

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 843**

51 Int. Cl.:

A23L 1/29 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2004 E 04762842 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 1667537**

54 Título: **Fórmula para lactantes**

30 Prioridad:

18.09.2003 DK 200301353
23.09.2003 US 504952 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2014

73 Titular/es:

ARLA FOODS AMBA (100.0%)
Sønderhøj 14
8260 Viby J, DK

72 Inventor/es:

SOERENSEN, ESBEN SKIPPER;
BURLING, HANS;
BOETTCHER, KAREN;
BERTELSEN, HANS;
ALBERTSEN, KRISTIAN;
GRAVERHOLT, GITTE;
JOERGENSEN, ANDERS STEEN y
SCHACK, LOTTE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 444 843 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

Fórmula para lactantes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a fórmulas para lactantes o alimento para bebés complementado con osteopontina y al uso de osteopontina en fórmulas para lactantes o alimento para bebés.

Antecedentes de la invención

10 En un hecho muy conocido que las fórmulas para bebés no poseen el mismo efecto inmunoestimulador que la leche materna. Por lo tanto, los bebés amamantados tienen menos infecciones junto con menor desarrollo de alergias y eccemas en comparación con los bebés alimentados con biberón. Debido a esto las fórmulas para lactantes intentan parecerse a la leche humana tanto como sea posible. Estas fórmulas reciben el nombre de fórmulas "humanizadas" para lactantes.

15 La osteopontina (OPN) es una proteína presente en la leche de mamíferos productores de leche, por ejemplo leche humana y bovina.

20 Hasta ahora se pensaba que la OPN contenida en la leche humana y en la leche bovina contenía OPN en casi la misma concentración. Por lo tanto no se había propuesto añadir OPN extra a las fórmulas para lactantes con objeto de humanizarlas.

25 Se estimó que el contenido de OPN en la leche humana era de aproximadamente 3-10 mg/litro. Sorprendentemente ahora se ha descubierto que la leche humana contiene, como promedio, aproximadamente 25 - 300 mg/litro, es decir, aproximadamente 5 - 10 veces más OPN que la leche bovina. Se dan casos de diferencias individuales.

30 También se ha observado que la OPN posee una función clave en la adquisición de respuestas Th-1. Desde el nacimiento los lactantes poseen principalmente respuestas Th-2, debido a los anticuerpos recibidos de la madre y la maduración de la respuesta inmunitaria en lactantes está mediada por la inducción/adquisición de respuestas Th-1. Por lo tanto se cree que la OPN es un componente esencial en la leche humana para la nutrición infantil.

35 La OPN es una proteína multifuncional, implicada en procesos tanto fisiológicos como patológicos en órganos y tejidos múltiples incluyendo biomineralización, inflamación, reclutamiento leucocitario y supervivencia celular (revisado en; Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J.2002. Osteopontin - a molecule for all reasons. Q. J. 95: 3-13; Denhart DT, Giachelli CM, Rittling SR.2001. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. 41: 4723-49). La OPN se expresa en diversos tipos de célula y en células epiteliales. Por consiguiente, la OPN está presente en la mayoría de tejidos y órganos que se han analizado para detectar su presencia. La OPN está presente en concentraciones relativamente elevadas en muchos fluidos corporales, tales como sangre, plasma, bilis, orina y leche. La OPN existe en isoformas específicas de tejido, por ejemplo, formas proteolíticamente truncadas, variantes de fosforilación y glucosilación etc., que pueden corresponder a funciones celulares particulares.

45 La OPN de leche bovina, la forma de la proteína mejor caracterizada, contiene 27 fosfoserinas, una fosfotreonina y tres treoninas O-glucosiladas (Sørensen ES, Højrup P, Petersen T. 1995. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: Identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylations sites. Protein Sci. 4: 2040-2049). Todas las fosforilaciones están situadas en secuencias de reconocimiento de ácidos de la caseína quinasa y caseína quinasa 2 de glándula mamaria (Sørensen ES, Petersen TE. 1994. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. Biochem.Biophys.Res.Comm.198: 200-205).

50 La OPN bovina y humana son muy homólogas conservándose todos los elementos funcionales entre las especies. En la Figura 1 se muestra un alineamiento de las dos proteínas. La secuencia de unión a integrina Arg-Gly-Asp es responsable de la unión a receptores celulares, la región rica en ácido poliaspártico está implicada en la unión a hidroxapatita, sales de calcio e iones y, lo que es más interesante, casi todos los restos de serina localizados en la secuencia de reconocimiento de la caseína quinasa de glándula mamaria que muestran estar fosforilados en la OPN bovina también están presentes en la secuencia humana. Del mismo modo, los restos de treonina que muestran estar glucosilados en la proteína bovina están también presentes en la proteína homóloga humana. Esta conservación de sitios y motivos de modificación postraducciona indica que pueden formarse péptidos bioactivos por digestión de la OPN humana y más probablemente también formarse por digestión de la OPN bovina. Por lo tanto, se piensa que la proteína bovina es muy adecuada para enriquecer, por ejemplo, fórmulas para lactantes y alimento para bebés.

