionarse en cualquier forma conocida en la técnica, tal como un polvo, un gel, una suspensión, una pasta, un sólido, un líquido, un concentrado líquido, un sustituto de la leche en polvo reconstituible o un producto listo para usar. La composición nutricional puede comprender un suplemento nutricional, un producto nutricional para niños, una leche en polvo para bebés, un fortificante de leche humana, una leche de crecimiento o cualquier otra composición nutricional diseñada para un bebé o un sujeto pediátrico. Las composiciones nutricionales de la presente descripción incluyen, por ejemplo, sustancias de ingestión oral que estimulan la salud que incluyen, por ejemplo, alimentos, bebidas, comprimidos, cápsulas y polvos. Además, la composición nutricional de la presente descripción puede conformarse a un contenido calórico específico, puede proporcionarse como un producto listo para usar, o puede proporcionarse en una forma concentrada. La composición nutricional puede estar en forma de polvo con un tamaño de partícula en el intervalo de 5 µm a 1500 µm, más preferiblemente en el intervalo de 10 µm a 300 µm.

35 Si la composición nutricional está en forma de un producto listo para usar, la osmolalidad de la composición nutricional puede estar entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1100 mOsm/kg de agua, más generalmente de aproximadamente 200 a aproximadamente 700 mOsm/kg de agua.

40 La composición nutricional puede ser hipoalergénica. La composición nutricional puede ser kosher y/o halal. La composición nutricional puede contener ingredientes no genéticamente modificados. La composición nutricional puede estar exenta de sacarosa. La composición nutricional también puede estar exenta de lactosa. La composición nutricional puede no contener ningún aceite de triglicéridos de cadena de longitud intermedia. Ningún carragenano puede estar presente en la composición. La composición nutricional también puede estar exenta de cualquier goma.

45 La composición nutricional de la presente descripción no se limita a las composiciones que comprenden los nutrientes específicamente listados en la presente. Cualquier nutriente puede administrarse como parte de la composición para cumplir con las necesidades nutricionales y/o para optimizar el estado nutricional en un sujeto.

Además, la composición nutricional puede ser nutricionalmente completa, contener tipos y cantidades adecuados de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales para que sea la única fuente de nutrición de un sujeto. En efecto, la composición nutricional puede incluir opcionalmente cualquier número de proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos grasos, probióticos y/o sus subproductos metabólicos, prebióticos, carbohidratos y cualquier otro nutriente u otro compuesto que pueda proporcionar muchos beneficios nutricionales y fisiológicos a un sujeto. Además, la composición nutricional de la presente descripción puede comprender aromas, potenciadores del aroma, edulcorantes, pigmentos, vitaminas, minerales, ingredientes terapéuticos, ingredientes alimentarios funcionales, ingredientes alimentarios, ingredientes del procesamiento o sus combinaciones.

55 La composición nutricional de la presente descripción puede conformarse a un contenido calórico específico, puede proporcionarse como un producto listo para usar, o puede proporcionarse en una forma concentrada.

La composición nutricional de la presente descripción puede ser una leche de crecimiento. Las leches de crecimiento son bebidas a base de leche fortificada previstas para niños mayores de 1 año (generalmente de 1-3 años, de 4-6 años, o de 1-6 años). No son alimentos médicos y no están previstos como sustitutos de comidas o suplementos para tratar una deficiencia nutricional concreta. En lugar de ello, las leches de crecimiento están diseñadas para servir como complemento a una dieta diversa para proporcionar más seguridad de que un niño consiga una ingesta diaria y continua de todas las vitaminas y los minerales esenciales, macronutrientes más otros componentes de la dieta funcionales, tales como nutrientes no esenciales que hayan alegado unas propiedades estimulantes de la salud.

La composición exacta de una composición nutricional según la presente descripción puede variar de un mercado a otro, dependiendo de las normas locales y de la información de ingesta dietética de la población de interés. Las composiciones nutricionales según la descripción pueden consistir en una fuente de proteínas de la leche, tal como leche entera o desnatada, más azúcar y edulcorantes añadidos para lograr unas propiedades sensoriales deseadas, y vitaminas y minerales añadidos. La composición en grasa generalmente se deriva de las materias primas de leche. Puede hacerse que las proteínas totales se correspondan con las de la leche humana, la leche de vaca o con un valor más bajo. Habitualmente, puede hacerse que los carbohidratos totales proporcionen la menor cantidad posible de azúcares añadidos, tales como sacarosa o fructosa, para lograr un sabor aceptable. Generalmente, se añade vitamina A, calcio y vitamina D a unos niveles que se corresponden con la contribución de nutrientes de la leche de vaca regional. Por lo demás, pueden añadirse vitaminas y minerales a unos niveles que proporcionan aproximadamente 20% de la ingesta de referencia dietética ("dietary reference intake", DRI) o 20% del valor diario ("Daily Value", DV) por ración. Además, los valores de los nutrientes pueden variar entre los mercados dependiendo de las necesidades nutricionales identificadas de la población prevista, las contribuciones de las materias y las normas regionales.

También pueden añadirse una o más vitaminas y/o minerales a la composición nutricional en unas cantidades suficientes para suministrar los requisitos nutricionales diarios de un sujeto. Los expertos en la técnica entenderán que los requisitos de vitaminas y minerales variarán, por ejemplo, basándose en la edad del niño o niña. Por ejemplo, un infante puede tener requisitos de vitaminas y minerales diferentes que un niño entre uno y trece años. Así, las realizaciones no pretenden limitar la composición nutricional a un grupo de edad concreto, sino que, al contrario, proporcionan una gama de componentes de vitaminas y minerales aceptables.

La composición opcionalmente puede incluir, pero no se limita a una o más de las siguientes vitaminas o sus derivaciones: vitamina B₁ (tiamina, pirofosfato de tiamina, TPP, trifosfato de tiamina, TTP, clorhidrato de tiamina, mononitrato de tiamina), vitamina B₂ (riboflavina, flavina mononucleótido, FMN, flavina adenina dinucleótido, FAD, lactoflavina, ovoflavina), vitamina B₃ (niacina, ácido nicotínico, nicotinamida, niacinamida, nicotinamida adenina dinucleótido, NAD, ácido nicotínico mononucleótido, NicMN, ácido piridin-3-carboxílico), triptófano precursor de vitamina B₃, vitamina B₆ (piridoxina, piridoxal, piridoxamina, clorhidrato de piridoxina), ácido pantoténico (pantotenato, pantenol), folato (ácido fólico, folacina, ácido pteroilglutámico), vitamina B₁₂ (cobalamina, metilcobalamina, desoxiadenosilcobalamina, cianocobalamina, hidroxicobalamina, adenosilcobalamina), biotina, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina A (retinol, acetato de retinilo, palmitato de retinilo, ésteres de retinilo con otros ácidos grasos de cadena larga, retinal, ácido retinoico, ésteres de retinol), vitamina D (calciferol, colecalciferol, vitamina D₃, 1,25-dihidroxivitamina D), vitamina E (α-tocoferol, acetato de α-tocoferol, succinato de α-tocoferol, nicotinato de α-tocoferol, α-tocoferol), vitamina K (vitamina K₁, filoquinona, naftoquinona, vitamina K₂, menaquinona-7, vitamina K₃, menaquinona-4, menadiona, menaquinona-8, menaquinona-8H, menaquinona-9, menaquinona-9H, menaquinona-10, menaquinona-11, menaquinona-12, menaquinona-13), colina, inositol, β-caroteno y cualquiera de sus combinaciones.

Cuando la composición nutricional es un producto nutricional para niños, tal como una leche de crecimiento, la composición opcionalmente puede incluir, pero no se limita a uno o más de los siguientes minerales o sus derivaciones: boro, calcio, acetato de calcio, gluconato de calcio, cloruro de calcio, lactato de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, cloruro, cromo, cloruro de cromo, picolonato de cromo, cobre, sulfato de cobre, gluconato de cobre, sulfato cúprico, fluoruro, hierro, carbonil-hierro, hierro férrico, fumarato ferroso, ortofosfato férrico, triturado de hierro, polisacáridos-hierro, yoduro, yodo, magnesio, carbonato de magnesio, hidróxido de magnesio, óxido de magnesio, estearato de magnesio, sulfato de magnesio, manganeso, molibdeno, fósforo, potasio, fosfato de potasio, yoduro de potasio, cloruro de potasio, acetato de potasio, selenio, azufre, sodio, docusato sodio, cloruro de sodio, selenato de sodio, molibdato de sodio, cinc, óxido de cinc, sulfato de cinc y sus mezclas. Los ejemplos no limitantes de derivados de compuestos minerales incluyen sales, sales alcalinas, ésteres y quelados de cualquier compuesto mineral.

Los minerales pueden añadirse a leches de crecimiento o a otras composiciones nutricionales para niños en forma de sales, tales como fosfato de calcio, glicerol fosfato de calcio, citrato de sodio, cloruro de potasio, fosfato de potasio, fosfato de magnesio, sulfato ferroso, sulfato de cinc, sulfato cúprico, sulfato de manganeso, y selenito de sodio. Pueden añadirse otras vitaminas y minerales tal como se conoce en la técnica.

