

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 750**

51 Int. Cl.:

A61K 38/01 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/US2014/023637**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14150571**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14714100 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 2968437**

54 Título: **Hidrolizado de caseína para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313838539

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

27.04.2021

73 Titular/es:

**MJN U.S. HOLDINGS LLC (100.0%)
 2400 West Lloyd Expressway
 Evansville, Indiana 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 2 821 750 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

Hidrolizado de caseína para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias

Campo técnico

La descripción se refiere a un método para reducir una respuesta proinflamatoria usando un hidrolizado de caseína.

5 Técnica anterior

La respuesta proinflamatoria, o inflamación, es la respuesta biológica del cuerpo a estímulos nocivos, tales como agentes patógenos, células dañadas o irritantes.

Los signos clásicos de inflamación aguda son dolor, calor, enrojecimiento, hinchazón y pérdida de función. La inflamación es un intento protector del organismo para eliminar los estímulos perjudiciales e iniciar el proceso de curación. La inflamación no es sinónimo de infección, incluso en casos en los que la inflamación es causada por una infección. Aunque la infección sea causada por un microorganismo, la inflamación es una de las respuestas del organismo al agente patógeno. Aunque la inflamación aguda es importante para la respuesta inmunitaria y evita mayor destrucción del tejido, la inflamación crónica inapropiada puede causar destrucción de tejidos (neurodegenerativa, cardiovascular, diabetes tipo 2) y enfermedades tales como la fiebre del heno, periodontitis, aterosclerosis, artritis reumatoide, diabetes tipo 1, enfermedad autoinmunitaria e incluso cáncer (por ejemplo, carcinoma de la vesícula biliar). La inflamación prolongada, o inflamación crónica, conduce a un cambio progresivo en el tipo de células presentes en el sitio de la inflamación y se caracteriza por la destrucción y curación simultáneas del tejido a partir del proceso inflamatorio. La respuesta inflamatoria es parte de la respuesta inmunitaria innata y emplea agentes celulares y derivados del plasma (vía) tal como el sistema del complemento, interferones (IFN), citoquinas, linfoquinas, monoquinas, prostaglandinas y leucotrienos, factor activador de plaquetas (PAF), histamina y quininas (por ejemplo, bradiquinina asociada al dolor). Las citoquinas proinflamatorias incluyen IL-1 (interleuquina-1 α y β), IL-6, IL-8, TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) y TNF- β (linfotóxina α), así como miembros de la familia de IL20, IL33, LIF (factor inhibidor de leucocitos), IFN- γ (interferón gamma), OSM (oncostatina M), CNTF (factor neurotrófico ciliar), TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos), IL11, IL12 e IL18.

Las enfermedades autoinmunitarias surgen de una respuesta inmunitaria inapropiada del cuerpo frente a sustancias y tejidos normalmente presentes en el cuerpo. Esta puede estar restringida a ciertos órganos (por ejemplo, en tiroiditis autoinmunitaria) o implicar a un tejido particular en diferentes lugares (por ejemplo, enfermedad de Goodpasture que puede afectar a la membrana basal tanto en el pulmón como en el riñón). El tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias se puede realizar generalmente con medicación inmunosupresora que disminuyen la respuesta inmunitaria.

La diabetes mellitus tipo 1 (diabetes tipo 1, T1DM, anteriormente diabetes dependiente de la insulina o juvenil) es una forma de diabetes mellitus que resulta de la destrucción autoinmunitaria de las células beta productoras de insulina del páncreas. La subsiguiente falta de insulina conduce a un aumento de glucosa en sangre y orina. Los síntomas clásicos son poliuria (micción frecuente), polidipsia (aumento de la sed), polifagia (aumento del hambre) y pérdida de peso. La incidencia varía de 8 a 17 por 100.000 habitantes en el norte de Europa y Estados Unidos, con un máximo de alrededor de 35 por 100.000 en Escandinavia hasta un mínimo de 1 por 100.000 en Japón y China. Eventualmente, la diabetes tipo 1 es letal a menos que se trate con insulina. La inyección es el método más común de administración de insulina, aunque otros métodos son las bombas de insulina y la insulina inhalada. Otras alternativas que se han utilizado son los trasplantes de páncreas y también el trasplante de células de los islotes pancreáticos. El trasplante es experimental pero en crecimiento.

La enfermedad celíaca es un trastorno autoinmunitario del intestino delgado que ocurre en personas genéticamente predispuestas de todas las edades desde la infancia media en adelante. Los síntomas incluyen dolor y malestar en el tracto digestivo, estreñimiento crónico y diarrea, retraso en el desarrollo (en niños) y fatiga, pero estos pueden estar ausentes y se han descrito síntomas en otros sistemas de órganos. En personas con enfermedad celíaca se observan con frecuencia deficiencias de vitaminas debido a la capacidad reducida del intestino delgado de absorber adecuadamente nutrientes de los alimentos. Cada vez más, se están haciendo diagnósticos en personas asintomáticas como resultado de un mayor cribado; se cree que la afección afecta entre 1 de cada 1750 y 1 de cada 105 personas en Estados Unidos. La enfermedad celíaca es causada por una reacción a la gliadina, una prolamina (proteína del gluten) que se encuentra en el trigo y proteínas similares que se encuentran en los cultivos de la familia de las *Triticeae* (que incluye otros cereales comunes como la cebada y el centeno). Tras la exposición a la gliadina, y específicamente a tres péptidos encontrados en las prolaminas, la enzima transglutaminasa tisular modifica la proteína y el sistema inmunológico reacciona de forma cruzada con el tejido del intestino delgado, provocando una reacción inflamatoria. Eso conduce a un truncamiento de las vellosidades que revisten el intestino delgado (denominada atrofia vellosa). Esto interfiere con la absorción de nutrientes, debido a que las vellosidades intestinales son responsables de la absorción. El único tratamiento eficaz conocido es una dieta sin gluten de por vida. Aunque la enfermedad es causada por una reacción a las proteínas del trigo, no es lo mismo que la alergia al trigo.

HLA-DQ2 (DQ2) es un grupo de serotipos dentro del sistema de serotipado HLA-DQ (DQ). El serotipo se determina por el reconocimiento de anticuerpos del subconjunto $\beta 2$ de las cadenas β de DQ. DQ2 representa el segundo mayor factor de riesgo para la enfermedad celíaca, el mayor riesgo es un miembro familiar cercano con la enfermedad. Debido a su vínculo con la enfermedad celíaca, DQ2 tiene la mayor asociación de cualquier serotipo HLA con enfermedad autoinmunitaria, cerca del 95% de todos los celíacos tienen DQ2, de los que el 30% tienen 2 copias de DQ2. De los homocigotos DQ2 que comen trigo, el riesgo de por vida de enfermedad celíaca está entre el 20 y el 40%. La diabetes juvenil (T1D) tiene una alta asociación con DQ2.5 y parece que hay una relación entre GSE y T1D en varones de aparición temprana. Los anticuerpos anti-tTG se encuentran altos en un tercio de los pacientes con T1D, y hay indicadores de que la familia *Triticeae* puede estar implicada, aunque la proteína del gluten es un tipo de globulina (Glb1). Estudios recientes indican que una combinación de DQ2.5 y DQ8 (ambos presentadores de péptidos ácidos) aumenta mucho el riesgo de aparición de diabetes tipo 1 en adultos y diabetes tipo I/II ambigua. HLA-DR3 desempeña un papel destacado en la diabetes autoinmunitaria. Sin embargo, la presencia de DQ2 con DR3 disminuye la edad de aparición y la gravedad del trastorno autoinmunitario.

HLA-DQ8 (DQ8) es un serotipo de antígeno leucocitario humano dentro del grupo de serotipos HLA-DQ (DQ). DQ8 es un antígeno escindido del antígeno amplio DQ3. DQ8 se determina por el reconocimiento de anticuerpos de $\beta 8$ y este detecta generalmente el producto génico de DQB1*0302. DQ8 está relacionado comúnmente con enfermedades autoinmunitarias en la población humana. DQ8 es la segunda isoforma más predominante asociada a la enfermedad celíaca y DQ más asociado a la diabetes juvenil. DQ8 aumenta el riesgo de artritis reumatoide y está relacionada con el locus de riesgo primario para RA, HLA-DR4. DR4 desempeña también un papel importante en la diabetes juvenil. Aunque el haplotipo DQ8.1 está asociado a la enfermedad, no existe una asociación conocida de los haplotipos DQB1*0305, DQ8.4 o DQ8.5 con una enfermedad autoinmunitaria; sin embargo, esto puede ser el resultado de la falta de estudios en poblaciones que los portan y la frecuencia muy baja. En Europa, DQ8 se asocia a la diabetes juvenil y a la enfermedad celíaca. El mayor factor de riesgo para la diabetes tipo 1 es el fenotipo HLA DQ8/DQ2.5. En zonas de Escandinavia oriental, tanto DQ2.5 como DQ8 presentan fuerte aumento de frecuencias de la diabetes tipo I tardía y diabetes tipo I/II ambigua. DQ8 también se encuentra en muchos pueblos indígenas de Asia, se detectó temprano en la población beduina de Arabia donde DQ2.5 está con frecuencia ausente y en estos casos DQ8 es el único HLA asociado a la enfermedad celíaca.

La enfermedad de Crohn, también conocida como síndrome de Crohn y enteritis regional, es un tipo de enfermedad inflamatoria intestinal que puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano, provocando una amplia variedad de síntomas. Principalmente causa dolor abdominal, diarrea (que puede ser sanguinolenta si la inflamación está en su peor momento), vómitos (pueden ser continuos) o pérdida de peso, pero también puede causar complicaciones fuera del tracto gastrointestinal, tales como erupciones cutáneas, artritis, inflamación de los ojos, cansancio y falta de concentración. La enfermedad de Crohn es causada por interacciones entre factores ambientales, inmunológicos y bacterianos en individuos genéticamente sensibles. Esto da como resultado un trastorno inflamatorio crónico, en el que el sistema inmunitario del cuerpo ataca el tracto gastrointestinal posiblemente dirigido a antígenos microbianos. Existe una asociación genética con la enfermedad de Crohn, principalmente con variaciones del gen NOD2 y su proteína, que detecta las paredes de las células bacterianas. Los hermanos de los individuos afectados corren un mayor riesgo. Los hombres y las mujeres se ven igualmente afectados. Los fumadores tienen dos veces más probabilidades de desarrollar la enfermedad de Crohn que los no fumadores. La enfermedad de Crohn afecta entre 400.000 y 600.000 personas en Norteamérica. Las estimaciones de prevalencia para el norte de Europa han oscilado entre 27-48 por 100.000 habitantes. La enfermedad de Crohn tiende a presentarse inicialmente en los adolescentes y veinteañeros, con otro pico de incidencia de los cincuenta a setenta, aunque la enfermedad puede aparecer a cualquier edad. No existe una curación farmacéutica ni quirúrgica conocida para la enfermedad de Crohn. Las opciones de tratamiento se limitan a controlar los síntomas, mantener la remisión y evitar la recaída.

La colitis ulcerosa (UC) es una forma de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). La colitis ulcerosa es una forma de colitis, una enfermedad del colon (intestino grueso), que incluye úlceras características o llagas abiertas. El síntoma principal de la enfermedad activa es generalmente diarrea constante mezclada con sangre, de aparición gradual. La IBD se confunde con frecuencia con el síndrome del intestino irritable (IBS), una afección molesta, pero mucho menos grave. La colitis ulcerosa tiene similitudes con la enfermedad de Crohn, otra forma de IBD. La colitis ulcerosa es una enfermedad intermitente, con períodos de síntomas exacerbados y períodos que están relativamente libres de síntomas. Aunque los síntomas de la colitis ulcerosa pueden disminuir algunas veces por sí solos, la enfermedad requiere generalmente tratamiento para entrar en remisión. La colitis ulcerosa tiene una incidencia de 1 a 20 casos por 100.000 individuos por año y una prevalencia de 8 a 246 por 100.000 individuos por año. La enfermedad es más prevalente en los países del norte del mundo, así como en las áreas del norte de países individuales u otras regiones. Las tasas tienden a ser mayores en países más ricos, lo que puede indicar que el aumento de prevalencia se debe al aumento de las tasas de diagnóstico. Aunque la colitis ulcerosa no tiene una causa conocida, existe un presunto componente genético a la susceptibilidad. La enfermedad puede desencadenarse en una persona susceptible por factores ambientales. Aunque la modificación de la dieta puede reducir el malestar de una persona con la enfermedad, no se cree que la colitis ulcerosa sea causada por factores dietéticos. La colitis ulcerosa se trata como una enfermedad autoinmunitaria. El tratamiento consiste en fármacos antiinflamatorios, inmunosupresión y terapia biológica dirigida a componentes específicos de la respuesta inmunitaria. La colectomía (extirpación parcial o total del intestino grueso mediante cirugía) es ocasionalmente necesaria si la enfermedad es grave, no responde al

tratamiento o si se desarrollan complicaciones significativas. Una proctocolectomía total (extirpación de la totalidad del intestino grueso) puede ser curativa, pero puede estar asociada a complicaciones.

El síndrome metabólico es una combinación de trastornos médicos que, cuando ocurren juntos, aumentan el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes. Algunos estudios han demostrado que la prevalencia en EE. UU. se estima en un 25% de la población y la prevalencia aumenta con la edad. El síndrome metabólico se conoce también como síndrome metabólico X, síndrome cardiometabólico, síndrome X, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome de Reaven (denominado así por Gerald Reaven) y CHAOS (en Australia). Los mecanismos exactos de las complejas vías del síndrome metabólico aún no se conocen completamente. La fisiopatología es extremadamente compleja y ha sido solo parcialmente explicada. La mayoría de los pacientes son mayores, obesos, sedentarios y tienen un grado de resistencia a la insulina. El estrés también puede ser un factor contribuyente. Los factores más importantes son el peso, la genética, los trastornos endocrinos (tales como el síndrome de ovario poliquístico en mujeres en edad reproductiva), el envejecimiento y el estilo de vida sedentario (es decir, poca actividad física y exceso de ingesta calórica). Existe un debate sobre si la obesidad o la resistencia a la insulina son la causa del síndrome metabólico o si son consecuencias de un trastorno metabólico de mayor alcance. Con frecuencia aumentan varios marcadores de inflamación sistémica, incluida la proteína C reactiva, así como el fibrinógeno, la interleuquina 6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y otros. Algunos investigadores han señalado una variedad de causas, incluido el aumento de los niveles de ácido úrico causado por la fructosa en la dieta. La obesidad central es una característica clave del síndrome, lo que refleja el hecho de que la prevalencia del síndrome está impulsada por la fuerte relación entre la circunferencia de la cintura y el aumento de la adiposidad. Sin embargo, a pesar de la importancia de la obesidad, los pacientes que tienen un peso normal también pueden ser resistentes a la insulina y tener el síndrome. Se estima que el 75% de los pacientes británicos con diabetes tipo 2 o intolerancia a la glucosa (IGT) tienen síndrome metabólico. La presencia de síndrome metabólico en estas poblaciones se asocia con una mayor prevalencia de CVD que la encontrada en pacientes con diabetes tipo 2 o IGT sin el síndrome.

Se ha demostrado que la hipoadiponectinemia aumenta la resistencia a la insulina y se considera un factor de riesgo para desarrollar el síndrome metabólico. La prevalencia aproximada del síndrome metabólico en pacientes con enfermedad cardíaca coronaria (CHD) es del 50%, con una prevalencia del 37% en pacientes con enfermedad arterial coronaria prematura (45 años), especialmente en mujeres. Con una rehabilitación cardíaca adecuada y cambios en el estilo de vida (por ejemplo, nutrición, actividad física, reducción de peso y, en algunos casos, fármacos), se puede reducir la prevalencia del síndrome. Los trastornos lipodistróficos en general están asociados al síndrome metabólico. Tanto las formas genéticas (por ejemplo, lipodistrofia congénita de Berardinelli-Seip, lipodistrofia parcial familiar de Dunnigan) como las adquiridas (por ejemplo, lipodistrofia relacionada con el HIV en pacientes tratados con terapia antirretroviral altamente activa) de lipodistrofia pueden dar lugar a una resistencia grave a la insulina y a muchos de los componentes del síndrome metabólico.

Para muchas de estas enfermedades inflamatorias aún no existe cura. Sería beneficioso si en estas enfermedades inflamatorias se suprimiera la respuesta proinflamatoria para tratar o mejorar los síntomas de la enfermedad inflamatoria.

Se ha descubierto sorprendentemente que los péptidos seleccionados de un hidrolizado de caseína suprimen la respuesta proinflamatoria.

