

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 844**

51 Int. Cl.:

**A23L 3/3454** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2014 PCT/EP2014/077481**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15086788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2014 E 14820785 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 3082455**

54 Título: **Uso de una fórmula para bebés que contiene suero lácteo dulce, para promover el desarrollo neuronal postnatal del tubo digestivo de bebés, y el establecimiento de las funciones intestinales que controla**

30 Prioridad:

**13.12.2013 EP 13197197**

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

**16.11.2018**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)  
Avenue Nestlé 55  
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**FAURE, MAGALI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 689 844 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

Uso de una fórmula para bebés que contiene suero lácteo dulce, para promover el desarrollo neuronal postnatal del tubo digestivo de bebés, y el establecimiento de las funciones intestinales que controla

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, al campo de la salud, protección y desarrollo neuronal. La invención se refiere específicamente a la administración de proteína lactosérica dulce para promover el desarrollo neuronal entérico en bebés, especialmente en bebés prematuros, con bajo, muy bajo, y extremadamente bajo peso al nacer.

10

Antecedentes de la invención

El sistema nervioso es una red muy compleja, compuesta por neuronas y gliocitos. Está presente en todas las especies de mamíferos y está compuesto por el sistema nervioso central (cerebro y médula espinal) y el sistema nervioso periférico (sistema nervioso somático, autónomo y entérico).

15

El sistema nervioso central dirige las funciones cognitivas (memoria, atención, percepción, acción, etc.). Junto con el sistema nervioso periférico, tiene un papel fundamental en el control del comportamiento. El sistema nervioso somático es responsable de la coordinación de los movimientos corporales (con control consciente). El sistema nervioso autónomo mantiene la homeostasis en las actividades corporales sin control consciente (frecuencia cardíaca, etc.). Por último, y como parte del último sistema, el sistema nervioso entérico controla directamente las funciones del tubo digestivo. Estas incluyen la función inmunitaria y de barrera, la motilidad, la absorción, la digestión y las secreciones exocrinas/endocrinas del tubo digestivo, que contribuyen a la protección del intestino frente a cualquier tipo de lesión y al bienestar del aparato digestivo [Neunlist, M. et al. (2008); Neuro-glia crosstalk in inflammatory bowel disease, *J Intern. Med*, 263: 577-583], [Burns, A.J. et al. (2009); Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages, *Semin. Pediatr. Surg.*, 18: 196-205], [Tapper E.J. (1983); Local modulation of intestinal ion transport by enteric neurons, *Am J Physiol.*, 244: G457-68].

20

25

30

El sistema nervioso se desarrolla durante la gestación y después se redefine hasta llegar a ser una red madura y funcional durante el período postnatal (posterior al nacimiento).

35

Debido al papel crítico del sistema nervioso entérico en la función digestiva, la inmadurez o retraso de maduración del sistema nervioso conducirá a un retraso del establecimiento y funcionamiento adecuado de las principales funciones digestivas. En particular, contribuirá a:

- la inmadurez de la motilidad digestiva [Burns, A.J. et al. (2009); Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages, *Semin. Pediatr. Surg.*, 18: 196-205], que dará como resultado un tránsito intestinal más lento con heces más duras que conducirá a molestias intestinales y, en casos más, extremos a estreñimiento, con una mayor predisposición del bebé a intolerancia alimentaria enteral, a una necesidad de nutrición parenteral total y, en casos más graves, a enterocolitis necrotizante (ECN) (Grave GD, Nelson SA, Walker WA, Moss RL, Dvorak B, Hamilton FA, Higgins R, Raju TN. New therapies and preventive approaches for necrotizing enterocolitis: report of a research planning workshop. *Pediatr Res. Oct. de 2007*; 62(4): 510-4; Indrio F, Riezzo G, Cavallo L, Di Mauro A, Francavilla R. Physiological basis of food intolerance in VLBW. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011 Oct; 24 Sup. 1:64-6
- reducir la capacidad intestinal digestiva/de absorción [Tapper, E.J. (1983); Local modulation of intestinal ion transport by enteric neurons, *Am J Physiol.*, 244: G457-68]; Josef Neu y Liyan Zhang, Feeding intolerance in very low birth weight infants: What is it and what can we do about it? *Acta Paediatrica* 2005; 94(sup. 449): 93-99]
- la inmadurez de la función de la barrera intestinal [Neunlist, M. et al. (2008); Neuro-glia crosstalk in inflammatory bowel disease, *J Intern. Med*, 263: 577-583, Burns, A.J. et al. (2009)], que aumenta el riesgo de infecciones, intolerancia alimentaria enteral y enterocolitis necrotizante (NEC) [Athalye-Jape G, More K, Patole S Progress in the field of necrotizing enterocolitis--year 2012.. *J Matern Fetal Neonatal Med.* Mayo de 2013; 26(7): 625-32; Indrio F, Riezzo G, Cavallo L, Di Mauro A, Francavilla R. Physiological basis of food intolerance in VLBW. *J Matern Fetal Neonatal Med.* Oct. de 2011; 24 Sup. 1: 64-6]

40

45

50

55

60

Un sistema nervioso entérico inmaduro o afectado puede observarse en bebés tal como:

- Bebés prematuros, con bajo (<2500 g), muy bajo (<1500 g) y extremadamente bajo (<1000 g) peso, al nacer; New J. Digestivo development and meeting the nutritional needs of premature infants *Am J Clin Nutr* 2007; 85(2): 629S-634S.
- Bebés prematuros o a término con un retraso de crecimiento intrauterino (RCIU) producido después de cualquier acontecimiento adverso durante la gestación (madre fumadora, madre con tratamiento farmacológico, baja

65

calidad de la placenta, colocación incorrecta de la placenta, malnutrición de la madre y del feto, exceso de estrés/ansiedad de la madre, etc.); [Shanklin D.R. y Cooke R.J. (1993); Effects of intrauterine growth on intestinal length in the human foetus, *Biol Neonate*, 64:76-81], [Neu, J. (2007); Digestivo development and meeting the nutritional needs of premature infants, *Am. J. Clin. Nutr.*, 85(2): 629S-634S], [Brandão, M.C.S. et al., (2003); Effects of pre- and postnatal protein energy deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weanling rats, *Nutr. Res.*, 23: 215-223].

- Cualquier neonato y niño pequeño que muestre retraso del crecimiento del sistema nervioso después de, por ejemplo, hipoxemia-isquemia al nacer o cualquier otro acontecimiento adverso [Taylor, C.T. y Colgan S.P. (2007); Hypoxia and digestive disease, *J. Mol. Med. (Berl.)*, 85:1295-300], [Barrett R.D. et al. (2007); Destruction and reconstruction: hypoxia and the developing brain, *Birth Defects Res C Embryo Today*, 81: 163-76].
- Cualquier neonato y niño pequeño que muestre alteraciones digestivas (trastornos digestivos, trastornos relacionados de motilidad, reflujo digestivo, tránsito digestivo lento, intolerancia a la alimentación oral), enfermedad de Hirschsprung e inflamación que afecte al tubo digestivo (tal como enterocolitis necrotizante) y patologías relacionadas con la obstrucción [Burns A.J. et al. (2009); Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages, *Semin. Pediatr Surg.*, 18(4): 196-205].

Se sabe que, en seres humanos, las células de la cresta neural, de la cual procede el sistema nervioso entérico, se desarrollan en el feto cuando está en el útero, en fases muy tempranas después de la concepción (a partir de 7,5 semanas de desarrollo) [Burns, A. J. y Thapar, N. (2006); Advances in ontogeny of the enteric nervous system, *Neurogastroenterol. Motil.*, 18, 876-887]. Se ha observado que el sistema nervioso entérico experimenta cambios importantes después del nacimiento hasta los seis años, continuando con cambios más minoritarios hasta los diez años [Wester, T. et al. (1999); Notable postnatal alterations in the myenteric plexus of normal human bowel, *Gut*, 44: 666-674]. Por tanto, si el feto, neonato o bebé ha tenido un retraso en el crecimiento del sistema nervioso, es deseable que este retraso se invierta rápidamente de tal manera que el desarrollo del sistema nervioso "alcance" un nivel normal. Es deseable que cualquier daño causado al sistema nervioso entérico se repare tan pronto como sea posible, de tal manera que el feto o el bebé en crecimiento apenas sufra alguna alteración intestinal u otras patologías asociadas a un sistema nervioso entérico inmaduro o dañado.

Por tanto, el desarrollo saludable del sistema nervioso entérico en el feto, neonato y niño en crecimiento ayuda a controlar el establecimiento y mantenimiento correctos de la motilidad intestinal, la función de la barrera intestinal, y por tanto, las funciones de absorción y digestión del intestino. Esto evita estados patológicos inflamatorios asociados a alteraciones intestinales y también reduce el riesgo de que se produzcan infecciones y alergias (Neunlist et al. 2008)

Por tanto, las intervenciones peri- y/o pos-natales corresponden a una estrategia prometedora para garantizar el desarrollo saludable del sistema nervioso entérico. Las intervenciones durante el embarazo/lactancia pueden tener ventajas considerables en cuanto a conveniencia y cumplimiento terapéutico en comparación con las intervenciones dirigidas a niños.

Hay una necesidad de promover y reforzar el desarrollo saludable y/o reparación del sistema nervioso entérico en una fase lo más temprana posible durante la gestación así como durante las fases tempranas de la vida del recién nacido, cuando el sistema nervioso madura rápidamente. Dado que el sistema nervioso continúa desarrollándose durante los primeros años de la infancia (hasta aproximadamente los diez años de edad), durante este periodo de tiempo existe esta necesidad de refuerzo continuo. En particular, hay una necesidad de reforzar el desarrollo saludable del sistema nervioso entérico en neonatos, bebés y niños pequeños, para prepararlos mejor frente a desafíos digestivos, tales como cambios de alimentación, productos químicos (por ejemplo, medicamentos) o lesiones físicas (abrasión), infecciones, reacciones inflamatorias/inmunitarias, etc., así como para potenciar la futura maduración de su sistema nervioso entérico durante su vida posterior.

Para esta finalidad o finalidades relacionadas, se han desvelado composiciones que, como principios activos, comprenden lactoferrina, probióticos, fibra soluble y/o LCPUFA (del inglés *Long-chain polyunsaturated fatty acids*, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga), por ejemplo, en los documentos US 2012/0184483; US 2012/0219526; EP 2 609 813; US 2007/0031537 y US 2013/0280225. Hay una necesidad de mejorar dicho refuerzo o dicha composición relacionada, en una forma que sea bien aceptada por la población en cuestión, en particular aquellas poblaciones que sean más frágiles y que más lo necesiten. Existe una necesidad adicional de no inducir desventajas, efectos secundarios o negativos en dicha población. Existe una necesidad de proporcionar dichas soluciones a las poblaciones en cuestión de una manera más sencilla y rentable.