La composición nutricional para niños puede contener entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50% de la recomendación dietética máxima para cualquier país concreto, o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50% de la recomendación dietética promedio para un grupo de países, por ración, de vitaminas A, C y E, cinc,

5 hierro, yodo, selenio y colina. La composición nutricional para niños puede suministrar aproximadamente 10-30% de la recomendación dietética máxima para cualquier país concreto, o aproximadamente 10-30% de la recomendación dietética promedio para un grupo de países, por ración, de vitaminas B. Los niveles de vitamina D, calcio, magnesio, fósforo y potasio en el producto nutricional para niños pueden corresponderse con los niveles promedios que se encuentran en la leche. Otros nutrientes en la composición nutricional para niños pueden estar presentes en aproximadamente 20% de la recomendación dietética máxima para cualquier país concreto, o aproximadamente 20% de la recomendación dietética promedio para un grupo de países, por ración.

10 La composición o composiciones nutricionales de la presente descripción opcionalmente pueden incluir uno o más de los siguientes agentes aromatizantes, que incluyen, pero no se limitan a extractos con aromas, aceites volátiles, aromas de cacao o chocolate, aroma de mantequilla de cacahuete, migas de galleta, vainilla o cualquier aroma disponible en el mercado. Los ejemplos de aromas útiles incluyen, pero no se limitan a extracto de anís puro, imitación de extracto de plátano, imitación de extracto de cereza, extracto de chocolate, extracto de limón puro, extracto de naranja puro, extracto de menta puro, miel, imitación de extracto de piña, imitación de extracto de ron, imitación de extracto de fresa, extractos de uva y/o de semilla de uva, extracto de manzana, extracto de arándano o extracto de vainilla; o aceites volátiles, tales como aceite de melisa, aceite de laurel, aceite de bergamota, aceite de cedro, aceite de cereza, aceite de canela, aceite de ajo, o aceite de menta; mantequilla de cacahuete, aroma de chocolate, migas de galletas de vainilla, caramelo, dulce de leche y sus mezclas. Las cantidades del agente aromatizante pueden variar mucho dependiendo del agente aromatizante usado. El tipo y la cantidad del agente aromatizante pueden seleccionarse como se conoce en la técnica.

20 Las composiciones nutricionales de la presente descripción opcionalmente pueden incluir uno o más emulgentes que pueden añadirse para la estabilidad del producto final. Los ejemplos de emulgentes adecuados incluyen, pero no se limitan a lecitina (por ejemplo, procedente de huevo o soja o cualquier otra fuente vegetal y animal), alfa-lactoalbúmina y/o mono- y diglicéridos, y sus mezclas. Los expertos en la técnica no tendrán problema en identificar otros emulgentes, y la selección del emulgente o emulgentes adecuados dependerán, en parte, de la formulación y el producto final.

25 Las composiciones nutricionales de la presente descripción opcionalmente pueden incluir uno o más conservantes que también pueden añadirse para extender la caducidad del producto. Los conservantes adecuados incluyen, pero no se limitan a sorbato de potasio, sorbato de sodio, benzoato de potasio, benzoato de sodio, EDTA calcio disodio, y sus mezclas.

30 Las composiciones nutricionales de la presente descripción opcionalmente pueden incluir uno o más estabilizantes. Los estabilizantes adecuados para su uso en la práctica de la composición nutricional de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a goma arábiga, goma de ghatti, goma de karaya, goma de tragacanto, agar, furcellarano, goma de guar, goma de gelano, goma de algarrobbilla, pectina, pectina con bajo contenido en metoxilo, gelatina, celulosa microcristalina, CMC (carboximetilcelulosa de sodio), metilcelulosahidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, DATEM (ésteres del ácido diacetiltartárico de mono- y diglicéridos), dextrano, carragenanos, CITREM, y sus mezclas.

40 La presente descripción proporciona el uso de una composición nutricional que comprende el componente de péptido descrito en la presente para reducir la incidencia de la diabetes mellitus. El uso incluye proporcionar una composición nutricional que comprende una fuente de carbohidratos, una fuente de equivalentes de proteínas, y una fuente de grasas, en donde la fuente de equivalentes de proteínas incluye un componente de péptido que comprende SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:60, y SEQ ID NO:63, a un sujeto diana.

45 La composición nutricional comprende una fuente de equivalentes de proteínas en donde del 20% al 80% de la fuente de equivalentes de proteínas comprende el componente de péptido descrito en la presente, y del 20% al 80% de la fuente de equivalentes de proteínas comprende una proteína intacta, una proteína parcialmente hidrolizada o sus combinaciones.

50 El sujeto diana puede ser un sujeto pediátrico. Además, la composición nutricional proporcionada al sujeto pediátrico puede ser una leche en polvo para bebés. El componente de péptido descrito en la presente y añadido a la leche en polvo para bebés puede seleccionarse de una fuente específica y sus concentraciones pueden ajustarse para maximizar los beneficios para la salud. La composición nutricional que comprende el componente de péptido puede ser una leche de crecimiento.

Los ejemplos 3-7 ilustran la reducción en las citoquinas proinflamatorias en ciertos modelos *in vitro* e *in vivo*.

Ejemplo 3

55 El ejemplo 3 se dirige a la inhibición de citoquinas proinflamatorias en ensayos de células dendríticas humanas primarias por caseína hidrolizada exhaustivamente y una fracción mayor que 500 Da de esta. De modo específico, las citoquinas proinflamatorias inhibidas incluyen interleuquina-12p70 ("IL12p70"), interferón-gamma (IFN γ), interleuquina-8 ("IL8"), factor de necrosis tumoral-alfa ("TNF α "), interleuquina-6 ("IL6"), e interleuquina-1 beta ("IL1 β ").

Se suspendieron monocitos CD14+ aislados en medio RPMI y se suplementaron con suero bovino fetal ("fetal bovine serum", FBS) inactivado con calor al 10%, penicilina/estreptomicina, interleuquina-4 recombinante ("rhIL-4") 500 IU/ml, y rhGM-CSF 800 IU/ml, y se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos a 37 °C y 5% de CO₂ durante 5 días para permitir la diferenciación en células dendríticas.

5 En el día 5, las células se sembraron en el mismo medio a 20.000 células/pocillo en placas con fondo en U de 96 pocillos, seguido de la adición de las muestras de hidrolizado que incluyen caseína hidrolizada exhaustivamente y una fracción mayor que 500 Da de esta, a una concentración final de 0,007, 0,02, 0,08 y 0,2% en m/v. Se usó dexametasona ("Dex") a una concentración final de 1 µg/ml como control positivo para la inhibición de la producción de citoquinas. Todas las muestras se ensayaron en duplicados biológicos.

10 En el día 6, se realizó un refresco de las células con muestras de hidrolizado en medio (RPMI + FBS al 10% + pen./estrep.) sin GM-CSF ni IL-4. Una hora después de la adición del hidrolizado, se añadió CD40L + potenciador (Alexis) hasta una concentración final de 0,5 µg/ml.

Después las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas y posteriormente los sobrenadantes se recolectaron y se conservaron a -20 °C hasta la cuantificación de las citoquinas usando el ensayo múltiple de citoquinas proinflamatorias Meso Scale Discovery según las instrucciones del fabricante.

15 Tal como se muestra en las figuras 1-2, la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-12p70 (IL12p70) por células dendríticas humanas primarias activadas es inhibida por la caseína hidrolizada exhaustivamente y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado exhaustivo de caseína.

20 Tal como se muestra en las figuras 3-4, la secreción de la citoquina proinflamatoria interferón-gamma (IFN γ) por células dendríticas humanas primarias activadas es inhibida por la caseína hidrolizada exhaustivamente y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado exhaustivo de caseína.

Tal como se muestra en las figuras 5-6, la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-8 (IL8) por células dendríticas humanas primarias activadas es inhibida por la caseína hidrolizada exhaustivamente y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado exhaustivo de caseína.

25 Tal como se muestra en las figuras 7-8, la secreción de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α) por células dendríticas humanas primarias activadas es inhibida por la caseína hidrolizada exhaustivamente y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado exhaustivo de caseína.

30 Tal como se muestra en las figuras 9-10, la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-6 (IL6) por células dendríticas humanas primarias activadas es inhibida por la caseína hidrolizada exhaustivamente y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado exhaustivo de caseína.

Tal como se muestra en las figuras 11-12, la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-1 beta (IL1 β) por células dendríticas humanas primarias activadas es inhibida por la caseína hidrolizada exhaustivamente y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado exhaustivo de caseína.

Ejemplo 4

35 El ejemplo 4 se dirige a la inhibición de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral-alfa ("TNF α ") en un ensayo de macrófagos humanos primarios por caseína hidrolizada exhaustivamente y una fracción mayor que 500 Da de esta.

40 Se suspendieron monocitos aislados en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor al 10% y penicilina/estreptomicina. Se añadió M-CSF humano recombinantes hasta una concentración final de 100 ng/ml, y las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 5 días.

En el día 5, las muestras de hidrolizado que incluyen caseína hidrolizada exhaustivamente y una fracción mayor que 500 Da de esta, a una concentración final de 0,007, 0,02, 0,08 y 0,2% en m/v se añadieron en medio RPMI con M-CSF.

45 En el día 6, el medio que incluye las muestras de hidrolizado se retiró y las células se refrescaron con muestras de hidrolizado en medio sin M-CSF. Una hora después de la adición del hidrolizado, se añadió LPS (*E. coli* (0111:84)) hasta una concentración final de 10 ng/ml. Después las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas y posteriormente los sobrenadantes se recolectaron y se conservaron a -20 °C hasta la cuantificación del TNF α usando el ensayo de TNF α Meso Scale Discovery según las instrucciones del fabricante.

