

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 282**

51 Int. Cl.:

A61K 38/40 (2006.01)

A23J 1/20 (2006.01)

A23L 33/00 (2006.01)

A23L 33/19 (2006.01)

A61K 35/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2010 PCT/EP2010/056237**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010 WO10130643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10718172 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2429572**

54 Título: **Lactoferrina y salud y desarrollo cerebral en los niños**

30 Prioridad:

12.05.2009 EP 09159966

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WANG, BING;
FAURE, MAGALI y
SCHMITT, JEROEN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 715 282 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

Lactoferrina y salud y desarrollo cerebral en los niños

- 5 La presente invención se refiere en general al campo de la salud, protección y desarrollo del cerebro. Una forma de ejecución de la presente invención se refiere a una composición que puede usarse para tratar o prevenir un desarrollo retardado del cerebro y/o del sistema nervioso. Se pueden proteger las células neuronales del cerebro y también se puede aumentar el rendimiento cognitivo.
- 10 La leche materna está recomendada para todos los bebés. Sin embargo, en algunos casos, la lactancia materna es inadecuada o infructuosa, o no es aconsejable por razones médicas o la madre decide no amamantar en absoluto o solo por un periodo de unas pocas semanas. Para estos casos se han desarrollado fórmulas de alimentación infantil. Hoy en día las fórmulas de alimentación infantil se usan comúnmente para proporcionar una nutrición complementaria o como única fuente de nutrición en la primera etapa de la vida. Se pueden usar para alimentar a los bebés en lugar
- 15 de la leche materna o como suplemento de la misma. En consecuencia suelen diseñarse actualmente de manera que su composición y función se parezcan lo más posible a la leche materna.
- Últimamente se están reuniendo pruebas de que la lactancia materna puede aportar ventajas cognitivas duraderas, sobre todo para bebés que han nacidos pequeños o prematuros (Anderson y otros, Am J Clin Nutr 1999; 70: 525-35; Lucas y otros, Lancet 1992; 339: 261-4). Sin embargo sigue sin estar claro el mecanismo subyacente que explique la
- 20 relación entre la lactancia materna y el desarrollo cognitivo.
- Se ha sugerido que el ácido docohexanoico (DHA) y el ácido araquidónico (AA) existentes en la leche humana podrían desempeñar un papel en el efecto observado.
- 25 La patente WO2008/005033 revela una composición que puede acelerar la migración de los neuroblastos, la visión y el desarrollo cognitivo cerebral. Esta composición puede llevar lactoferrina, pero en cuanto al desarrollo neurológico no se atribuye ningún efecto a la lactoferrina per se.
- En otro estudio se asegura que la suplementación dietética con ácido siálico mejora el aprendizaje y la memoria de los lechones (Wang y otros, 2007, American Journal of Clinical Nutrition, vol. 85, nº 2, 561-569). Se sabe que el ácido
- 30 siálico es un componente clave, tanto de los oligosacáridos de la leche humana como de los tejidos neurales.
- El sistema nervioso es una red altamente compleja compuesta de células neuronales y gliales. Está presente en todas las especies de mamíferos. Los cambios metabólicos en el sistema nervioso del córtex después de la administración de lactoferrina denotan la modulación de la memoria a largo plazo.
- 35 La lactoferrina (LF), también conocida como lactotransferrina (LTF), es una proteína globular multifuncional de la cual es sabido que tiene acción antimicrobiana y forma parte de la defensa innata, principalmente en las mucosas.
- La lactoferrina se puede encontrar, por ejemplo, en la leche y el suero de leche y en muchas secreciones mucósicas, como las lágrimas y la saliva. La lactoferrina se puede purificar tal cual, p.ej. a partir de la leche, o se puede producir de forma recombinante.
- 40 La presente invención se refiere a la lactoferrina que se pueda obtener de cualquier fuente.
- 45 La lactoferrina de la leche o del suero de leche, por ejemplo, tiene la ventaja de ser un ingrediente natural obtenido de una composición de calidad alimentaria, que por tanto se puede usar como una fracción enriquecida de la composición alimentaria, sin necesidad de purificación adicional.
- La lactoferrina obtenida de forma recombinante tiene la ventaja de que se puede producir fácilmente a concentraciones
- 50 elevadas.
- El calostro humano tiene una concentración relativamente alta de lactoferrina, seguido de la leche humana y luego de la leche de vaca.
- 55 La composición de la presente invención puede ser particularmente eficaz en mamíferos con RCIU. La restricción del crecimiento intrauterino (IUGR, por sus siglas en inglés) es un término que se usa para describir un estado en el cual el feto o el bebé es más pequeño que lo esperado por el número de semanas de embarazo. El peso de un feto o de un bebé con RCIU suele ser al menos un 10% menor en comparación con los fetos o bebés normales de la misma edad gestacional. Así, por ejemplo, un feto humano con RCIU puede nacer a término (tras 37 semanas de embarazo)
- 60 o prematuramente (antes de 37 semanas).
- Los presentes inventores han encontrado que la lactoferrina o las composiciones enriquecidas con lactoferrina pueden emplearse para proteger las células neuronales contra la degeneración. Esta degeneración puede ser, por ejemplo, consecuencia del estrés. Se vio que la lactoferrina promueve la supervivencia neuronal y/o limita o previene la muerte neuronal en el cerebro.
- 65

En los bebés la lactoferrina y/o las composiciones de la presente invención que contienen lactoferrina se pueden usar para proteger el sistema nervioso central de cualquier estrés que ocurra durante el período de desarrollo neuronal y, por consiguiente, para limitar y/o prevenir el retraso del crecimiento neuronal inducido por estrés y las disfunciones cognitivas relacionadas.