65 El documento WO 02/28413 desvela la purificación de una fracción de proteína ácida de la proteína láctea por intercambio aniónico y el uso de esta fracción en composiciones sanitarias óseas. La fracción descrita contiene diversas proteínas séricas ácidas secundarias. Estas incluyen proteosa peptona componente 3, proteosa peptona componente 5 (PP5), también conocida como beta-caseína-5P (fl-1 05) o beta-caseína-5P (fl-107), proteosa peptona

8-lenta (PP8-lenta), conocida también como beta-caseína-1 P (f29-105) o beta-caseína-1P (f29-107), proteínas sialiladas y fosforiladas, alfa-s1-caseín fosfopéptidos y osteopontina y también una mezcla de péptidos derivados de estas proteínas así como pequeñas cantidades de betagalactoglobulina, albúmina de suero bovino e inmunoglobulinas. La fracción de proteína descrita en la invención puede usarse para la generación de alimentos
 5 funcionales para el tratamiento y/o la prevención de defectos óseos. La memoria descriptiva de patente no identifica la osteopontina como que es el componente activo en la fracción de proteína, y la memoria descriptiva de la patente no menciona el uso de osteopontina o de la fracción de proteína descrita con fines inmunoestimuladores o para la humanización de fórmulas para lactantes.

10 Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A, Tenen DG. 1989. Biochem.Biophys.Acta. 996: 43-48. Purificación de una proteína láctea humana muy similar a las fosfoproteínas segregadas en tumores y a la osteopontina, describe la presencia y purificación de la osteopontina en leche materna humana. Los autores estiman que la concentración de osteopontina en leche humana está en el intervalo de 3 -10 mg/litro. Esta estimación es más de 10 veces por debajo del valor que se mide en la presente invención.

15 Dhanireddy R, Senger R, Mukherjee BB, Mukherjee AB. 1993. Acta Paediatr. 82: 821-2. Osteopontina en leche humana de madres de lactantes prematuros, describe la presencia de osteopontina en leche de pretérmino. Las muestras de leche se caracterizan por transferencia de Western. Las concentraciones de OPN en las muestras no están determinadas. La presencia de OPN en la leche solo se comenta en relación con el transporte de calcio.

20 Sorensen S, Justesen SJ, Johnsen, AH. 2003. Protein Expression and Purification 30: 238-245. Purificación y caracterización de la osteopontina de leche humana, describe un nuevo protocolo para la purificación de osteopontina de leche humana. El artículo describe la purificación de diversos fragmentos y péptidos derivados de osteopontina así como de osteopontina intacta de longitud completa. La estimación de la concentración de
 25 osteopontina en leche humana se basa en la cantidad purificada mediante el procedimiento, y está generalmente de acuerdo con los hallazgos de Senger et al. 1989. Esta es más de 10 veces por debajo del valor de osteopontina medido por ELISA de tipo sándwich en la presente invención. El artículo también describe la producción de anticuerpos policlonales contra la osteopontina, pero estos no se usan para determinar la cantidad real de osteopontina en la leche. El artículo simplemente describe una manera de preparar la osteopontina y variantes de la
 30 misma para procedimientos de estandarización, producción de anticuerpos y estudios funcionales. El artículo no comenta o menciona la función de, o posible uso de, la osteopontina en relación con la leche, fórmulas para lactantes o cualquier otro producto alimenticio.

35 Choi, K. W. et al in "Purification and properties of osteopontin from bovine milk" (junio 2003) (XP002281089 nº de acceso en la base de datos PREV200300375294) desvelan leche bovina, que contiene 31,7-39,7 mg de osteopontina/litro.

40 Bayless, K. J. et al en "Isolation and Biological Properties of Osteopontin from Bovine Milk", Protein expression and purification, vol. 9, no. 3 (abril 1997), páginas 309-314, desvelan leche bovina que contiene 8 mg de osteopontina/litro.

El documento WO 01/11990 desvela una fórmula para lactantes.

45 Ensayos que determinan la concentración de OPN en la técnica anterior estiman el contenido en el intervalo de 3 - 10 mg/litro. Sin embargo, ensayos que determinan la concentración de OPN en la leche son difíciles de realizar debido, por ejemplo, a la interferencia de proteínas que forman agregados. Por lo tanto, el contenido de OPN en la leche no se ha determinado exactamente. Debido a esto la OPN no se ha añadido a fórmulas para lactantes, para obtener un producto que se asemeje a la leche materna con el efecto protector beneficioso contra el desarrollo de
 50 alergias. Por lo tanto, actualmente las fórmulas para lactantes están desprovistas de factores inmunoestimuladores, que puedan aumentar la adquisición de respuestas Th1.

Sumario de la invención

55 La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la OPN está presente a niveles elevados en la leche materna humana en comparación con la leche bovina. Estimaciones previas del contenido de OPN en la leche se han basado en análisis de transferencia de Western y purificación de proteínas, es decir 3 -10 mg/litro. El desarrollo de un ELISA cuantitativo dirigido frente a la OPN láctea ha conducido a un nuevo entendimiento en la concentración de OPN en la leche.