La presente invención se aplica a seres humanos.

#### Sumario de la invención

La invención se define a través de las reivindicaciones y se refiere al uso de proteína lactosérica dulce (PLD) para promover el desarrollo saludable y/o reparar el sistema nervioso entérico en neonatos. La proteína lactosérica dulce

puede ser proteína lactosérica dulce modificada (PLDM), de la que se ha eliminado el caseinoglucomacropéptido (CGMP). La PLD puede hidrolizarse parcial o ampliamente. Más específicamente, la presente invención se refiere a proteína lactosérica dulce para su uso en la prevención y el tratamiento de al menos un trastorno asociado a un sistema nervioso entérico inmaduro o afectado en un bebé o un niño pequeño, en el que en la proteína lactosérica dulce se administra al bebé o al niño pequeño como una dosis diaria de 30 a 80 % de la ingesta de proteína total. La administración de la proteína lactosérica dulce promueve el desarrollo normal y saludable de neuronas y gliocitos en el intestino. También garantiza la diferenciación neuronal saludable en el sistema nervioso periférico. Por tanto, la administración de la PLD según la invención impide y trata trastornos asociados a un sistema nervioso entérico inmaduro o afectado. La administración de la PLD según la invención promueve el desarrollo saludable y/o la reparación del sistema nervioso entérico en mamíferos pequeños.

El trastorno puede ser disfunción de la barrera intestinal, intolerancia a los alimentos o enterocolitis necrotizante. El trastorno puede ser uno que esté directamente asociado a disfunción de la barrera intestinal. Más generalmente, el trastorno puede ser una motilidad digestiva disfuncional que puede manifestarse como una reducción del tránsito intestinal, molestias intestinales, heces duras, estreñimiento y/o reflujo digestivo.

La administración de la proteína lactosérica dulce puede ser a un bebé prematuro o nacido a término, bien directamente o mediante la leche materna. La administración también puede ser a un niño, generalmente hasta los seis años, o la edad equivalente en un animal.

La proteína lactosérica dulce puede administrarse directamente al bebé, o al bebé que ya da sus primeros pasos (*toddler*), en su forma pura, o diluida en agua o en leche materna, en un complemento alimentario, o junto con un fortificante lácteo o cualquier refuerzo lácteo utilizado durante la alimentación trófica, en un preparado para bebés, o en una bebida láctea. La proteína lactosérica dulce se administra al bebé, o al niño pequeño, como una dosis diaria de 30 a 80 %, preferentemente 60 % p/p, de la ingesta de proteína total.

El periodo de administración para el bebé o niño pequeño es generalmente de al menos 4 meses, preferentemente de 2-12 meses, y más preferentemente de al menos 18 meses e incluso más preferentemente hasta que el niño tiene seis años.

La PLDM puede administrarse a un bebé prematuro o nacido a término, o a un niño o adulto joven, como una dosis de 1,6-3,2 g de proteína/100 kcal, preferentemente, 1,6-2,2 g de proteína/100 kcal, y más preferentemente 1,8-2,1 g de proteína/100 kcal. En una realización, la PLDM se administra al niño como una dosis de 1,0 a menos de 1,6 g de proteína/100 kcal.

La invención se refiere a una composición que comprende 30-80 %, preferentemente 60 % de proteína lactosérica dulce, para la prevención o el tratamiento de trastornos asociados al sistema nervioso entérico inmaduro o afectado en un mamífero joven. También se desvela el uso de una PLD, y más particularmente a composiciones que comprenden PLD del 30-80 % p/p, para promover el desarrollo saludable y/o reparar el sistema nervioso entérico en mamíferos jóvenes.

#### Breve descripción de los dibujos

Figura 1 Estimulación con campo eléctrico de la respuesta contráctil *ex vivo* en el yeyuno:

Tensiones (área bajo la curva (ABC)) obtenidas por contracciones isométricas del yeyuno en respuesta a estimulación con campo eléctrico a 10 Hz en crías CTRL-a, RP-a y RP complementadas con diferentes fracciones lácteas, medidas en el momento del sacrificio (14 días después del nacimiento). Los resultados son medianas  $\pm$  ETM (error típico de la media), n=6 a 10 dependiendo del grupo, P<0,05 \* frente a CTRL-A y † frente a RP-A. Las abreviaturas son RP: restricción de proteínas; A: agua, PLDM28: proteína lactosérica modificada 28; concentrado de FC: concentrado de factor de crecimiento.

Figura 2 Estimulación con acetilcolina de la respuesta contráctil *ex vivo* en el yeyuno:

Tensiones (área bajo la curva (ABC)) obtenidas por contracciones isométricas del yeyuno en respuesta a acetilcolina a una concentración de  $10^{-6}$  en crías CTRL-a, RP-A y RP complementadas con diferentes fracciones lácteas, medidas en el momento del sacrificio (14 días después del nacimiento). Los resultados son medianas  $\pm$  ETM, n=6 a 10 dependiendo del grupo, P<0,05 \* frente a CTRL-A y † frente a RP-A. Las abreviaturas son RP: restricción de proteínas; A: agua, PLDM28: proteína lactosérica modificada 28; concentrado de FC: concentrado de factor de crecimiento.

#### Descripción detallada

##### Definiciones:

En esta memoria descriptiva, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

“Bebés”: según la Directiva de la Comisión 2006/141/EC del 22 de diciembre de 2006 sobre fórmulas para bebés y fórmulas de seguimiento, artículo 1.2 (a), el término “bebé” significa niño menor de 12 meses.

“Neonato” significa generalmente un bebé hasta los 6 meses.

“Bebé prematuro” se refiere en general a un bebé nacido antes de 37 semanas de gestación.

5 “Bebé nacido a término” se refiere generalmente a un bebé nacido después de 37 semanas de gestación.

“Bebé que ya da sus primeros pasos” se refiere en general a un niño desde cuando empieza a andar hasta los tres años.

10 “Niño pequeño” se refiere en general a un niño de uno a diez años (y la edad equivalente en animales donde se utiliza la expresión “mamífero pequeño”).

15 “Proteína lactosérica dulce modificada” (PLDM) o “Suero lácteo dulce modificado” (SLDM), significa proteína lactosérica dulce de la cual se han eliminado algunos o todos los caseinoglucomacropéptidos (CGMP). En diversas realizaciones de la invención el caseinoglucomacropéptido (CGMP) del SLDM se reduce en más del 60 %, más del 75 %, más del 90 %, más del 95 % o más del 99 % (p/p) en comparación con la cantidad presente en promedio en suero lácteo natural del mismo origen (por ejemplo suero lácteo dulce bovino).

20 “Probiótico” significa preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas que tienen un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar del receptor. [Salminen, S. et al. (1999); Probiotics: how should they be defined, Trends Food Sci. Technol., 10 107-10]. La definición de probiótico se admite en general y está en consonancia con la definición de la OMS. El probiótico puede comprender una cepa única de microorganismo, una mezcla de varias cepas y/o una mezcla de varias especies y géneros de bacterias. En caso de mezclas, el término “probiótico” en singular, puede no obstante utilizarse para referirse a la mezcla o preparación probiótica.  
25 Para los fines de la presente invención, los microorganismos del género *Lactobacillus* se consideran como probióticos.

30 “Prebiótico” se refiere en general a un ingrediente alimenticio no digerible que influye beneficiosamente en el receptor, estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de microorganismos presentes en el intestino del receptor, y por tanto, su intención es mejorar su salud.

“Alergia” significa una alergia que ha detectado un médico y que puede tratarse ocasionalmente o de una manera más duradera. Una “alergia alimentaria” es una alergia con respecto a una composición nutricional.

35 “Fórmula para bebés” según las Directivas de la Comisión 2006/141/EC del 22 de diciembre de 2006 y/o 91/321/EEC del 14 de mayo de 1991 sobre fórmulas para bebés y fórmulas de continuación, artículo 1.2(c), la expresión “fórmula para bebés” significa productos alimenticios destinados a un uso nutricional particular para bebés durante los cuatro a seis primeros meses de vida y que de por sí satisfacen las necesidades nutricionales de esta categoría de personas. Ha de entenderse que los bebés pueden alimentarse exclusivamente con fórmulas para bebés, o que la fórmula para bebés puede utilizarla el cuidador como un complemento de leche humana. Esta expresión es sinónima de la expresión “fórmula de inicio” tan generalmente utilizada.  
40

45 “Fórmula de continuación”: de acuerdo con las Directivas de la Comisión 2006/141/EC del 22 de diciembre de 2006 y/o 91/321/EEC del 14 de mayo de 1991 sobre fórmulas para bebés y fórmulas de continuación, artículo 1.2(d), la expresión “fórmula de continuación” significa productos alimenticios destinados a un uso nutricional particular para bebés mayores de cuatro meses y que constituye el principal elemento líquido en una alimentación progresivamente diversificada de esta categoría de personas.

50 “Leche de crecimiento”: composición nutricional láctea especialmente adaptada para niño de entre uno a tres años.

“Fortificante de leche humana”: composición nutricional para bebés o niños pequeños, destinada a añadirse o a diluirse con leche humana.

55 La expresión “composición hipoalergénica” significa una composición que es improbable que cause reacciones alérgicas.

La expresión “oligosacárido sialilado” significa un oligosacárido que tiene un resto de ácido siálico.

60 La expresión “oligosacárido fucosilado” significa un oligosacárido que tiene un resto de fucosa.

Todos los porcentajes son en peso salvo que se indique otra cosa.

65 Como se usa en esta memoria descriptiva, las palabras “comprende”, “que comprende” y palabras similares, no deben interpretarse en un sentido exclusivo o exhaustivo. En otras palabras, pretenden significar “incluyendo, pero sin limitación”.

En esta memoria descriptiva, cualquier referencia a documentos de la técnica anterior, no debe considerarse como una admisión de que dicha técnica anterior sea ampliamente conocida o forme parte del conocimiento general común en este campo.

5 Las proteínas alimenticias proporcionan los aminoácidos esenciales necesarios para la síntesis de proteínas y el crecimiento y tan importante es la calidad de las proteínas como su cantidad. La presente invención proporciona una proteína lactosérica dulce para su uso por administración para promover el desarrollo saludable del sistema nervioso entérico de los mamíferos. El suero lácteo dulce puede obtenerse de la elaboración del queso, particularmente del suero lácteo dulce obtenido de la coagulación de la caseína por el cuajo.