Para los fines de la presente invención el término "infantil" se refiere a niños e incluye sujetos en el intervalo de edad de 0-14 años.

Un bebé humano de menos de un mes de edad es un recién nacido o un neonato. El término "recién nacido" incluye bebés prematuros, bebés post-maduros y recién nacidos a término. Cuando llegan a la edad de un año o empiezan a caminar, se alude a ellos como "niños pequeños" (en general de 12 a 36 meses).

La lactoferrina y/o las composición de la presente invención se puede administrar por ejemplo a

- bebés prematuros o nacidos a término con un retraso en el crecimiento intrauterino que hay ocurrido después de cualquier suceso adverso durante la gestación (hábito de fumar de la madre, medicación de la madre, baja calidad de la placenta, posicionamiento anormal de la placenta, malnutrición de la madre y el feto, etc.)
- bebés prematuros sin ningún retraso del crecimiento intrauterino
- bebés nacido con peso bajo / muy bajo
- recién nacidos con RCIU
- neonatos y niños con retraso del crecimiento cerebral, por ejemplo después de una hipoxemia-isquemia al nacer o de cualquier otro suceso adverso
- neonatos y niños con disfunciones cognitivas, retraso

Por tanto la lactoferrina o la composición de la presente invención se puede administrar al bebé y/o a la madre durante el periodo de gestación y/o lactancia.

Por consiguiente, una forma de ejecución de la presente invención consiste en una composición ingerible enriquecida en lactoferrina.

Enriquecida significa que la lactoferrina se añade a la composición de modo que el contenido de lactoferrina resultante en la composición sea mayor que el contenido de lactoferrina en la composición sin adición de lactoferrina, o que la composición se ha tratado de forma que se concentrara el contenido natural de lactoferrina en la composición.

La lactoferrina también se puede preparar como compuesto puro.

Como alternativa la lactoferrina se puede preparar en forma de una fracción enriquecida en lactoferrina, por ejemplo una fracción de leche o de suero de leche enriquecida en lactoferrina.

Como fuente de leche o de suero de leche se puede usar, por ejemplo, leche bovina, leche humana, leche de cabra, leche de camella, leche de yegua y/o leche de burra. Asimismo se puede usar calostro.

En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran en cantidad suficiente para curar o detener, al menos parcialmente, los síntomas del trastorno y/o sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguirlo se define como "una dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para ello dependerán de una serie de factores conocidos por los expertos en la materia, tales como la gravedad del trastorno y el peso y estado general del paciente. En aplicaciones profilácticas, las composiciones según la presente invención se administran a un paciente susceptible o con riesgo de sufrir un trastorno particular, en una cantidad que sea suficiente para disminuir al menos parcialmente el riesgo de desarrollar el trastorno. Dicha cantidad se define como "una dosis profiláctica efectiva". Nuevamente, las cantidades precisas dependen de una serie de factores específicos del paciente, como el estado de salud y el peso del paciente.

En el marco de la presente invención la lactoferrina se puede administrar en dosis terapéuticamente efectivas y/o en dosis profilácticamente efectivas.

Las típicas composiciones enriquecidas en lactoferrina pueden contenerla en una proporción de al menos 1,6 g/l.

Por ejemplo, la composición de la presente invención puede contener lactoferrina en una concentración de al menos el 0,75% (p/p), preferiblemente de al menos el 1% (p/p).

Según una forma de ejecución, la composición se debe administrar en una cantidad correspondiente a la ingestión de al menos 0,25 g de lactoferrina, preferiblemente de al menos 0,5 g de lactoferrina, con mayor preferencia de al menos 1 g de lactoferrina al día por kg de peso corporal.

Por ejemplo, la composición se puede consumir en una cantidad correspondiente a la ingestión de al menos 1 g de lactoferrina/kg de peso corporal/día para las madres gestantes y/o lactantes.

La composición también puede ser consumida en una cantidad correspondiente a la ingestión de al menos a 200 mg de lactoferrina/kg de peso corporal/día para los niños.

La lactoferrina puede estar contenida en la composición a una concentración de al menos 0,01 g por 100 kcal, preferiblemente de al menos 0,1 g por 100 kcal. Por ejemplo, la lactoferrina puede estar contenida en la composición a una concentración comprendida en un intervalo aproximado de 0,01 g -100 g, preferiblemente de 0,1 g - 50 g, con mayor preferencia de 2 g - 25 g por 100 kcal de la composición.

La lactoferrina también se puede usar en combinación con otros compuestos, tales como ácido siálico y/o hierro, por ejemplo.

Una composición particularmente preferida con contenido de lactoferrina puede incluir además ácido siálico en una proporción comprendida en el intervalo de 100 mg/100 g (p/p) hasta 1000 mg/100 g (p/p) de composición, por ejemplo en el intervalo de 500 mg/100 g (p/p) hasta 650 mg/100 g (p/p) de composición.

La composición de la presente invención puede contener, por ejemplo, al menos un 0,001% en peso aproximadamente de ácido siálico. En otras formas de ejecución de la presente invención la composición puede contener al menos un 0,005% en peso aproximadamente, o al menos un 0,01% en peso aproximadamente, de ácido siálico.