60 Por consiguiente la presente invención proporciona fórmulas para lactantes o alimento para bebés complementado con osteopontina láctea de origen no humano DL, en el que la osteopontina láctea está contenida en una cantidad que da como resultado al menos a 50-300 mg de osteopontina/litro en una fórmula de alimento preparado. En todas las fórmulas para lactantes conocidas la OPN puede incluirse como complemento o puede administrarse al lactante por separado de la fórmula que promueve la adquisición de respuestas Th1 y por tanto reduce la función inmunitaria
 65 deteriorada en lactantes.

La cantidad de osteopontina proporcionada al lactante, bien en una fórmula para lactantes o por separado de una fórmula para lactantes puede ser comparable a la encontrada en la leche materna humana. La osteopontina puede incorporarse en todas las fórmulas para lactantes humanos, tales como fórmulas para lactantes a base de leche bovina y a base de soja y en alimento para bebés tal como NAN[®] de Nestlé.

5 Todas las fórmulas para lactantes preparadas como fórmulas de inicio, fórmulas de continuación y fórmulas LBW (de bajo peso al nacer) pueden comprender OPN láctea.

10 Las fórmulas para lactantes deben comprender preferentemente OPN láctea en una cantidad de al menos el 1 % del contenido de proteína total correspondiente a la cantidad de OPN láctea en la leche materna.

Breve descripción de las Figuras

15 La Figura 1 muestra un alineamiento de OPN láctea bovina y humana. En negrita se muestran restos fosforilados en OPN bovina.

La Figura 2 muestra la expresión de IL-12 en linfocitos T intestinales humanos después de estimulación con OPN bovina.

20 Descripción detallada de realizaciones preferidas

En un gran número de recién nacidos no amamantados sino alimentados con fórmulas para lactantes, la adquisición de la respuesta inmunitaria Th1 puede retrasarse, aumentando así el riesgo de producirse reacciones alérgicas. Proporcionando a los recién nacidos no amamantados fórmulas para lactantes complementadas con OPN láctea en cantidades comparables a las de la leche humana, es posible que ocurra la inducción de la respuesta inmunitaria Th1.

Por tanto la invención propone una fórmula para lactantes o alimento para bebés complementado con osteopontina.

30 Las fórmulas para lactantes comprenden preferentemente osteopontina obtenida a partir de leche bovina DL. Sin embargo, las fórmulas para lactantes también pueden complementarse con osteopontina de leche de otros animales tales como cabra, oveja, camello, dromedario o llama.

35 Preferentemente las fórmulas para lactantes comprenden osteopontina en una cantidad correspondiente al 1 % del contenido de proteína total. Puede usarse tanto como un 3 %, y preferentemente usarse cantidades que sean mayores de 1,5 %, 2 % o 2,5 %. La cantidad de osteopontina láctea en las fórmulas preparadas para alimentar es de 50 - 300 mg/litro, preferentemente 100 - 200 mg/litro, prefiriéndose más una cantidad de 130 - 150 mg/litro. En muchos casos, se piensa que la mejor fórmula para lactantes es la proporciona 130 mg/litro.

40 Otro aspecto de la presente invención es el uso de osteopontina láctea como complemento en fórmulas para lactantes o alimento para bebés.

45 También se piensa que determinadas deficiencias inmunitarias se tratan proporcionando fórmulas con un complemento extra de osteopontina láctea.

Como se ha mencionado, la osteopontina láctea puede obtenerse de cualquier mamífero, tal como camello, cabra, oveja, llama y dromedario. Preferentemente la osteopontina se obtiene por purificación de leche bovina DL.

50 La osteopontina puede aplicarse a todas las fórmulas para lactantes conocidas, es decir fórmulas de inicio, fórmulas de continuación, fórmulas LBW (de bajo peso al nacer) y fórmulas para prematuros.

La concentración de osteopontina láctea puede depender de la posición geográfica, grupo étnico, modo de vida, alimentación, etc.

55 La osteopontina láctea también puede aplicarse a fórmulas para lactantes proporcionadas a otros mamíferos que no son seres humanos, tales como animales domésticos, de granja (cerdos, vacas, caballos, etc.) de compañía y de zoológico.

60 La leche extraída a diferentes días postparto puede usarse como una medición de la concentración de osteopontina en leche materna humana a diferentes momentos postparto. Esta medición puede usarse para tener diferentes niveles de OPN, por ejemplo, en fórmulas de inicio, fórmulas de continuación y fórmulas LBW.

También es posible medir el contenido de OPN en una leche materna y complementarla con OPN láctea extra si fuera necesario y dársela a su propio hijo o a otro niño.

65

La medición de OPN en leche humana puede realizarse usando ELISA u otros procedimientos inmunológicos tal como análisis de transferencia de Western.

5 En diversas realizaciones diferentes puede realizarse un ELISA, muchas de las cuales son aplicables en la presente invención. Una realización ELISA, que es particularmente adecuada para su uso en la presente invención, utiliza anticuerpos específicos contra OPN láctea natural.