50 Tal como se muestra en las figuras 13-14, la secreción de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α) de macrófagos humanos primarios activados es inhibida por la caseína hidrolizada exhaustivamente y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado exhaustivo de caseína.

Ejemplo 5

El ejemplo 5 se dirige a la evaluación de la expresión del ARN mensajero de citoquinas proinflamatorias en el íleon de ratones diabéticos no obesos ("Non-Obese Diabetic", NOD).

5 Brevemente, se usaron ratones hembra BALB/c agrupados por edad como ratones control sanos. Los ratones BALB/c se mantuvieron con pienso normal, si no se indica lo contrario, mientras que los ratones NOD se mantuvieron con pienso normal o con una leche en polvo dietética que contenía caseína hidrolizada exhaustivamente (CH) que comienza en el momento del destete.

10 El aislamiento de ARN a partir de muestras de íleon se realizó con un kit de aislamiento de ARN. Se sintetizó el ADNc y se evaluó la expresión de citoquinas mediante PCR a tiempo real cuantitativa. Se calcularon los números de copias absolutos de ARN (moléculas/μg) ensayando patrones y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga.

Tal como puede observarse en las figuras 15-18, la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL1, IL6, IL18 e IL17 en el íleon de ratones NOD es elevada, comparado con ratones control sanos (BALB/C) de su misma edad. Estos niveles elevados disminuyen en ratones NOD alimentados con una dieta de caseína hidrolizada exhaustivamente.

15 **Ejemplo 6**

El 6 se dirige a la evaluación de los perfiles de citoquinas proinflamatorias a partir de células T aisladas de nódulos linfáticos de drenaje del intestino en ratones diabéticos no obesos (NOD).

20 Brevemente, se usaron ratones hembra BALB/c agrupados por edad como ratones control sanos. Los ratones BALB/c se mantuvieron con pienso normal, si no se indica lo contrario, mientras que los ratones NOD se mantuvieron con pienso normal o con una leche en polvo dietética que contenía caseína hidrolizada exhaustivamente (CH) que comienza en el momento del destete.

25 Se estimularon células de nódulos linfáticos mesentéricas aisladas procedentes de cada grupo de ratones con anti-CD3 unido a placas en medio completo (DMEM con 10% (en vol./vol.) de FBS, L-glutamina 2 mmol/l, penicilina más estreptomycinina 100 U/ml). Las fracciones de sobrenadante se recogieron 48 h después para el análisis de citoquinas con matrices de esferas de citoquinas múltiplex según las instrucciones del fabricante.

Tal como se muestra en las figuras 19-21, la secreción de las citoquinas proinflamatorias IFNγ, IL4 e IL17 de células T de nódulos linfáticos que drenan el intestino procedentes de ratones NOD es elevada, comparado con ratones control sanos (BALB/C) de su misma edad. Estos niveles elevados disminuyen en ratones NOD con una dieta de caseína hidrolizada exhaustivamente.

30 **Ejemplo 7**

El ejemplo 7 se dirige al análisis de la secreción de citoquinas en una línea de células de macrófagos murinos.

La línea celular de macrófagos murinos J774A.1 se mantuvo en RPMI-1640 suplementado con suero de ternero fetal al 10% (en v/v), penicilina 50 IU/ml y estreptomycinina 0,5 mg/ml. Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂.

35 Las muestras de hidrolizado de caseína que incluyen caseína hidrolizada exhaustivamente y una fracción mayor que 500 Da de esta se añadieron a agua estéril a una concentración de 100 mg/ml y se esterilizaron mediante filtración a través de filtros de nailon de 0,2 μm. Como control adicional, también se ensayó caseína hidrolizada exhaustivamente no esterilizada mediante filtración. Las células se cultivaron en placa a 1x10⁵ células/ml y se incubaron por triplicado con una concentración final de 1 mg/ml de hidrolizado durante 1 hora. Después las células se trataron con LPS 100 ng/ml o se dejaron sin tratar durante 24 horas antes de recolectar los sobrenadantes mediante centrifugación y se conservaron a -20 °C.

Los sobrenadantes se evaluaron para cada concentración de citoquinas usando ensayos ELISA individuales para IL-1β, IL-6, IL12p40 y TNF-α según las instrucciones del fabricante. Las muestras se ensayaron por triplicado y se calcularon las diferentes significativas usando el análisis ANOVA de una vía normal con el programa informático Graphpad Prism 6. Se considera significativo p<0,05.

45 Tal como puede observarse en las figuras 22-25, la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-12p40 e IL-1β desde macrófagos de ratón estimulados con LPS disminuyó por la caseína hidrolizada exhaustivamente, con o sin esterilización mediante filtración antes de la incubación de las células (* p<0,05). La secreción de la citoquina proinflamatoria IL6 disminuyó significativamente por la caseína hidrolizada exhaustivamente (* p<0,05). La secreción de la citoquina proinflamatoria TNFα disminuyó significativamente por la fracción mayor que 500 Da del hidrolizado exhaustivo de caseína (* p<0,05). Los resultados también se muestran en formato de tabla en la figura 26.

Ejemplo 8

El ejemplo 8 ilustra el efecto de la secreción de insulina de la caseína hidrolizada exhaustivamente y de una fracción

mayor que 500 Da de la caseína hidrolizada exhaustivamente.

Materiales y métodos: Se mantuvieron células secretoras de insulina (BRIN-BD11) en medio Gibco® RPMI-1640 que contenía glucosa 11,1 mM, suplementado con suero de ternero fetal al 10% (en v/v), glutamina 2 mM, penicilina 50 IU/ml, estreptomina 0,05 mg/ml, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire.

Para los experimentos de secreción de insulina, las células BRIN BD 11 se incubaron con glucosa Krebs 1,1 mmol/l durante 40 minutos. Después todos los pocillos se trataron durante 20 minutos con (1) glucosa Krebs 16,7 mmol/l y alanina 10 mmol/l, o (2) glucosa 16,7 mM y caseína hidrolizadas exhaustivamente 1 mg/ml. Después de este tratamiento, el sobrenadante se retiró y se congeló hasta que se analizó la insulina. La insulina segregada se midió usando el kit de ELISA de insulina de rata ultrasensible Mercodia (Mercodia AB, Uppsala, Suecia). Se midió el contenido en proteínas usando un ensayo de proteínas de ácido bicinónico (BCA), y la concentración se expresa como ng de insulina/mg de proteína como se ha descrito previamente (Wallace *et al.*, 2012). Se evaluó la viabilidad celular mediante MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio).

Se añadieron las citoquinas seleccionadas interleuquina-1β (IL-1β), interleuquina-23 (IL-23), interferón-γ (IFN-γ), con efectos perjudiciales conocidos sobre la funcionalidad y la viabilidad de célula beta, a una concentración final de 10 ng/ml. Las concentraciones se eligieron para que no indujeran efectos citotóxicos, sino que provocasen efectos suaves para permitir la investigación de los efectos de rescate potenciales de la caseína hidrolizada exhaustivamente.

Para los experimentos de secreción de insulina, alanina 10 mM y glucosa 16,7 mM actuaron como control positivo. Una muestra que induce la secreción de insulina por encima de este control positivo se considera un potente secretagogo.

El efecto de la caseína hidrolizada exhaustivamente sobre la secreción de insulina (n = 4) tras la exposición a IL-1β se muestra en la figura 27. Los valores son promedios ± PEE. Glu representa glucosa 16,7 mM, y Glu/Ala representa glucosa 16,7 mM y alanina 10 mM (control positivo). Se realizó un análisis ANOVA con una significancia global de P < 0,001. Unos análisis posthoc revelaron diferencias significativas con respecto al control positivo (* P<0,05). La caseína hidrolizada exhaustivamente demostró poseer capacidad para estimular significativamente la secreción de insulina en un grado mayor que el control positivo.

La figura 28 indica los correspondientes efectos para una fracción >500Da de la caseína hidrolizada exhaustivamente. Glu -IL-1Beta representa el control de glucosa sin exposición a IL-1β, G/A -IL-1Beta representa el control de glucosa/alanina sin exposición a IL-1β, Glu: glucosa, representa el control con exposición a IL-1β, y G/A: glucosa/alanina, representa el control con exposición a IL-1β.

La figura 29 muestra el efecto de muestras de hidrolizado sobre la secreción de insulina (n = 4) tras la exposición a IFN-γ. Los valores son promedios ± PEE. Glu representa glucosa 16,7 mM, y Glu/Ala representa glucosa 16,7 mM y alanina 10 mM (control positivo). Se realizó un análisis ANOVA con una significancia global de P < 0,001. Unos análisis posthoc revelaron diferencias significativas con respecto al control positivo (** P<0,01). La caseína hidrolizada exhaustivamente demostró poseer capacidad para estimular significativamente la secreción de insulina en un grado mayor que el control positivo.

La figura 30 muestra el efecto de la caseína hidrolizada exhaustivamente sobre la secreción de insulina (n = 4) tras la exposición a IL-23. Los valores son promedios ± PEE. Glu representa glucosa 16,7 mM, y Glu/Ala representa glucosa 16,7 mM y alanina 10 mM (control positivo). Se realizó un análisis ANOVA con una significancia global de P < 0,001. Unos análisis posthoc revelaron diferencias significativas con respecto al control positivo (** P<0,01). La caseína hidrolizada exhaustivamente demostró poseer capacidad para estimular significativamente la secreción de insulina en un grado mayor que el control positivo.