Como alternativa, o adicionalmente, la composición que lleva lactoferrina puede contener hierro en una proporción comprendida en el intervalo aproximado de 1 mg/100 g (p/p) hasta 50 mg/100 g (p/p) de composición, por ejemplo de 10 mg/100 g (p/p) hasta 30 mg/100 g (p/p) de composición.

Una composición que lleve lactoferrina puede contener por ejemplo unos 852 mg/100 g.

Según una forma de ejecución, la composición debe administrarse en una cantidad correspondiente a la ingestión de al menos 0,25 g de lactoferrina, preferiblemente de al menos 0,5 g de lactoferrina, con mayor preferencia de al menos 1 g de lactoferrina al día por kg de peso corporal.

Por ejemplo, la composición se puede consumir en una cantidad correspondiente a la ingestión de al menos 1 g de lactoferrina/kg de peso corporal/día para las madres gestantes y/o lactantes.

La composición también se puede consumir en una cantidad correspondiente a la ingestión de al menos 200 mg de lactoferrina/kg de peso corporal/día para los niños.

La lactoferrina puede estar contenida en la composición a una concentración de 2 g - 25 g por kcal de composición.

La lactoferrina también se puede usar en combinación con otros compuestos, tales como ácido siálico y/o hierro, por ejemplo.

Una composición particularmente preferida con contenido de lactoferrina puede incluir además ácido siálico en una proporción comprendida en el intervalo de 100 mg/100 g (p/p) hasta 1000 mg/100 g (p/p) de composición, por ejemplo en el intervalo de 500 mg/100 g (p/p) hasta 650 mg/100 g (p/p) de composición.

La composición de la presente invención puede contener, por ejemplo, al menos un 0,001% en peso aproximadamente de ácido siálico. En otras formas de ejecución de la presente invención la composición puede contener al menos un 0,005% en peso aproximadamente, o al menos un 0,01% en peso aproximadamente de ácido siálico.

Como alternativa, o adicionalmente, la composición que lleva lactoferrina puede contener hierro en una proporción comprendida en el intervalo aproximado de 1 mg/100 g (p/p) hasta 50 mg/100 g (p/p) de composición, por ejemplo de 10 mg/100 g (p/p) hasta 30 mg/100 g (p/p) de composición.

Una composición con un contenido de lactoferrina de unos 852 mg /100 g, por ejemplo, da como resultado una proteína con un contenido de treonina más parecido al de la leche humana. Luego este suero de leche dulce modificado puede complementarse con aquellos aminoácidos que contiene en baja proporción (principalmente histidina y triptófano). En la patente EP 880902 se describe un proceso para eliminar el GMPC del suero de leche dulce y en la patente WO 01/11990 se describe una fórmula infantil basada en este suero de leche dulce modificado. Las proteínas pueden ser intactas o hidrolizadas, o una combinación de proteínas intactas e hidrolizadas. Puede ser conveniente proporcionar proteínas parcialmente hidrolizadas (con un grado de hidrólisis entre el 2 y el 20%), por ejemplo para aquellos sujetos que supuestamente corran el riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca. Si se requieren proteínas hidrolizadas, el proceso de hidrólisis se puede llevar a cabo del modo deseado y conocido en el estado técnico. Por ejemplo, un hidrolizado de proteína de suero de leche se puede preparar hidrolizando enzimáticamente la fracción de suero en dos etapas, tal como está descrito en la patente EP 322589. Para obtener una proteína extensamente hidrolizada, las proteínas de suero de leche se pueden someter a una hidrólisis triple utilizando Alcalase 2.4L (EC 940459), después Neutrase 0.5L (que puede adquirirse de Novo Nordisk Ferment AG) y luego pancreatina a 55°C. Si la fracción de suero de leche empleada como material de partida está sustancialmente libre de lactosa, se encuentra que la proteína sufre

mucho menos bloqueo de lisina durante el proceso de hidrólisis. Esto permite reducir el nivel de bloqueo de lisina desde aproximadamente el 15% en peso de la lisina total hasta aproximadamente menos del 10% en peso de la lisina, por ejemplo hasta aproximadamente el 7% en peso de la lisina, lo cual mejora mucho la calidad nutricional de la fuente proteica.

5 Las composiciones de la presente invención pueden contener una fuente de hidratos de carbono. Se puede emplear cualquier fuente de hidratos de carbono tales como lactosa, sacarosa, maltodextrina, almidón y mezclas de ellos.

10 Las composiciones de la presente invención pueden contener una fuente de lípidos. La fuente de lípidos puede ser cualquier lípido. Las fuentes de grasa preferidas incluyen grasa de leche, oleína de palma, aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico y aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico. También pueden agregarse ácidos grasos esenciales como el linoleico y el α -linolénico, y asimismo pequeñas cantidades de aceites con gran contenido de ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico preformados, como los aceites de pescado o los aceites microbianos. La fuente de lípidos tiene preferiblemente una relación de ácidos grasos n-6 a n-3 de aproximadamente 5:1 hasta 15:1; por ejemplo, de aproximadamente 8:1 hasta aproximadamente 10:1.

Las composiciones de la presente invención también pueden contener en proporciones nutricionalmente significativas todas las vitaminas y minerales que se consideran esenciales en la dieta diaria.