10 Las fórmulas para lactantes de la presente invención se complementan con OPN láctea aislada de leche, sin embargo, se apreciará que la OPN láctea puede prepararse por medios recombinantes en células apropiadas que producen un patrón de fosforilación como el encontrado en la "OPN láctea". Las células preferidas para la expresión son las de la glándula mamaria, ya que puede esperarse que estas células produzcan un patrón de fosforilación idéntico o esencialmente idéntico.

15 Es bien conocido que las fórmulas para lactantes no poseen el mismo efecto inmunoestimulador que el de la leche materna y que los bebés amamantados tienen menos infecciones junto con un menor desarrollo de alergias y eccemas en comparación con los bebés alimentados con biberón. Una razón sería que la leche materna contiene grandes cantidades de OPN.

20 Definiciones

Como se usa en el presente documento el término "osteopontina" u "OPN" se usa para la osteopontina procedente de la leche, incluyendo fragmentos o péptidos de origen natural derivados de OPN por escisión proteolítica en la leche, o variantes de corte y empalme, fosforilación o glucosilación como las que pueden obtenerse a partir del método propuesto en el documento WO 01/49741.

25 La OPN láctea es OPN purificada y obtenida de muestras de leche de mamíferos.

La leche de mamíferos es leche de DL de cualquier animal productor de leche no humano, tal como vaca, camello, cabra, oveja, dromedario y llama.

30 La leche materna es leche extraída de madres humanas (sanas).

Las fórmulas para lactantes son fórmulas que cubren la nutrición necesaria de un lactante.

35 Las fórmulas de inicio son fórmulas para bebés que cubren sus necesidades nutritivas los 4-6 primeros meses.

Las fórmulas de continuación son fórmulas para bebés que cubren sus necesidades nutritivas después de los 4 primeros meses.

40 Las fórmulas LBW (*Low Birth Weight*, de bajo peso al nacer) son fórmulas que cubren las necesidades nutritivas de un lactante con bajo peso al nacer.

Las fórmulas para prematuros son fórmulas que cubren las necesidades nutritivas de un lactante prematuro.

45 La invención se ilustra adicionalmente en relación a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Extracción y tratamiento de muestras de leche

50 Se extrajeron muestras de leche materna humana de 10 madres sanas a los 10-58 días postparto. La leche se extrajo con un sacaleche y se muestrearon 2 ml de cada extracción y se agrupó para obtener leche de un día completo. La nata se extrajo de la leche entera por centrifugación a alta velocidad y se separó de la leche desnatada. La leche desnatada se dividió en alícuotas en fracciones de 0,2 ml y se analizó inmediatamente o se congeló a -20 °C hasta necesitarse.

60 Procedente de una lechería local se obtuvo leche de vaca reciente agrupada. La leche se obtuvo cuatro veces durante un periodo de 4 meses y se procesó individualmente. La nata se retiró por centrifugación y las muestras de leche se congelaron a -20 °C hasta necesitarse.

Medición de concentración de proteína total en leche

65 La concentración de proteína en todas las muestras de leche se determinó por análisis Bradford usando, como patrón, albúmina de suero bovino. Los análisis se realizaron de acuerdo con las descripciones proporcionadas por el fabricante.

ELISA para OPN en leche

La concentración de OPN en las leches individuales y en las fórmulas para lactantes disponibles en el comercio se midió mediante un ELISA tipo sándwich. Para este ensayo, se generó antisuero contra OPN bovina y humana, contra OPN natural purificada de leche bovina y humana, respectivamente, en conejos en Dako (Glostrup, Dinamarca). La OPN bovina se purificó esencialmente como se describe en (Sorensen ES, Petersen TE, 1993, Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk, J. Dairy Res. 60: 189-197). La OPN láctea humana se purificó esencialmente como se describe en (Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A, Tenen DG, 1989, Purification of a milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. Biochem.Biophys.Acta 996: 43-48). Para una pureza extra alta ambas proteínas se sometieron a cromatografía de fase inversa antes de la inmunización de los conejos. La fracción de IgG del antisuero se purificó por afinidad con Concavalina A y se usó directamente en el ELISA, o se purificó en una columna de afinidad de OPN para obtener anticuerpos altamente específicos. Las especificidades de los anticuerpos se comprobaron y se verificaron por análisis de transferencia de Western de muestras de leche y OPN purificada. El ELISA desarrollado era muy sensible con un límite de detección <5 ng/ml de leche, y linealidad en el intervalo de 10-300 ng/ml, por consiguiente las muestras de leche se diluyeron 2000-23000 veces antes del análisis. Todas las muestras se analizaron por triplicado en 6-12 diluciones por medición. La fiabilidad del ELISA se comprobó añadiendo muestras de leche con las cantidades de OPN conocidas que mostraban que el ensayo era cuantitativo con recuperación completa de la cantidad de OPN añadida en el intervalo usado para estas mediciones. Del mismo modo, la purificación de OPN de muestras de leche humana mostró rendimiento de OPN comparable con las concentraciones medias por ELISA.

Concentración de OPN en leche bovina

El nivel de OPN en leche bovina agrupada se determinó cuatro veces durante un periodo de 4 meses (Tabla 1). Se encontró que la concentración media de OPN era de 18,28 mg/litro. La proteína total se estableció a 35.000 mg/litro de acuerdo con la bibliografía. El contenido de OPN en leche bovina es 0,05 % (p/p) de la proteína total.