40 Descripción de la invención

La presente descripción está dirigida a una composición nutricional para uso de acuerdo con la reivindicación 1. Las características adicionales de la composición nutricional se dan en las reivindicaciones 2 a 6.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Figura esquemática del modelo TIM-1: A. compartimento del estómago; B. esfínter pilórico; C. compartimento del duodeno; D. válvula peristáltica; E. compartimento del yeyuno; F. válvula peristáltica; G. compartimento del íleon; H. esfínter ileocecal; I. secreción del estómago; J. secreción del duodeno; K. secreción del yeyuno/íleon; L. prefiltro; M. membrana semipermeable; N. absorción de agua; P. electrodos de pH; Q. sensores de nivel; R. sensor de temperatura; S. sensor de presión.

Figura 2. Comparación de los perfiles de péptidos después de la digestión simulada del estómago de un lactante observada para un hidrolizado de caseína de la presente descripción por LC-MS (m/z 230-2000). Los perfiles de péptidos se representan antes de la digestión, después de la digestión (TIM) y después de digestión y de diálisis.

Figura 3. Efecto de una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína de la presente descripción sobre el nivel del género *Bacteroides* en la comunidad microbiana del experimento de fermentación fecal a T = 18 después de la exposición a una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína digerida de la presente descripción (por tanto > 500 Da) añadida a concentración baja (9,5 mg/mL) o alta (19 mg/mL) y determinado por pirosecuenciación 454. El eje y representa el valor del logaritmo decimal del número de secuencias, que se correlaciona directamente con la abundancia.

- 5 Figura 4. Abundancia de filotipos de *Bacteroides* en la comunidad microbiana del experimento de fermentación fecal a T = 18 después de exposición a una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína digerida de la presente descripción (por tanto > 500 Da) añadida a baja concentración y determinada por pirosecuenciación 454. Se muestran los cuatro principales filotipos similares a especies de *Bacteroides* (en OTU). El eje y representa el valor del logaritmo decimal del número de secuencias, que se correlaciona directamente con la abundancia.
- 10 Figura 5. Efecto de un hidrolizado de caseína de la presente descripción (APZ-1) sobre el nivel del género *Bacteroides* en la comunidad microbiana del experimento de fermentación fecal a T = 18 después de exposición a hidrolizado de caseína no digerida o digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción añadido a baja concentración y determinado por pirosecuenciación 454. El eje y representa el valor del logaritmo decimal del número de secuencias que se correlacionan con la abundancia. El hidrolizado de caseína inhibió la abundancia de *Bacteroides*, lo que indicaba que el efecto del producto acabado estaba parcialmente mediado por la fracción hidrolizado/péptido presente en el producto. Se incluye como referencia una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína de la presente descripción (digerida, a baja concentración).
- 15 Figura 6. Abundancia de filotipos de *Bacteroides* en la comunidad microbiana del experimento de fermentación fecal a T = 18 después de exposición al hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción (APZ-1) añadido a alta concentración (19 mg/mL) y determinada por pirosecuenciación 454. El eje y representa el valor del logaritmo decimal del número de secuencias, que se correlaciona directamente con la abundancia.
- 20 Figura 7. Abundancia de filotipos de *Bacteroides* en la comunidad microbiana del experimento de fermentación fecal a T = 18 después de exposición al hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción (APZ-1) añadido a baja concentración (9,5 mg/mL) y determinado por pirosecuenciación 454. El eje y representa el valor del logaritmo decimal del número de secuencias, que se correlaciona directamente con la abundancia.
- 25 Figura 8. Concentración (microgramos/mL) de ácido glutámico a T = 0 y T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con la composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) del producto acabado de la presente descripción a baja concentración. Condiciones de control con tampón MES.
- 30 Figura 9. Concentración (microgramos/mL) de ácido glutámico a T = 0 y T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con un hidrolizado de caseína no digerida de la presente descripción (APZ-1) añadido a baja concentración. Condiciones de control con tampón MES.
- 35 Figura 10. Concentración (microgramos/mL) de ácido alfa-amino-n-butírico a T = 0 y T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con *Alimentum Similac* digerido (por tanto > 500 Da) y una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína de los productos de la presente descripción añadidos a baja concentración. Condiciones de control con tampón MES.
- 40 Figura 11. Concentración (microgramos/mL) de ácido alfa-amino-n-butírico a T = 0 y T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con un hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción (APZ-1) añadido a baja concentración. Condiciones de control con tampón MES.
- 45 Figura 12. Concentración (microgramos/mL) de prolina a T = 0 y T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción añadida a baja concentración. Condiciones de control con tampón MES.
- 50 Figura 13. Concentración (microgramos/mL) de prolina a T = 0 y T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con un hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción (APZ-1) añadido a baja concentración. Condiciones de control con tampón MES.
- 55 Figura 14. Concentraciones (microgramos/mL) de ácido butírico a T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con *Alimentum Similac* digerido (por tanto > 500 Da) y una fórmula que contiene hidrolizado de caseína de la presente descripción añadida a concentraciones baja (9,5 mg/mL) y alta (19 mg/mL). Condiciones de control con tampón MES.
- 60 Figura 15. Concentraciones (microgramos/mL) de ácido butírico a T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con un hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción (APZ-1) añadido a una concentración baja (9,5 mg/mL) y alta (19 mg/mL). Condiciones de control con tampón MES.
- 65 La Fig. 16 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria IL12p70 por células dendríticas humanas primarias activadas expuestas a caseína ampliamente hidrolizada.
- 70 La Fig. 17 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria IL12p70 por células dendríticas humanas primarias activadas expuestas a una fracción mayor que 500 Da de caseína ampliamente hidrolizada.
- 75 La Fig. 18 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interferón-gamma por células dendríticas humanas activadas expuestas a caseína ampliamente hidrolizada.

- La Fig. 19 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interferón-gamma por células dendríticas humanas primarias activadas expuestas a una fracción mayor que 500 Da de caseína ampliamente hidrolizada.
- La Fig. 20 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-8 por células dendríticas humanas activadas expuestas a caseína ampliamente hidrolizada.
- 5 La Fig. 21 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-8 por células dendríticas humanas primarias activadas expuestas a una fracción mayor que 500 Da de caseína ampliamente hidrolizada.
- La Fig. 22 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral alfa por células dendríticas humanas activadas expuestas a caseína ampliamente hidrolizada.
- 10 La Fig. 23 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral alfa por células dendríticas humanas primarias activadas expuestas a una fracción mayor que 500 Da de caseína ampliamente hidrolizada.
- La Fig. 24 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-6 por células dendríticas humanas activadas expuestas a caseína ampliamente hidrolizada.
- La Fig. 25 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-6 por células dendríticas humanas primarias activadas expuestas a una fracción mayor que 500 Da de caseína ampliamente hidrolizada.
- 15 La Fig. 26 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-1 β por células dendríticas humanas activadas expuestas a caseína ampliamente hidrolizada.
- La Fig. 27 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-1 β por células dendríticas humanas activadas expuestas a una fracción mayor que 500 Da de caseína ampliamente hidrolizada.
- 20 La Fig. 28 muestra la secreción de factor de necrosis tumoral alfa por macrófagos humanos primarios activados cuando se exponen a caseína ampliamente hidrolizada.
- La Fig. 29 ilustra la secreción de factor de necrosis tumoral alfa por macrófagos humanos primarios activados cuando se exponen a una fracción mayor que 500 Da de caseína ampliamente hidrolizada.
- La Fig. 30 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 ampliamente hidrolizada.
- 25 La Fig. 31 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 ampliamente hidrolizada.
- La Fig. 32 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 ampliamente hidrolizada.
- 30 La Fig. 33 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 ampliamente hidrolizada.
- La Fig. 34 ilustra la secreción de IFN-gamma por linfocitos T de ganglios linfáticos drenantes del intestino de ratones NOD, ratones BALB/c y ratones NOD alimentados con una dieta de caseína ampliamente hidrolizada.
- La Fig. 35 ilustra la secreción de interleuquina-4 por linfocitos T de ganglios linfáticos drenantes del intestino de ratones NOD, ratones BALB/c y ratones NOD alimentados con una dieta de caseína ampliamente hidrolizada.
- 35 La Fig. 36 ilustra la secreción de interleuquina-17 por linfocitos T de ganglios linfáticos drenantes del intestino de ratones NOD, ratones BALB/c y ratones NOD alimentados con una dieta de caseína ampliamente hidrolizada.
- La Fig. 37 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-12p40 por macrófagos de ratón expuestos a caseína ampliamente hidrolizada, caseína ampliamente hidrolizada filtrada no estéril y una fracción mayor que 500 Da de caseína ampliamente hidrolizada.
- 40 La Fig. 38 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-1 β por macrófagos de ratón expuestos a caseína ampliamente hidrolizada, caseína ampliamente hidrolizada filtrada no estéril y una fracción mayor que 500 Da de caseína ampliamente hidrolizada.
- La Fig. 39 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-6 por macrófagos de ratón expuestos a caseína ampliamente hidrolizada, caseína ampliamente hidrolizada filtrada no estéril y una fracción mayor que 500 Da de caseína ampliamente hidrolizada.
- 45 La Fig. 40 ilustra la secreción de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral alfa por macrófagos de ratón expuestos a caseína ampliamente hidrolizada, caseína ampliamente hidrolizada filtrada no estéril y una fracción mayor que 500 Da de caseína ampliamente hidrolizada.

La Fig. 41 ilustra la secreción de las citoquinas proinflamatorias interleuquina-12p40, interleuquina-1 β , interleuquina-6 y factor de necrosis tumoral alfa por macrófagos de ratón expuestos a caseína ampliamente hidrolizada, caseína ampliamente hidrolizada filtrada no estéril y una fracción mayor que 500 Da de caseína ampliamente hidrolizada.

Mejor modo de realización de la invención

5 El término "composición nutricional" como se usa en la presente memoria describe una formulación sólida o líquida que por tanto puede ser comida o bebida por un sujeto humano para su nutrición. La composición nutricional de la descripción tiene preferiblemente un valor nutricional de al menos 1, más preferiblemente al menos 10 e incluso más preferiblemente 50 kcal (kilocalorías)/100 mL para formulaciones líquidas y preferiblemente al menos 1, más preferiblemente al menos 10, incluso más preferiblemente al menos 50, tal como al menos 100, y lo más preferiblemente al menos 300 kcal/100 g para formulaciones de alimentos secos. En la realización de la descripción, la formulación nutricional de la descripción tiene un valor nutricional de al menos 50-200 kcal/100 mL para formulaciones líquidas y al menos 300-600 kcal/100 g para formulaciones de alimentos secos. Una composición nutricional se distingue de una vacuna. A diferencia de una vacuna, una composición nutricional no comprende adyuvantes (salvo como contaminantes), compuestos virales activados o inactivados (salvo como contaminantes), compuestos bacterianos activados o inactivados (salvo como contaminantes) y compuestos patógenos (salvo como contaminantes). El término "suplemento" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un suplemento nutricional que es una fuente concentrada de nutriente o alternativamente a otras sustancias con un efecto nutricional o fisiológico cuya finalidad es complementar la dieta normal.

20 Además de los ingredientes citados anteriormente, se pueden seleccionar otros ingredientes entre lípidos, minerales, carbohidratos, aminoácidos, quelatos de aminoácidos, nutrientes anabólicos, vitaminas, antioxidantes, cepas bacterianas probióticas y agentes lipotrópicos con el fin de proporcionar una energía prolongada óptima y una formulación nutricional anabólica. La composición nutricional puede ser un complemento nutricional o puede proporcionar una nutrición completa. Preferiblemente, la composición nutricional está en forma de concentrado de alimento seco. La composición nutricional de la descripción proporciona a un sujeto humano una mayor preferencia de al menos 5%, al menos 10%, al menos 25%, al menos 50%, al menos 75% o al menos 90% del requerimiento diario de calorías de un sujeto humano. El experto en la técnica es consciente de que el requerimiento diario de calorías depende del género, la altura y la edad de un sujeto humano. Por ejemplo, un hombre de 30 años de 80 kg de peso y 180 cm de altura tiene un requerimiento diario de calorías de alrededor de 2900 cal (calorías) para mantener su peso, mientras que una mujer de 30 años de 55 kg de peso y 165 cm de altura tiene un requerimiento diario de calorías de alrededor de 2100 cal para mantener su peso. En la realización, la formulación nutricional de la presente descripción es un lactante o un producto nutricional para lactantes o jóvenes.

35 El término "péptido", como se usa en la presente memoria, describe cadenas moleculares lineales de aminoácidos, incluidas moléculas monocatenarias o sus fragmentos. Un péptido de acuerdo con la descripción contiene con mayor preferencia aproximadamente de 2 a 100 aminoácidos, aproximadamente de 5 a 50 aminoácidos o aproximadamente de 5 a 40 aminoácidos. Los péptidos pueden formar además oligómeros que constan de al menos dos moléculas idénticas o diferentes. Las correspondientes estructuras de orden superior de dichos multímeros se denominan, correspondientemente, homo- o hetero-dímeros, homo- o hetero-trímeros, etc. Además, los peptidomiméticos de dichos péptidos en los que el o los aminoácidos y/o el o los enlaces peptídicos han sido reemplazados por análogos funcionales son también abarcados por el término "péptido". Dichos análogos funcionales incluyen todos los aminoácidos conocidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes, tal como la selenocisteína. El término "péptido" también se refiere a péptidos modificados de forma natural en los que la modificación se efectúa, por ejemplo por glicosilación, acetilación, fosforilación y modificaciones similares que son bien conocidas en la técnica. Un péptido debe distinguirse de una proteína en la presente descripción. Una proteína de acuerdo con la presente descripción describe un compuesto orgánico constituido por aminoácidos dispuestos en una cadena lineal y plegados en forma globular. Además, una proteína de acuerdo con la presente descripción describe una cadena de aminoácidos de más de 100 aminoácidos. Los péptidos se pueden producir, por ejemplo, de forma recombinante, (semi)sintética u obtenerse de fuentes naturales, tales como después de hidrólisis de proteínas, todo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

50 El término "hidrolizado de caseína" como se usa en la presente memoria define una fórmula que comprende péptidos derivados de las proteínas caseínas hidrolizadas de leche de vaca. A este respecto, una proteína hidrolizada es una proteína que se ha roto en los componentes péptidos y/o aminoácidos. Aunque existen muchos medios para lograr la hidrólisis de proteínas, dos de los medios más comunes son la ebullición prolongada en un ácido fuerte o una base fuerte o el uso de una enzima, tal como la enzima proteasa pancreática, para estimular el proceso hidrolítico existente de forma natural. La hidrólisis de proteínas derivadas de la leche se consigue preferiblemente utilizando una enzima o una mezcla de enzimas. Un hidrolizado de caseína de leche de vaca puede comprender péptidos derivados de la leche, en los que las proteínas de dicha leche se han hidrolizado en diversos grados. Por consiguiente, se puede distinguir entre un hidrolizado que contiene péptido de leche de vaca parcialmente hidrolizado y un hidrolizado que contiene péptido de leche de vaca ampliamente hidrolizado. A este respecto, un hidrolizado que contiene péptido de leche de vaca parcialmente hidrolizado comprende más del 20% de proteína de leche de vaca intacta, mientras que un hidrolizado que contiene péptido de leche de vaca ampliamente hidrolizado comprende menos del 1% de péptidos que tienen un tamaño superior a 1,5 kD. Además, un hidrolizado que contiene péptido de leche de vaca ampliamente hidrolizado es preferiblemente hipoalergénico.