La figura 31, a la derecha, indica los correspondientes efectos con respecto a IL-17 para una fracción >500Da de la caseína hidrolizada exhaustivamente. G/A -IL-17: glucosa/alanina, representa el control sin exposición a IL-17, Glu: glucosa, representa el control con exposición a IL-17, y G/A: glucosa/alanina, representa el control con exposición a IL-17.

Ejemplos de formulación

La tabla 3 proporciona un ejemplo de realización de un componente de péptido que incluye 5 péptidos seleccionados de la tabla 1, y 3 péptidos seleccionados de la tabla 2 que pueden comprender el componente de péptido descrito en la presente que puede incorporarse o añadirse a las composiciones nutricionales descritas en la presente.

Tabla 3 - Perfil nutricional de un ejemplo de un componente de péptido

Ejemplo de los péptidos seleccionados para el componente de péptido
SEQ ID NO:5
SEQ ID NO:24
SEQ ID NO:33
SEQ ID NO:56
SEQ ID NO:64
SEQ ID NO:13
SEQ ID NO:24
SEQ ID NO:60

5 La tabla 4 proporciona un ejemplo de realización de un componente de péptido que incluye 5 péptidos seleccionados de la tabla 1, 3 péptidos seleccionados de la tabla 2, y al menos 10 péptidos adicionales procedentes de la tabla 1 que pueden comprender el componente de péptido descrito en la presente que puede incorporarse o añadirse a las composiciones nutricionales descritas en la presente.

Tabla 4 - Perfil nutricional de un ejemplo de un componente de péptido

Ejemplo de los péptidos seleccionados para el componente de péptido
SEQ ID NO:13
SEQ ID NO:24
SEQ ID NO:60
SEQ ID NO:5
SEQ ID NO:11
SEQ ID NO:22
SEQ ID NO:25
SEQ ID NO:33
SEQ ID NO:45
SEQ ID NO:46
SEQ ID NO:47
SEQ ID NO:48
SEQ ID NO:52
SEQ ID NO:34
SEQ ID NO:36
SEQ ID NO:61
SEQ ID NO:62
SEQ ID NO:64

La tabla 5 proporciona un ejemplo de realización de una composición nutricional según la presente descripción y

ES 2 820 567 T3

describe la cantidad de cada ingrediente para ser incluida por 100 kcal de ración.

Tabla 5 - Perfil nutricional de un ejemplo de una composición nutricional

Nutriente	por 100 kcal	
	Mínimo	Máximo
Fuente de equivalentes de proteínas (g)	1,8	6,8
Grasas (g)	1,3	7,2
Carbohidratos (g)	6	22
Prebiótico (g)	0,3	1,2
DHA (g)	4	22
Beta-glucano (mg)	2,9	17
Probióticos (cfu)	$9,60 \times 10^5$	$3,80 \times 10^8$
Vitamina A (IU)	134	921
Vitamina D (IU)	22	126
Vitamina E (IU)	0,8	5,4
Vitamina K (mcg)	2,9	18
Tiamina (mcg)	63	328
Riboflavina (mcg)	68	420
Vitamina B6 (mcg)	52	397
Vitamina B12 (mcg)	0,2	0,9
Niacina (mcg)	690	5881
Ácido fólico (mcg)	8	66
Ácido pantoténico (mcg)	232	1211
Biotina (mcg)	1,4	5,5
Vitamina C (mg)	4,9	24
Colina (mg)	4,9	43
Calcio (mg)	68	297
Fósforo (mg)	54	210
Magnesio (mg)	4,9	34
Sodio (mg)	24	88
Potasio (mg)	82	346
Cloruro (mg)	53	237
Yodo (mcg)	8,9	79
Hierro (mg)	0,7	2,8
Cinc (mg)	0,7	2,4

Manganeso (mcg)	7,2	41
Cobre (mcg)	16	331

El análisis de las referencias en la presente pretende simplemente resumir las afirmaciones realizadas por sus autores y no se admite que ninguna referencia forme parte de la técnica anterior. Los solicitantes se reservan el derecho de cuestionar la precisión y la pertinencia de las referencias citadas.

5 El alcance de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

<110> Mead Johnson Nutritional Co. Ltd. Asia Pacífico

<120> Composiciones nutricionales que contienen un componente de peptido y sus usos

10

<130> MJE00373NP

<160> 64

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> bovino

20

<400> 1

Ala Ile Asn Pro Ser Lys Glu Asn
1 5

25

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> bovino

<400> 2

Ala Pro Phe Pro Glu
1 5

30

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> bovino

35

<400> 3

Asp Ile Gly Ser Glu Ser
1 5

40

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> bovino

45

<400> 4

Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr
1 5

50

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> bovino

<400> 5

ES 2 820 567 T3

		Asp Met Glu Ser Thr
		1 5
5	<210> 6 <211> 4 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 6	
10		Asp Met Pro Ile
		1
15	<210> 7 <211> 4 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 7	
20		Asp Val Pro Ser
		1
25	<210> 8 <211> 7 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 8	
30		Glu Thr Ala Pro Val Pro Leu
		1 5
35	<210> 9 <211> 6 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 9	
40		Phe Pro Gly Pro Ile Pro
		1 5
45	<210> 10 <211> 7 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 10	
50		Phe Pro Gly Pro Ile Pro Asn
		1 5
55	<210> 11 <211> 4 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 11	
60		Gly Pro Phe Pro
		1
65	<210> 12 <211> 4 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 12	
70		Gly Pro Ile Val
		1
75	<210> 13	

ES 2 820 567 T3

5	<210> 28 <211> 5 <212> PRT <213> bovino		
	<400> 28	Asn Ala Val Pro Ile	
		1	5
10	<210> 29 <211> 5 <212> PRT <213> bovino		
15	<400> 29	Asn Glu Val Glu Ala	
		1	5
20	<210> 30 <211> 6 <212> PRT <213> bovino		
	<400> 30	Asn Gln Glu Gln Pro Ile	
25		1	5
30	<210> 31 <211> 5 <212> PRT <213> bovino		
	<400> 31	Asn Val Pro Gly Glu	
		1	5
35	<210> 32 <211> 6 <212> PRT <213> bovino		
	<400> 32	Pro Phe Pro Gly Pro Ile	
40		1	5
45	<210> 33 <211> 6 <212> PRT <213> bovino		
	<400> 33	Pro Gly Pro Ile Pro Asn	
		1	5
50	<210> 34 <211> 8 <212> PRT <213> bovino		
55	<400> 34	Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr	
		1	5
60	<210> 35 <211> 5 <212> PRT		

ES 2 820 567 T3

<213> bovino
<400> 35
5
Pro Ile Thr Pro Thr
1 5
<210> 36
<211> 4
<212> PRT
<213> bovino
10
<400> 36
Pro Asn Pro Ile
1
15
<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> bovino
<400> 37
20
Pro Asn Ser Leu Pro Gln
1 5
<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> bovino
25
<400> 38
Pro Gln Leu Glu Ile Val Pro Asn
1 5
30
<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> bovino
35
<400> 39
Pro Gln Asn Ile Pro Pro Leu
1 5
<210> 40
<211> 6
<212> PRT
<213> bovino
40
<400> 40
Pro Val Leu Gly Pro Val
1 5
45
<210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> bovino
50
<400> 41
Pro Val Pro Gln
1
55
<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> bovino
<400> 42

ES 2 820 567 T3

		Pro Val Val Val Pro
		1 5
5	<210> 43 <211> 6 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 43	
10		Pro Val Val Val Pro Pro
		1 5
15	<210> 44 <211> 11 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 44	
		Ser Ile Gly Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ala Glu
		1 5 10
20	<210> 45 <211> 7 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 45	
25		Ser Ile Ser Ser Ser Glu Glu
		1 5
30	<210> 46 <211> 11 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 46	
		Ser Ile Ser Ser Ser Glu Glu Ile Val Pro Asn
		1 5 10
35	<210> 47 <211> 7 <212> PRT <213> bovino	
40	<400> 47	
		Ser Lys Asp Ile Gly Ser Glu
		1 5
45	<210> 48 <211> 6 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 48	
50		Ser Pro Pro Glu Ile Asn
		1 5
55	<210> 49 <211> 7 <212> PRT <213> bovino	
	<400> 49	
		Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
		1 5
	<210> 50	

ES 2 820 567 T3

	<400> 57		Val Pro Ser Glu
			1
5	<210> 58 <211> 9 <212> PRT <213> bovino		
	<400> 58		Val Val Pro Pro Phe Leu Gln Pro Glu
10			1 5
15	<210> 59 <211> 5 <212> PRT <213> bovino		
	<400> 59		Val Val Val Pro Pro
			1 5
20	<210> 60 <211> 6 <212> PRT <213> bovino		
25	<400> 60		Tyr Pro Phe Pro Gly Pro
			1 5
30	<210> 61 <211> 8 <212> PRT <213> bovino		
	<400> 61		Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Pro
35			1 5
40	<210> 62 <211> 9 <212> PRT <213> bovino		
	<400> 62		Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Pro Asn
			1 5
45	<210> 63 <211> 5 <212> PRT <213> bovino		
	<400> 63		Tyr Pro Ser Gly Ala
50			1 5
55	<210> 64 <211> 5 <212> PRT <213> bovino		
	<400> 64		Tyr Pro Val Glu Pro
			1 5
60			