Tabla 1. Concentración de OPN en leche bovina

Leche bovina "muestra n ^o "	OPN (mg/litro)	Proteína total (mg/litro)	OPN/Proteína (%)
301002	17,84		
061102	19,37		
141101	17,91		
120203	18,01		
Media	18,28	~35.000	0,052

Concentración de OPN en leche humana

La leche de 10 madres, con una edad de 25-35 años (media de 29 años) se muestreó a los 10-58 días postparto (media de 21,6 días postparto) y se analizó con respecto a OPN y proteína total. En la tabla 2 se resumen los datos. La OPN en la leche materna varió de 22,44 mg/litro a 257,35 mg/litro con un valor medio de 138,5 mg/litro. La concentración de proteína total en la leche varió de 8327 mg/litro a 13268 mg/litro con un valor medio de 10821 mg/litro. La OPN aporta una media del 1,3 % (p/p) de la proteína total en leche humana y en una sola madre más del 3 % de la proteína láctea era OPN.

Tabla 2. Concentración de OPN en leche humana.

	Edad de la madre	Días postparto	Concentración de OPN (mg/litro)	Concentración de proteína total (mg/litro)	Proteína OPN (%)
	28	59	65,97	8550	0,77
	35	13	257,35	8327	3,09
	28	12	200,52	13268	1,50
	30	10	238,69	12628	1,89
	25	12	22,44	11442	0,20
	30	33	101,54	10000	1,02

	31	39	113,96	10157	1,12
	30	17	67,04	10328	0,65
	23	12	212,00	10936	1,94
	30	10	105,00	12576	0,83
Media	29	21.6	138,4	10821	1,3

Hay una variación considerable en la concentración de OPN en relación con la proteína total en madres individuales. En todas las madres, la proporción OPN/proteína total fue significativamente más alta que el valor correspondiente para la leche bovina. Estas mediciones muestran que la concentración media de OPN relacionada con proteína total en leche humana (1,3 %) comparada con leche bovina (0,05 %) es aproximadamente 26 veces más alta. Este valor medio cubre variaciones individuales en el intervalo de 4 a 62 veces el valor de la leche bovina.

5

Concentración de OPN en fórmulas para lactantes disponibles en el comercio

10 Los datos se calcularon como mg de OPN/litro, en una fórmula de alimento preparado, basada en 125 g/litro.

Tabla 3

Procedente de la firma	Fórmula para lactante	Contenido de OPN, mg/litro
Nam Yang	Science 1	11,5
	Science 2	9,4
	Agisarang 3	12,3
	Agisarang 4	17,4
	XO1	7,9
	XO2	6,2
	XO3	8,4
	XO4	6,7
	Agisarang soo	5,5
	Imperial Dream	6,0
	Science	17,8
	Premium XO	13,0
Nestlé	Nan 1	10,3
	Nidina 1	5,3
Beauvais	Allomin 2	6,4

La osteopontina bovina induce la expresión de IL-12 en células intestinales humanas

15

Se obtuvieron células intestinales humanas y se cultivaron en presencia de IL-2 e IL-4 esencialmente como se describe en (Agnholt J, Kaltoft K, 2001. Infliximab downregulates interferon production in activated gut T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. Cytokine.15: 212-222). El cultivo en presencia de IL-2 e IL-4 promueve el crecimiento de linfocitos T con características celulares conservadas tales como expresión de los receptores; TCR $\alpha\beta$ +, CD4+CD45RO+.

20

Se revistieron pocillos de cultivo celular con 1 ml de solución PBS- osteopontina (1 mg/ml) y PBS, respectivamente, durante una noche a 4 °C. Los pocillos se vaciaron y se cultivaron linfocitos T en los pocillos (10⁶ células/ml) durante 24 horas y posteriormente, para el análisis, se muestrearon alícuotas de los sobrenadantes celulares.

25

Se obtuvieron pares de anticuerpos emparejados con citocinas para la determinación de IL-12 de R&D Systems. Todos los anticuerpos de detección estaban marcados con biotina. Para determinar el contenido de IL-12 se utilizó un ensayo fluorométrico resuelto en tiempo aplicando estreptavidina marcada con Europio (Eu³⁺) y un flujómetro Delphia 1234 (Wallac, Turku, Finlandia). Los valores obtenidos son medias de tres lecturas de ensayo ELISA en experimentos realizados por triplicado.

Tabla 4. Expresión de IL-12 en células inmunitarias intestinales humanas después de estimulación con osteopontina bovina

	IL-12 (pg/ml)
	Media (desviación típica)
Células control	3,3 (+/- 3,2)
+ Osteopontina	16,7 (+/-2,1)

Como se muestran en la tabla 4 y en la figura 2, puede observarse un aumento significativo en la expresión de IL-12 en las células inmunitarias humanas estimuladas con osteopontina bovina natural.

En este caso se muestra que la OPN bovina natural puede inducir la expresión de la citocina IL-12 Th-1 en células inmunitarias intestinales humanas no activadas, lo que indica contundentemente una función en la regulación de la inmunidad intestinal.