- En la presente memoria se describe un ejemplo no limitativo de un método de hidrólisis. Este método se puede usar 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 comercialmente en Amano Enzyme U.S.A. Co., Ltd., Elgin, Ill. La proteasa N es una preparación de enzimas proteolíticas que procede de la especie bacteriana *Bacillus subtilis*. Se especifica que la proteasa en polvo "no tiene menos de 150.000 unidades/g", lo que 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 fórmula infantil de la presente invención, la proteasa N se puede usar a niveles de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1,0% en peso de la proteína total que se hidroliza.
- La hidrólisis de proteínas por la proteasa N se realiza típicamente a una temperatura de aproximadamente de 50°C a aproximadamente 60°C. La hidrólisis se produce durante un período de tiempo de modo que se obtenga un grado de hidrólisis entre aproximadamente 4% y 10%. La hidrólisis se produce durante un período de tiempo de modo que se obtenga un grado de hidrólisis entre aproximadamente 6% y 9%. Alternativamente, la hidrólisis se produce durante un período de tiempo de modo que se obtenga un grado de hidrólisis de aproximadamente 7,5%. Este nivel de hidrólisis puede llevar entre aproximadamente media hora y aproximadamente 3 horas.
- Durante la hidrólisis se debe mantener un pH constante. El pH se ajusta y se mantiene entre aproximadamente 6,5 y 8. En particular, el pH se mantiene en aproximadamente 7,0.
- Con el fin de mantener el pH óptimo de la solución de proteína de suero, caseína, agua y proteasa N, para ajustar el pH durante la hidrólisis se puede usar una solución cáustica de hidróxido de sodio y/o hidróxido de potasio. Si se usa hidróxido de sodio para ajustar el pH, la cantidad de hidróxido de sodio añadida a la solución se debe controlar hasta el nivel que comprenda menos de aproximadamente 0,3% del sólido total en el hidrolizado de proteína acabado. También se puede usar una solución de hidróxido de potasio al 10% para ajustar el pH de la solución al valor deseado, ya sea antes de la adición de la enzima o durante el proceso de hidrólisis, con el fin de mantener el pH óptimo.
- La cantidad de solución cáustica añadida a la solución durante la hidrólisis de proteínas se puede controlar por un pH-stat o añadiendo la solución cáustica de forma continua y proporcional. El hidrolizado se puede fabricar por procesos discontinuos o por procesos continuos estándares.
- Para asegurar mejor la calidad constante del hidrolizado parcial de proteínas, el hidrolizado se somete a desactivación enzimática para finalizar el proceso de hidrólisis. La etapa de desactivación enzimática puede consistir en un tratamiento térmico a una temperatura de aproximadamente 82°C durante aproximadamente 10 minutos. Alternativamente, la enzima se puede desactivar calentando la solución a una temperatura de aproximadamente 92°C durante aproximadamente 5 segundos. Una vez completada la desactivación enzimática, el hidrolizado se puede conservar en estado líquido a una temperatura inferior a 10°C.
- Un método para producir un hidrolizado parcial de proteínas incluye el siguiente procedimiento. Inicialmente, se entremezclaron 60,3 kg de sólidos no lácteos (leche en polvo) y 37,4 kg de concentrado de proteínas de suero (60%) en un depósito que contenía agua a 54°C. La suspensión tenía un contenido total de sólidos entre 20% y 23%. A continuación se midió el pH de la suspensión. Se añadieron a la suspensión hidróxido de sodio y potasio para ajustar el pH de la suspensión a 7,0. Después de ajustar el pH, se añadieron a la suspensión 0,5 kg de la enzima N Amano. Después de la adición de N Amano a la suspensión, el pH se ajustó continuamente hasta 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 0,3 kg. La cantidad total de hidróxido de potasio añadida a la suspensión fue 1,5 kg.
- Se dejó que se produjera la hidrólisis durante 90 minutos, comenzando a contar el tiempo en el momento de la adición a la suspensión de la enzima N Amano. Al final de los 90 minutos, la suspensión se trató térmicamente para inactivar la enzima. El tratamiento térmico consistió en elevar la temperatura de la suspensión hasta 82°C durante 10 minutos. El grado de hidrólisis obtenido en este ejemplo fue entre 6% y 9%. Después, la suspensión se enfrió y secó por pulverización para obtener un hidrolizado en polvo.
- Se incluye un método no limitativo para determinar la distribución de pesos moleculares de los péptidos hidrolizados. Se aplicó cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) para determinar la distribución de pesos moleculares de los péptidos hidrolizados creados por el proceso de hidrólisis descrito actualmente. Específicamente, se pesó una cantidad suficiente de la fórmula infantil en polvo para proporcionar 0,5 gramos de proteína en un tubo de centrifuga cónico de 50 mL. Se añadió agua para llevar el tubo hasta un volumen de 45 mL. La mezcla se colocó en un mezclador Sarstedt D-5223 y se mezcló durante una hora. Después del mezclamiento, se preparó una solución de proteína al 1% añadiendo al tubo otros 5 mL de agua. Igualmente se preparó un patrón madre y se mezcló durante una hora. Por separado, se añadieron 14,91 gramos de cloruro de potasio (KCl) a un vaso de 1000 mL. El KCl se disolvió añadiendo al vaso 700 mL de agua. A continuación, se añadieron 250 mL de acetonitrilo y 1,0 mL de ácido trifluoroacético a la solución de KCl (eluyente). El pH se ajustó a 3,0 usando una solución de K_2HPO_4 0,2 M. Se llenó una botella de reactivo para HPCL y la botella se lavó con eluyente, reservando aproximadamente 50 mL para la dilución de muestras y patrones. Las tuberías de la bomba Hitachi L-6200 A Intelligent se purgaron con eluyente y las columnas se equilibraron con eluyente durante una hora. Después se mezclaron las muestras durante una hora,

5 se pipetearon 5,0 mL de cada muestra en tubos de vidrio con tapón de rosca. También se pipetearon en cada tubo 5,0 mL de diclorometano. Los tubos se taparon y se mezclaron por inversión cuatro veces. A continuación, las muestras se centrifugaron durante cinco minutos a 200xg. Mientras las muestras estaban en la centrifuga, se diluyeron los patrones madre 1-5 con eluyente (800 µL + 3200 µL). Aproximadamente 1 mL de cada patrón se pipeteó en cada uno de los dos viales del muestreador automático y se tapó. Se diluyó la capa superior (acuosa) de las muestras centrifugadas 1-10 con eluyente (100 µL + 900 µL). Los viales se cargaron en la bandeja del muestreador automático como sigue: blanco, patrón, muestras y segundo patrón. La bandeja se colocó en el muestreador automático de Hitachi. En el programa del automuestreador se introdujo el número total de viales que se han de analizar utilizando las teclas en la parte frontal del muestreador automático y se analizaron las muestras. 10 Los resultados indicaron el perfil de los pesos moleculares de la proteína.

El término "péptido derivado de leche de vaca" como se usa en la presente memoria define un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es una secuencia de aminoácidos parcial de una proteína de leche de vaca. Dichos péptidos se pueden obtener como se ha descrito anteriormente por hidrólisis o se pueden sintetizar *in vitro* por métodos conocidos por los expertos y descritos en los ejemplos de la descripción.

15 El término "fracción del hidrolizado que contiene péptidos" se refiere a una mezcla de péptidos que comprende al menos 2, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10 y lo más preferiblemente al menos 20 que se han aislado del hidrolizado de la descripción por técnicas de filtración que son conocidas por los expertos. Además, las técnicas para el aislamiento de péptidos del hidrolizado de la descripción se describen a continuación en la presente memoria.

20 El término "niño" o el término "juvenil" se usan en la presente memoria de acuerdo con las definiciones proporcionadas en la técnica. Así, el término "niño" significa un sujeto humano entre las etapas del nacimiento y la edad de aproximadamente 10 años y el término "juvenil" significa un sujeto humano entre la edad de aproximadamente 10 años y la pubertad (antes de la madurez sexual).

25 El término "adulto" se usa en la presente memoria de acuerdo con las definiciones proporcionadas en la técnica. Por lo tanto, este término significa un sujeto humano después de la pubertad (después de la madurez sexual).

30 El término "alergia a la leche de vaca" describe una alergia alimentaria en un sujeto humano, es decir, una reacción adversa inmunitaria a una o más de las proteínas contenidas en la leche de vaca. Los síntomas principales son síntomas gastrointestinales, dermatológicos y respiratorios. Estos pueden traducirse en erupciones cutáneas, urticaria, vómitos, diarrea, estreñimiento y angustia. El espectro clínico se extiende a diversos trastornos: reacciones anafilácticas, dermatitis atópica, sibilancias, cólicos infantiles, enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD), esofagitis, colitis, gastroenteritis, cefalea/migraña y estreñimiento.

En la realización de la descripción, la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo 1, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y síndrome metabólico.

35 Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que un hidrolizado de caseína tiene un efecto beneficioso sobre la supresión de la respuesta proinflamatoria. También encontraron que especialmente un hidrolizado que contiene péptidos de leche de vaca ampliamente hidrolizados tuvo efectos positivos sobre los factores de riesgo de enfermedad inflamatoria y especialmente diabetes tipo 1. Los hidrolizados adecuados son los hidrolizados de caseína. Además, encontraron que la diálisis del hidrolizado con un límite de 500 Da hace que una fracción de hidrolizado tenga incluso mejor efecto sobre la supresión de la respuesta proinflamatoria. Por 40 consiguiente, en las realizaciones, el hidrolizado consiste en péptidos con un peso molecular mayor que 500 Da.

Se han identificado los siguientes péptidos en el hidrolizado y pueden tener un efecto beneficioso sobre una respuesta inflamatoria:

Tabla 1: Péptidos identificados en el hidrolizado:

SEQ ID NO: 1*	IPNPIG
SEQ ID NO: 2	IGSESTEDQ
SEQ ID NO 3:	DKTEIPT
SEQ ID NO: 4	IVPN
SEQ ID NO: 5	LEDSPE
SEQ ID NO: 6	NQEQPI

ES 2 821 750 T3

SEQ ID NO: 7	NVPGE
SEQ ID NO: 8	PFFGPI
SEQ ID NO: 9	TEDEL
SEQ ID NO: 10	VPSE
SEQ ID NO: 11	YFFPGP
SEQ ID NO: 12	YPSGA
SEC ID NO 13	FPGPIP
SEQ ID NO: 14	MHQPHQPLPPT
SEQ ID NO: 15	YFFPGPIP
SEQ ID NO: 16	DMEST
SEQ ID NO: 17	FPGPIP
SEQ ID NO: 18	IPNPI
SEQ ID NO: 19	MESTEV
SEQ ID NO: 20	PGPIP
SEQ ID NO: 21	PHQPLPPT
SEQ ID NO: 22	PNPI
SEQ ID NO: 23	SKDIGSE
SEQ ID NO: 24	YFFPGPIP
SEQ ID NO: 25	AINPSKEN
SEQ ID NO: 26	APFPE
SEQ ID NO: 27	DIGSES
SEQ ID NO: 28	DMPI
SEQ ID NO: 29	DVPS
SEQ ID NO: 30	EDI
SEQ ID NO: 31	ELF
SEQ ID NO: 32	EMP
SEQ ID NO: 33	ETAPVPL
SEQ ID NO: 34	GPFP

ES 2 821 750 T3

SEQ ID NO: 35	GPIV
SEQ ID NO: 36	IGSSSEES
SEQ ID NO: 37	IGSSSEESA
SEQ ID NO: 38	INPSKE
SEQ ID NO: 39	IPPLTQTPV
SEQ ID NO: 40	ITAP
SEQ ID NO: 41	KHQGLPQ
SEQ ID NO: 42	LDVTP
SEQ ID NO: 43	LPLPL
SEQ ID NO: 44	NAVPI
SEQ ID NO: 45	NEVEA
SEQ ID NO: 46	NLL
SEQ ID NO: 47	PITPT
SEQ ID NO: 48	PNSLPQ
SEQ ID NO: 49	PQLEIVPN
SEQ ID NO: 50	PQNIPPL
SEQ ID NO: 51	PVLGPV
SEQ ID NO: 52	PVPQ
SEQ ID NO: 53	PVVVP
SEQ ID NO: 54	PVVVPP
SEQ ID NO: 55	SIGSSSEESAE
SEQ ID NO: 56	SISSEE
SEQ ID NO: 57	SISSEEIVPN
SEQ ID NO: 58	SPPEIN
SEQ ID NO: 59	SPPEINT
SEQ ID NO: 60	TDAPSFS
SEQ ID NO: 61	VATEEV
SEQ ID NO: 62	VLPVP

SEQ ID NO: 63	VPGE
SEQ ID NO: 64	VPGEIV
SEQ ID NO: 65	VPITPT
SEQ ID NO: 66	VVPPFLQPE
SEQ ID NO: 67	VVPP
SEQ ID NO: 68	YPVEP

5 En la realización de la presente descripción, el hidrolizado comprende un péptido con SEQ ID NO: 1 y al menos dos péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2-68, preferiblemente al menos 3 péptidos, preferiblemente al menos 4 péptidos, preferiblemente al menos 5 péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2-68.

La composición nutricional comprende un oligosacárido.

La composición nutricional comprende péptidos seleccionados de un hidrolizado de caseína.

La descripción se ilustra ahora por los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos:

10 Ejemplo 1: Puesta a punto del modelo de digestión.

Todas las formulaciones (fórmulas acabadas e hidrolizados) se investigaron en el sistema TIM-1 (TNO, Zeist, Países Bajos) simulando las condiciones medias en el estómago e intestino delgado de niños pequeños (0-0,5 años). Estas condiciones incluyeron especialmente la dinámica del vaciamiento gástrico, los valores del pH gástrico e intestinal y las composiciones y actividades de los fluidos de secreción oral, gástrica e intestinal, tales como electrolitos, enzimas digestivas y bilis. Los materiales digeridos y dializados (para eliminar mono- y di-sacáridos) de los productos acabados, así como los materiales no digeridos, digeridos y dializados de los hidrolizados, se utilizaron en experimentos de fermentación fecal infantil para estudiar los posibles efectos sobre la digestión de proteínas/péptidos por la comunidad microbiana del colon y estudiar los efectos de estos componentes sobre la composición y metabolismo de la microbiota intestinal. De las fermentaciones fecales, se tomaron muestras en diferentes momentos y se sometieron a diferentes tipos de análisis.

La figura 1 muestra el equipo. Muestra una figura esquemática del modelo TIM-1: A. compartimento del estómago; B. esfínter pilórico; C compartimento del duodeno; D válvula peristáltica; E. compartimento del yeyuno; F. válvula peristáltica; G. compartimento de íleon; H. esfínter ileocecal; I. secreción del estómago; J. secreción del duodeno; K. secreción del yeyuno/íleon; L. prefiltro; M. membrana semipermeable; N. absorción de agua; P. electrodos de pH; Q. sensores de nivel; R sensor de temperatura; S. sensor de presión. Perfiles de péptidos después de la digestión del estómago:

La Figura 2 muestra una comparación de los perfiles de péptidos después de la digestión simulada del estómago de un lactante observada para el hidrolizado de caseína de la presente descripción por LC-MS (m/z 230-2000). Los perfiles de péptidos se representan antes de la digestión, después de la digestión (TIM) y después de la digestión y de la diálisis. Las figuras muestran que el perfil de péptidos del hidrolizado apenas cambió durante la digestión simulada del estómago.

Composición y metabolismo de la microbiota

Los siguientes hallazgos se generaron con productos o hidrolizados acabados después de diálisis, generando así un producto con péptidos que tenía un peso molecular mayor que 500 Da.

35 Los siguientes hallazgos se generaron con productos o hidrolizados acabados después de diálisis, generando así un producto con péptidos que tenían un peso molecular mayor que 500 Da. La Figura 3 muestra el efecto de una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína de la presente descripción sobre el nivel del género *Bacteroides* en la comunidad microbiana del experimento de fermentación fecal a T = 18 después de exposición a una composición nutricional que contenía hidrolizado de caseína digerida de la presente descripción (por tanto > 500 Da) añadida a baja o alta concentración y determinado por pirosecuenciación 454. El eje y representa el valor del logaritmo decimal del número de secuencias, que se correlaciona directamente con la abundancia. Una composición nutricional que contenía hidrolizado de caseína de la presente descripción inhibió claramente la abundancia de

Bacteroides, que pudo haber sido mediada tanto por carbohidratos como por péptidos presentes en el producto. La Figura 4 muestra la abundancia de filotipos de *Bacteroides* en la comunidad microbiana del experimento de fermentación fecal a T = 18 después de exposición a una composición nutricional que contenía hidrolizado de caseína digerida de la presente descripción (por tanto > 500 Da) añadida a baja concentración y determinada por pirosecuenciación 454. Se muestran los cuatro filotipos principales similares de la especie de *Bacteroides* (en OTU). El eje y representa el valor del logaritmo decimal del número de secuencias, que se correlaciona directamente con la abundancia. La composición nutricional que contenía hidrolizado de caseína inhibió claramente la abundancia de *Bacteroides*, que pudo haber sido mediada tanto por carbohidratos como por péptidos presentes en el producto. La Figura 5 muestra el efecto de un hidrolizado de caseína de la presente descripción (APZ-1) sobre el nivel del género *Bacteroides* en la comunidad microbiana del experimento de fermentación fecal a T = 18 después de exposición a hidrolizado de caseína no digerida o digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción añadido a baja concentración y determinado por pirosecuenciación 454. El eje y representa el valor del logaritmo decimal del número de secuencias que se correlacionan con la abundancia. Un hidrolizado de caseína de la presente descripción inhibió la abundancia de *Bacteroides*, lo que indicaba que el efecto del producto acabado estaba parcialmente mediado por la fracción de hidrolizado/péptido presente en el producto. Se incluye como referencia una composición nutricional que contenía hidrolizado de caseína de la presente descripción (digerida, a baja concentración). Las figuras 6 y 7 muestran la abundancia de filotipos de *Bacteroides* en la comunidad microbiana del experimento de fermentación fecal a T = 18 después de exposición a un hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción (APZ-1) añadido a concentración alta (figura 6) (19 mg/mL) o baja (figura 7) (9,5 mg/mL) y determinada por pirosecuenciación 454. El eje y representa el valor del logaritmo decimal del número de secuencias, que se correlaciona directamente con la abundancia. Un hidrolizado de caseína de la presente descripción inhibió claramente la abundancia de *Bacteroides*, lo que indicaba que el efecto del producto acabado estaba parcialmente mediado por la fracción de hidrolizado/péptido presente en el producto. Curiosamente, el hidrolizado afecta principalmente a 013 y 458 OTU, relacionadas con *B. stercoris/uniformis*, mientras que se observó poco o ningún efecto sobre las 006 (grupo *B. thetaiotaomicron*) y 0220 (grupo *B. fragilis*) OTU. En la bibliografía (Giongo et al, 2010), se ha observado mayor abundancia de *B. uniformis* en la microbiota de niños que desarrollan T1D y *B. fragilis* en niños de control, lo que implica que los efectos del hidrolizado sobre estos grupos pueden ser beneficiosos contra el desarrollo de la T1D.