REIVINDICACIONES

1. Una composición nutricional para su uso para reducir la incidencia de la diabetes mellitus, en donde dicha composición nutricional comprende:
 - (i) una fuente de carbohidratos;
 - 5 (ii) una fuente de grasas; y
 - (iii) una fuente de equivalentes de proteínas,
 en donde:
 - a) del 20% al 80% de la fuente de equivalentes de proteínas incluye un componente de péptido que comprende cada uno de los siguientes péptidos individuales: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:60, y SEQ ID NO:63; y
 - 10 b) del 20% al 80% de la fuente de equivalentes de proteínas comprende una proteína intacta, una proteína parcialmente hidrolizada, o sus combinaciones.
2. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 1, en donde la diabetes mellitus es la diabetes mellitus de tipo 1.
3. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 1, en donde la diabetes mellitus es la diabetes mellitus de tipo 2.
4. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 1, en donde el componente de péptido está presente en una cantidad de 0,2 g/100 kcal a 5,6 g/100 kcal.
- 20 5. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 1, en donde el componente de péptido comprende además al menos 10 péptidos adicionales seleccionados de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, y SEQ ID NO:64.
- 25 6. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 1, en donde fuente de equivalentes de proteínas comprende una proteína parcialmente hidrolizada que tiene un grado de hidrólisis menor que 40%.
7. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 1, que comprende además al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga.
8. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 7, en donde dicho al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga se selecciona del grupo que consiste en ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (ARA).
- 35 9. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 8, en donde dicho al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga comprende DHA y ARA, en donde la proporción en peso de ARA:DHA es de entre 1:3 y 9:1.
10. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 1, que comprende además un prebiótico.
- 40 11. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 10, en donde el prebiótico comprende polidextrosa (PDX) y galacto-oligosacárido (GOS).
12. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 11, en donde la PDX y el GOS están presentes en la composición nutricional en una cantidad total de al menos aproximadamente 0,2 mg/100 kcal a 1,5 mg/100 kcal.
13. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 1, que comprende además un probiótico.
- 45 14. La composición nutricional para su uso según la reivindicación 13, en donde el probiótico comprende *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Fig. 1