10 La proteína lactosérica dulce de la invención comprende 30 %-100 % p/p de proteína, preferentemente >80 % p/p de proteína. Un ejemplo de PLD que puede utilizarse de acuerdo con la invención, es una PLD comercializada con el nombre registrado Lacprodan Di9224™. Por tanto, la PLD puede estar en forma de un aislado de proteína lactosérica dulce o de un concentrado de proteína lactosérica dulce.

15 De acuerdo con una realización de la invención, la proteína lactosérica dulce es una fracción de suero lácteo dulce modificado, es decir, es una proteína lactosérica dulce que tiene un nivel reducido de caseinoglucomacropéptido (CGMP) en comparación con una proteína lactosérica dulce clásica. Esta fracción de suero lácteo dulce se denomina Suero Lácteo Dulce Modificado (SLDM). Un suero lácteo dulce clásico puede contener de 4 a 40 % de CGMP según sea el procesamiento de la leche.

20 La fracción de proteína en la leche de vaca es una mezcla de diversas proteínas, todas ellas con un perfil diferente de aminoácidos. El caseinoglucomacropéptido (CGMP) procede de la proteólisis de la kappa-caseína en para-kappa-caseína, una fracción insoluble que permanece en la fracción de caseína y CGMP, una fracción soluble que se encuentra en la fracción de suero lácteo. Esta fracción de suero lácteo o SLDM con nivel reducido de CGMP proporciona la ventaja de un contenido de treonina reducido y un contenido de triptófano aumentado en comparación con el suero lácteo dulce normal y por lo tanto es adecuada como una fuente de proteínas para los bebés.

25 Esta fracción de suero lácteo dulce puede tratarse además para eliminar minerales (cationes, aniones), lactosa o cualquiera de estas sustancias. El suero lácteo dulce puede concentrarse según se desee. En el comercio se dispone de fuentes adecuadas de suero lácteo dulce.

30 La eliminación del caseinoglucomacropéptido puede realizarse mediante cualquier proceso adecuado. Un proceso adecuado se describe en el documento EP0880902. En este proceso, el pH del suero lácteo dulce se ajusta de 1 a 4,3, si fuera necesario. El suero lácteo dulce se pone después en contacto con una resina débilmente aniónica que es predominantemente alcalina hasta que el pH del suero lácteo dulce se estabiliza a aproximadamente de 4,5 a 5,5. Después, la fracción de suero lácteo dulce, de la cual se elimina una cantidad significativa de caseinoglucomacropéptido, se recoge. Según una realización de la invención, esta fracción de proteína lactosérica con nivel reducido de CGMP, contiene aproximadamente 28 % de proteína, de la cual el CGMP representa del 2 al 3 % de proteína total, y por tanto se denomina "PLDM28".

35 El SLDM para su uso de acuerdo con la invención puede contener, por supuesto, un mayor porcentaje de proteína que en la PLDM28, por ejemplo de 30 a 99 % de proteína. De manera similar, el SLDM para su uso de acuerdo con la invención, también puede contener un mayor porcentaje de CGMP que en la PLDM28, por ejemplo, de hasta 15, 20, 25 o 35 % de la proteína total.

40 Según otra realización de la invención, la proteína lactosérica dulce no está modificada y comprende un mínimo de proteína al 50 %. Por ejemplo, la PLD comercializada con la marca registrada Lacprodan Di9224™ de Aria Foods Ingredients, Skanderborgvej 277, 8260 Viby J, Dinamarca, contiene proteína al 87 %.

45 Otros ejemplos de proteína lactosérica dulce no modificada disponibles en el comercio para su uso de acuerdo con la invención, son Lacprodan DI-8790, otro suero lácteo dulce de Aria, 894 Instantised y MPC 485 comercializado por Fonterra (Nueva Zelanda), YV0608, Armor Protéines (Francia) y BiPro, Davisco Food International inc (US, 11000 West 78th Street, Suite 210, Eden Prairie, MN 55344).

50 La proteína lactosérica dulce puede estar no hidrolizada. Como alternativa, según algunas realizaciones de la invención, la proteína de fracción lactosérica dulce está parcial o ampliamente hidrolizada para impedir que se produzcan reacciones alérgicas en bebés con riesgo de alergia y hacer que la proteína sea más fácil de digerir. El proceso de hidrólisis puede realizarse como se desee y como se conoce en la técnica. En general, el hidrolizado de proteína lactosérica se prepara hidrolizando enzimáticamente en una o más etapas la fracción de suero lácteo dulce. Por ejemplo, para una proteína extensamente hidrolizada, las proteínas lactoséricas dulces pueden someterse a triple hidrólisis utilizando, por ejemplo, Alcalasa 2.4L (EC 940459), después Neutrasa 0.5L (disponible en Novo Nordisk Ferment AG) y después pancreatina a 55 °C. Como alternativa, para una proteína menos hidrolizada, el suero lácteo dulce puede someterse a doble hidrólisis utilizando, por ejemplo, NOVOZYMES y después pancreatina.

55

Si la proteína lactosérica dulce utilizada carece sustancialmente de lactosa, se encuentra que la proteína se somete a un bloqueo de lisina mucho menor durante el proceso de hidrólisis. Esto permite reducir el grado de bloqueo de lisina de aproximadamente 15 % en peso de lisina total a menos de aproximadamente 10 % en peso de lisina; por ejemplo aproximadamente 7 % en peso de lisina. Esto mejora enormemente la calidad nutricional de la fuente de proteína.

La administración de la PLD puede ser a un feto a través de la madre. También puede ser a un bebé prematuro o nacido a término directamente o a través la leche materna. La administración puede ser también a un niño pequeño, generalmente hasta la edad de cuatro años o edad equivalente en un animal.

La administración de la LPD al mamífero joven, que puede ser un ser humano (un feto, un bebé, un bebé que da sus primeros pasos o un niño pequeño) o un animal, tiene un efecto positivo sobre el desarrollo de su sistema nervioso entérico, lo que permite que el sistema madure y se desarrolle normalmente. Por tanto, la administración de la proteína lactosérica dulce de acuerdo con la invención, impide y trata trastornos asociados a un sistema nervioso entérico inmaduro o afectado.

Estos trastornos pueden ser, por ejemplo, disfunción de la barrera intestinal, intolerancia a los alimentos o enterocolitis necrotizante. Estos últimos estados aumentan el riesgo de infecciones y alergias, conduciendo de este modo a intolerancia alimentaria (por lo tanto necesidad de refuerzo nutricional parenteral). Más generalmente, estos trastornos pueden ser una motilidad digestiva disfuncional que puede manifestarse como tránsito intestinal lento, molestias intestinales, heces duras, estreñimiento y/o reflujo digestivo.

El efecto beneficioso de la invención está especialmente dirigido a aquellos mamíferos jóvenes que han tenido, por ejemplo, retraso de crecimiento intrauterino (RCIU) que puede haberse producido después de cualquier acontecimiento adverso durante la gestación (por ejemplo, madre fumadora pasiva o activa, madre con tratamiento farmacológico, baja calidad de la placenta, colocación incorrecta de la placenta, malnutrición de la madre y/o del feto, etc).

Los autores de la presente invención han descubierto que la PLD y/o las composiciones que contienen la PLD de la presente invención, pueden utilizarse para promover el desarrollo, la funcionalidad, la supervivencia, la plasticidad y la diferenciación de las neuronas y para protegerlas contra la degeneración, como se muestra mediante la promoción de la expresión de proteínas asociadas a esas actividades biológicas. Dicha degeneración puede producirse, por ejemplo, después de cualquier situación de estrés, como las que afectan al feto (en el útero) tales como el RCIU, mencionado anteriormente, o a los recién nacidos (hipoxia-isquemia al nacer, oxigenoterapia e hiperoxia, inflamación, necesidad de refuerzo parenteral, etc.), o cualquier causa que conduzca a estrés oxidativo. Se ha descubierto que la PLD promueve la supervivencia neuronal y/o limita o impide la muerte neuronal de las células neuronales entéricas y promueve el crecimiento neuronal que es importante, por ejemplo, en los procesos de desarrollo.

En los bebés, la PLD y/o composiciones que contienen PLD de la presente invención, pueden utilizarse para proteger el sistema nervioso entérico de cualquier tipo de estrés, por ejemplo, que se produce durante el periodo del desarrollo neuronal y - por consiguiente - limitar y/o impedir el retraso de crecimiento neuronal inducido por estrés y disfunciones intestinales asociadas.

Por tanto, la PLD puede administrarse, en el contexto de la presente invención, cuando ya se ha observado un retraso en el desarrollo del sistema nervioso entérico o, de manera profiláctica, cuando aún no se ha observado dicho retraso.

El efecto beneficioso de la PLD sobre el desarrollo saludable del sistema nervioso entérico de mamíferos se describe con más detalle los siguientes párrafos.

#### Dosis de PLD:

La proteína lactosérica dulce puede administrarse a bebés, o a niños pequeños, a una dosis de 1,6-3,2 g de proteína/100 kcal, preferentemente 1,6-2,2 g de proteína/100 kcal e incluso más preferentemente de 1,8-2,1 g de proteína/100 kcal.

Para los bebés prematuros hay recomendaciones específicas, publicadas por el Comité ESPGHAN sobre Nutrición, acerca de la cantidad de proteína que deben recibir. Para el caso de los bebés prematuros con un peso al nacer menor de 1 kg, la ingesta recomendada de contenido proteico es de 3,6 a 4,1 g de proteína/100 kcal. Para bebés con un peso al nacer de entre 1 a 1,8 kg, la ingesta recomendada de contenido proteico es de 3,2 a 3,6 g de proteína/100 kcal [Agostini et al (2010) JPGN 2010 (50), 1, Enteral Nutrient Supply for Preterm Infants].

Por tanto, la cantidad PLD administrada a un bebé prematuro se adapta apropiadamente según las recomendaciones actuales. Por ejemplo, si según una realización de la invención la PLD tiene un contenido proteico de 100 % y la PLD representa el 80 % de la proteína total que se administra al bebé prematuro, entonces una

cantidad adecuada de PLD a administrar al bebé prematuro es de 2,8-3,2 g por 100 kcal para bebés cuyo peso corporal sea menor de 1 kg y de 2,5-2,9 g para bebés cuyo peso corporal sea de 1 kg-1,8 kg.

5 La dosis de PLD administrada es tal que la ingesta de proteína del sujeto está dentro de las directrices apropiadas (por ejemplo, recomendaciones de la OMS y del Comité ESPGHAN).

10 Por ejemplo, en una realización preferida, una composición comprende de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 10,0 % p/p de proteína, más preferentemente aproximadamente 9,5 % p/p. Esto corresponde a aproximadamente 1,8 g de proteína/100 kcal. Una ventaja proporcionada por esta concentración de proteína es que es equivalente a la cantidad de proteína generalmente presente en leche humana y corresponde al límite inferior descrito en el *Codex Alimentarius* (Código de los Alimentos).