En el modelo *in vitro* de fermentación de la muestra fecal infantil no hubo un efecto evidente de la composición nutricional que contenía hidrolizado de caseína de la presente descripción o del hidrolizado de caseína de la presente descripción sobre la composición de *Bifidobacterias*. La abundancia de especie *Bacteroides* se vio gravemente afectada después de la exposición de la comunidad fecal a diversos productos comerciales, incluida una composición nutricional que contenía hidrolizado de caseína de la presente descripción, y esto también podía implicar la fermentación de carbohidratos. La exposición del ecosistema fecal a los hidrolizados afectó al grupo *Bacteroides*, como se determinó por qPCR. Se produjo un efecto inhibitor del crecimiento significativo de un hidrolizado de caseína de la presente descripción sobre el grupo *Bacteroides stercoris/uniformis*. Hubo poco o ningún efecto sobre el grupo *B. thetaiotamicron* o *B. fragilis*. Obsérvese que ciertas especies de *Bacteroides*, *ovatus*, *fragilis*, *vulgates*, *uniformis* se pueden haber asociado con enfermedades inflamatorias crónicas o autoinmunitarias. En este sentido, la reducción de especies *Bacteroides* podría implicar un beneficio potencial para la salud.

40 Aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta

La Figura 8 muestra la concentración de ácido glutámico a T = 0 y T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción a baja concentración. Condiciones de control con tampón MES. La concentración de glutamato (microgramos/mL) añadida al producto acabado disminuyó durante la fermentación. Esto podría indicar un efecto beneficioso puesto que los niveles elevados de glutamato en plasma están asociados con el inicio de la T1D (Oresic et al., 2008).

La Figura 9 muestra la concentración de ácido glutámico a T = 0 y T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con un hidrolizado de caseína no digerida de la presente descripción (APZ-1) añadido a baja concentración. Condiciones de control con tampón MES. La concentración (microgramos/mL) de glutamato añadido con el hidrolizado disminuyó ligeramente durante la fermentación, lo que indicaba que los efectos de una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína de la presente descripción sobre los niveles de glutamato podrían estar parcialmente mediados por la fracción de hidrolizado/péptido presente en el producto.

La producción de glutamato disminuyó después de la fermentación de una composición nutricional que contenía hidrolizado de caseína de la presente descripción, una composición nutricional que contenía hidrolizado de caseína y aminoácidos de la presente descripción y Similac, acompañada por un aumento de prolina y treonina en comparación con otros productos.

La Figura 10 muestra la concentración de ácido alfa-amino-n-butírico (microgramos/mL) a T = 0 y T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con producto Alimentum Similac digerido (por tanto > 500 Da) y composiciones nutricionales que contenían hidrolizado de caseína de la presente descripción añadidas a baja concentración. Condiciones de control con tampón MES. Las composiciones nutricionales que contenían hidrolizado de caseína de

la presente descripción estimularon la producción de ácido alfa-amino-n-butírico durante la fermentación en un grado mucho mayor que Similac.

5 La Figura 11 muestra la concentración de ácido alfa-amino-n-butírico (microgramos/mL) a T = 0 y T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción (APZ-1) añadido a baja concentración. Condiciones de control con tampón MES. Estos resultados indican claramente que la fracción de hidrolizado/péptido contribuye a los efectos de las composiciones nutricionales que contienen hidrolizado de caseína.

10 La Figura 12 muestra la concentración de prolina (microgramos/mL) a T = 0 y T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción añadida a baja concentración. Condiciones de control con tampón MES. La composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína de la presente descripción estimuló la producción de prolina durante la fermentación.

15 La Figura 13 muestra la concentración de prolina (microgramos/mL) a T = 0 y T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con un hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción (APZ-1) añadido a baja concentración. Condiciones de control con tampón MES. Estos resultados sugieren fuertemente que la fracción de hidrolizado/péptido está implicada en el efecto estimulante de prolina de las composiciones nutricionales que contienen hidrolizado de caseína de la presente descripción.

20 La fermentación de una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína de la presente descripción y una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína y aminoácidos de la presente descripción condujo a un mayor aumento de hidroxiprolina que otros productos, mientras que la lisina estaba menos agotada.

25 La Figura 14 muestra las concentraciones (microgramos/mL) de ácido butírico a T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con Alimentum Similac digerido (por tanto > 500 Da) y composiciones nutricionales que contienen hidrolizado de caseína de la presente descripción añadidas a concentraciones baja (9,5 mg/mL) y alta (19 mg/mL). Condiciones de control con tampón MES. Las composiciones nutricionales que contienen hidrolizado de caseína de la presente descripción condujeron a una mayor producción de butirato en comparación con Similac.

30 La Figura 15 muestra las concentraciones (microgramos/mL) de ácido butírico a T = 6 de los experimentos de fermentación fecal con un hidrolizado de caseína digerida (por tanto > 500 Da) de la presente descripción (APZ-1) añadido a una concentración baja (9,5 mg/mL) y alta (19 mg/mL). Condiciones de control con tampón MES. Estos resultados indican que el hidrolizado/péptidos presentes en el producto acabado contribuyen a los efectos sobre la producción de butirato.

La mayor producción de butirato se observó en las fermentaciones con composiciones nutricionales que contenían hidrolizado de caseína de la presente descripción en comparación con otros productos, también reflejada en la relación más alta de butirato:(acetato+propionato).

35 En los experimentos de fermentación, se encontró que las composiciones nutricionales que contenían hidrolizado de caseína de la presente descripción eran superiores a otros productos en la estimulación de una variedad de aminoácidos (glutamato, treonina) y ácidos grasos de cadena corta, especialmente ácido butírico.

Estimulación de CCK

40 Se encontró que un hidrolizado de caseína de la presente descripción, en comparación con un hidrolizado parcial (por ejemplo, Gentlease) o aminoácidos libres estimula la liberación de CCK de STC-1 (línea celular endocrina intestinal). Además, los péptidos específicos de un hidrolizado de caseína de la presente descripción pueden estimular la liberación de CCK de las células STC-1 (DISLLDAQSAPLR, ALPMHIR, GPVRGPF). Estos hallazgos pueden traducirse en un potencial efecto de apoyo a la saciedad y la motilidad gastrointestinal. Modelo animal (ratón NOD)

45 Una composición nutricional que contiene hidrolizado de caseína de la presente descripción y un hidrolizado de caseína de la presente descripción reducen la incidencia de T1D en modelos animales experimentales (modelos de ratón NOD y de rata DP-BB, respectivamente).

Ejemplo 2:

50 El ejemplo 2 está dirigido a la inhibición de citoquinas proinflamatorias en ensayos de células dendríticas humanas primarias por caseína ampliamente hidrolizada y una de sus fracciones mayor que 500 Da. Específicamente, 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-1beta ("IL1 β "). Se pusieron en suspensión monocitos CD14+ aislados en medio RPMI y se complementaron con 10% de suero fetal de bovino inactivado por calor ("FBS"), penicilina/estreptomicina, 500 UI/mL de interleuquina-4 recombinante ("rhIL-4") y 800 UI/mL de rhGM-CSF y se cultivaron en frascos de cultivo de tejidos a 37°C y 5% de CO₂ durante 5 días, para permitir la diferenciación en células dendríticas. El día 5, las células se sembraron en el mismo medio a 20.000

células/pocillo en placas de fondo en U de 96 pocillos, seguido de la adición de las muestras de hidrolizado, incluyendo la caseína ampliamente hidrolizada y una de sus fracciones mayor que 500 Da a una concentración final de 0,007, 0,02, 0,08 y 0,2% m/v. Se utilizó 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 analizaron por duplicado biológico.

5 El día 6 se realizó una renovación de las células con muestras de hidrolizado en medio (RPMI + 10% de FBS + penicilina/estreptomycin) sin GM-CSF e IL-4. Una hora después de la adición del hidrolizado, se añadió potenciador CD40L+ (Alexis) hasta una concentración final de 0,5 µg/mL. A continuación se incubaron las células a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas y posteriormente se recogieron los líquidos sobrenadantes y se conservaron a -20°C hasta la cuantificación de las citoquinas utilizando el ensayo multiplex de citoquinas proinflamatorias Meso Scale Discovery de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 Como se muestra en las Figs. 16-17, la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-12p70 (IL12p70) por células dendríticas humanas primarias activadas es inhibida por caseína ampliamente hidrolizada y una fracción mayor de 500 Da del hidrolizado amplio de caseína.

15 Como se muestra en las Figs. 18-19, la secreción de la citoquina proinflamatoria interferón-gamma (IFN γ) por células dendríticas humanas primarias activadas es inhibida por caseína ampliamente hidrolizada y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado amplio de caseína.

Como se muestra en las Figs. 20-21, la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-8 (IL8) por células dendríticas humanas primarias activadas es inhibida por caseína ampliamente hidrolizada y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado amplio de caseína.

20 Como se muestra en las Figs. 22-23, la secreción de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) por células dendríticas humanas primarias activadas es inhibida por caseína ampliamente hidrolizada y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado amplio de caseína.

25 Como se muestra en las Figs. 24-25, la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-6 (IL6) por células dendríticas humanas primarias activadas es inhibida por caseína ampliamente hidrolizada y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado amplio de caseína.

Como se muestra en las Figs. 26-27, la secreción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-1beta (IL1 β) por células dendríticas humanas primarias activadas es inhibida por caseína ampliamente hidrolizada y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado amplio de caseína.

Ejemplo 3:

30 El ejemplo 3 está dirigido a la inhibición de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral alfa ("TNF α ") en un ensayo con macrófagos humanos primarios por hidrolizado de caseína ampliamente hidrolizada y una de sus fracciones mayor que 500 Da. Los monocitos aislados se pusieron en suspensión en medio RPMI complementado con 10% de suero fetal de bovino (FBS) inactivado por calor y penicilina/estreptavidina. Se añadió M-CSF humano recombinante hasta una concentración final de 100 ng/mL y las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 5 días.

35 El día 5, las muestras de hidrolizado que incluían caseína ampliamente hidrolizada y una de sus fracciones mayor que 500 Da a una concentración final de 0,007, 0,02, 0,08 y 0,2% m/v se añadieron en medio RPMI con M-CSF. El día 6, se retiró el medio que incluía las muestras de hidrolizado y las células se renovaron 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. A continuación se incubaron las células a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas y posteriormente se recogieron y conservaron los líquidos sobrenadantes a -20°C hasta la cuantificación de TNF α utilizando el ensayo de TNF α Meso Scale Discovery de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 Como se muestra en las Figs. 28-29, la secreción de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) por los macrófagos humanos primarios activados es inhibida por caseína ampliamente hidrolizada y una fracción mayor que 500 Da del hidrolizado amplio de caseína.

Ejemplo 4:

45 El ejemplo 4 está dirigido a la evaluación de la expresión del RNA mensajero de la citoquina proinflamatoria en el íleon de ratones diabéticos no obesos (NOD). En resumen, se utilizaron ratones BALB/c hembras de la misma edad como ratones de control sanos. Los ratones BALB/c se mantuvieron con la comida habitual cuando no se indicaba lo contrario, mientras que los ratones NOD se mantuvieron con la comida habitual o una formulación dietética que contenía caseína ampliamente hidrolizada (CH) comenzando en el momento del destete. El aislamiento del RNA de las muestras de íleon se realizó por un kit de aislamiento de RNA. Se sintetizó DNAc y se evaluó la expresión de la citoquina por PCR cuantitativa en tiempo real. Se calcularon los números absolutos de copias de RNA (moléculas/µg) por patrones de desplazamiento y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga.

Como se puede observar en las Figs. 30-33, la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL1, IL6, IL18 e IL17 en el íleon de ratones NOD es elevada en comparación con la de los ratones de control sanos de la misma edad (BALB/c). Estos niveles elevados disminuyen en ratones NOD alimentados con una dieta de caseína ampliamente hidrolizada.

5 Ejemplo 5:

El ejemplo 5 está dirigido a la evaluación de perfiles de citoquinas proinflamatorias de linfocitos T aisladas de ganglios linfáticos drenantes del intestino de ratones diabéticos no obesos (NOD). En resumen, se utilizaron ratones BALB/c hembras de la misma edad como ratones de control sanos. Los ratones BALB/c se mantuvieron con la comida habitual cuando no se indicaba lo contrario, mientras que los ratones NOD se mantuvieron con la comida habitual o una formulación dietética que contenía caseína ampliamente hidrolizada (CH) a partir del momento del destete.

15 Las células de los ganglios linfáticos mesentéricos aisladas de cada grupo de ratones se estimularon con anti-CD3 unido a placas en medio completo (DMEM con 10% (vol/vol) de FBS, 2 mmol/L de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina más estreptomycin). Las fracciones sobrenadantes se recogieron 48 horas después para análisis de las citoquinas con matrices de perlas de citoquinas múltiples de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como se muestra en las Figs. 34-35, la secreción de las citoquinas proinflamatorias IFN γ , IL4 e IL17 de los linfocitos T de los ganglios linfáticos drenantes del intestino de ratones NOD es elevada en comparación con la de los ratones de control (BALB/c) sanos de la misma edad. Estos niveles elevados se redujeron en ratones NOD por una dieta de caseína ampliamente hidrolizada.

20 Ejemplo 6:

El ejemplo 6 está dirigido al análisis de la secreción de citoquinas en una línea celular de macrófagos de muridos. La línea celular de macrófagos de muridos J774A.1 se mantuvo en RPMI-1640 complementado con 10% (v/v) de suero fetal de ternero, 50 UI/mL de penicilina y 0,5 mg/mL de estreptomycin. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO $_2$. Se añadieron muestras de hidrolizado de caseína que incluían caseína ampliamente hidrolizada y una de sus fracciones mayor que 500 Da a agua estéril a una concentración de 100 mg/mL y se esterilizaron por filtración a través de filtros de nailon de 0,2 μ m. Como un control adicional también se analizó caseína ampliamente hidrolizada esterilizada no filtrada. Las células se cultivaron en placas a 1x10 6 células/mL y se incubaron por triplicado con una concentración final de 1 mg/mL de hidrolizado durante 1 hora. A continuación, se trataron las células con 100 ng/mL de LPS o se dejaron sin tratar durante 24 horas antes de recoger los líquidos sobrenadantes por centrifugación y conservación a -20°C. Los líquidos sobrenadantes se evaluaron para cada concentración de citoquina usando ensayos ELISA individuales para IL-1 β , IL-6, IL12p40 y TNF- α de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron por triplicado y se calcularon las diferencias significativas utilizando el análisis ANOVA unidireccional ordinario en el programa informático Graphpad Prism 6. p<0,05 se consideró significativo.

35 Como se puede observar en las Figs. 37-38 la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-12p40 e IL-1 β por macrófagos de ratón estimulados con LPS disminuyó por caseína ampliamente hidrolizada, con o sin filtración estéril antes de la incubación de las células (* p<0,05). La secreción de la citoquina proinflamatoria IL6 disminuyó significativamente por la caseína ampliamente hidrolizada (* p<0,05). La secreción de la citoquina proinflamatoria TNF α disminuyó significativamente por la fracción mayor que 500 Da del hidrolizado amplio de caseína (* p<0,05). Los resultados se muestran también en formato de tabla en la Fig.41.