Caseína hidrolizada exhaustivamente

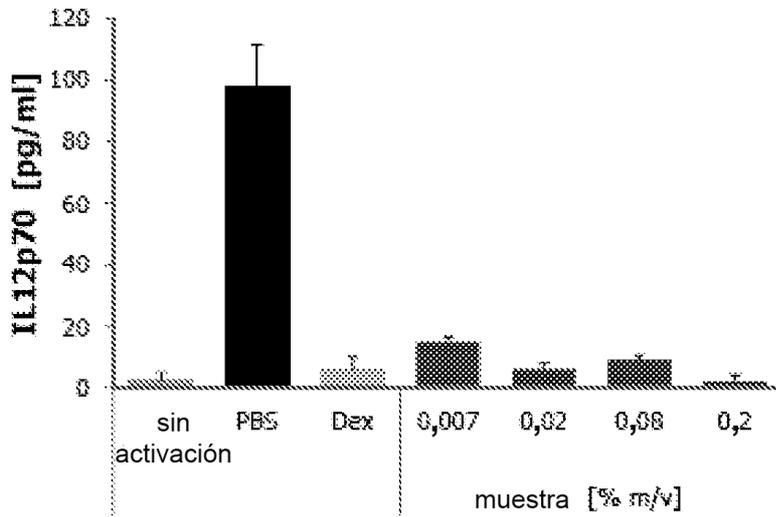


Fig. 2

Fracción >500 Da

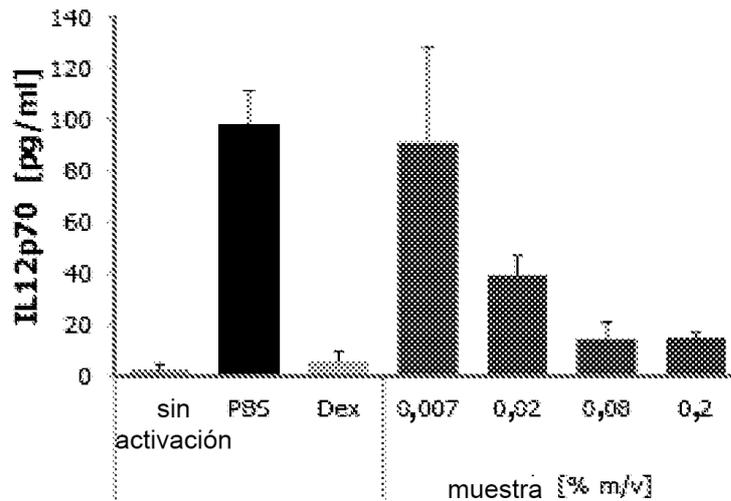


Fig. 3

Caseína hidrolizada exhaustivamente

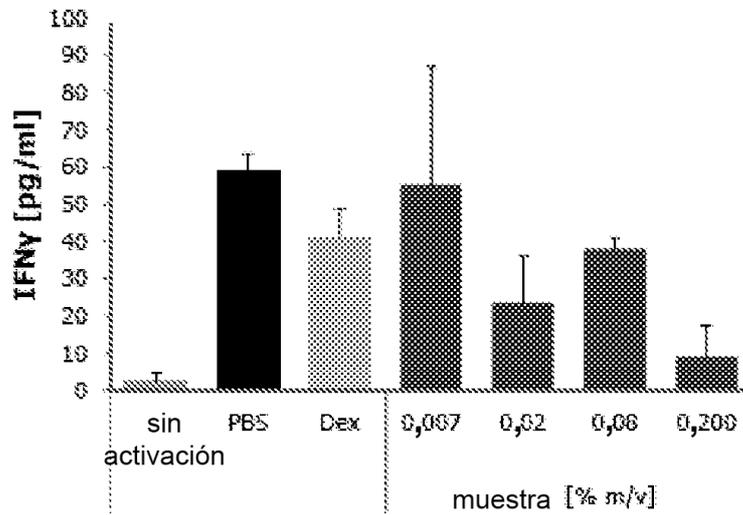


Fig. 4

Fracción >500 Da

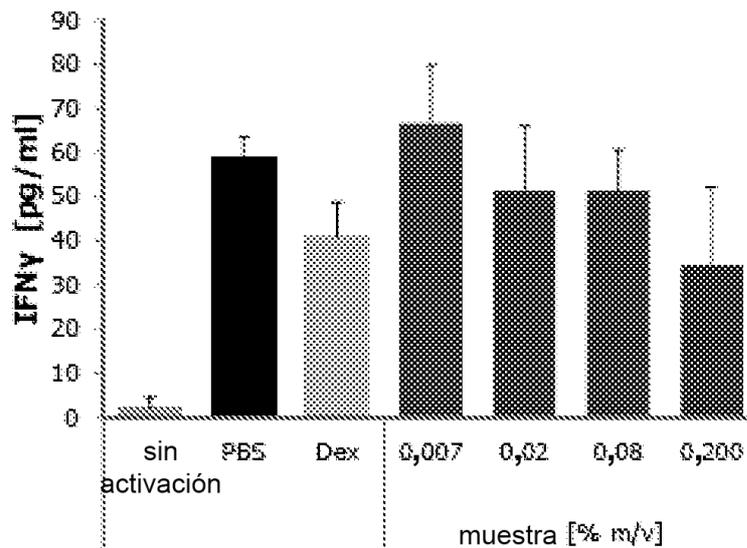


Fig. 5

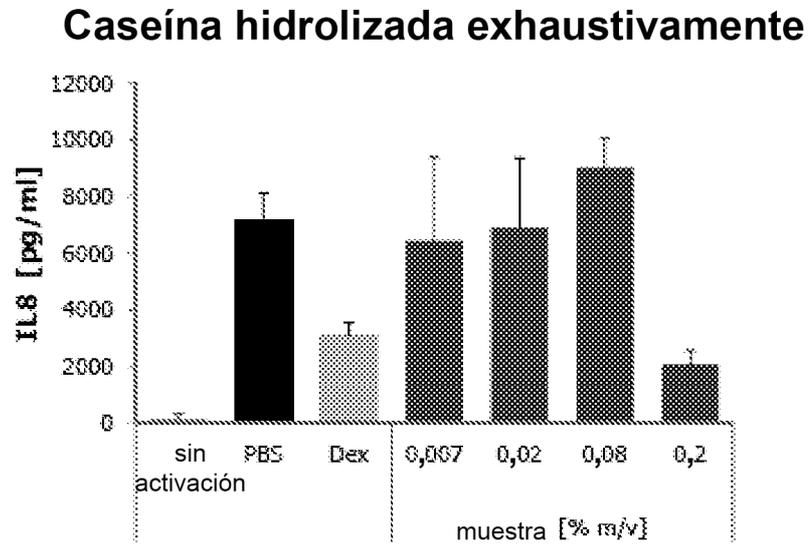


Fig. 6

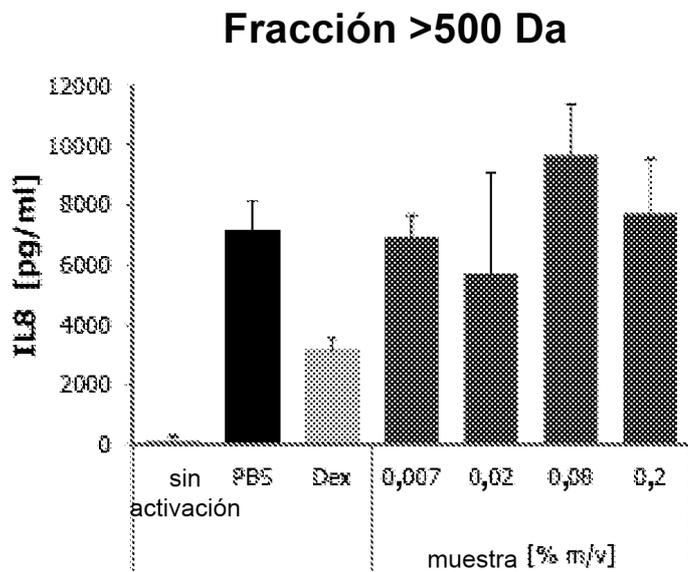


Fig. 7

Caseína hidrolizada exhaustivamente

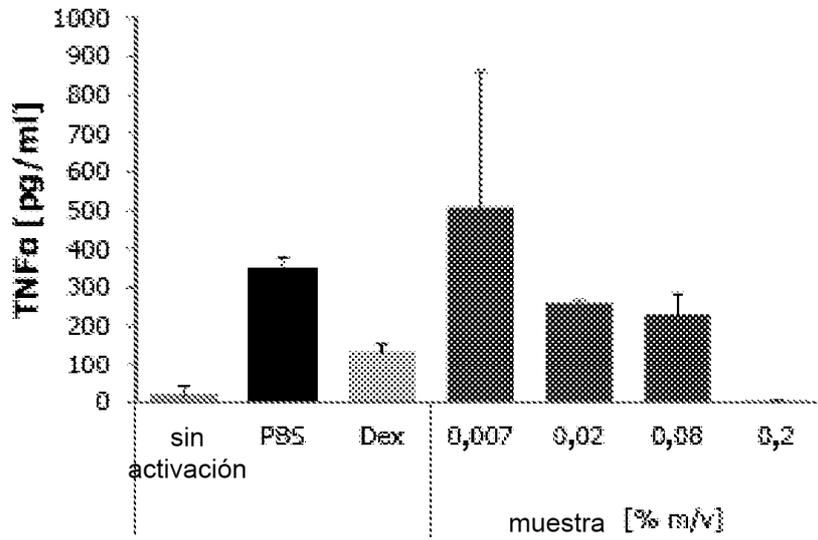


Fig. 8

Fracción >500 Da

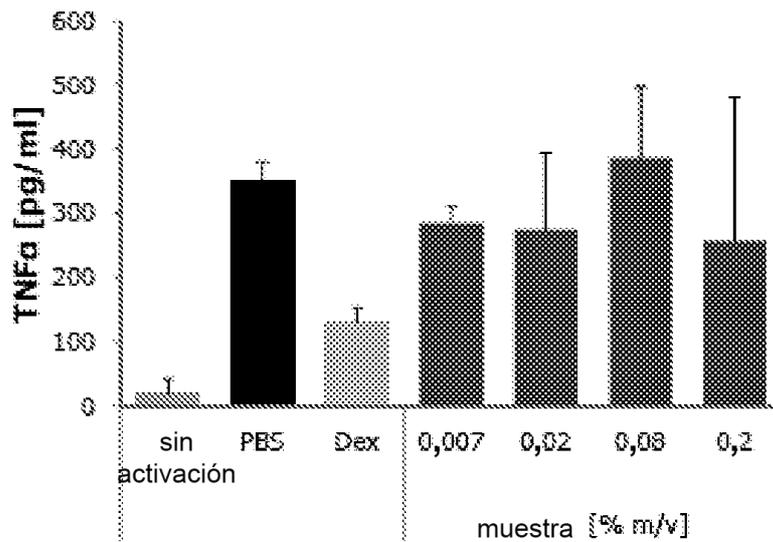


Fig. 9

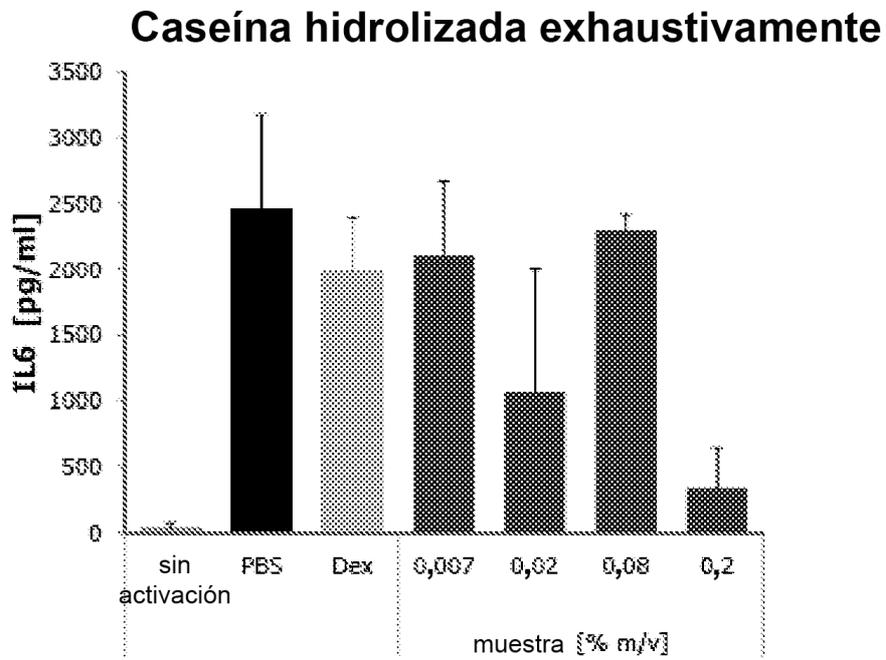


Fig. 10

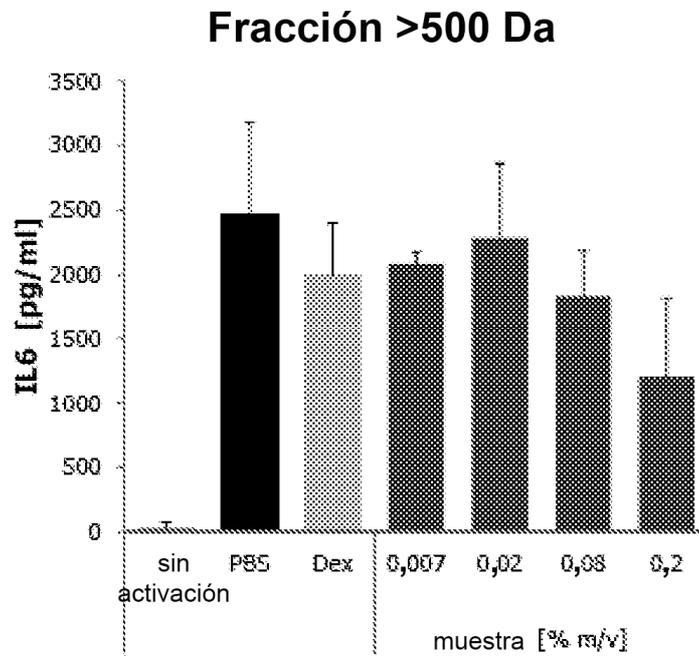


Fig. 11

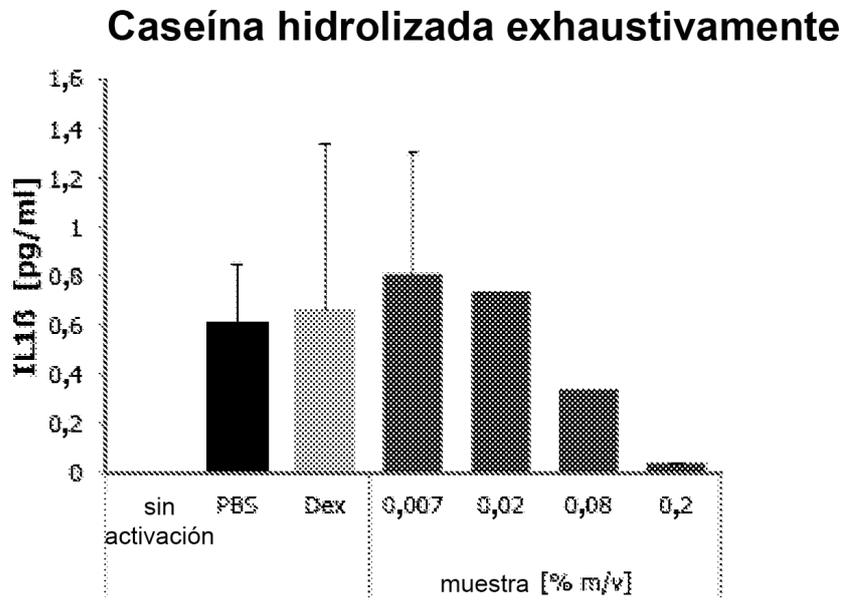


Fig. 12