Mezcla de fórmulas para lactantes que comprenden OPN

En los siguientes ejemplo, se considera que un nivel de OPN de 100 - 130 mg/litro es una cantidad adecuada en fórmulas para lactantes. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado a esta cantidad ya que pueden existir variaciones en las composiciones de leche humana debido a la alimentación, estilo de vida, área geográfica, grupo étnico, etc.

Incorporadas en los ejemplos de la presente invención se encuentran las composiciones de fórmulas para lactantes, que se han preparado, basándose en la legislación de los Estados Unidos y en las recomendaciones para las fórmulas para lactantes.

En relación con esto, solo se toma en cuenta la cantidad de proteína, ya que se espera que las otras partes del producto no cambien. Se ha seleccionado aplicar 100 mg de OPN/1000 ml para todos los productos, sin embargo también es posible y está dentro del ámbito de la presente invención aplicar OPN de acuerdo con el propio nivel de proteína.

La leche de vaca contiene OPN en el intervalo de 15 - 20 mg/litro que es al menos 5 veces por debajo del contenido de OPN en leche humana medido en los ejemplos en la presente invención para una media de 138,4 mg/litro. La OPN en el intervalo de 15 - 20 mg/litro corresponde al 0,05 % del contenido de proteína total en leche bovina. Esta cifra es aproximadamente 26 veces más baja que el 1,3 % (OPN/proteína total) medida en leche humana en los ejemplos de la presente invención.

En los cálculos de la presente invención se ha supuesto que la OPN está contenida en la parte del suero de la leche y el nivel será por lo tanto de aproximadamente 18 mg/100 g en leche en polvo y aproximadamente 360 mg/100 g en polvo WPC80. Debido a estos números se ha calculado el nivel, que se espera que provenga de los ingredientes usados.

En algunos de los siguientes ejemplos la parte de proteína de suero se ha reducido por la cantidad de OPN adicional ya que se considera que la glucoproteína permanece en el suero después de la precipitación de caseína rennet a un pH de aproximadamente 6,2 y de caseína ácida a un pH de 4,6.

El nivel de proteína para fórmulas de lactantes puede calcularse de la siguiente manera:

Fórmulas de inicio

Las fórmulas de inicio son fórmulas para bebés que cubren sus necesidades nutritivas los 4-6 primeros meses.

Requisitos reguladores para el contenido de proteínas en los Estados Unidos.

Fuente: notificación nº 202 en lo que respecta a fórmulas para lactantes y complementos para recién nacidos y bebés:

Proteínas:

Contenido de proteínas = contenido de nitrógeno x 6,38 cuando son proteínas de leche de vaca

5 **Contenido de proteínas = contenido de nitrógeno x 6,25 cuando son aislados de proteínas de leche de soja y proteínas parcialmente hidrolizadas.**

Contenido de proteínas = contenido de nitrógeno x 6,25 cuando son aislados de proteínas de leche de soja y proteínas parcialmente hidrolizadas.

10 El índice químico significa la relación más baja entre la cantidad de aminoácidos esenciales en la proteína presente y la cantidad del aminoácido correspondiente en la proteína de referencia.

Productos basados en leche de vaca:

	Mínimo	Máximo
Fórmulas de inicio	0,45 g/100 kJ (1,8 g/100 kcal)	0,7 g/100 kJ (3 g/100 kcal)

15 Al mismo contenido energético el producto debe contener una cantidad accesible de aminoácidos esenciales y semi-esenciales que la proteína de referencia (leche materna como se define en el anexo 6); al cálculo puede añadirse el contenido de metionina y cisteína.

20 Productos basados en proteína parcialmente hidrolizada:

	Mínimo	Máximo
Fórmulas de inicio	0,56 g/100 kJ (2,25 g/100 kcal)	0,7 g/100 kJ (3 g/100 kcal)

25 Al mismo contenido energético el producto debe contener una cantidad accesible de aminoácidos esenciales y semi-esenciales que la proteína de referencia (leche materna como se define en el anexo 6); al cálculo puede añadirse el contenido de metionina y cisteína.

30 La relación de eficiencia proteica (REP) y la utilización de proteína neta (UPN) deben correlacionarse al menos con la caseína. El contenido de taurina debe ser de al menos de 10 $\mu\text{mol}/100 \text{ kJ}$ (42 $\mu\text{mol}/100 \text{ kcal}$) y el contenido de L-carnitina debe ser al menos de 1,8 $\mu\text{mol}/100 \text{ kJ}$ (7,5 $\mu\text{mol}/100 \text{ kcal}$).

Productos basados exclusivamente en aislados de proteína de soja o en composiciones junto con proteínas de leche de vaca:

	Mínimo	Máximo
Fórmulas de inicio	0,56 g/100 kJ (2,25 g/100 kcal)	0,7 g/100 kJ (3 g/100 kcal)

35 Solo pueden usarse aislados de proteína de soja en estas fórmulas para lactantes. El índice químico de las proteínas debe ser al menos el 80 por ciento de la proteína de referencia (leche materna definida en el anexo 7 en la notificación).