15 En general, la PLDM puede representar entre aproximadamente 70 a aproximadamente 100 % de la proteína total en la composición. Por tanto, también puede representar 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la proteína en la composición.

20 Por tanto, la proteína lactosérica dulce modificada de la invención puede administrarse generalmente a un bebé o a un niño pequeño como una dosis de 1,6-3,2 g de proteína/100 kcal, preferentemente 1,6-2,2 g de proteína/100 kcal e incluso más preferentemente 1,8-2,1 g de proteína/100 kcal.

Método de administración:

(i) Administración a bebés:

25 La PLD puede administrarse directamente por vía oral a bebés, sola (pura o diluida en agua o en leche materna, por ejemplo) como un complemento alimenticio (por ejemplo, como un complemento fortificante de leche humana o conjuntamente con este), o como cualquier refuerzo lácteo utilizado durante la alimentación trófica, o como una composición farmacéutica o nutracéutica, o como un ingrediente en una fórmula láctea para bebés. Dicha fórmula puede ser una "fórmula para prematuros" si la descendencia nace antes de término o tiene un bajo peso al nacer, una "fórmula de inicio" o una "fórmula de continuación". La fórmula también puede ser una fórmula hipoalérgica (HA) en la que las proteínas de leche de vaca están hidrolizadas. En el ejemplo 2 se ofrece un ejemplo de dicha fórmula de inicio. La PLD puede administrarse como una leche de crecimiento o en cualquier bebida láctea.

35 (ii) Administración a niños pequeños:

La PLD también puede administrarse por vía oral a niños pequeños en forma de una composición farmacéutica o nutracéutica, leche de crecimiento, bebidas lácteas, complementos alimenticios, yogures lácteos, postres y púdines, galletas y barritas de cereales, cereales y bebidas basadas en frutas.

40 (iii) Administración a madres gestantes o lactantes:

La PLD también puede administrarse a madres gestantes o lactantes por vía oral, preferentemente en alimentos, bebidas, complementos alimenticios o composiciones farmacéuticas.

45 (iv) Administración a animales:

La PLD también puede administrarse por vía oral a animales sola, o en agua o en forma de un complemento alimenticio, una composición farmacéutica o nutracéutica o leche o pienso.

50 Administración con otros compuestos:

La PLD puede administrarse sola (pura, o diluida en agua o en leche, incluyendo leche materna, por ejemplo) o en una mezcla con otros compuestos (tales como complementos alimenticios, complementos nutricionales, medicamentos, vehículos, aromatizantes, ingredientes digeribles o no digeribles). Las vitaminas y minerales son ejemplos de complementos alimenticios típicos. En una realización preferida, la PLD se administra en una composición, por ejemplo, en una fórmula para bebés, junto con otros compuestos que potencian el efecto beneficioso descrito en los mamíferos jóvenes. Por ejemplo, esta puede ser un probiótico.

60 También puede administrarse otros probióticos. Preferentemente, para este propósito, el probiótico puede seleccionarse del grupo que consiste en *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida*, en particular seleccionarse del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* o mezclas de los mismos, preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en *Bifidobacterium*

5 *longum* NCC3001 (ATCC BAA-999), *Bifidobacterium longum* NCC2705 (CNCM 1-2618), *Bifidobacterium longum* NCC490 (CNCM 1-2170), *Bifidobacterium lactis* NCC2818 (CNCM 1-3446), *Bifidobacterium breve* cepa A, *Lactobacillus paracasei* NCC2461 (CNCM 1-2116), *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (CNCM 1-1225), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC53103), *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (CGMCC 1.3724), *Enterococcus faecium* SF 68 (NCC2768; NCIMB10415), y sus mezclas.

10 Otros ejemplos de compuestos sinérgicos que pueden incluirse en las composiciones de la invención, especialmente en fórmulas para bebés, son compuestos prebióticos. Un prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible que influye beneficiosamente en el receptor estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o diversas bacterias en el colon, y por tanto mejora su salud. Dichos ingredientes son no digeribles en el sentido de que no se degradan ni absorben en el estómago o intestino delgado y por tanto pasan intactos al colon, donde fermentan selectivamente gracias a las bacterias beneficiosas. Los ejemplos de prebióticos incluyen determinados oligosacáridos, tales como fructooligosacáridos (FOS), oligosacáridos de leche de vaca (OSLV) y galactooligosacáridos (GOS). Puede utilizarse una combinación de prebióticos, como GOS al 90 % con fructooligosacáridos de cadena corta al 10 % tal como el producto sólido comercializado con la marca registrada Raftilose® o inulina al 10 % tal como el producto comercializado con la marca registrada Raftiline®. Otros ejemplos de prebióticos que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención incluyen el grupo de oligosacáridos obtenidos de la leche o de otras fuentes, que contienen opcionalmente ácido siálico, fructosa, fucosa, galactosa o manosa. Los prebióticos preferidos son sialooligosacáridos (SOS), fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), isomaltooligosacáridos (IMO), xilooligosacáridos (XOS), arabinoxilooligosacáridos (AXOS), mananoligosacáridos (MOS), oligosacáridos de soja, glicosil-sacarosa (GS), lactosacarosa (LS), sialil-lactosa (SL), fucosil-lactosa (FL), Lacto-N-Neotetraosa (LNNT), lactulosa (LA), palatinosaoligosacáridos (PAO), maltooligosacáridos, gomas y/o hidrolizados de los mismos, pectinas, almidones y/o hidrolizados de los mismos. Una fórmula para bebés de acuerdo con la invención, contiene además preferentemente al menos un prebiótico en una cantidad de 0,3 al 10 % del peso total de la composición en seco.

20 En particular, en la composición según la invención, pueden incluirse los oligosacáridos de leche humana, por ejemplo, oligosacáridos sialilados, descritos en el documento WO 2012/069416 publicado el 31 de mayo de 2012. Estos últimos oligosacáridos pueden actuar en sinergia con la PLD de la invención para promover el desarrollo saludable del sistema nervioso entérico de mamíferos en el bebé o niño pequeño.

25 La dosis diaria de hidratos de carbono, y de otros componentes administrados con la PLD debe cumplir siempre con las directrices de seguridad y normas reguladoras publicadas. Esto es particularmente importante con respecto a la administración a bebés recién nacidos, especialmente a los nacidos con bajo, muy bajo o extremadamente bajo peso al nacer.

30 Una composición, por ejemplo, una fórmula para bebés, que contiene la PLD para la administración según una realización de la invención, puede contener una fuente de proteína adicional en una cantidad tal que la proteína total no sea más de 4,0, 3,0 o 2,0 g/100 kcal, preferentemente 1,8 a 2,0 g/100 kcal. Se prefiere que más del 50 % en peso de la fuente de proteína sea suero lácteo, que incluya el suero lácteo dulce modificado (SLDM) y/o suero lácteo dulce no modificado. El tipo de fuente de proteína adicional no se considera crítico para la presente invención siempre que se cumplan los requisitos mínimos en cuanto al contenido de aminoácidos esenciales y se garantice un crecimiento satisfactorio. En una realización, el contenido de proteína varía entre 30 % y 80 % de proteínas de suero. Por tanto, pueden utilizarse fuentes de proteína adicionales tales como leche desnatada, caseína o soja. En una realización, la proporción de caseína/suero oscila entre 70/30 y 20/80.

35 Las proteínas pueden estar intactas o hidrolizadas o en una mezcla de proteínas intactas e hidrolizadas. Puede ser deseable aportar proteínas parcialmente hidrolizadas (con un grado de hidrólisis entre 2 y 20 %), por ejemplo, para bebés que se piensa que están en riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca. Si se requieren proteínas hidrolizadas, el proceso de hidrólisis puede realizarse según se desee como se conoce en la técnica.

40 La composición también puede comprender una fuente de hidratos de carbono y/o una fuente de grasas. La fórmula para bebés puede contener una fuente de lípidos. La fuente de lípidos puede ser cualquier lípido o grasa que sea adecuado para su uso en fórmulas para bebés. Las fuentes de grasa preferidas incluyen aceite de palma, aceite de girasol con alto contenido en oleico y aceite de cártamo con alto contenido en oleico. También pueden añadirse ácidos grasos esenciales, ácido linoleico y ácido  $\alpha$ -linoléico. En la composición pueden incluirse uno o más ácidos grasos esenciales de cadena larga (AGPI-CL). Como ejemplos de AGPI-CL que pueden añadirse se incluyen ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA). Los AGPI-CL pueden añadirse a concentraciones de tal manera que constituyan más del 0,01 % de los ácidos grasos presentes en la composición. Pueden añadirse como pequeñas cantidades de aceites que contienen altas cantidades de ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico previamente formados, tales como aceites de pescado o aceites microbianos. Puede añadirse ácido palmítico, preferentemente en la posición Sn-2. En total, el contenido en grasas es preferentemente tal que aporta un porcentaje entre 30 a 55 % de la energía total de la fórmula. La fuente de grasas tiene, preferentemente, una proporción de ácidos grasos n-6 con respecto a n-3 de aproximadamente 5: 1 a aproximadamente 15: 1; por ejemplo, de aproximadamente 8: 1 a aproximadamente 10: 1.

A la composición nutricional puede añadirse una fuente adicional de hidratos de carbono. Preferentemente, esta proporciona aproximadamente de 40 % a aproximadamente 80 % de la energía de la composición nutricional. Puede utilizarse cualquier hidrato de carbono adecuado, por ejemplo, sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrina o una mezcla de los mismos.

5 Si se desea, también pueden añadirse fibras dietéticas adicionales. Si se añaden, estas comprenden preferentemente hasta aproximadamente el 5 % de la energía de la composición nutricional. La fibra de la dieta adicional, puede ser de cualquier origen adecuado, incluyendo, por ejemplo, soja, guisante, avena, pectina, goma de guar, goma arábica, oligosacáridos incluyendo FOS, GOS y los descritos anteriormente, o una mezcla de los  
10 mismos. Pueden incluirse vitaminas y minerales adecuados en la composición nutricional en una cantidad que cumpla con las directrices apropiadas.

15 Como ejemplos de minerales, vitaminas y otros nutrientes opcionalmente presentes en la fórmula para bebés, se incluyen vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B 12, vitamina E, vitamina K, vitamina C, vitamina D, ácido fólico, inositol, niacina, biotina, ácido pantoténico, colina, calcio, fósforo, yodo, hierro, magnesio, cobre, cinc, manganeso, cloro, potasio, sodio, selenio, cromo, molibdeno, taurina y L-carnitina. Normalmente, los minerales se añaden en forma de sal. La presencia y cantidades de minerales específicos y otras vitaminas variarán dependiendo de la población infantil a la que estén destinados.