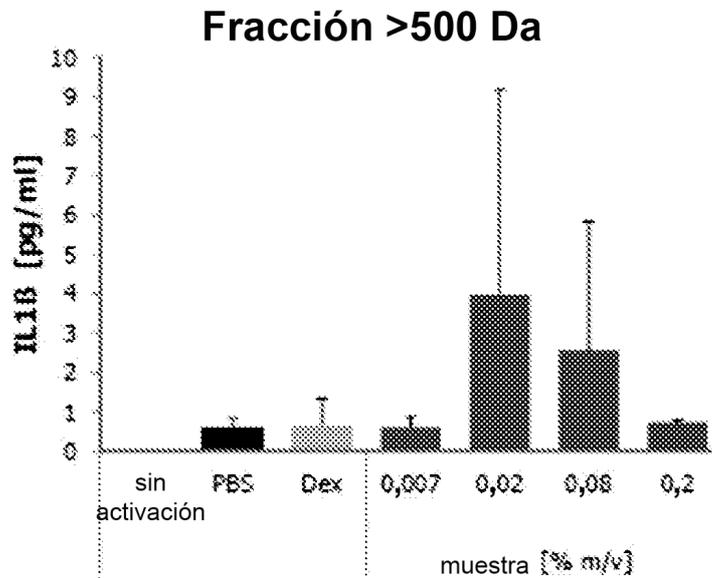


Fig. 13

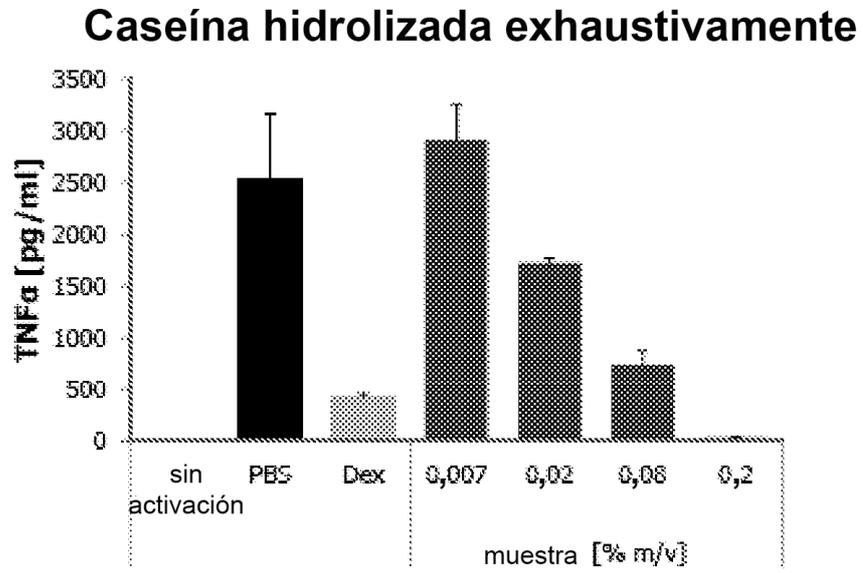


Fig. 14

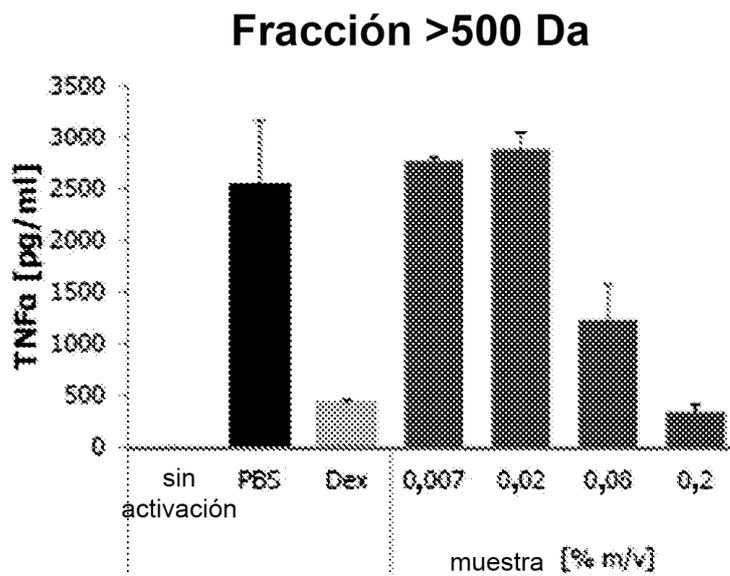


Fig. 15

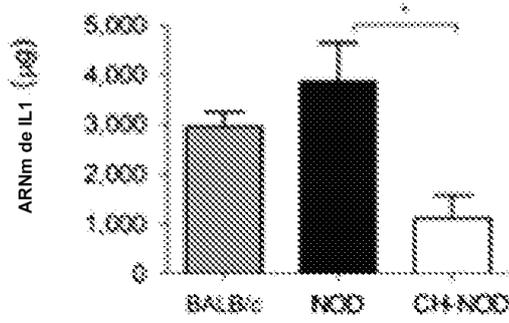


Fig. 16

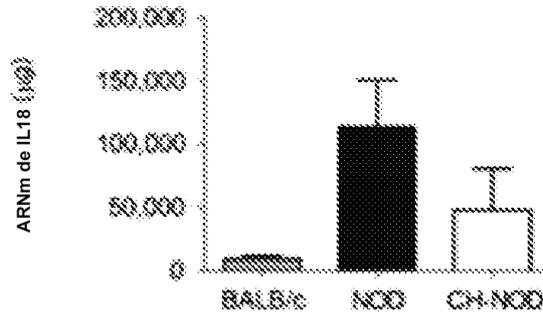


Fig. 17

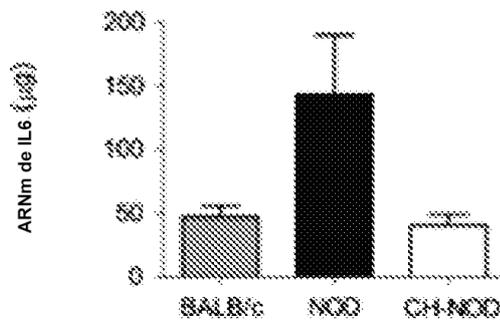


Fig. 18

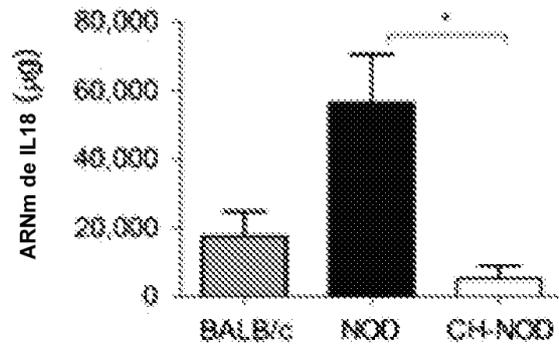


Fig. 19

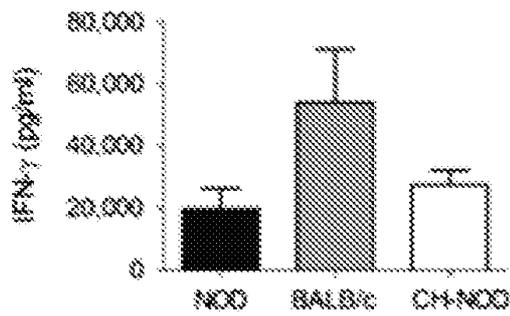


Fig. 20

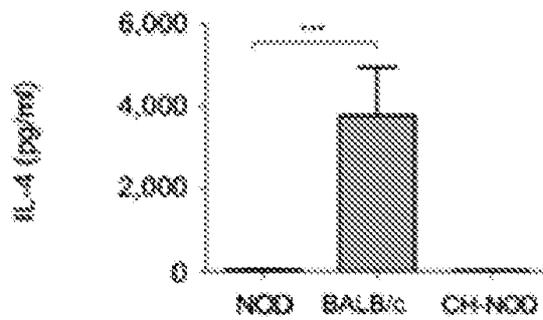


Fig. 21

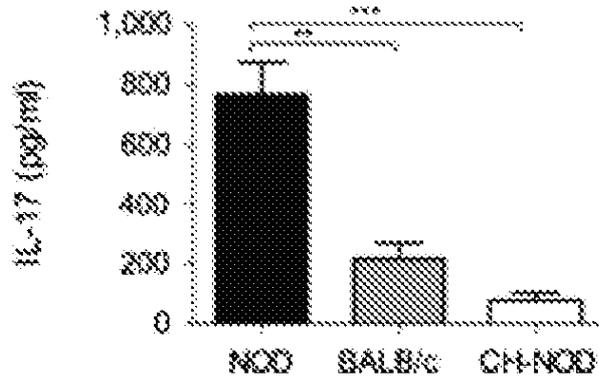


Fig. 22

IL12p40

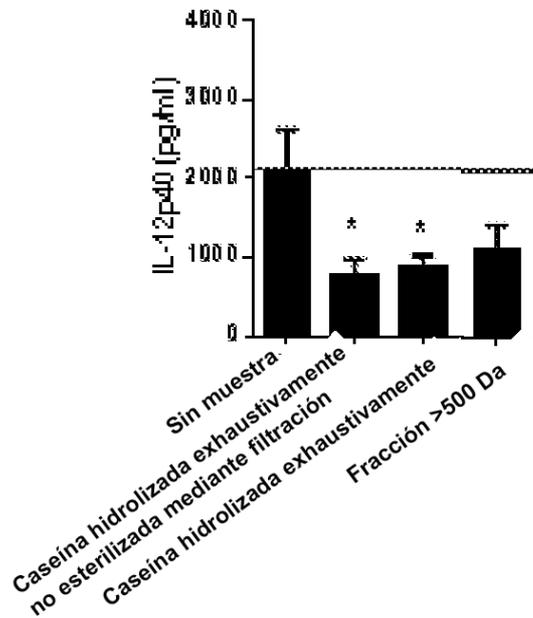


Fig. 23

IL1 β

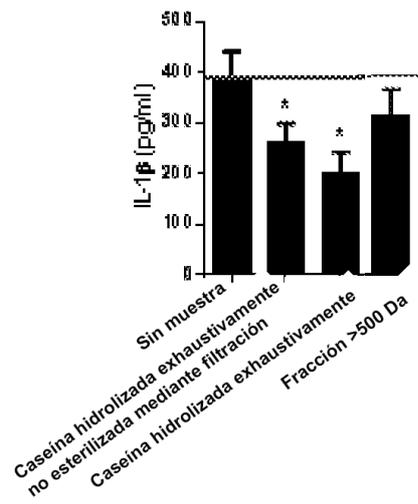


Fig. 24

IL6

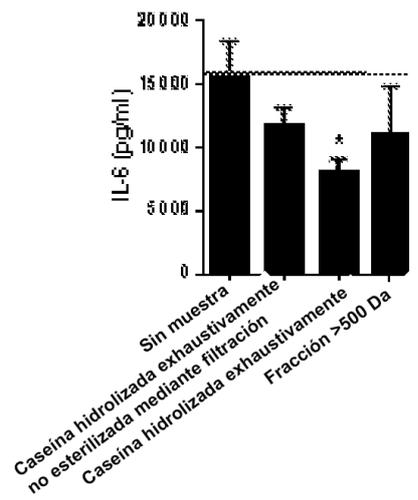


Fig. 25

TNF α

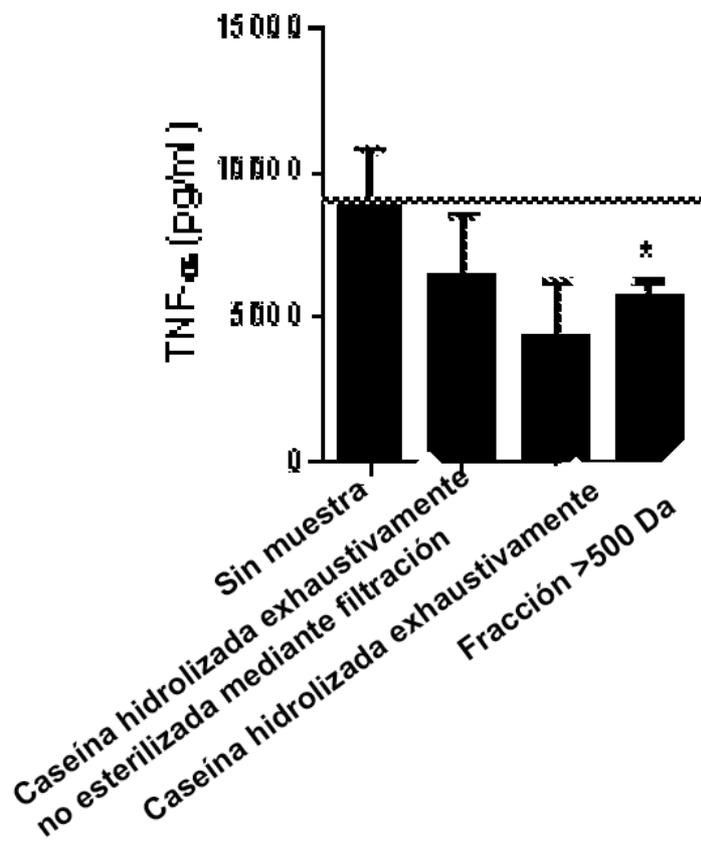