40 **Listado de secuencias**

<110> Mead Johnson Nutritional Company Ltd. (Asai Pacific)

<120> Reducción de la respuesta proinflamatoria

45 <130> MJE00378NP

<160> 68

<170> PatentIn versión 3.5

50 <210> 1

<211> 6

<212> PRT

ES 2 821 750 T3

<213> BOVINO

<400> 1

Ile Pro Asn Pro Ile Gly
1 5

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> BOVINO

10

<400> 2

Ile Gly Ser Glu Ser Thr Glu Asp Gln
1 5

<210> 3

15

<211> 7

<212> PRT

<213> BOVINO

<400> 3

20

Asp Lys Thr Glu Ile Pro Thr
1 5

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

25

<213> BOVINO

<400> 4

Ile Val Pro Asn
1

30

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> BOVINO

35

<400> 5

Leu Glu Asp Ser Pro Glu
1 5

<210> 6

<211> 6

40

<212> PRT

<213> BOVINO

ES 2 821 750 T3

<400> 6
Asn Gln Glu Gln Pro Ile
1 5

<210> 7
5 <211> 5
<212> PRT
<213> BOVINO

<400> 7
10 Asn Val Pro Gly Glu
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
15 <213> BOVINO

<400> 8
Pro Phe Pro Gly Pro Ile
1 5

20 <210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> BOVINO

25 <400> 9
Thr Glu Asp Glu Leu
1 5

<210> 10
<211> 4
30 <212> PRT
<213> BOVINO

<400> 10
Val Pro Ser Glu
1

35 <210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> BOVINO

40 <400> 11
Tyr Pro Phe Pro Gly Pro
1 5

ES 2 821 750 T3

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
5 <213> BOVINO

<400> 12

Tyr Pro Ser Gly Ala
1 5

10 <210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> BOVINO

15 <400> 13

Phe Pro Gly Pro Ile Pro
1 5

<210> 14
<211> 11
20 <212> PRT
<213> BOVINO

<400> 14

Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr
1 5 10

25 <210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> BOVINO

30 <400> 15

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Pro Asn
1 5

<210> 16
35 <211> 5
<212> PRT
<213> BOVINO

<400> 16

40 Asp Met Glu Ser Thr
1 5

<210> 17

ES 2 821 750 T3

<211> 7
<212> PRT
<213> BOVINO

5 <400> 17

Phe Pro Gly Pro Ile Pro Asn
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> BOVINO

10

<400> 18

Ile Pro Asn Pro Ile
1 5

15

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> BOVINO

20

<400> 19

Met Glu Ser Thr Glu Val
1 5

25

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> BOVINO

<400> 20

30

Pro Gly Pro Ile Pro Asn
1 5

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> BOVINO

35

<400> 21

Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr
1 5

40

<210> 22
<211> 4
<212> PRT

ES 2 821 750 T3

<213> BOVINO

<400> 22

Pro Asn Pro Ile
1

5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> BOVINO

10

<400> 23

Ser Lys Asp Ile Gly Ser Glu
1 5

<210> 24

15

<211> 8

<212> PRT

<213> BOVINO

<400> 24

20

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Pro
1 5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

25

<213> BOVINO

<400> 25

Ala Ile Asn Pro Ser Lys Glu Asn
1 5

30

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> BOVINO

35

<400> 26

Ala Pro Phe Pro Glu
1 5

<210> 27

<211> 6

40

<212> PRT

<213> BOVINO

ES 2 821 750 T3

<400> 27
Asp Ile Gly Ser Glu Ser
1 5

<210> 28
5 <211> 4
<212> PRT
<213> BOVINO

<400> 28
10 Asp Met Pro Ile
1

<210> 29
<211> 4
<212> PRT
15 <213> BOVINO

<400> 29
Asp Val Pro Ser
1

20 <210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> BOVINO

25 <400> 30
Glu Asp Ile
1

<210> 31
<211> 3
30 <212> PRT
<213> BOVINO

<400> 31
Glu Leu Phe
1

35 <210> 32
<211> 3
<212> PRT
<213> BOVINO

40 <400> 32
Glu Met Pro
1

ES 2 821 750 T3

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
5 <213> BOVINO

<400> 33
Glu Thr Ala Pro Val Pro Leu
1 5

10 <210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> BOVINO

15 <400> 34
Gly Pro Phe Pro
1

<210> 35
<211> 4
20 <212> PRT
<213> BOVINO

<400> 35
Gly Pro Ile Val
1

25
<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> BOVINO

30
<400> 36
Ile Gly Ser Ser Ser Glu Glu Ser
1 5

<210> 37
35 <211> 9
<212> PRT
<213> BOVINO

<400> 37
Ile Gly Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ala
40 1 5

<210> 38

ES 2 821 750 T3

<211> 6
<212> PRT
<213> BOVINO

5 <400> 38

Ile Asn Pro Ser Lys Glu
1 5

<210> 39
<211> 9

10 <212> PRT
<213> BOVINO

<400> 39

Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr Pro Val
1 5

15

<210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> BOVINO

20

<400> 40

Ile Thr Ala Pro
1

<210> 41

25 <211> 7
<212> PRT
<213> BOVINO

<400> 41

30 Lys His Gln Gly Leu Pro Gln
1 5

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

35 <213> BOVINO

<400> 42

Leu Asp Val Thr Pro
1 5

40 <210> 43

<211> 5

<212> PRT

ES 2 821 750 T3

<213> BOVINO

<400> 43

5

Leu Pro Leu Pro Leu
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> BOVINO

10

<400> 44

Asn Ala Val Pro Ile
1 5

<210> 45

15 <211> 5
<212> PRT
<213> BOVINO

<400> 45

20 Asn Glu Val Glu Ala
1 5

<210> 46
<211> 3

25 <212> PRT
<213> BOVINO

<400> 46

30 Asn Leu Leu
1

<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> BOVINO

35

<400> 47

Pro Ile Thr Pro Thr
1 5

<210> 48

40 <211> 6
<212> PRT
<213> BOVINO

ES 2 821 750 T3

<400> 48
Pro Asn Ser Leu Pro Gln
1 5

<210> 49
5 <211> 6
<212> PRT
<213> BOVINO

<400> 49
10 Pro Asn Ser Leu Pro Gln
1 5

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
15 <213> BOVINO

<400> 50
Pro Gln Asn Ile Pro Pro Leu
1 5

20 <210> 51
<211> 6
<212> PRT
<213> BOVINO

25 <400> 51
Pro Val Leu Gly Pro Val
1 5

<210> 52
<211> 4
30 <212> PRT
<213> BOVINO

<400> 52
Pro Val Pro Gln
1

35 <210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> BOVINO

40 <400> 53
Pro Val Val Val Pro
1 5

ES 2 821 750 T3

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
5 <213> BOVINO

<400> 54
Pro Val Val Val Pro Pro
1 5

10 <210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> BOVINO

15 <400> 55
Ser Ile Gly Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ala Glu
1 5 10

<210> 56
<211> 7
20 <212> PRT
<213> BOVINO

<400> 56
Ser Ile Ser Ser Ser Glu Glu
1 5

25 <210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> BOVINO

30 <400> 57
Ser Ile Ser Ser Ser Glu Glu Ile Val Pro Asn
1 5 10

<210> 58
35 <211> 6
<212> PRT
<213> BOVINO

<400> 58
Ser Pro Pro Glu Ile Asn
1 5

40 <210> 59

ES 2 821 750 T3

<211> 7
<212> PRT
<213> BOVINO

5 <400> 59

Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr
1 5

<210> 60
<211> 7
10 <212> PRT
<213> BOVINO

<400> 60

Thr Asp Ala Pro Ser Phe Ser
1 5

15

<210> 61
<211> 6
<212> PRT
<213> BOVINO

20

<400> 61

Val Ala Thr Glu Glu Val
1 5

25

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> BOVINO

<400> 62

Val Leu Pro Val Pro
1 5

30

<210> 63
<211> 4
<212> PRT
35 <213> BOVINO

<400> 63

Val Pro Gly Glu
1

40

<210> 64
<211> 6
<212> PRT

ES 2 821 750 T3

<213> BOVINO

<400> 64

Val Pro Gly Glu Ile Val
1 5

5

<210> 65

<211> 6

<212> PRT

<213> BOVINO

10

<400> 65

Val Pro Ile Thr Pro Thr
1 5

<210> 66

15

<211> 9

<212> PRT

<213> BOVINO

<400> 66

20

Val Val Pro Pro Phe Leu Gln Pro Glu
1 5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

25

<213> BOVINO

<400> 67

Val Val Val Pro Pro
1 5

30

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> BOVINO

35

<400> 68

Tyr Pro Val Glu Pro
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición nutricional, que comprende un lípido o una fase grasa, una fuente de proteína y un hidrolizado de caseína para uso en el tratamiento en un sujeto de una enfermedad inflamatoria, en donde la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo 1, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome metabólico y enfermedad celíaca, y en donde la composición nutricional comprende aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 g/100 kcal de un prebiótico, y en donde la composición prebiótica comprende al menos 20% de un oligosacárido y en donde el hidrolizado consiste en péptidos con un peso molecular mayor que 500 Da; y en donde el hidrolizado comprende un péptido con SEQ ID NO: 1 y al menos dos péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2-68.
- 10 2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el hidrolizado comprende al menos tres péptidos, preferiblemente al menos cuatro péptidos y más preferiblemente al menos cinco péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2-68.
- 15 3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición nutricional comprende además de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg/100 kcal de una fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que comprende ácido docosahexaenoico.
4. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la composición nutricional comprende además ácido araquidónico.
5. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto es un niño o joven humano.
- 20 6. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende adicionalmente uno o más de carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, minerales, nutrientes anabólicos, vitaminas, antioxidantes, cepas bacterianas probióticas y agentes lipotrópicos.