20 Se han fijado unos requisitos mínimos para ciertas vitaminas y minerales. Los ejemplos de minerales, vitaminas y otros nutrientes presentes opcionalmente en la fórmula infantil incluyen vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina E, vitamina K, vitamina C, vitamina D, ácido fólico, inositol, niacina, biotina, ácido pantoténico, colina, calcio, fósforo, yodo, hierro, magnesio, cobre, cinc, manganeso, cloruro, potasio, sodio, selenio, cromo, molibdeno, taurina y L-carnitina. Los minerales se añaden generalmente en forma salina. La presencia y las cantidades de minerales específicos y de otras vitaminas variarán dependiendo de numerosos factores, tales como la edad, el peso y el estado de la persona o del animal al que se administra la composición.

30 Las composiciones también pueden contener al menos una cepa bacteriana probiótica. Un probiótico es un preparado de células microbianas o de componentes de células microbianas que tienen un efecto beneficioso en la salud o en el bienestar del huésped. Las cepas bacterianas probióticas adecuadas incluyen *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, que se puede obtener de Valio Oy de Finlandia con la marca comercial LGG, *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-2116, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, que se puede obtener de BioGaia AB, *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446, vendido, entre otros, por la empresa Christian Hansen de Dinamarca con la marca comercial Bb12 y *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, vendido por Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón con la marca comercial BB536. Si está presente, la cantidad de probiótico también varía preferiblemente en función de la edad de la persona o del animal. En general el contenido de probióticos puede aumentar con la edad del niño, por ejemplo de 10^3 hasta 10^{12} ufc/g de fórmula, con mayor preferencia entre 10^4 y 10^8 ufc/g de fórmula (peso seco).

40 Las composiciones también pueden contener al menos un prebiótico en una proporción del 0,3 al 10%. Un prebiótico es un ingrediente alimentario no digerible que afecta de manera beneficiosa al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o de un número limitado de bacterias en el colon, y que por tanto mejora la salud del huésped. Estos ingredientes no son digeribles en el sentido de ser descompuestos y absorbidos en el estómago o en el intestino delgado y, por lo tanto, pasan intactos al colon, donde son fermentados selectivamente por las bacterias beneficiosas. Como ejemplos de prebióticos cabe citar ciertos oligosacáridos, como los fructo-oligosacáridos (FOS) y los galacto-oligosacáridos (GOS). Se puede usar una combinación de prebióticos tal como un 90% de GOS con un 10% de fructo-oligosacáridos de cadena corta, como el producto vendido con la marca comercial Raftilose®, o con un 10% de inulina, como el producto vendido con la marca registrada Raftiline®.

50 Un prebiótico particularmente preferido es una mezcla de galacto-oligosacárido(s), oligosacárido(s) N-acetilado(s) y oligosacárido(s) sialilado(s) en la cual el o los oligosacárido(s) N-acetilado(s) constituyen del 0,5 al 4,0% de la mezcla de oligosacáridos, el o los galacto-oligosacárido(s) constituyen del 92,0 al 98,5% de la mezcla de oligosacáridos y el o los oligosacárido(s) sialilado(s) constituyen del 1,0 al 4,0% de la mezcla de oligosacáridos. Esta mezcla se denomina en lo sucesivo "CMOS-GOS". Una composición para usar según la invención contiene preferiblemente del 2,5 al 15,0% en peso de CMOS-GOS sobre materia seca, con la condición de que la composición lleve al menos un 0,02% en peso de un oligosacárido N-acetilado, al menos un 2,0% en peso de un galacto-oligosacárido y al menos un 0,04% en peso de un oligosacárido sialilado.

60 Los oligosacáridos N-acetilados adecuados incluyen $\text{GalNAc}\alpha 1,3\text{Gal}\beta,4\text{Glc}$ y $\text{Gal}\beta 1,6\text{GalNAc}\alpha 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$. Los oligosacáridos N-acetilados se pueden preparar por acción de la glucosaminidasa y/o la galactosaminidasa sobre N-acetil-glucosa y/o N-acetil-galactosa. Con este fin también se pueden usar N-acetil-galactosil transferasas y/o N-acetil-glicosil transferasas. Los oligosacáridos N-acetilados también pueden producirse mediante tecnología de fermentación con los respectivos enzimas (recombinantes o naturales) y/o fermentación microbiana. En el último caso los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o pueden diseñarse genéticamente para producir los sustratos y enzimas respectivos. Se pueden emplear cultivos microbianos individuales o cultivos mixtos. La formación de los oligosacáridos N-acetilados puede ser iniciada por sustratos aceptores a partir de cualquier grado de polimerización

(GP), desde GP = 1 en adelante. Otra opción es la conversión química de ceto-hexosas (p.ej. fructosa) libres o unidas a un oligosacárido (p.ej. lactulosa) en N-acetilhexosamina o en una N-acetilhexosamina que lleve oligosacárido, como está descrito en Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999), *Angew. Chem. Int. Ed.* 38:827-828. Los galacto-oligosacáridos adecuados incluyen Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,4Gal β 1,4Glc y Gal β 1,4Gal β 1,4Gal β 1,4Glc. Galacto-oligosacáridos sintetizados tales como Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,4Gal β 1,4Glc y Gal β 1,4Gal β 1,4Gal β 1,4Glc y sus mezclas están disponibles comercialmente con las marcas comerciales Vivinal® y Elix'or®. Otros proveedores de oligosacáridos son Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH y Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Como alternativa se pueden emplear glicosiltransferasas específicas, tales como las galactosiltransferasas, para producir oligosacáridos neutros.