40 Al mismo contenido energético el producto debe contener al menos una cantidad accesible de metionina comparable a la de la proteína de referencia (leche materna). El contenido de L-carnitina debe ser al menos de 1,8 $\mu\text{mol}/100 \text{ kJ}$ (7,5 $\mu\text{mol}/100 \text{ kcal}$).

Los aminoácidos solo pueden aplicarse a productos para potenciar el valor nutricional y solo en proporciones, necesarias para conseguir el objetivo.

45 Ejemplos: mezcla para fórmulas de inicio
Energía: 2200 kJ/100 g/525 kcal/100 g
Reconstitución: 125 g por litro

50 Fórmula tradicional de inicio para lactantes

	Gramos en polvo por 100 g	Gramos reconstituídos por litro	Gramos por 100 kcal	Gramos por 100 kJ

ES 2 444 843 T3

Proteína total*	12	15	2,29	0,550
Caseína	4,8	6,1	0,91	0,220
Proteína de suero	7,2	9,1	1,38	0,330
*de esta OPN	0,030	0,038	0,006	0,001
Relación Caseína/ Proteína de Suero	40/60			

Fórmula de inicio para lactantes que comprende OPN

	Gramos en polvo por 100 g	Gramos reconstituidos por litro	Gramos por 100 kcal	Gramos por 100 kJ
Proteína total*	12	15	2,29	0,550
Caseína	4,80	6,1	0,91	0,220
*de esta OPN	0,030	0,038	0,006	0,001
Proteína de suero	7,12	9,0	1,36	0,326
OPN añadida	0,074	0,092	0,014	0,003
Relación Caseína/ Proteína de suero	40/60			

5 Fórmulas de continuación

Requisitos reguladores para el contenido de proteínas en los Estados Unidos.

Fuente: notificación nº 202 con respecto a fórmulas para lactantes y complementos para recién nacidos y bebés:

10

Proteínas:

Contenido de proteína = contenido de nitrógeno x 6,38 cuando son proteínas de leche de vaca

15 **Contenido de proteína = contenido de nitrógeno x 6,25 cuando son aislados de proteínas de leche de soja**

El índice químico significa la relación más baja entre la cantidad de aminoácidos esenciales en la proteína presente y la cantidad del aminoácido correspondiente en la proteína de referencia.

20 Productos basados en leche de vaca:

	Mínimo	Máximo
[Fórmulas de continuación]	0,50 g/100 kJ (2,25 g/100 kcal)	1 g/100 kJ (4,5 g/100 kcal)

25 El índice químico de las proteínas debe ser al menos el 80 por ciento de la proteína de referencia (leche materna definida en el anexo 7 en la notificación). Solo pueden usarse aislados de proteína de soja en estas fórmulas para lactantes. Los aminoácidos solo pueden aplicarse a productos para potenciar el valor nutricional y solo en las relaciones necesarias para alcanzar el objetivo.

30 Al mismo contenido energético el producto debe contener una cantidad accesible de aminoácidos esenciales y semi-esenciales que la de la proteína de referencia (leche materna definida en el anexo 6); al cálculo puede añadirse el contenido de metionina y cisteína.

Ejemplos:

35 Energía: 2170 kJ/100g (520 kcal/100g)
Reconstitución: 150 g por litro

Fórmulas de continuación tradicionales

ES 2 444 843 T3

	Gramos en polvo por 100 g	Gramos reconstituidos por litro	Gramos por 100 kcal	Gramos por 100 kJ
Proteína total*	15	22,5	2,89	0,690
Caseína	12	18	2,31	0,554
Proteína de suero	3	4,5	0,58	0,138
*de esta OPN	0,007	0,011	0,001	0,000
Relación Caseína/Proteína de suero	80/20			

Fórmula de continuación que comprende OPN

	Gramos en polvo por 100 g	Gramos reconstituidos por litro	Gramos por 100 kcal	Gramos por 100 kJ
Proteína total*	15	22,5	2,89	0,690
Caseína	12	18	2,31	0,554
Proteína de suero	2,92	4,4	0,56	0,134
*de esta OPN	0,007	0,011	0,001	0,000
Relación Caseína/Proteína de suero	0,078	0,117	0,015	0,004
Proteína total*	80/20			

5

Fórmulas para lactantes de bajo peso al nacer (LBW)

10 Actualmente no existe legislación en este campo, sin embargo está en proceso. Los fabricantes de fórmulas para lactantes LBW están actualmente recibiendo recomendaciones de pediatras y del "IDACE proposal for guidelines on compositions of low-birth-weight formulae for marketing in the European Union". Se espera que estas directrices proporcionen la base para la próxima legislación en los Estados Unidos.

Proteínas:

15 **Contenido de proteína = nitrógeno x 6,38 para proteínas de leche de vaca y de leche de vaca hidrolizadas**

Productos basados en proteínas de leche de vaca y de leche de vaca hidrolizadas.