20 La fórmula para bebés puede contener opcionalmente otras sustancias, tales como fibras, lactoferrina, nucleótidos, nucleósidos y similares, que pueden tener un efecto beneficioso.

25 En la composición nutricional, si se desea, pueden incluirse uno o más emulsionantes de calidad alimentaria; por ejemplo, diacetil ésteres de ácido tartárico de mono- y di-glicéridos, lecitina y mono- o di-glicéridos o una mezcla de los mismos.

De manera similar, pueden incluirse sales y/o estabilizadores adecuados. En la composición pueden añadirse aromatizantes.

30 Período de administración:

El plazo de la administración puede variar. Cuando se esperan efectos positivos con un plazo de administración relativamente corto (por ejemplo, una administración diaria durante una a dos semanas para recién nacidos), se piensa que los plazos más prolongados proporcionan un efecto potenciado, o, al menos, mantienen el efecto en  
35 bebés más mayores (por ejemplo, un plazo de tres, cinco, ocho o 12 meses) o en niños (por ejemplo, un plazo de hasta 2 o 4 o 6 años). Para la administración a animales, se aplican los plazos correspondientes.

40 La madre gestante puede comenzar a tomar la proteína lactosérica dulce modificada o una proteína lactosérica dulce no modificada (estándar) tan pronto como sepa que está embarazada. Sin embargo, el periodo de administración también puede comenzar antes de que comience el embarazo, por ejemplo, si la mujer está intentando quedarse embarazada. La administración puede comenzar en cualquier momento después de que comience el embarazo. Puede comenzar preferentemente, al mes 3, 4, 5, 6, 7 u 8 del embarazo, en el caso de un embarazo humano, o en periodos correspondientes para otros mamíferos, o hasta dos semanas antes de la fecha esperada del parto.

45 El periodo de administración puede ser continuo (por ejemplo, hasta e incluyendo la lactancia hasta el destete), o discontinuo. Se prefiere la administración continua para obtener un efecto más prolongado. Sin embargo, se especula que un patrón discontinuo (por ejemplo, administración diaria durante una semana al mes o durante semanas alternas) puede inducir efectos positivos en la descendencia.

50 La administración puede cubrir al menos parte del periodo de gestación y al menos parte del periodo de lactancia, o el periodo equivalente en el que el recién nacido no debe ser amamantado. Preferentemente, el periodo de administración a la madre gestante cubre sustancialmente todo el periodo de gestación, aunque este puede ser menor. Del mismo modo, el periodo de administración a la madre lactante cubre preferentemente y de manera  
55 sustancial todo el periodo de lactancia, aunque, de nuevo, este periodo puede ser menor.

Preferentemente, la administración a la madre es por ingesta diaria (a tomar una o dos veces al día) o por ingesta semanal (a tomar una o dos veces a la semana).

60 La proteína lactosérica dulce modificada o proteína lactosérica estándar puede administrarse directamente al bebé. Este es el caso particularmente si la madre no amamanta o después de que interrumpe la lactancia. Sin embargo, un bebé que está siendo amamantado también puede recibir la proteína lactosérica dulce modificada o la proteína lactosérica dulce estándar por administración directa.

65 Preferentemente, la administración al bebé es por ingesta diaria. Por ejemplo, si la proteína lactosérica dulce modificada o proteína lactosérica dulce se administra como una fórmula para bebés, la administración es con cada

toma, es decir, de aproximadamente cuatro a aproximadamente seis veces al día para bebés, reduciéndose el número de tomas con la edad. Para niños pequeños (mayores de un año), la administración puede ser menor, una o dos veces al día. Para bebés que ya dan sus primeros pasos y niños de hasta seis años, la administración es como se aconseja el consumo de leche para el crecimiento y desarrollo.

5 La administración al bebé, ya sea a través de la lactancia materna, o por administración directa, o ambos métodos, puede continuar hasta los seis meses o incluso un año o más. Por tanto, la proteína lactosérica dulce modificada o proteína lactosérica dulce estándar puede administrarse durante la lactancia, si esta tiene lugar, o después del destete total o parcial. La administración puede continuar a lo largo de la etapa de bebé que ya da sus primeros  
10 pasos e incluso, hasta los seis años. Se sabe que el sistema nervioso entérico continúa desarrollándose en los niños hasta esta última edad [Wester, T. et al. (1999); Notable postnatal alterations in the myenteric plexus of normal human bowel, Gut, 44: 666-674]. Por tanto, los presentes inventores especulan que la administración de la proteína lactosérica dulce modificada o proteína lactosérica estándar, puede continuar teniendo un efecto positivo, generalmente hasta los seis años.

15 Efecto de la administración de la PLDM o PLD estándar:

La proteína lactosérica dulce modificada o proteína lactosérica dulce estándar, administrada a neonatos promueve el desarrollo saludable del sistema nervioso entérico. En un experimento de modelo de rata detallado en el Ejemplo 1,  
20 se evaluó el efecto de la administración de una proteína lactosérica dulce modificada (PLDM28) o de una proteína lactosérica dulce disponible en el comercio (Lacprodan Di9224) sobre el desarrollo neuronal.

En este experimento, crías que habían tenido un retraso de crecimiento intrauterino inducido por la dieta materna (grupo de RP) y crías que no habían tenido RCIU (CTRL) se complementaron, a partir de 2 días después del nacimiento, con agua (controles; particularmente CTRL-a y RP-a) o con una de las siguientes fracciones lácteas:

- Lacprodan Di9224: Aislado de proteína de suero, suero dulce, comercializado por Arla Foods Ingredients, Países Bajos.
- 30 - PLDM28: Suero dulce modificado utilizando un procedimiento patentado por Nestlé (eliminación de cGMP).
- Concentrado de FC: Concentrado de factor de crecimiento, que es un aislado con alto contenido en proteínas (97 % de proteínas) extraído directamente de la leche desnatada y comercializado por Tatua (Tatuani, Nueva Zelanda). Contiene altos niveles de IGF y TGF.

35 Estas fracciones se administraron a crías como complementaciones isonitrogenadas (12 % de proteínas), de tal manera que el efecto biológico puede atribuirse al contenido cualitativo de la fracción de suero en vez de a la cantidad de proteínas.

40 El volumen de las complementaciones se adaptó gradualmente para adaptarse al crecimiento de las crías de rata (150 µl/100 g de peso corporal). Por lo tanto, la complementación proporcionó de 1 a 5 mg de proteínas al día y por cría.

Los grupos fueron los siguientes:

- 45 1) CTRL-a: crías CTRL nacidas de madres CTRL, que recibieron una complementación de agua.
- 2) RP-a: crías RP nacidas de madres RP, que recibieron una complementación de agua.
- 50 3) RP-Lacprodan Di9224: crías RP nacidas de madres RP, que recibieron una complementación de Lacprodan Di9224.
- 4) RP- PLDM28: crías RP nacidas de madres RP, que recibieron una complementación de PLDM28.
- 55 6) RP- concentrado de FC: Crías RP nacidas de madres RP, que recibieron una complementación de concentrado de FC.

60 Dos semanas después del nacimiento, momento del sacrificio, el desarrollo neuronal de las crías se evaluó utilizando dos métodos: (i) una estrategia de perfil de expresión génica dirigida en yeyuno, y (ii) midiendo la respuesta contráctil *ex vivo* del yeyuno a una estimulación con campo eléctrico (ECE). El último método mide la respuesta contráctil inducida por el sistema nervioso entérico y por lo tanto la maduración y el grado funcional del sistema nervioso entérico.

65 La respuesta contráctil *ex vivo* del yeyuno a la acetilcolina también se evaluó, esta mide la propia respuesta contráctil del músculo intestinal, que por lo tanto refleja la maduración y el grado funcional del músculo intestinal.

Este último experimento se realizó como un control, para permitir a los inventores separar los factores, es decir, sistema nervioso y músculo, controlando las respuestas contráctiles medidas.

Respuesta contráctil *ex vivo* del yeyuno a estimulación con campo eléctrico (ECE):

Para evaluar la maduración neuronal en el modelo de restricción de proteínas y después de la complementación con los aislados de suero lácteo dulce de la invención, se midió la respuesta contráctil del yeyuno a ECE, que mide la implicación/capacidad de la red neuronal para estimular la contractilidad muscular. La posible implicación de cualquier efecto sobre la maduración muscular intestinal debida a la restricción de proteínas, o después de complementación con aislados de suero lácteo dulce, se evaluó midiendo la respuesta contráctil del yeyuno a la acetilcolina.

La respuesta contráctil del yeyuno a ECE se redujo en el grupo de RP-a en comparación con el grupo de CTRL-a, a la frecuencia de 10 Hz ( $P=0,040$ ) (Figura 1). La respuesta contráctil del yeyuno a la acetilcolina se redujo ligeramente, pero no significativamente ( $P=0,181$ ), en el grupo de RP-a en comparación con el grupo de CTRL-a (Figura 2). Considerado en su conjunto, esto refleja una interacción neuromuscular alterada y en particular una maduración neuronal alterada, en el yeyuno de las crías con restricción de proteínas.

La complementación con fracciones de suero lácteo dulce (Lacprodan Di9224 y PLDM28) aumentó significativamente ( $P=0,007$  y  $0,026$  respectivamente) la respuesta contráctil del yeyuno a 10 Hz a un nivel estadísticamente similar al de los controles (Figura 1). Esto indica un efecto de promoción de las fracciones de suero lácteo dulce sobre la capacidad estimuladora neuronal en el yeyuno, lo que refleja una promoción del desarrollo y la función neuronal en el periodo neonatal. De hecho, la maduración del compartimento del músculo del yeyuno no se modificó significativamente después de la complementación con la fracción de suero lácteo dulce ( $P=0,199$  y  $0,828$  para Lacprodan Di9224 y PLDM28, respectivamente) ya que la capacidad de respuesta contráctil del yeyuno a la acetilcolina permaneció sin cambios en comparación con la del grupo de RP-a (Figura 2).

Considerados en su conjunto, estos datos indican que la proteína lactosérica dulce estándar y modificada (Lacprodan Di9224 y PLDM28, respectivamente en el experimento) mejora la respuesta contráctil muscular mediada por la red neuronal frente a estimulación con campo eléctrico, ECE, en el yeyuno de crías del grupo RP. Esto indica que la proteína lactosérica dulce promueve el desarrollo y la funcionalidad postnatal del sistema nervioso entérico.

Dicho efecto estimulador no se observó en respuesta a la estimulación con acetilcolina, lo que sugiere que no hay mejora de la respuesta contráctil del músculo liso en respuesta a la acetilcolina, es decir, no hay promoción de la maduración postnatal del músculo liso.