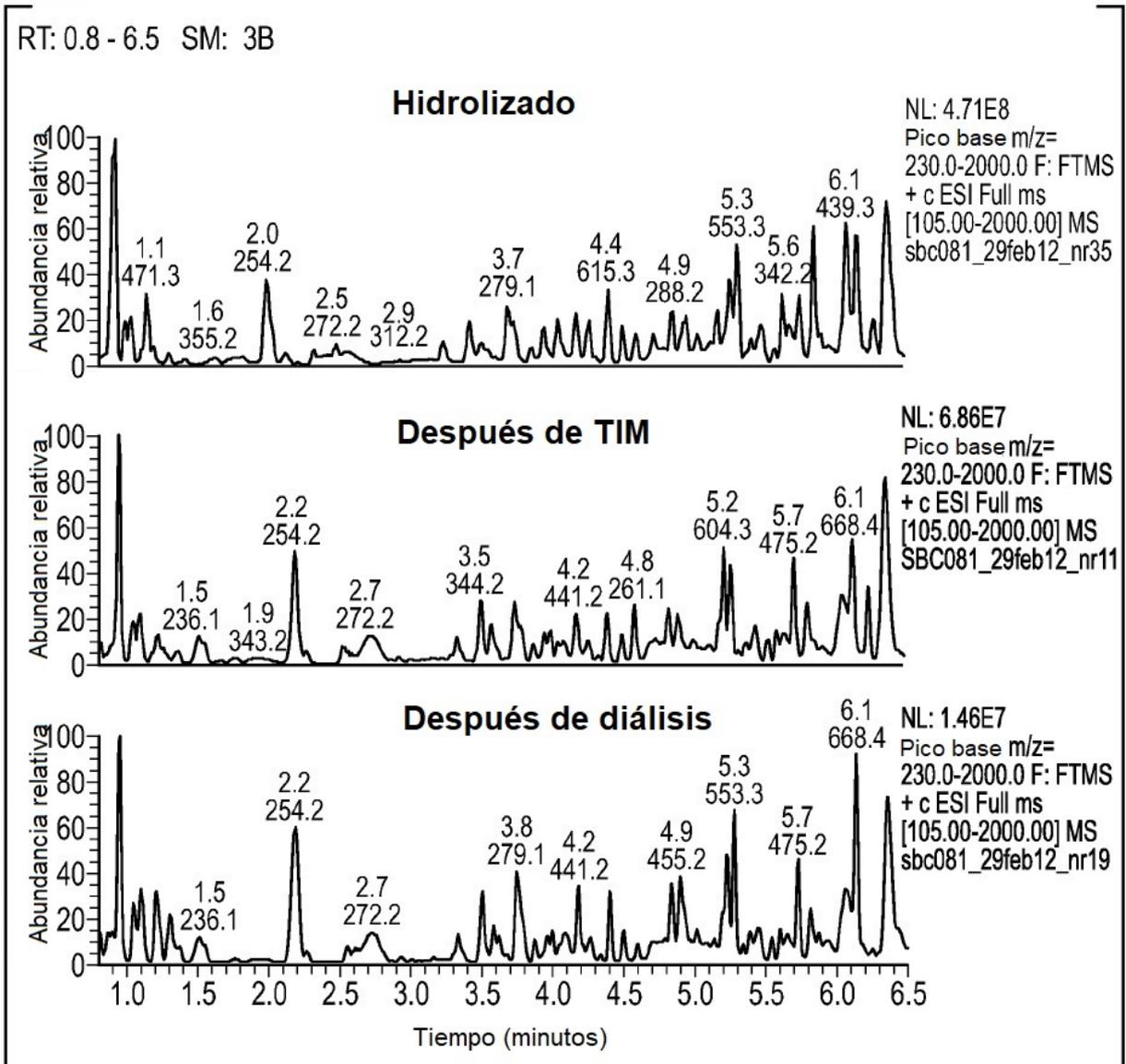


FIG. 2

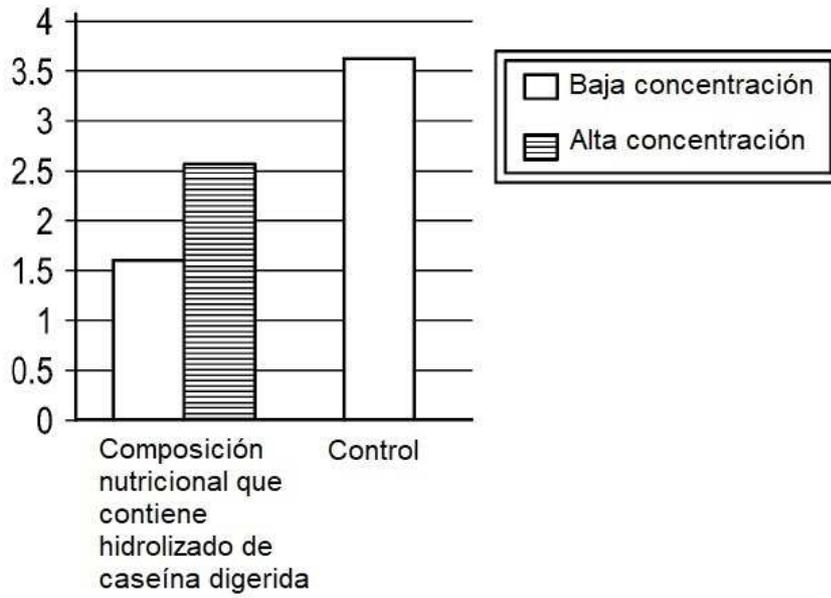


FIG. 3

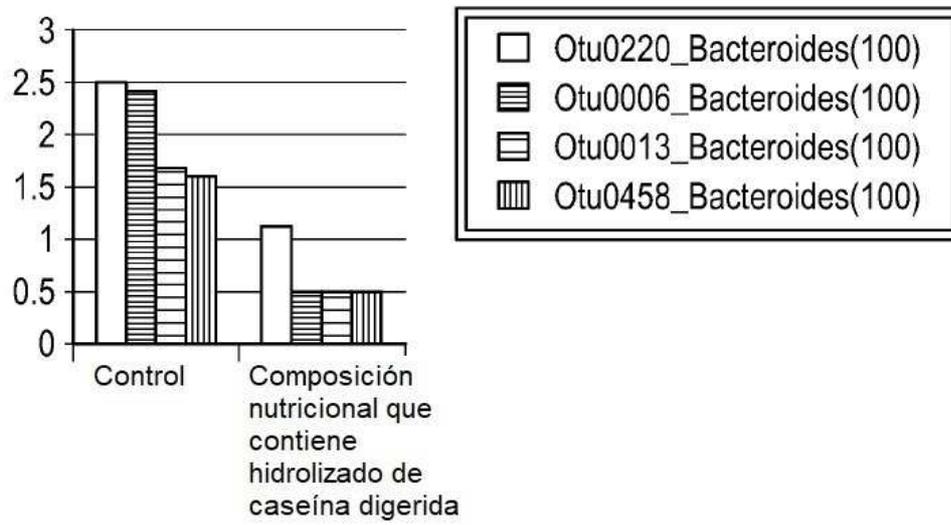


FIG. 4

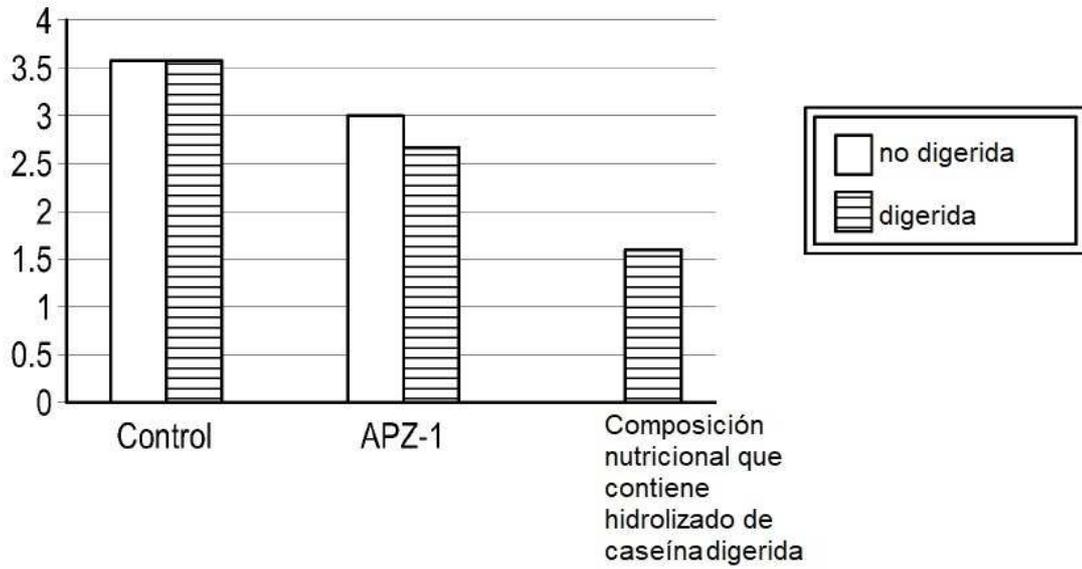


FIG. 5

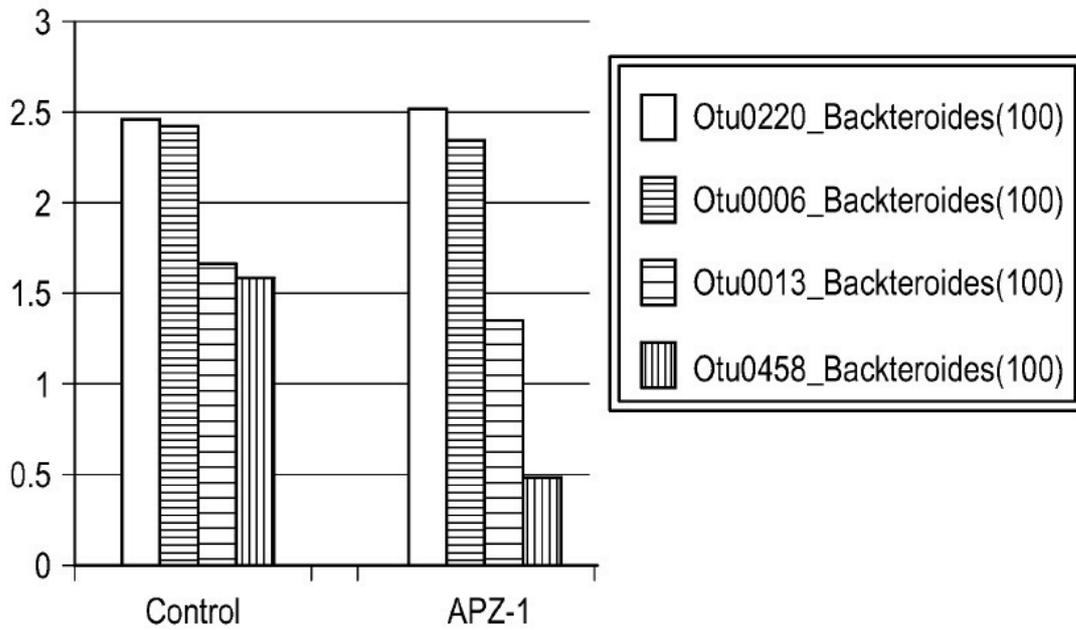


FIG. 6

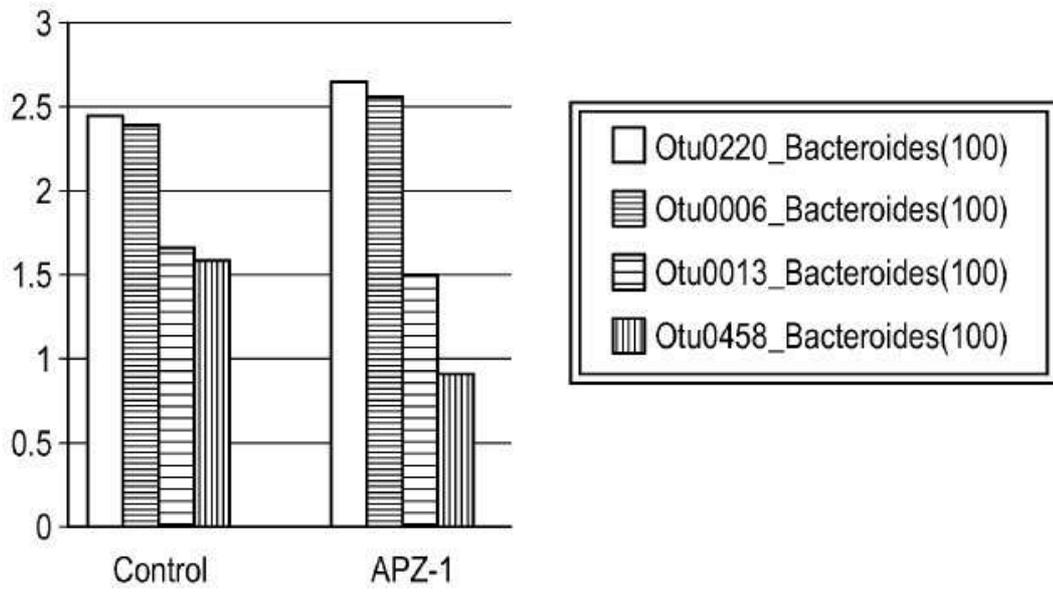


FIG. 7

Ácido glutámico

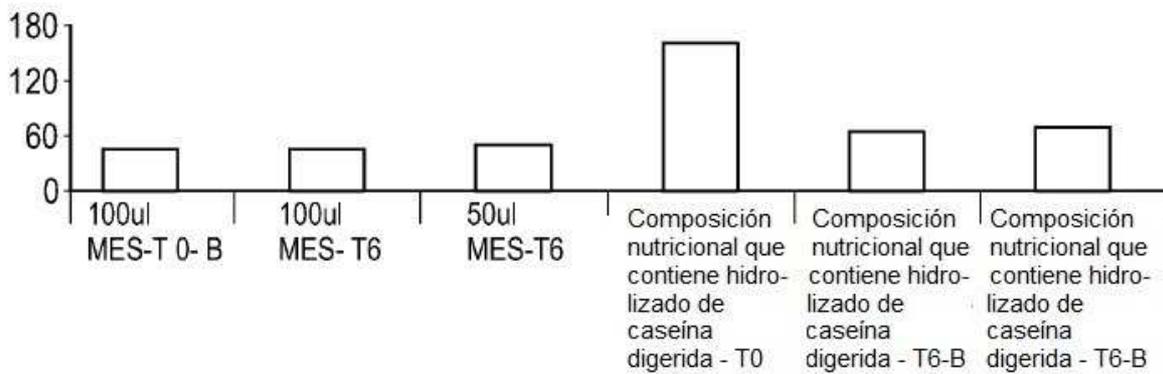


FIG. 8

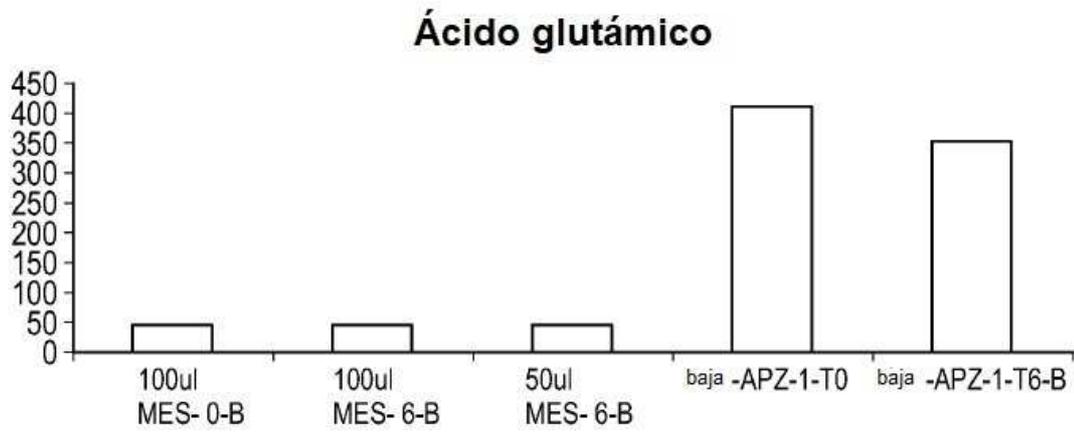


FIG. 9

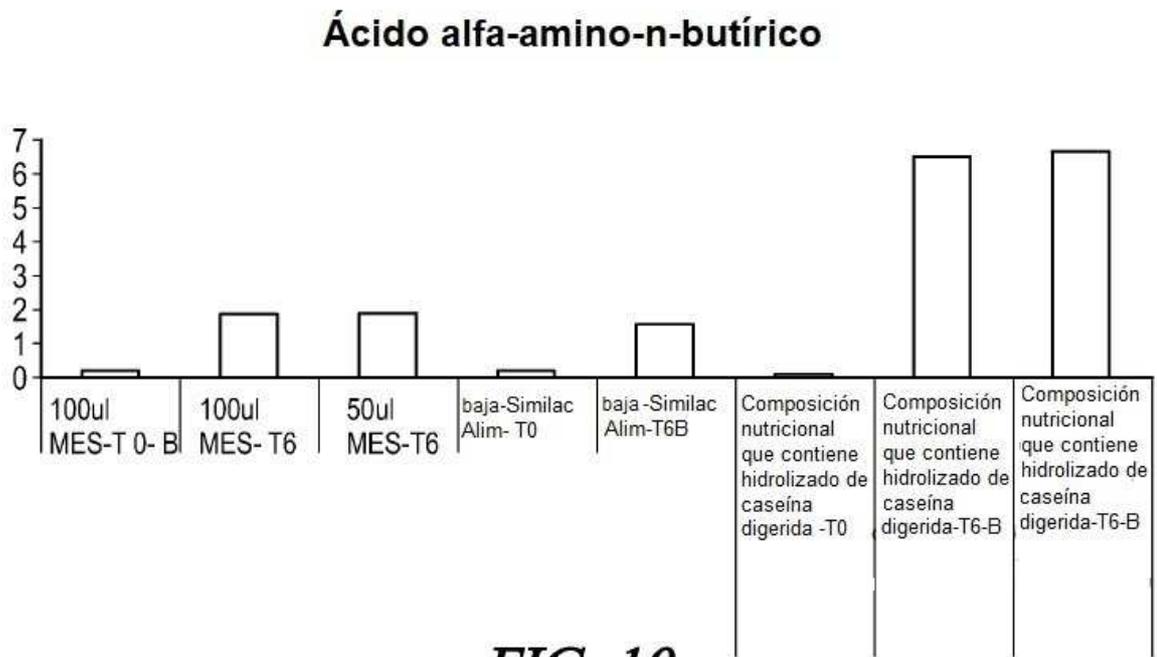


FIG. 10

Ácido alfa-amino-n-butírico

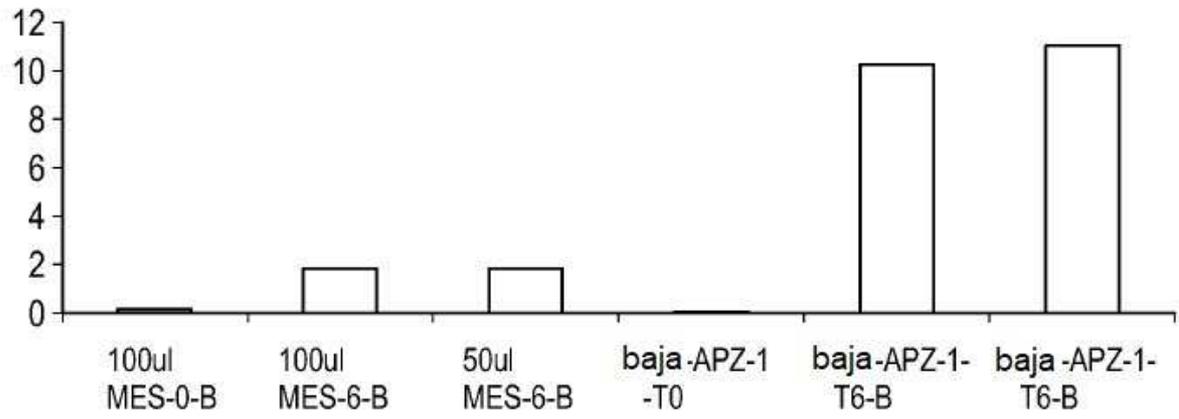


FIG. 11

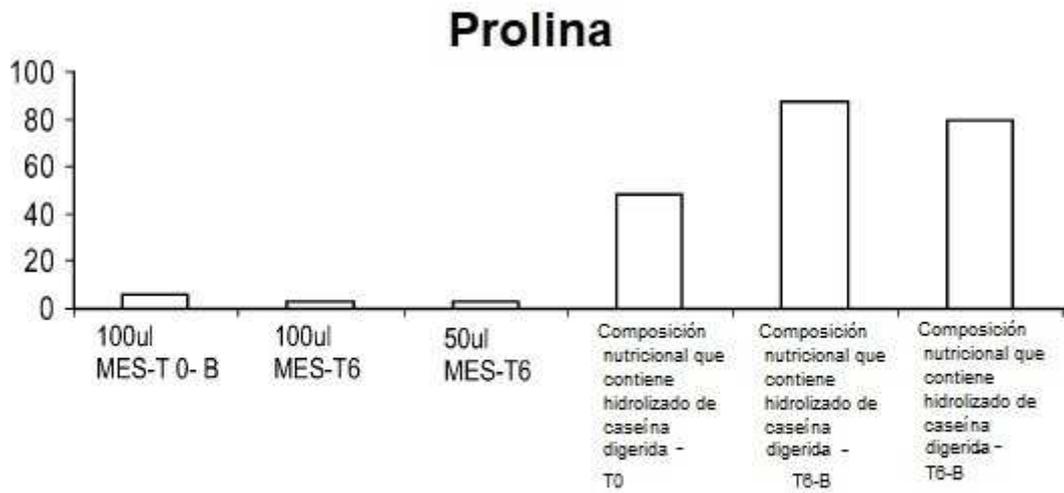


FIG. 12

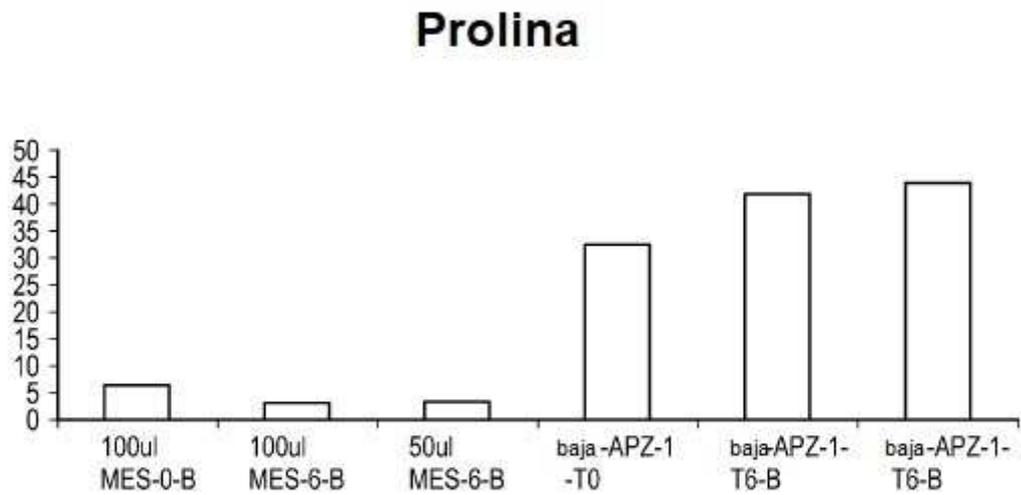


FIG. 13

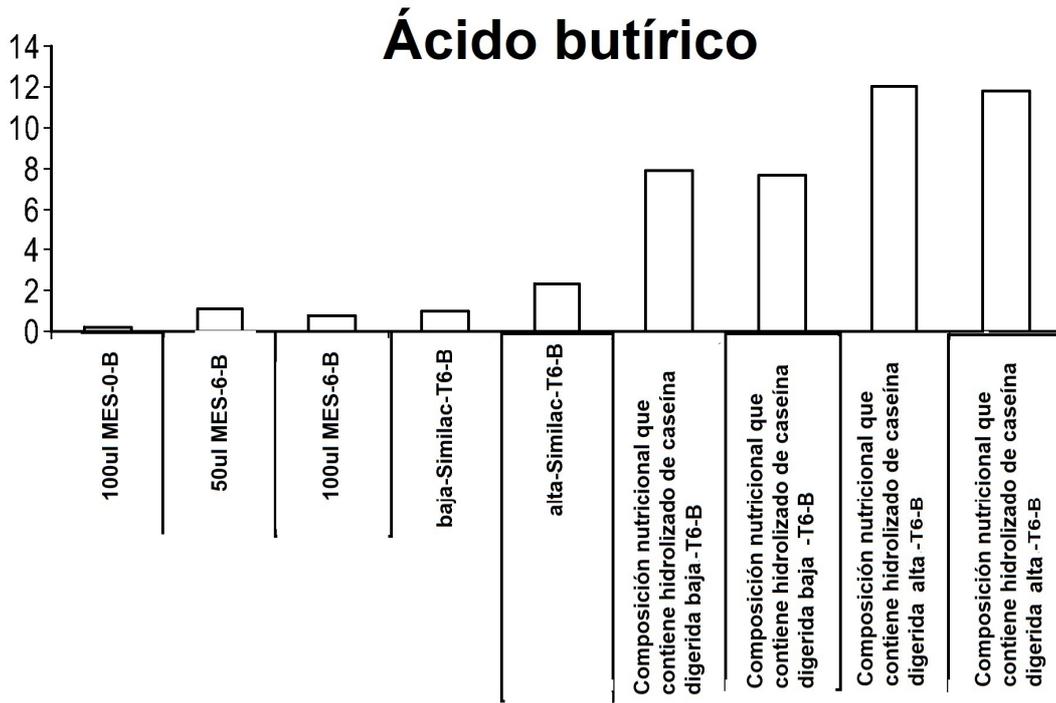


FIG. 14

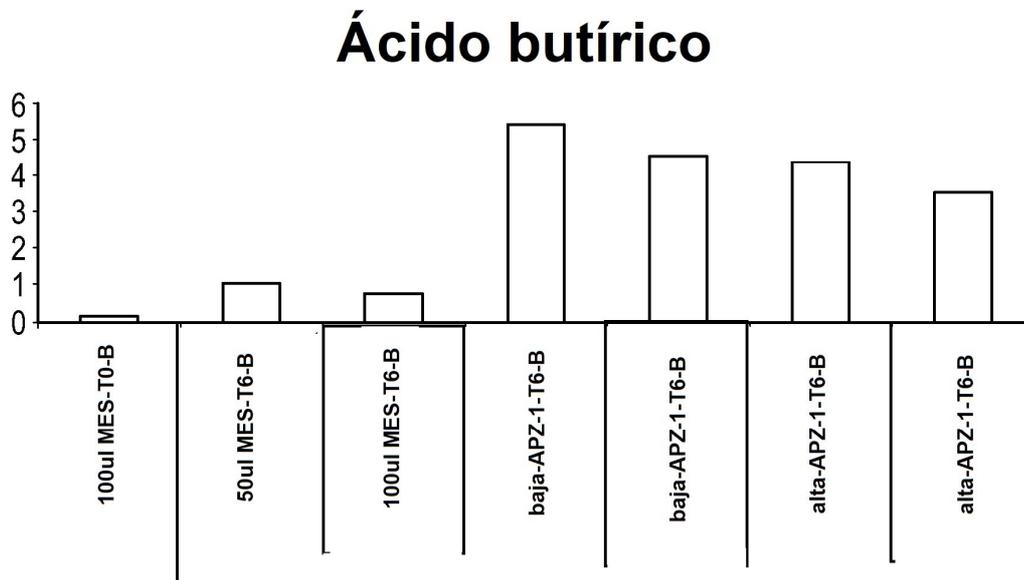


FIG. 15

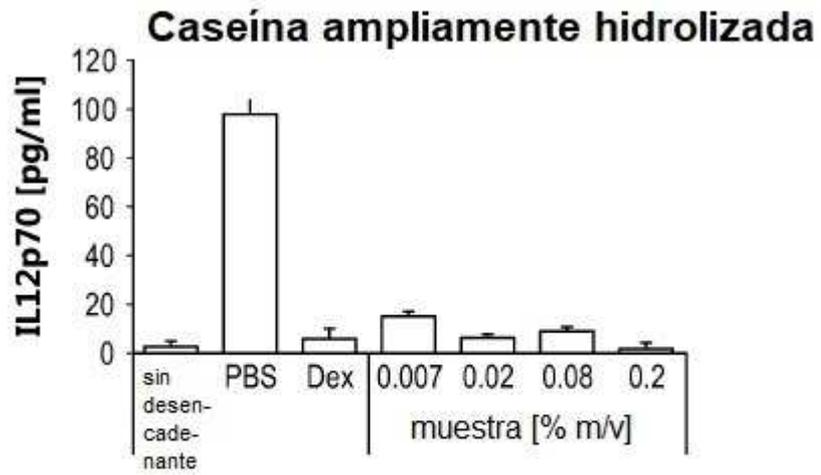


FIG. 16

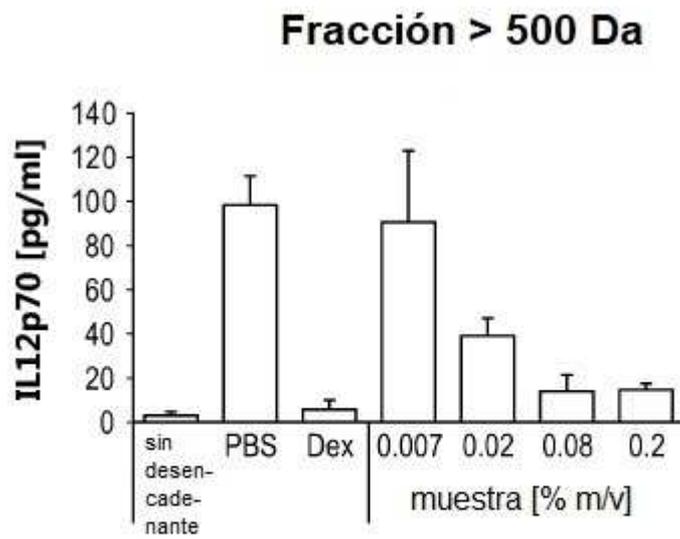


FIG. 17

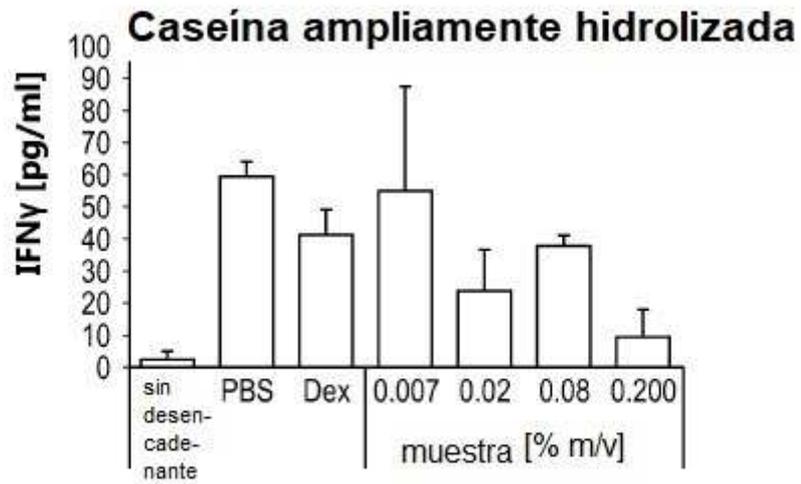