Los oligosacáridos sialilados idóneos incluyen NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc. Estos oligosacáridos sialilados se pueden aislar mediante tecnología cromatográfica o de filtración, a partir de una fuente natural como las leches animales. Alternativamente también pueden producirse por biotecnología usando sialiltransferasas específicas, ya sea por tecnología de fermentación basada en enzimas (enzimas recombinantes o naturales) o mediante tecnología de fermentación microbiana. En este último caso los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o pueden diseñarse genéticamente para producir los sustratos y enzimas correspondientes. Se pueden utilizar cultivos microbianos individuales o cultivos mixtos. La formación de sialil oligosacáridos se puede iniciar mediante sustratos aceptores a partir de cualquier grado de polimerización (GP), desde GP = 1 en adelante.

Las composiciones pueden contener opcionalmente otras sustancias de efecto beneficioso tales como nucleótidos, nucleósidos y similares.

Las composiciones, por ejemplo una fórmula infantil para usar según la presente invención, se pueden preparar de cualquier modo adecuado. Por ejemplo, una fórmula infantil se puede preparar mezclando en proporciones apropiadas la fuente de proteínas, la fuente de hidratos de carbono y la fuente de grasa. En caso de emplearlos, los emulsionantes se pueden incluir en la mezcla. Las vitaminas y los minerales se pueden añadir en este punto, pero generalmente se agregan más tarde para evitar la degradación térmica. Cualquier vitamina, emulsionante y similares de carácter lipófilo pueden disolverse en la fuente de grasa antes de la mezcla. Para formar una mezcla líquida se puede añadir agua, preferiblemente agua que haya sido sometida a ósmosis inversa. La mezcla líquida puede tratarse térmicamente para disminuir las cargas bacterianas. Por ejemplo, la mezcla líquida se puede calentar rápidamente a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 80°C hasta aproximadamente 110°C, durante aproximadamente 5 segundos hasta aproximadamente 5 minutos, lo cual puede tener lugar por inyección de vapor o intercambio de calor, por ejemplo con un intercambiador de calor de placas. Luego la mezcla líquida se puede enfriar a una temperatura comprendida entre 60°C y 85°C aproximadamente, por ejemplo por enfriamiento instantáneo. A continuación la mezcla líquida se puede homogeneizar, por ejemplo en dos etapas de aproximadamente 7 MPa hasta aproximadamente 40 MPa en la primera etapa y de aproximadamente 2 MPa hasta aproximadamente 14 MPa en la segunda etapa. La mezcla homogeneizada se puede seguir enfriando todavía más para agregar cualquier componente térmicamente sensible, tal como vitaminas y minerales. El pH y el contenido de sólidos de la mezcla homogeneizada se estandarizan convenientemente en este punto. La mezcla homogeneizada se transfiere a un aparato de secado idóneo, tal como un secador por pulverización o un liofilizador, y se transforma en polvo. El polvo debe tener un contenido de humedad inferior aproximadamente al 5% en peso. Si se quiere agregar uno o más probióticos, éstos se pueden cultivar por cualquier método apropiado y se pueden preparar para añadirlos a la fórmula infantil por liofilización o secado por pulverización, por ejemplo. Como alternativa las preparaciones bacterianas se pueden adquirir a proveedores especializados como Christian Hansen y Morinaga, ya preparados de forma adecuada para añadirlos a productos alimenticios como una fórmula infantil. Dichas preparaciones bacterianas se pueden añadir en polvo a la fórmula infantil por mezclado en seco.

La lactoferrina se puede añadir en cualquier fase de este procedimiento, pero es preferible agregarla tras la etapa de calentamiento.

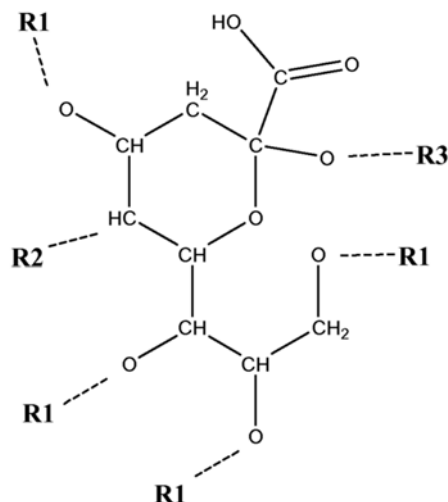
La composición comprende una fuente proteica cuyo contenido puede estar comprendido entre 1,4 y 100 g/100 kcal, preferiblemente entre 1,4 y 6,0 g/100 kcal de la composición. Como la lactoferrina es una proteína debe considerarse una parte de la fuente proteica.

Es sabido que la proteína de suero de leche proporciona varios beneficios para la salud. Por ejemplo, es fácilmente digerible. La fracción proteica del suero de leche (aproximadamente el 10% del total de sólidos secos del suero) incluye varias fracciones de proteína, como por ejemplo beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina, albúmina de suero bovino e inmunoglobulinas. Según una forma de ejecución, al menos el 50%, preferiblemente al menos el 75% y con mayor preferencia al menos el 85% en peso de la fuente proteica es proteína de suero de leche.

Si está presente, la fuente de lípidos puede contribuir entre un 30 y un 55% a la energía total de la composición. Una fuente de hidratos de carbono puede contribuir entre un 35 y un 65% a la energía total de la composición.

También se puede añadir ácido siálico a la composición de la presente invención. Ácido siálico es un término genérico de los derivados N- u O-sustituidos del ácido neuramínico, un monosacárido con un esqueleto de nueve carbonos.