Fig. 26

	IL-12p40			IL-1β			IL-6			TNF-α		
	Promedio	Efecto sign.	% de cambio	Promedio	Efecto sign.	% de cambio	Promedio	Efecto sign.	% de cambio	Promedio	Efecto sign.	% de cambio
Sin muestra	2074,78			390,34			15926,39			8922,91		
Caseína hidrolizada exhaustivamente no esterilizada mediante filtración	758,52	↓	63,44	258,42	↓	33,80	11851,96			6461,56		
Caseína hidrolizada exhaustivamente	882,27	↓	57,48	198,27	↓	49,21	8124,46	↓	48,99	4310,24		
Fracción >500 Da	1124,63			309,98						5682,15	↓	36,32

Fig. 27

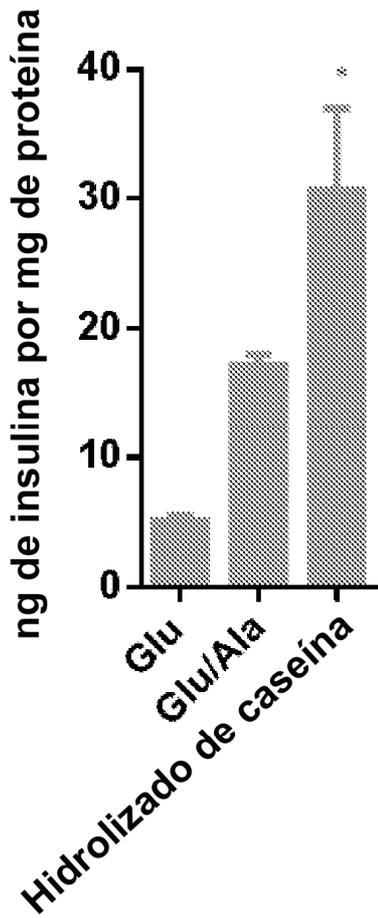


Fig. 28

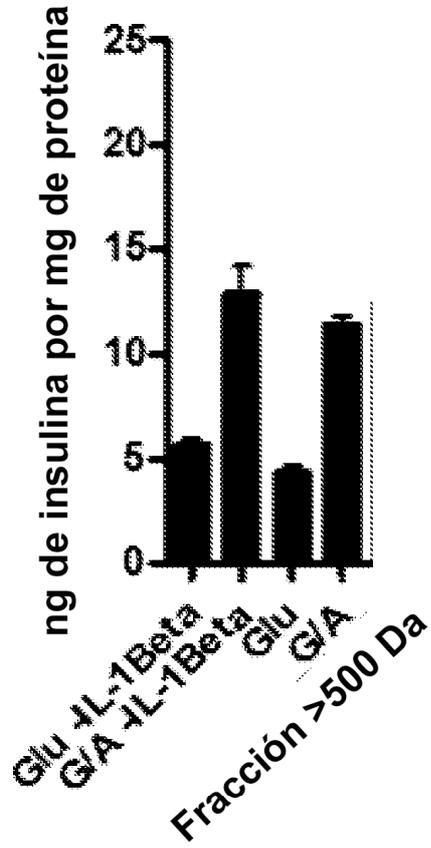


Fig. 29

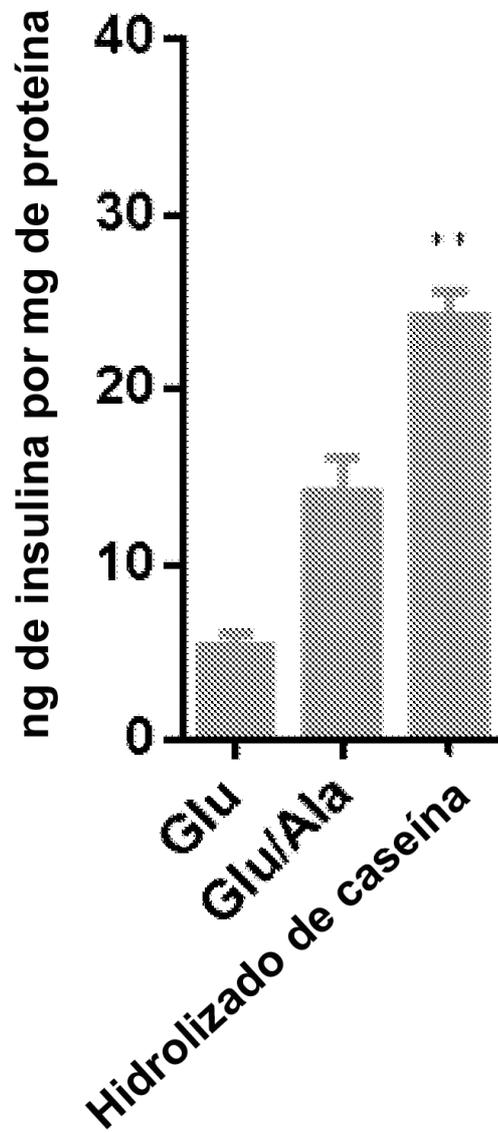


Fig. 30

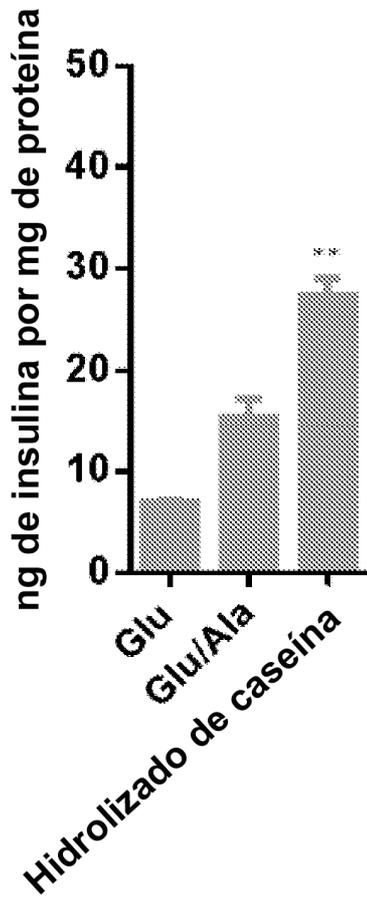


Fig. 31