FIG. 18

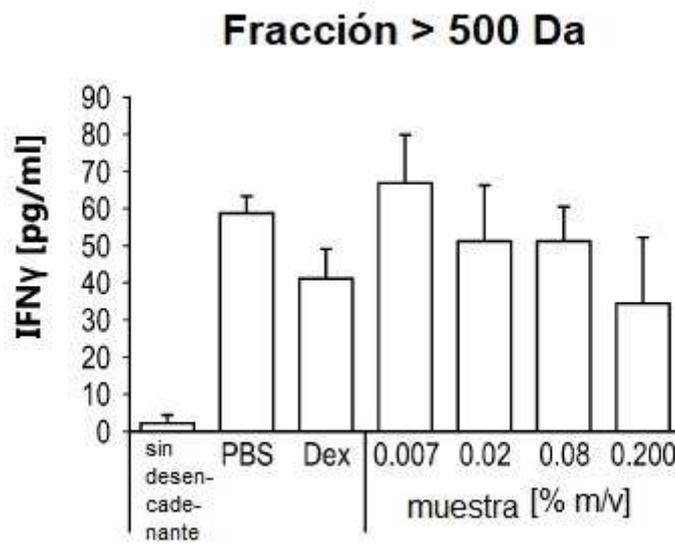


FIG. 19

Caseína ampliamente hidrolizada

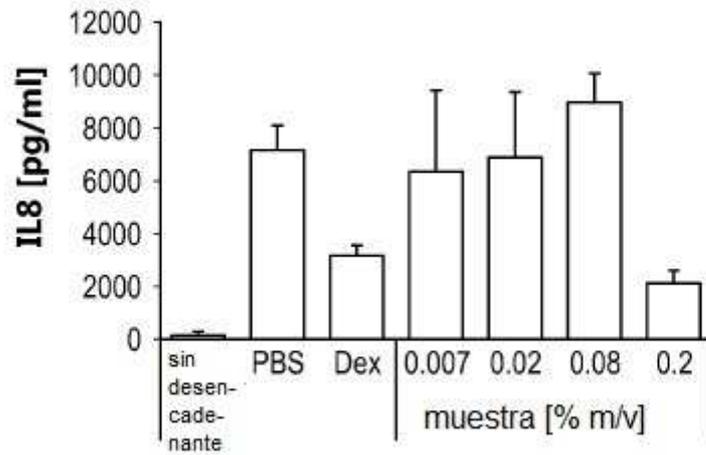


FIG. 20

Fracción > 500 Da

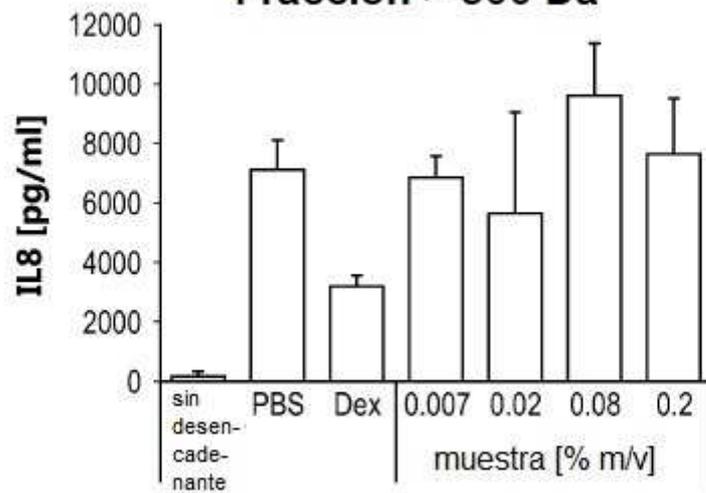


FIG. 21

Caseína ampliamente hidrolizada

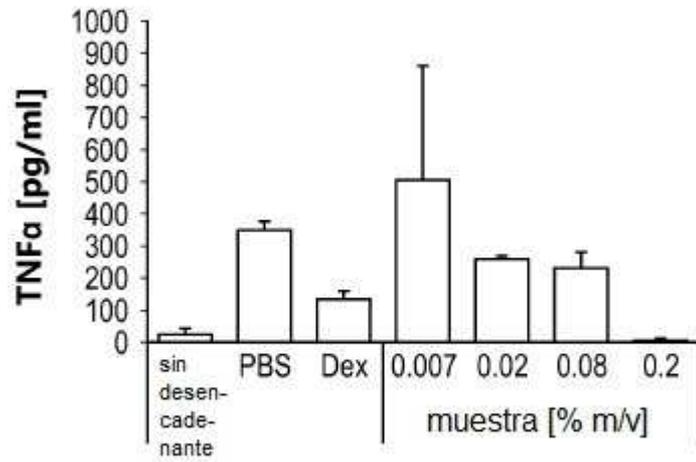


FIG. 22

Fracción > 500 Da

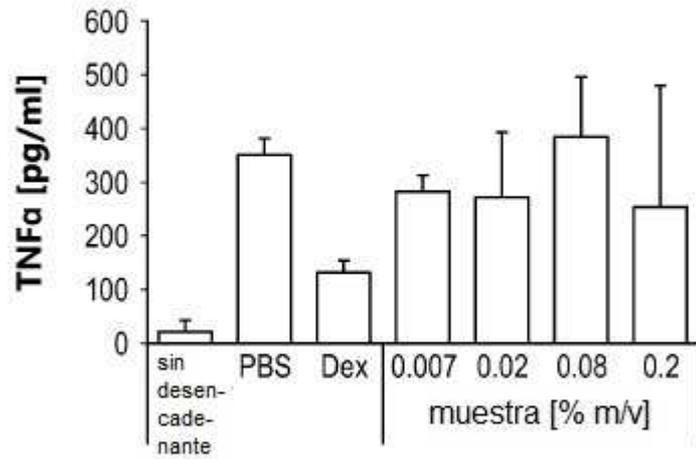


FIG. 23

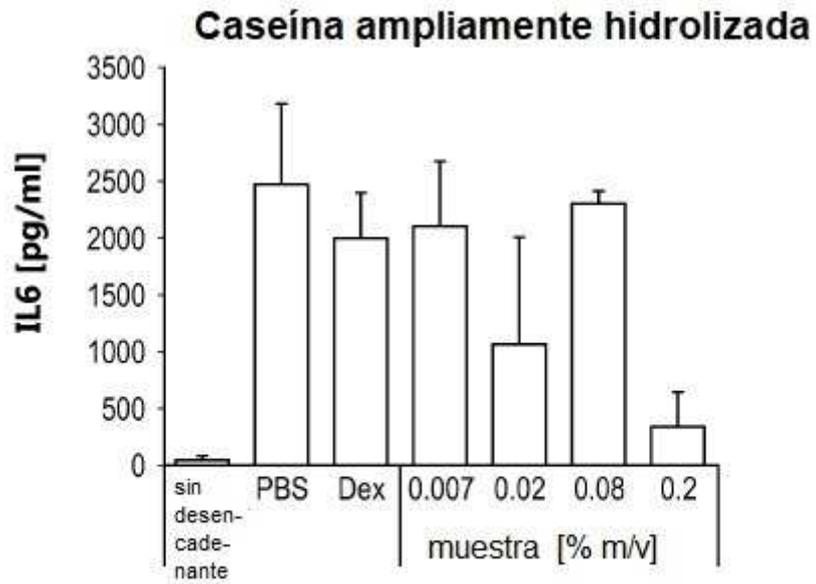


FIG. 24

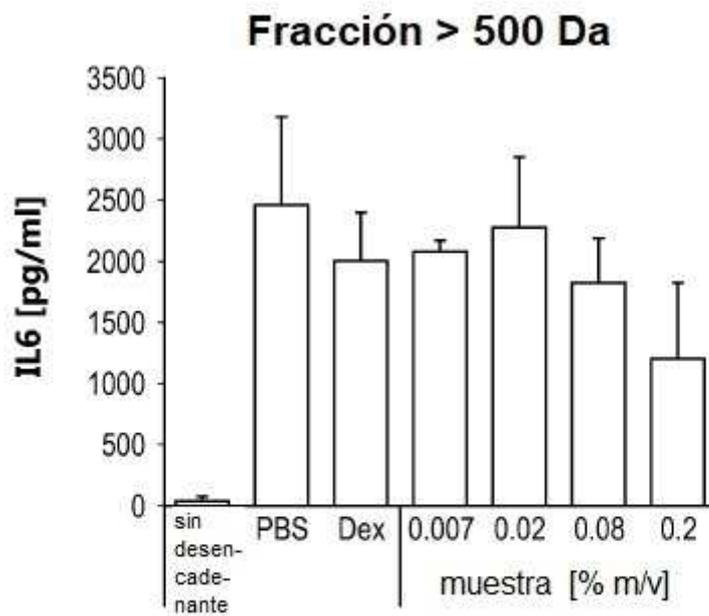


FIG. 25

Caseína ampliamente hidrolizada

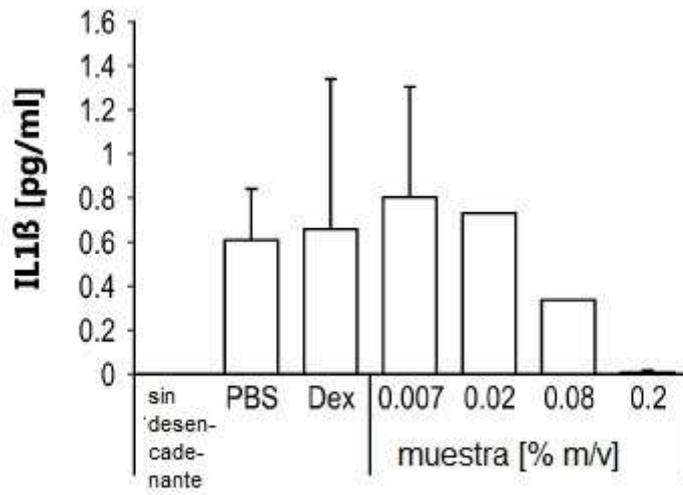


FIG. 26

Fracción > 500 Da

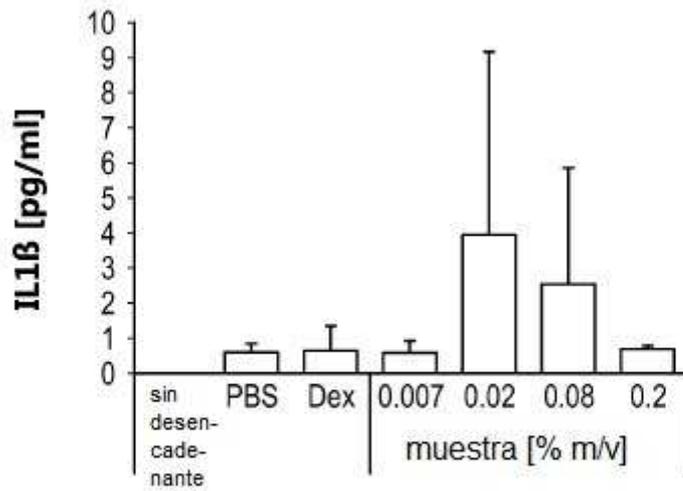


FIG. 27

Caseína ampliamente hidrolizada

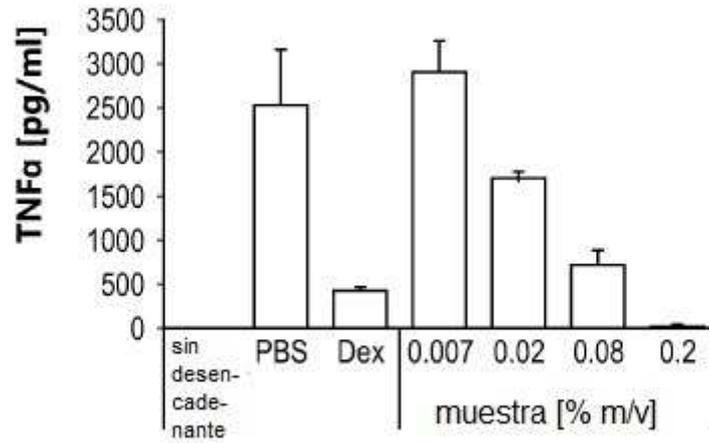


FIG. 28

Fracción > 500 Da

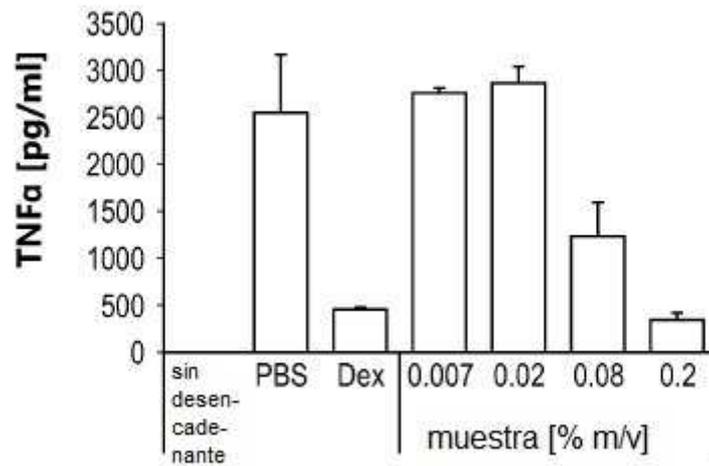


FIG. 29

FIG. 30

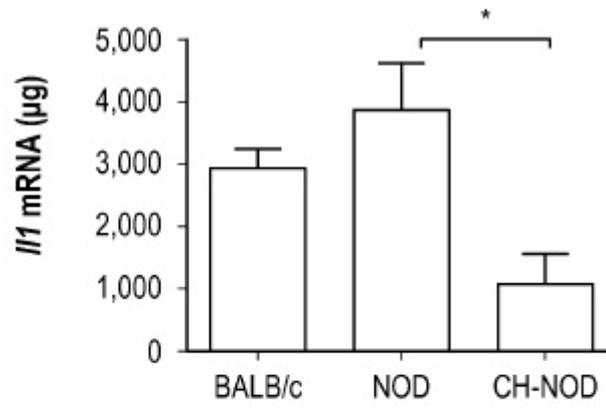


FIG. 31

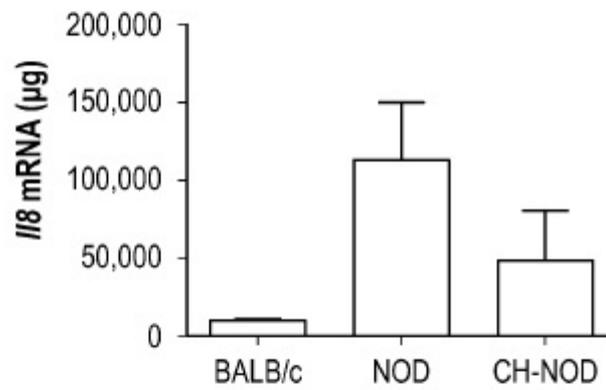


FIG. 32