Para los fines de la presente invención se puede emplear cualquier ácido siálico. No obstante se prefiere que el ácido siálico tenga la fórmula siguiente



R1 = H, acetilo, lactilo, metilo, sulfato, fosfonato, ácido anhidrosiálico, fucosa, glucosa o galactosa

R2 = N-acetilo, N-glicolilo, amino, hidroxilo, N-glicolil-O-acetilo o N-glicolil-O-metilo

R3 = H, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico o ácido N-glicolilneuramínico

R1 se puede escoger del grupo formado por H, acetilo, lactilo, metilo, sulfato, fosfonato, ácido anhidrosiálico, fucosa, glucosa y/o galactosa.

R2 se puede escoger del grupo formado por N-acetilo, N-glicolilo, amino, hidroxilo, N-glicolil-O-acetilo y/o N-glicolil-O-metilo.

R3 se puede escoger del grupo formado por H, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico y/o ácido N-glicolilneuramínico.

Los grupos en posición R1 pueden ser idénticos o distintos entre sí.

Por ejemplo, el ácido siálico puede ser ácido N-acetilneuramínico con R1 = H, R2 = N-acetilo y R3 = H. Según otra forma de ejecución de la presente invención el ácido siálico se puede escoger del grupo formado por el ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulosónico (Neu5Ac) y el ácido N-glicolilneuramínico o mezclas de los mismos.

El ácido siálico empleado en la presente invención comprende el ácido N-acetilneuramínico, que tiene los siguientes sinónimos y abreviaciones: ácido O-siálico; ácido 5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulosónico; ácido 5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactonulosónico; ácido aceneurámico; N-acetil-neuraminato; ácido N-acetilneuramínico; NANA, y Neu5Ac.

La presente invención se amplía con el uso de lactoferrina para preparar una composición destinada al tratamiento o a la prevención de un desarrollo retardado del cerebro y/o del sistema nervioso.

Para los usos de la presente invención es fundamental que la composición contenga lactoferrina o un compuesto que produzca lactoferrina después del consumo. La composición no tiene por qué estar enriquecida en lactoferrina, aunque eso sería preferible, pues así se podría administrar más lactoferrina mediante volúmenes menores.

La lactoferrina se puede usar para preparar cualquier tipo de composición. Sin embargo es preferible proporcionar la lactoferrina como una composición según lo descrito anteriormente.

En una forma de ejecución de la presente invención, la composición que contiene lactoferrina se puede emplear para tratar o prevenir un desarrollo retardado de la visión.

En otra forma de ejecución de la presente invención, la composición que contiene lactoferrina se puede emplear para tratar o prevenir una migración neuronal retardada.

En otra forma de ejecución de la presente invención, la composición que contiene lactoferrina se puede emplear para tratar o prevenir un desarrollo cognitivo retardado.

La composición de la presente invención se puede emplear para aumentar la densidad neuronal y/o la supervivencia neuronal.

Además las composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar o prevenir una deficiente capacidad de aprendizaje, un rendimiento mental alterado o un periodo de atención reducido.

Para conseguirlo, la composición se puede administrar a las madres durante el embarazo, a las madres durante la lactancia, a los bebés prematuros o nacidos a término, a los bebés nacidos con peso bajo o muy bajo, a los bebés con RCIU y a bebés, niños pequeños, niños mayores y/o adolescentes.

Aunque las composiciones de la presente invención se pueden emplear en general para tratar o prevenir trastornos cerebrales y/o para reparar y/o revertir el daño cerebral en bebés de cualquier grupo de edad, se encontró que las composiciones de la presente invención son especialmente útiles para tratar o prevenir trastornos cerebrales y/o para reparar y/o revertir el daño cerebral en niños con RCIU.

Los especialistas en la materia entenderán que se pueden combinar libremente todas las características de la presente invención descritas en este documento, sin apartarse del alcance de la presente invención tal como está descrita. En particular, las características descritas para los usos de la presente invención se pueden aplicar a la composición de la presente invención y viceversa.

Otras ventajas y características de la presente invención son evidentes a partir de los siguientes ejemplos y figuras.

La figura 1 representa el porcentaje de células NS20Y positivas para el crecimiento de neuritas, en estado basal (células no tratadas) y después del tratamiento de las células con el factor neurotrófico FNTC (100 ng/ml, control positivo) o con la fracción de leche bovina enriquecida con lactoferrina a diferentes concentraciones. Los datos son valores medios $\pm$ ESM, n = 3 hasta 7 en función del grupo (basal, n = 7; FNTC, n = 3; 1 μ g/l, n = 3; 10 μ g/l, n = 7; 100 μ g/l, n = 3; 1 mg/l, n = 3; 10 mg/l, n = 5; 100 mg/l, n = 7; 1 g/l, n = 6). Los datos se compararon con el grupo basal no tratado mediante la prueba t de Student. Una diferencia se consideró significativa cuando $P < 0,05$.

La figura 2 muestra la liberación de enolasa específica de neuronas (NSE), un marcador de la muerte de las células neuronales, mediante un cultivo primario de neuronas entéricas, seguido de exposición a H_2O_2 y prevención con lactoferrina de leche bovina. Los datos son valores medios $\pm$ ESM, n = 8. Se consideró significativa una diferencia cuando $P < 0,05$.

La figura 3 muestra el porcentaje de células positivas para 7-AAD, en células SH-SY5Y cultivadas, después de la exposición a H_2O_2 en presencia o en ausencia de distintas concentraciones de lactoferrina de leche bovina, desde 0,001 hasta 1 g/l.