	Mínimo	Máximo
Bajo peso al nacer	0,6 g/100 kJ (2,4 g/100 kcal)	0,8 g/100 kJ (3,3 g/100 kcal)

20 Las fórmulas han de contener una cantidad accesible de cada aminoácido esencial y semi-esencial al menos comparable a la del contenido en la proteína de referencia (leche materna). A diferencia de las fórmulas convencionales para lactantes la cantidad de metionina y de cisteína no puede añadirse con fines de cálculo. El contenido de taurina debe ser al menos de 1,3 mg/100 kJ (5,3 mg/100 kcal).

25 Ejemplo

Energía: 315 kJ / 100 ml (75 kcal/100 ml)
Reconstitución: 150 g por litro

30

Fórmula LBW tradicional

	Gramos en polvo por 100 g	Gramos reconstituidos por litro	Gramos por 100 kcal	Gramos por 100 kJ
Proteína total*	15	22,5	3	0,718
Proteína de suero hidrolizada	14,96	22,44	2,992	0,716
*de esta OPN	0,067	0,101	0,012	0,002
Taurina	0,04	0,06	0,008	0,002

Fórmula LBW que comprende OPN:

5

	Gramos en polvo por 100 g	Gramos reconstituidos por litro	Gramos por 100 kcal	Gramos por 100 kJ
Proteína total*	15	22,5	3,000	0,718
Proteína de suero hidrolizada	14,89	22,34	2,972	0,712
*de esta OPN	0,067	0,101	0,012	0,002
Taurina	0,04	0,06	0,008	0,002
OPN añadida	0,023	0,034	0,005	0,002

Figuras

- 10 Figura 1. Alineamiento de OPN humana y bovina. La identidad se indica con dos puntos y los aminoácidos homólogos se indican con un solo punto. Los restos fosforilados en la OPN bovina se indican en negrita. El triplete de unión a integrina RGD (Arg-Gly-Asp) y la región que contiene las glucosilaciones en la secuencia bovina se indican subrayados.
- 15 Figura 2. Expresión de IL-12 de linfocitos T estimulados con OPN bovina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Fórmula para lactantes o alimento para bebés complementado con osteopontina láctea de origen mamífero no humano, en la que la osteopontina láctea está contenida en una cantidad que da como resultado al menos 50-300 mg de osteopontina/litro en una fórmula de alimento preparado.
- 10 2. Fórmula para lactantes o alimento para bebés de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la osteopontina láctea se obtiene de leche bovina.
- 15 3. Fórmula para lactantes o alimento para bebés de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la osteopontina láctea está contenida en una cantidad que da como resultado al menos 50-250 mg de osteopontina/litro en la fórmula de alimento preparado.
- 20 4. Fórmula para lactantes o alimento para bebés de acuerdo con la reivindicación 3 en la que la osteopontina láctea está contenida en una cantidad que da como resultado al menos 100-200 mg de osteopontina/litro en la fórmula de alimento preparado.
- 25 5. Fórmula para lactantes o alimento para bebés de acuerdo con la reivindicación 4 en la que la osteopontina láctea está contenida en una cantidad que da como resultado al menos 130-150 mg de osteopontina/litro en la fórmula de alimento preparado.
- 30 6. Fórmula para lactantes o alimento para bebés de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la fórmula para lactantes es una fórmula de inicio.
- 35 7. Fórmula para lactantes o alimento para bebés de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la fórmula para lactantes es una fórmula de continuación.
- 40 8. Uso de osteopontina láctea como complemento en fórmulas para lactantes o alimento para bebés.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 en el que la osteopontina láctea se obtiene a partir de leche humana o bovina.
10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 en el que la osteopontina láctea está contenida en una cantidad que da como resultado al menos 50-300 mg de osteopontina/litro en la fórmula de alimento preparado.
11. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en el que la fórmula para lactantes es una fórmula de inicio.
12. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en el que la fórmula para lactantes es una fórmula de continuación.

Fig. 1.

Hum	IPVKQADSGSSEEKQLYNKYPDVAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQET
Bov	LPVKPTSSGSSEEKQLNNKYPDAVAIWLPDPSQKQTFLLAPQNSVSSEETDDNKQNT
Hum	LPSKSNESHDMDDMDEDDDDHVDSDSIDSNDSDDDVDDTDDSHQSDESHHSDESD
Bov	LPSKSNESPEQTDLDLDDDDN----SQD-VNSNDSDDAETTDDPDHSDESHHSDESD
Hum	ELVTDFPDLPATEVFTPVVPTVDTYDGRGDSVVYGLRSKSKKFRFPDIQYPDATDE
Bov	EV--DFPTDIPTIAVFTPFIPTESANDGRGDSVAYGLKSRSKKFRRSNVQSPDATEE
Hum	DITSHMESEELNGAYKAI PVAQDLNAPSDWDSRGKDSYETSQLDDQSAETHSHKQSR
Bov	DFTSHIESEEMHDAPK-----KTSQLTDHSKETNSSELSK
Hum	LYKRKANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDMLVDPKSKEEDKHLKFR
Bov	ELTPKRKDK-NKHSNLIESQENSKLS-----QEFHSLEDKLDLDHKS-EEDKHLKIR
Hum	ISHELDSASSEVN
Bov	ISHELDSASSEVN

Fig. 2.