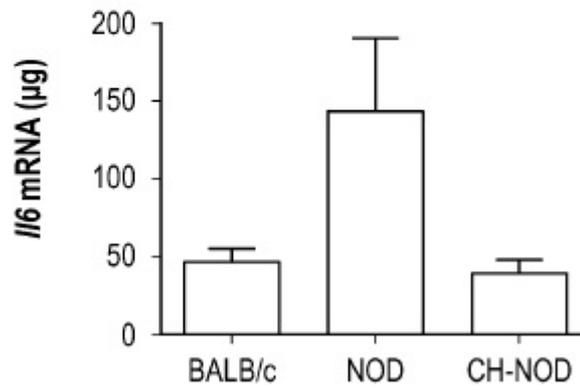


FIG. 33

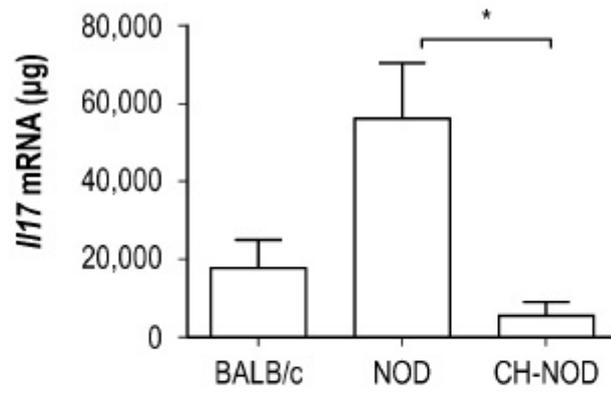


FIG. 34

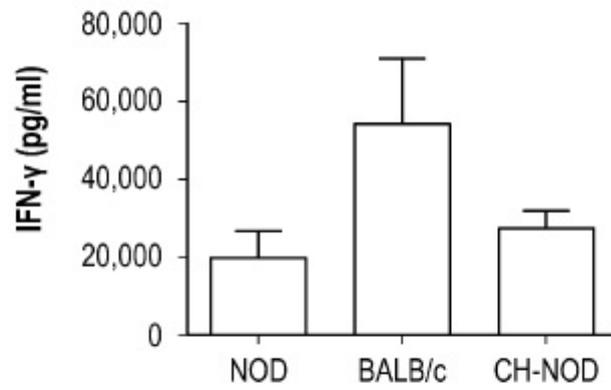
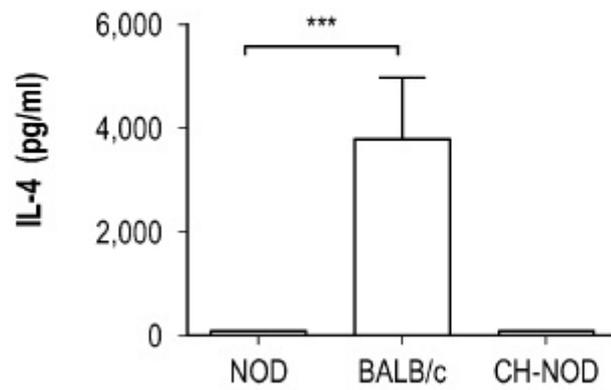


FIG. 35



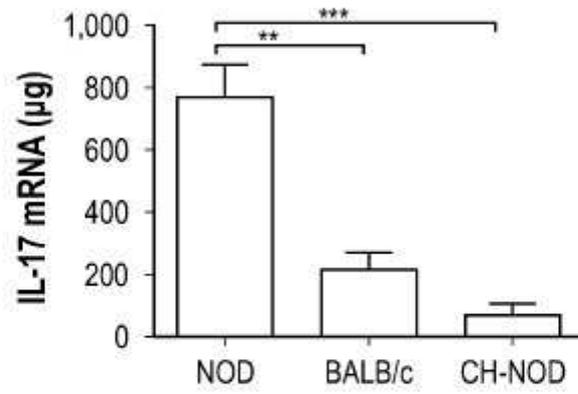


FIG. 36

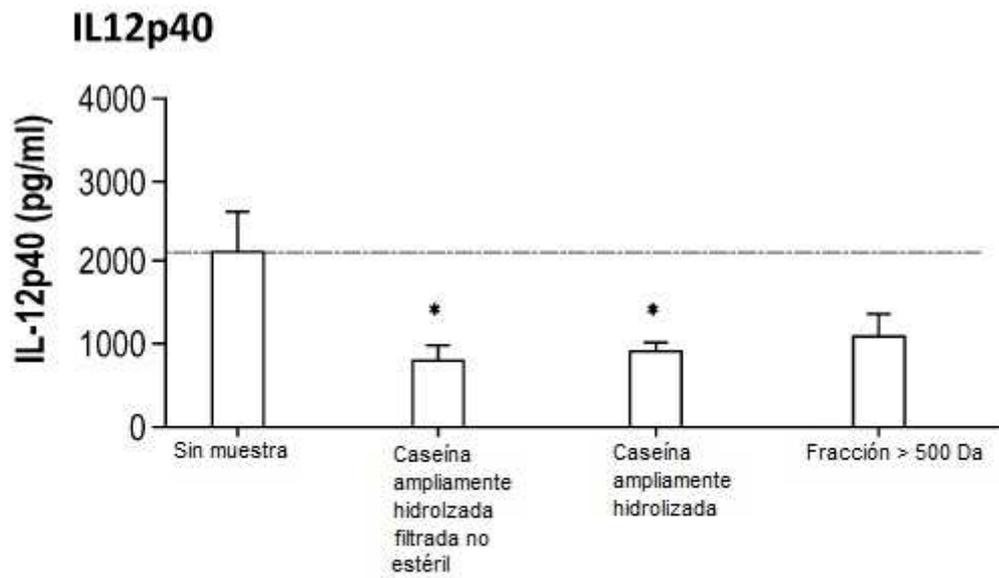


FIG. 37

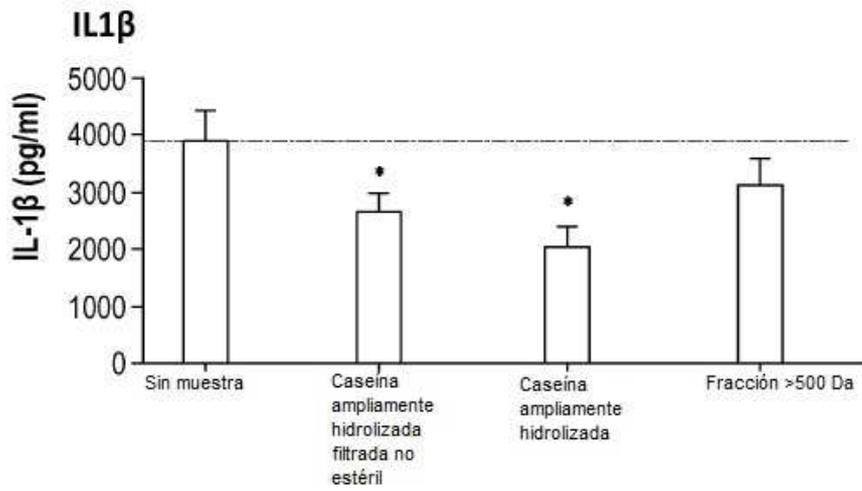


FIG. 38

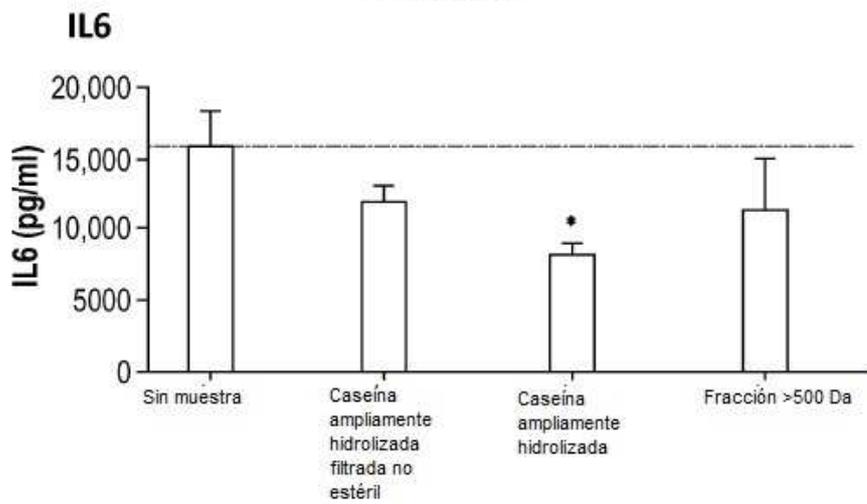


FIG. 39

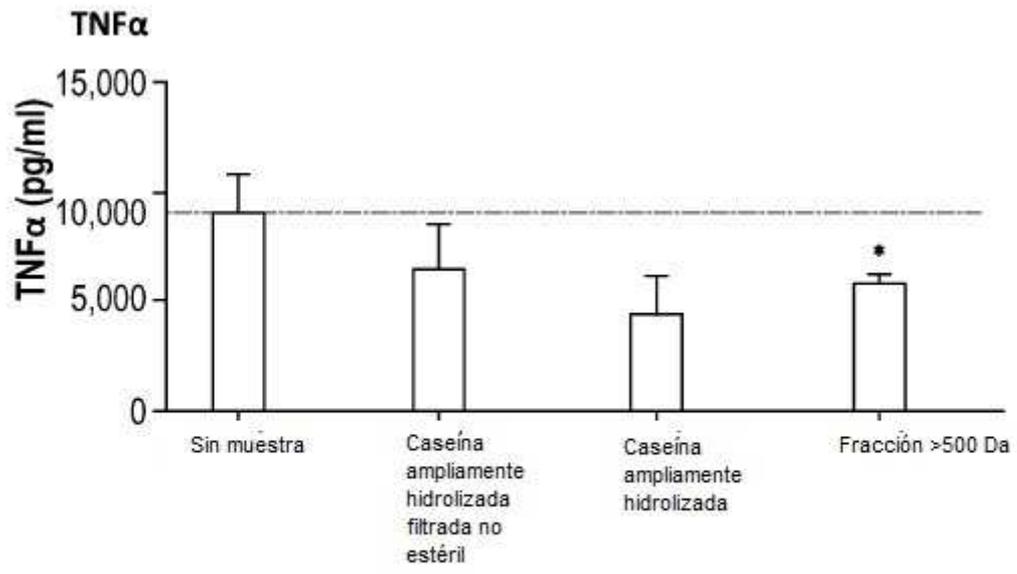


FIG. 40

	IL-12p40				IL-1 β				IL-6				TNF- α			
	Valor medio	Efecto sign.	% de cambio		Valor medio	Efecto sign.	% de cambio		Valor medio	Efecto sign.	% de cambio		Valor medio	Efecto sign.	% de cambio	
Sin muestra	2074.78				390.34				15926.39				8922.91			
Caseína ampliamente hidrolizada filtrada no estéril	758.52	↓	63.44		258.42	↓	33.80		11851.96				6461.56			
Caseína ampliamente hidrolizada	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. 41