La figura 4a muestra la relación entre el peso del cerebro y el peso corporal al P1 en bebés normales y con RCIU. Se encontró que la relación entre el peso del cerebro y el peso corporal aumentaba después de la administración de lactoferrina durante la gestación, tanto en bebés normales e incluso más en bebés con RCIU.

La figura 4b muestra la relación entre el peso del cerebro y el peso corporal al P7 en bebés normales y con RCIU. Se encontró que la relación entre el peso del cerebro y el peso corporal aumentaba después de la administración de lactoferrina, tanto en bebés normales e incluso más en bebés con RCIU.

La figura 5 representa la presencia de varios marcadores metabólicos indicativos de la actividad y del desarrollo cerebral en el hipocampo de bebés normales, bebés con RCIU y bebés con IUGR tratados con lactoferrina al P7. La actividad del hipocampo está vinculada al aprendizaje y a la memoria a corto plazo.

La figura 6 representa la presencia de varios marcadores metabólicos indicativos de la actividad y del desarrollo cerebral en el córtex de bebés normales, bebés con RCIU y bebés con IUGR tratados con lactoferrina al P7. La actividad del córtex está vinculada a la memoria a largo plazo.

La figura 7 muestra la morfología de los núcleos en las zonas CA2-CA3 del hipocampo después de la tinción con DAPI.

La figura 8 demuestra que la suplementación con lactoferrina en la dieta aumentó significativamente la expresión génica del factor neurotrófico derivado del cerebro (FND) en el día postnatal 7.

La figura 9 muestra los resultados de un ensayo de adaptación libre para ratas de 4,5 meses de edad. n = 10 para vehículo de control y vehículo bLf, n = 7 para control-dex, n = 14 para bLf-Dex; un solo parámetro: visitas.

Ejemplos:

La actividad biológica de la fracción de leche bovina enriquecida con lactoferrina tiene el efecto de promover la supervivencia de las células neuronales y el crecimiento de las neuritas in vitro.

El proceso de crecimiento de las neuritas comprende el crecimiento de los axones de las neuronas y forma parte del desarrollo neuronal. El efecto de una fracción de leche bovina enriquecida en lactoferrina sobre el crecimiento de las neuritas se midió utilizando un bioensayo in vitro bien establecido y de uso común.

En suma, las células de neuroblastoma murino NS20Y (DSMZ) se descongelaron del almacenamiento criogénico, se sembraron en placas a una densidad de aproximadamente 27×10^3 células por cm^2 en matraces de cultivo de tejidos (Falcon) y se expandieron en presencia de DMEM (Gibco) que contenía FCS al 10% (Gibco) y L-glutamina 2 mM

(Gibco). Dos días después de la siembra, las células se despegaron del matraz por agitación mecánica (golpeteo del matraz) y se obtuvo una suspensión de una sola célula, pasando la suspensión varias veces a través de una pipeta de vidrio pulida a la llama. Las células se sembraron en placas sobre cubreobjetos redondos de vidrio de 13 mm, en presencia de DMEM que contenía FCS al 10% y L-glutamina 2 mM, a una densidad de 2.000 células por cubreobjetos. Al día siguiente se cambió el medio por otro DMEM que contenía FCS al 0,5%, L-glutamina 2 mM y concentraciones distintas de las fracciones de leche analizadas. Un día después, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos.

Se fotografiaron todos los cubreobjetos con un microscopio Axioplan 2 (Zeiss). Se tomaron imágenes digitales de 25 zonas definidas a lo largo del diámetro del cubreobjetos (objetivo 20X, Axiocam MRc, Zeiss). Las células se contaron metódicamente desde la primera zona, al borde del cubreobjetos, y a través del mismo, hasta totalizar 100 células. Las células se valoraron positiva o negativamente en cuanto al crecimiento de las neuritas. Las células se consideraron positivas para el crecimiento de las neuritas, si las proyecciones similares a los axones que emanan del cuerpo celular alcanzaban una longitud mayor que el cuerpo celular.

Se usó una prueba t de Student para comparar las diferencias de los valores medios entre una población de referencia tomada como control y las medias de todos los tratamientos en cada grupo.

Se ensayaron las siguientes concentraciones de fracción de leche bovina enriquecida con lactoferrina: 1 µg/l, 10 µg/l, 100 µg/l, 1 mg/l, 10 mg/l, 100 mg/l y 1 g/l. Se efectuó un control positivo (FNCT, factor neurotrófico ciliar, 100 ng/ml), que es un factor neurotrófico bien conocido y ha sido descrito como promotor del crecimiento de neuritas de distintas poblaciones neuronales (Oyesiku y Wigston, 1996 (Oyesiku NM, Wigston DJ: Ciliary neurotrophic factor stimulates neurite outgrowth from spinal cord neurons [*El factor neurotrófico ciliar estimula el crecimiento de neuritas a partir de neuronas de la médula espinal*]. J Comp Neurol 1996; 364: 68-77..). Un control basal constaba de células no tratadas. Los resultados se muestran en la figura 1.