Por lo tanto, estos datos muestran claramente un efecto beneficioso de la proteína lactosérica dulce en la promoción del desarrollo y función neuronal durante el periodo postnatal. Basándose en estos datos, el suero lácteo dulce constituye una nueva solución nutricional para prevenir o tratar trastornos asociados a un sistema nervioso entérico inmaduro y/o alterado en mamíferos jóvenes hasta la edad de aproximadamente seis años, en particular, durante el periodo neonatal (generalmente definido como los 6 primeros seis meses de vida, para un ser humano).

Expresión de genes implicados en el desarrollo neuronal intestinal:

En el experimento del modelo de rata del Ejemplo 1, se estudió el efecto de la restricción de proteínas, así como de la restricción de proteínas seguido de complementación con fracción láctea, sobre la expresión de genes principales implicados en rutas biológicas del desarrollo neuronal, en el yeyuno, utilizando una estrategia de perfil de expresión de genes. En la Tabla 2 se enumeran los genes estudiados y los datos se presentan en la Tabla 3. No se indican los datos de genes no expresados o mal expresados.

Entre los 35 genes restantes expresados a un nivel detectable, en 18 de ellos (Tabla 3), se observó una interacción significativa entre el tratamiento (restricción de proteínas) y la complementación (fracciones lácteas). Los genes que se expresaron diferencialmente de un modo significativo eran los principalmente implicados en la maduración o diferenciación de neuronas y células gliales o eran marcadores de crecimiento y plasticidad neuronal.

Los presentes inventores han mostrado previamente (Cettour y Faure, manuscrito en preparación) que se producen mecanismos compensatorios en crías con restricción de proteínas (RP) para ayudar a promover el desarrollo celular y neuronal en el intestino delgado. Los datos presentes confirman estos hallazgos. Específicamente, la expresión génica de factores neurotróficos y sus receptores, tales como NGF (Factor de Crecimiento Nervioso, *Nerve Growth Factor*), Gfra1 (receptor alfa 1 de la familia de GDNF), Graf2 (receptor alfa 2 de la familia de GDNF), Ntg3 (Neutrofina 4), S100B (proteína B de unión al calcio S100) y sinaptofisina, se reguló significativamente al alza en el grupo RP-a, en comparación con el grupo CTRL-a. Posiblemente esto refleja un desequilibrio y una situación de "estrés" en los animales, que no obstante continúa siendo insuficiente para promover la maduración neuronal como se indica en nuestros resultados después de estimulación con campo eléctrico (ECE).

La complementación con Lacprodan Di9224 aumentó significativamente la expresión génica de NGF, NGFr (Receptor del Factor de Crecimiento Nervioso) y Chrm3 (receptor muscarínico 3) y disminuyó la de S100B a un nivel de expresión similar al de CTRL-a (Tabla 3). La expresión génica aumentada de NGFr y NGF, junto con la expresión aumentada de NGF en el grupo RP, sugiere la promoción del crecimiento, desarrollo y supervivencia neuronal observados en la Figura 1 [Tessarollo, (1998) Pleiotropic functions of neurotrophins in development. Cytokine Growth Factor Rev. 9(2): 125-37]. Se observó que los niveles de NGF y NGFr aumentaban en el grupo RP-a en comparación con los del grupo CTRL-a, pero que ese aumento era solo significativo para NGF.

La complementación con PLDM28 aumentó significativamente la expresión génica de Crhr1, ApoE, NGFr, Ntf3 (neurotrofina 3), Chrm2 y 3 (receptores muscarínicos 2 y 3) y TGFb2, y disminuyó significativamente la de S100b. De nuevo, la expresión génica aumentada de NGFr y Ntf3 puede contribuir a promover el crecimiento y desarrollo neuronal y puede, al menos en parte, explicar la maduración neuronal observada en la Figura 1.

Los receptores muscarínicos como los codificados por los genes *Chrm2* y *Chrm3* están implicados en la contractilidad y motilidad de la musculatura intestinal en respuesta a la Acetilcolina [Chen J, Wen J, Cai W. (2012) Smooth muscle adaptation and recovery of contractility after massive small bowel resection in rats. Exp Biol Med (Maywood). 1 de mayo; 237(5): 578-84]. De manera similar, el receptor de la hormona liberadora de corticotropina (Crhr), también conocido como factor de liberación de corticotropina, y la apolipoproteína E, están implicados en las rutas de motilidad y contracción muscular [Taché Y, Kiank C, Stengel A. (2009) A role for corticotropin releasing factor in functional gastrointestinal disorders Curr Gastroenterol Rep. 11 de agosto; (4):270-7; Vincelette J, Martin-McNulty B, Vergona R, Sullivan ME, Wang YX, (2006) Reduced cardiac functional reserve in apolipoprotein E knockout mice Transl Res. Julio; 148(1):30-6.].

Después de la complementación con PLDM28, la expresión de *chrm3* y la de los genes mencionados anteriormente implicados en las rutas de contractilidad muscular, aumentó significativamente en comparación con la de RP-a. Esto podría sugerir promoción de la maduración muscular intestinal, pero esto merecería más atención ya que estas expresiones génicas aumentadas no se tradujeron aún en un beneficio funcional medible como lo indica la respuesta de contractilidad inalterada a la acetilcolina en el momento del sacrificio de las crías (Figura 2).

La complementación con el concentrado de factor de crecimiento aumentó significativamente la expresión génica de Crhr1 y disminuyó significativamente la de GDFN, GFra1, Neurod1, S100b y sinaptofisina. A diferencia de PLDM28 y Lacprodan Di9224, no hubo niveles de expresión aumentados en la ruta de NGF (ruta del factor de crecimiento nervioso) observados después de la complementación con el concentrado de factor de crecimiento. Esto coincide con el resultado de que no se observó ningún efecto beneficioso sobre la respuesta contráctil mediada por la red neuronal (ECE) del yeyuno (Figura 1) después de la complementación con GF1.

El nivel de expresión génica de NGFr se reguló significativamente al alza después de la complementación con cualquiera de PLDM28 o Lacprodan Di9224, mientras que la expresión génica aumentada inducida por la restricción de proteínas se mantuvo en estos grupos complementados. Esto indica claramente la estimulación de la ruta de NGF.

Las neurotrofinas, tales como NGF, y sus receptores, están expresados a muy alto nivel en el sistema nervioso periférico y central. Las estrategias de direccionamiento génico en el ratón han documentado la función de las neurotrofinas en la promoción de la maduración del desarrollo de neuronas del sistema nervioso periférico y central, confirmando su papel crítico en el desarrollo neuronal. Revisado en Tessarollo, L. (1998). NGF is also critical for the survival and maintenance of sympathetic and sensory neurons. Without it, these neurons undergo apoptosis [Freeman RS et al., (2004) NGF deprivation-induced gene expression: after ten years, where do we stand? "NGF and Related Molecules in Health and Disease". Prog. Brain Res. Progress in Brain Research 146: 111-26]. El factor de crecimiento nervioso causa crecimiento axonal. Esto demuestra que el NGF circula por todo el organismo y que es importante para mantener la homeostasis [Levi-Montalcini R (2004). "The nerve growth factor and the neuroscience chess board". Prog. Brain Res. 146: 525-7.] Human and bovine milk also contain NGF activity suggested to play a role in the postnatal neurodevelopment and neuroprotection of the newborn [Gaul, G.E., Wright, C.E. & Isaacs, C.E. (1985). Significance of growth modulators in human milk. Pediatrics. 75: 142-145].

Las modificaciones de la expresión génica observadas en la Tabla 3, y, en particular, la estimulación de la ruta de NGF, probablemente contribuyen a la promoción observada de las respuestas estimuladoras neuronales frente a ECE en los grupos complementados con PLDM28 y Lacprodan mostrados en la Figura 1.

Las poblaciones que pueden beneficiarse de la invención son:

- Bebés pretérmino, con bajo (<2500 g), muy bajo (>1500 g) y extremadamente bajo (<1000 g) peso al nacer;
- Bebés prematuros o nacidos a término que han tenido retraso de crecimiento intrauterino (RCIU) producido después de cualquier acontecimiento adverso durante la gestación;

- Cualquier neonato y bebé que muestre un retraso del crecimiento del sistema nervioso después de, por ejemplo, hipoxemia-isquemia al nacer o cualquier otro acontecimiento adverso;
- Cualquier neonato y bebé o niño hasta los seis años con disfunciones gastrointestinales (trastornos digestivos, trastornos de motilidad, reflujo gastrointestinal, tránsito gastrointestinal lento o intolerancia oral a los alimentos), enfermedad de Hirschsprung e inflamación que afecte al tubo digestivo (tal como enterocolitis necrotizante) y patologías relacionadas con obstrucción.

La invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos. Debe apreciarse que la invención, tal y como se reivindica, no pretende limitarse de ningún modo a estos ejemplos.

Ejemplo 1:

Estudio con animales (alimentación y sacrificio):

Los experimentos con animales se realizaron con la autorización n.º 2120 garantizada por la Office Vétérinaire Cantonal, Etat de Vaud. Se obtuvieron ratas hembra Sprague-Dawley de dos meses después de una semana de gestación en Harlan, Barcelona. El día de su llegada, las madres rata se instalaron en jaulas individuales y se asignaron al azar en grupos de control (CTRL) o de restricción de proteínas (RP). Los animales tuvieron acceso al alimento y al agua a voluntad y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

En la Tabla 1 se detallan las dietas de las madres de los grupos de CTRL y RP. Las madres de grupo CTRL recibieron una dieta de control que contenía 20 % de proteínas (caseína) adaptada a las necesidades proteicas de ratas estándar durante la gestación (Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C., JR. 1993. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. J. Nutr. 123: 1939-1951.). Las madres del grupo RT recibieron una dieta RP que contenía 10 % de proteínas (caseína). Ambas dietas eran isocalóricas, equilibrándose el déficit de proteínas con la adición de almidón de maíz.

Tabla 1: Composición de dieta de control (CTRL) y de restricción de proteínas (RP) AIN-93G

Componentes	Dietas	
	CTRL	RP
Almidón de maíz	53	63
Caseína (Caseinato de K)	20	10
Sacarosa	10	10
Aceite de soja	7	7
Celulosa	5	5
Mezcla mineral AIN-93G	4	-
Mezcla mineral AIN-93M	-	4
Mezcla de Vitaminas AIN-93	1	1
Bitartrato de Colina	0,25	0,25
L-Cisteína	0,3	0,3
Terc-butilhidroquinona	0,0014	0,0014

Las madres de los grupos CTRL y RP recibieron sus dietas respectivas durante la gestación y la lactancia hasta el día del sacrificio (14 días después del nacimiento (14 DDN)).

Dos DDN, las crías se asignaron al azar a madres del mismo grupo experimental y el tamaño de la camada se ajustó a 9 crías por madre con un número mínimo de cuatro a cinco machos por camada.

Desde 2 DDN hasta 14 DDN, se administró manualmente / con una pipeta, una complementación diaria de agua o de una de las siguientes fracciones lácteas a los grupos de control o tratados, respectivamente. El volumen de las complementaciones se adaptó gradualmente para ajustarse al crecimiento de las crías de rata (150 µl/100 g de peso corporal).

Los grupos y las dietas fueron los siguientes:

- 1) CTRL-a: crías CTRL nacidas de madres CTRL, que recibieron una complementación de agua.
- 2) RP-a: crías RP nacidas de madres RP, que recibieron una complementación de agua.
- 3) RP-Lacprodan Di9224: crías RP nacidas de madres RP, que recibieron una complementación de Lacprodan Di9224.
- 4) RP- PLDM28: crías RP nacidas de madres RP, que recibieron una complementación de PLDM28.

5) RP - concentrado de FC: Crías RP nacidas de madres RP, que recibieron una complementación de concentrado de FC.

Las fracciones lácteas fueron:

- Lacprodan Di9224: aislado de proteína de suero lácteo, suero lácteo dulce, comercializado por Arla Foods Ingredients, Dinamarca.
- PLDM28: suero lácteo dulce modificado utilizando un proceso patentado por Nestlé (eliminación de cGMP).
- Concentrado de FC: Concentrado de factor de crecimiento comercializado por Tatua, Nueva Zelanda. Contiene niveles enriquecidos de IGF (Factor de crecimiento insulínico) y TGF (factor de crecimiento transformante).

Catorce DDN, un máximo de 10 crías de los grupos CTRL y RP, se pesaron y después se sacrificaron por decapitación tras anestesiarse con halotano.

La cavidad peritoneal se abrió por incisión longitudinal de la pared abdominal y se extrajo todo el tubo digestivo y se quitó el mesenterio. El primer tercio del segmento de yeyuno después del ligamiento de Treitz, se aisló y dividió en varios segmentos. Un segmento se lavó abundantemente con PBS a temperatura ambiente y se colocó en solución de Krebs fría para realizar las mediciones de la respuesta contráctil *ex vivo*. Un segmento se aclaró con PBS enfriado con hielo para retirar el material luminal, se transfirió a criotubos individuales, se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80 °C hasta realizar el análisis de genes.

El desarrollo neuronal en el yeyuno se evaluó utilizando dos métodos: (i) una estrategia de perfil de expresión de genes dirigida y (ii) midiendo la respuesta contráctil *ex vivo* del yeyuno frente a una estimulación con campo eléctrico (ECE).

Respuesta contráctil *ex vivo* del yeyuno frente a estimulación con campo eléctrico (ECE):

Segmentos de yeyuno distal de aproximadamente 1 cm de longitud, se colocaron en solución de Krebs fría (CaCl<sub>2</sub> (5 mM), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1,2 mM), NaCl (120 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (1,2 mM), NaHCO<sub>3</sub> (15,5 mM), KCl (5,9 mM), rojo fenol (0,005 mM) y glucosa (11,5 mM)) pre-oxigenada con O<sub>2</sub> al 95 %/CO<sub>2</sub> al 5 %. Los segmentos intestinales se suspendieron a lo largo de su eje longitudinal en un baño tisular (volumen de 50 ml) cargado con solución de Krebs oxigenada con O<sub>2</sub> al 95 %/CO<sub>2</sub> al 5 %, a 37 °C. Un extremo del músculo se conectó a una pinza estacionaria. El otro extremo se conectó mediante un alambre rígido a un transductor de fuerza isométrica.

Se permitió un periodo de estabilización de 30 min para obtener contracciones espontáneas. El tejido se estiró después a una longitud inicial tal que cualquier estiramiento adicional aumentaría la tensión en reposo. La contractilidad isométrica en el yeyuno distal se indujo con acetilcolina (Ac. 10<sup>-5</sup> M) o con estimulación con campo eléctrico (ECE, 5-10 Hz). La Ac. se aplicó durante 1 min. Después de finalizar la curva de respuesta a la dosis, las tiras se analizaron con KCl 80 mM para asegurarse que se había conservado su capacidad para contraerse. Las señales se registraron digitalmente en un ordenador utilizando Powerlab Chart 3.4. Los resultados se normalizaron por área de sección transversal después de secar y pesar cuidadosamente los fragmentos tisulares. Se realizaron ajustes no lineales utilizando Prism 4.0 (Programa Informático GraphPad, Inc., San Diego, Estados Unidos). Para obtener las frecuencias, se realizó un análisis de los espectros de densidad de potencia de la señal medida.

Se aplicó un filtro de paso alto, con una frecuencia de corte de 2 Hz (mucho más pequeña que la frecuencia Nyquist de 100 Hz). Se utilizó el método de Welch para calcular la densidad del espectro de potencia con 1,3 segundos de superposición imponiendo una discretización de baja frecuencia: se definió una serie de frecuencias entre 0 y 2 Hz, separadas equitativamente por 0,05 Hz. Los cálculos de la densidad del espectro de potencia se realizaron utilizando el algoritmo de Goertzel. Se eligieron tres frecuencias correspondientes a los tres mayores valores de potencia por debajo de 2 Hz.

Perfil de expresión génica:

Utilizando el método de fenol/cloroformo con el reactivo TriPure® (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se extrajo ARN total del yeyuno de crías RP y CTRL. En resumen, muestras tisulares congeladas (50-100 mg) se homogeneizaron en 1 ml de TriPure® utilizando TissueLyser (Qiagen AG, Basilea, Suiza). Utilizando el kit de cuantificación de ARN RiboGreen (Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA) y el kit RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en los kits, se midió la cantidad y la calidad del ARN aislado.

Utilizando un cebador oligo (dT15) (Promega, Madison, WI) y el sistema de transcripción inversa ImProm-II™ (Promega) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante, se realizó transcripción inversa con 1 µg de ARN total.

Tabla 2: Listado de genes analizados.

Símbolo del Gen	Nombre Completo Oficial	Función
Ache	Acetilcolinesterasa	Motilidad
Crhr2	Receptor 2 de la hormona liberadora de corticotropina	Motilidad
Bdnf	Factor neurotrófico derivado de cerebro	Factor neurotrófico
Chat	Colina acetiltransferasa	Motilidad
Cckar	Receptor de colecistoquinina A	Motilidad
Chrm2	Receptor colinérgico, muscarínico 2	Motilidad
Chrm3	Receptor colinérgico, muscarínico 3	Motilidad
Crh	Hormona liberadora de corticotropina	Motilidad
Crhbp	Proteína de unión de la hormona liberadora de corticotropina	Motilidad
Crhr1	Receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina	Motilidad
Egf	Factor de crecimiento epidérmico	Factor de crecimiento
Apoe	Apolipoproteína E	Motilidad
Gap43	Proteína 43 asociada al crecimiento	Maduración neuronal
Gdnf	Factor neurotrófico derivado de células gliales	Maduración de la glía
Gfap	Proteína gliofibrilar ácida	Maduración de la glía
Gfra1	Receptor alfa 1 de la familia de GDNF	Maduración de la glía
Gfra2	Receptor alfa 2 de la familia de GDNF	Maduración de la glía
Gmfb	Factor beta de maduración de la glía	Maduración de la glía
Gmfg	Factor gamma de maduración de la glía	Maduración de la glía
Igf1	Factor 1 de crecimiento insulínico	Factor de crecimiento y neurotrófico
Igf2	Factor 2 de crecimiento insulínico	Factor de crecimiento y neurotrófico
Lep	Leptina	Factor neurotrófico
Neurod1	Diferenciación neurogénica 1	Neurodiferenciación
Npffr2	Receptor 2 de neuropéptido FF	Factor de maduración neuronal
Ngf	Factor de crecimiento nervioso (polipéptido beta)	Factor neurotrófico
Ngfr	Receptor del factor de crecimiento nervioso (miembro 16 de la superfamilia de TNFR)	Receptor neurotrófico
Ngfrap1	Proteína 1 asociada al receptor del factor de crecimiento nervioso (TNFRSF16)	Receptor neurotrófico
Npy	Neuropéptido Y	Motilidad
Npy1r	Receptor Y1 de neuropéptido Y	Motilidad
Npy2r	Receptor Y2 de neuropéptido Y	Motilidad
Nrg1	Neurregulina 1	Neurodiferenciación
Nrg2	Neurregulina 2	Neurodiferenciación
Ntf3	Neurotrofina 3	Factor neurotrófico
Ntf4	Neurotrofina 4	Factor neurotrófico
Ntrk1	Receptor neurotrófico de tirosina cinasa de tipo 1	Receptor neurotrófico
Ntrk2	Receptor neurotrófico de tirosina cinasa de tipo 2	Receptor neurotrófico
S100b	Proteína B de unión al calcio S100	Factor neurotrófico
Syp	Sinaptofisina	Neurodesarrollo
Tacr1	Receptor taquinina 1	Motilidad
Tgfa	Factor de crecimiento transformante alfa	Factor de crecimiento
tgfb2	Factor de crecimiento transformante beta 2	Factor de crecimiento
tgfb3	Factor beta 3 de crecimiento transformante	Factor de crecimiento
Ucn	Urocortina	Motilidad

Actb	Beta Actina	Controles
Rpl13a	Proteína L13A ribosómica	Controles
Rplp1	Proteína grande P1 ribosómica	Controles
Gapdh	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Controles
RGDC	Contaminación de ADN Genómico de Rata	Controles

Los niveles de expresión de los genes principales implicados en el desarrollo del sistema nervioso entérico (véase la Tabla 2) se evaluaron mediante RT-PCR cuantitativa, en tiempo real, de 2 etapas utilizando el sistema de micromatriz de PCR Profiler RT de Sybergreen (SABiosciences).

5 Las mediciones se realizaron por duplicado utilizando conjuntos específicos de cebadores y sondas TAMRA fluorescentes durante la fase logarítmica lineal de una reacción PCR con el Sistema de PCR en Tiempo Real Fas TaqMan 7600HT (Applied Biosystems) utilizando el Programa Informático de Detección de Secuencias, versión 2.2. 10 Las reacciones de PCR se efectuaron en pocillos de 2 µl previamente cargados con los cebadores y las sondas específicos del fabricante en cada uno de los 384 pocillos de la placa de reacción. La reacción se realizó utilizando una concentración de muestra de ADNc final de 0,8 ng/µl con la Mezcla Maestra de PCR Universal TaqMan (Applied Biosystems) que contenía enzimas ADN Polimerasa de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), los nucleótidos y el colorante fluorescente ROX utilizado como una referencia de carga pasiva. Se diseñaron las secuencias de los 15 cebadores y de las sondas utilizadas y se validaron en Applied Biosystems y se tomaron de la biblioteca de ensayos a demanda realizados en ratas. El nivel de expresión relativo de cada gen se normalizó mediante el promedio geométrico de genes de control (aquellos cuya expresión era estadísticamente estable en todos los grupos experimental en nuestras condiciones).



Datos estadísticos:

El efecto de la restricción de proteínas se evaluó comparando los grupos RP con CTRL. El efecto de las complementaciones basadas en proteínas se evaluó comparando cada grupo complementado con RP con RP-a. Se evaluó un restablecimiento eventual a los niveles de CTRL comparando cada grupo complementado con RP con el grupo CTRL-a.

Se utilizaron métodos no paramétricos para analizar los datos. Para analizar las diferencias entre los tratamientos se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. También se obtuvo la estimación de Hodges-Lehmann de la diferencia de tratamiento por pares con su intervalo de confianza del 95 %.

Para la expresión de genes, los análisis estadísticos se realizaron sobre recuentos en bruto de umbral de ciclo (Ct, *cycle threshold*), suponiendo que eran valores log 2. Se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía sobre el cambio: gen – gen de referencia, el valor de p calculado es la probabilidad de que al menos uno de los grupos sea diferente de los otros. Los cálculos se han realizado sobre 5 posibles genes de mantenimiento, o sobre la media de más de uno, únicamente los más estables se han mantenido con los criterios del mínimo error residual.

## Ejemplo 2:

A continuación se proporciona un ejemplo de la composición de una fórmula para bebés para su uso de acuerdo con la presente invención. Esta composición se proporciona exclusivamente a modo ilustrativo. La fuente de proteína es una mezcla de PLDM28 al 60 % y caseína al 40 %.

Nutriente	por 100 kcal	por litro
Energía (kcal)	100	670
Proteína (g)	1,83	12,3
Grasa (g)	5,3	35,7
Ácido linoleico (g)	0,79	5,3
ácido $\alpha$ linolénico (mg)	101	675
Lactosa (g)	11,2	74,7
Prebiótico (GOS al 100 %) (g)	0,64	4,3
Minerales (g)	0,37	2,5
Na (mg)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Mn (mg)	8	50
Se (mg)	2	13
Vitamina A ( $\mu$ g RE)	105	700
Vitamina D ( $\mu$ g)	1,5	10
Vitamina E (mg TE)	0,8	5,4
Vitamina K1 ( $\mu$ g)	8	54
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,47
Vitamina B2 (mg)	0,15	1,0
Niacina (mg)	1	6,7
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,50
Ácido fólico ( $\mu$ g)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 ( $\mu$ g)	0,3	2
Biotina ( $\mu$ g)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I ( $\mu$ g)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536	2x10 <sup>7</sup> ufc/g de polvo	

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína lactosérica dulce, para su uso en la prevención o el tratamiento de al menos un trastorno asociado a un sistema nervioso entérico inmaduro o alterado en un bebé o niño pequeño, en la que la proteína lactosérica dulce se administra al bebé o niño pequeño como una dosis diaria de 30 a 80 % de la ingesta de proteína total.
- 10 2. Proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el trastorno es una motilidad gastrointestinal disfuncional que se pone de manifiesto como tránsito intestinal reducido, molestias intestinales, heces duras, estreñimiento y/o reflujo gastrointestinal.
- 15 3. Proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la patología es disfunción de la barrera intestinal, intolerancia a los alimentos o enterocolitis necrotizante.
- 20 4. Proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína lactosérica dulce comprende al menos 88 % p/p de proteína, tiene un contenido de grasas máximo de 0,2 % p/p y un contenido de CGMP de hasta 40 % p/p.
- 25 5. Proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína lactosérica dulce es una proteína lactosérica dulce modificada (PLDM) de la que se ha eliminado parcial o completamente el cGMP.
- 30 6. Proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el contenido final de CGMP es menor de 15 % p/p, preferentemente menor de 10 % p/p, más preferentemente menor de 5 % p/p.
- 35 7. Proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está parcial o ampliamente hidrolizada.
- 40 8. Proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el bebé o niño pequeño es un bebé prematuro o nacido a término, o un niño de seis años.
- 45 9. Proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el bebé o niño pequeño ha tenido hipoxemia-isquemia al nacer, ha tenido o tiene RCIU y/o ha tenido, o se espera que tenga, bajo, muy bajo o extremadamente bajo peso al nacer y/o padece o está padeciendo retraso del crecimiento del sistema nervioso entérico ya sea en el útero o durante el nacimiento o después del mismo.
- 50 10. Una proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la administración al bebé o niño pequeño es a través de la madre lactante y/o directamente al bebé o niño pequeño.
- 55 11. Una proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el periodo de administración al bebé o niño pequeño tiene una duración de al menos 4 semanas, preferentemente de 2-12 meses, y más preferentemente durante un periodo de al menos 18 meses e incluso más preferentemente hasta que el niño tenga 6 años.
- 60 12. Una proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína lactosérica dulce se administra directamente a un bebé o a un bebé que ya da sus primeros pasos, en su forma pura, o diluida en agua, o en leche materna, en un complemento alimentario, o en un fortificante lácteo, o cualquier refuerzo lácteo, utilizado durante la alimentación trófica, en una fórmula para bebés para bebés prematuros, una fórmula de inicio o una fórmula de continuación o una leche de crecimiento o en una bebida láctea.
13. Una proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la administración a la madre lactante o al bebé o al niño pequeño, es por vía oral, preferentemente en alimentos, bebidas, complementos dietéticos o composiciones farmacéuticas.
14. Una proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha proteína lactosérica dulce se administra a un bebé prematuro o nacido a término o a un niño pequeño a una dosis de 1,6-3,2 g de proteína/100 kcal, preferentemente 1,6-2,2 g de proteína/100 kcal e incluso más preferentemente 1,8-2,1 g de proteína/100 kcal.
15. Una proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que esta se administra en una composición que comprende al menos un prebiótico, preferentemente seleccionado de inulina, fructooligosacárido (FOS), fructooligosacárido de cadena corta (FOS de cadena corta), galactooligosacárido (GOS) y oligosacáridos de leche de vaca (OSLV) u oligosacáridos de leche humana (OSLH).

16. Una proteína lactosérica dulce, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que esta se administra en una composición que comprende al menos un probiótico, preferentemente seleccionado de *Bifidobacterium longum* BB536 (ATCC BAA-999); *Lactobacillus rhamnosus* (CGMCC 1.3724), *Bifidobacterium lactis* (NCC2818) o mezclas de los mismos.

5

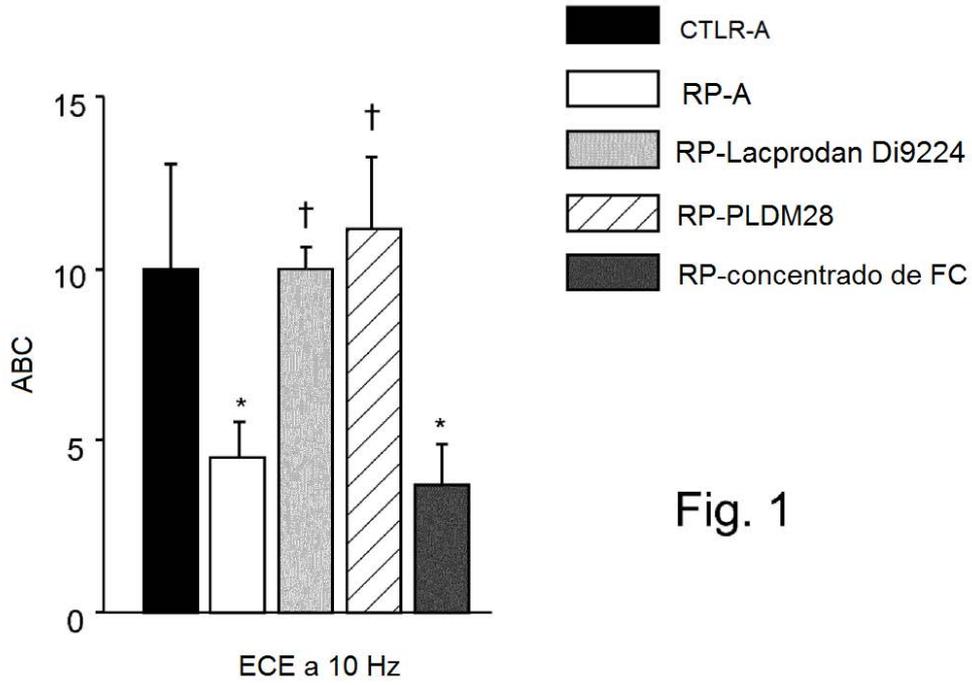


Fig. 1

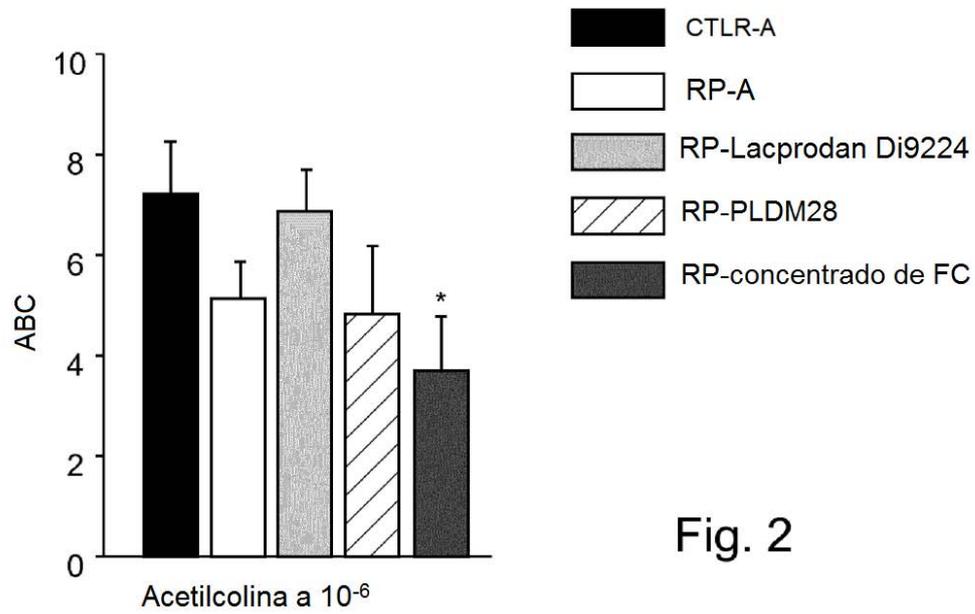


Fig. 2