Protección de las células neuronales contra el estrés

Unos cultivos primarios de células neuronales entéricas de rata se sembraron en pocillos y se incubaron durante 48 h con distintas concentraciones de fracción de leche bovina enriquecida con lactoferrina. Después de lavar tres veces con suero fisiológico tamponado con fosfato (PBS estéril a 37°C), las células se incubaron durante 12 horas en medio celular sin lactoferrina y en el mismo medio con H₂O₂ o con su vehículo (control). El efecto protector de la lactoferrina contra la muerte de las células neuronales inducida por H₂O₂ se evaluó midiendo la liberación de enolasa específica de neuronas (NSE) en el medio celular. Después del estrés oxidativo se recogió el medio de los distintos grupos y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 rpm (4°C). Se recogió el sobrenadante y el NSE liberado en el medio de cultivo se cuantificó mediante un ensayo inmunoradiométrico. Los resultados están expresados en ng/ml. Como se muestra en la figura 2, el H₂O₂ indujo un incremento significativo de NSE en el medio (p < 0,05, n = 8). El tratamiento de las células entéricas neuronales primarias con fracción enriquecida en lactoferrina evitó significativamente la liberación de NSE inducida por H₂O₂ (p < 0,05, n = 8).

La propiedad neuroprotectora de la lactoferrina bovina se confirmó usando una línea celular humana de tipo neuronal (células de neuroblastoma SH-SY5Y). En suma, se sembraron células SH-SY5Y en placas durante 24 h y la fracción enriquecida con lactoferrina bovina se incorporó a los medios de cultivo de las células a diferentes concentraciones durante las siguientes 48 h. Las células se estimularon con H₂O₂ durante 6 h. Por último las células se lavaron con PBS 0,1 M antes de recogerlas con tripsina-EDTA. La suspensión celular se juntó con el sobrenadante y se centrifugó durante 5 minutos a 2.000 rpm. Después de la centrifugación, el sedimento se resuspendió en 500 microlitros de PBS 0,1M. La permeabilidad de membrana se evaluó por citometría de flujo utilizando 7-AAD como marcador fluorescente. Para ello se incubaron 200 microlitros de suspensión celular con 7-AAD durante 10 minutos antes de la adquisición, utilizando el bioanalizador BD FACS Array™. Este ensayo de citometría de flujo con 7-aminoactinomicina D (7-AAD) permitió distinguir células SH-SY5Y vivas (7-AAD negativas) y apoptóticas/necróticas tardías (7-AAD positivas) como respuesta al estrés oxidativo. Los resultados mostrados en la figura 3 están expresados como porcentaje de células 7-AAD positivas respecto al número total de células. Como se ve en la figura 3, el H₂O₂ indujo un aumento significativo del porcentaje de células 7-AAD positivas (p < 0,05, n = 6). El tratamiento de las células SH-SY5Y con lactoferrina evitó el aumento del porcentaje de células 7-AAD positivas inducido por H₂O₂.

La lactoferrina mejora la relación peso del cerebro/peso corporal

Modelo de rata: ratas Wister

Las madres se tratan con dexametasona (DEX) durante la tercera semana de gestación. Este corticoesteroide se administrará durante la 3ª semana de gestación con una bomba osmótica Alzet® alojada subcutáneamente; como control se utilizarán animales tratados con una bomba osmótica que lleva suero fisiológico. Este diseño representa un modelo de gran debilidad para las crías, que simula una situación de inestabilidad durante el período perinatal en la especie humana y es un modelo característico para demostrar la capacidad de la lactoferrina para mejorar el desarrollo cerebral, aparte de cualquier otra intervención. La suplementación con lactoferrina se ensayará 1) durante la gestación y la lactancia, 2) durante la lactancia y 3) sin suplementación. Con el fin de establecer un diseño experimental lógico

que permita realizar comparaciones adecuadas, se aplicará el mismo protocolo de suplementación en las gestaciones normales.

Crías con RCIU: el modelo de crecimiento intrauterino retardado (RCIU) se obtiene mediante el tratamiento de las madres con dexametasona (100 µg/kg/día) durante la tercera semana de gestación. Para la suplementación nutricional de las madres gestantes, la lactoferrina se administrará por vía oral desde el día 15º de la gestación hasta el destete y la comida estará disponible a voluntad. La lactoferrina se administrará a las ratas recién nacidas desde el primer día postnatal hasta el destete.

Se utilizaron los 6 grupos siguientes de animales:

Grupo 1: crías normales; ninguna intervención nutricional en las madres de control (simulación = bomba osmótica con tampón de suero fisiológico).

Grupo 2: crías con RCIU; ninguna intervención nutricional en las madres tratadas con DEX.

Grupo 3: crías normales; suplementación con bLf (1g/kg/día) a las madres de control (simulación), desde el inicio de la gestación hasta el final de la lactancia.

Grupo 4: crías con RCIU; suplementación con bLf (1g/kg/día) a las madres tratadas con DEX, desde el inicio de la gestación hasta el final de la lactancia.

Grupo 5: crías con RCIU; ninguna intervención nutricional en las madres tratadas con DEX; al vehículo de las crías (el mismo volumen que con bLf) se le añadieron por caída 200 mg/kg/día de una mezcla de aminoácidos que simulaba la caseína, además de la lactancia, desde el día 1 hasta el 21 después del parto.

Grupo 6: crías con RCIU; ninguna intervención nutricional en las madres tratadas con DEX; suplementación con bLf (200 mg/kg/día) a las crías mediante alimentación por caída, además de la lactancia, desde el día 1 hasta el 21 después del parto.

Se obtuvieron los siguientes resultados, que se muestran en la figura 4 a) y b).

El peso corporal de las crías del grupo de control con DEX y de DEX suplementado con lactoferrina, al nacer es un 20-25% aproximadamente menor que en el grupo con vehículo de control. Esto demuestra que el modelo DEX es una herramienta válida para imitar una situación de debilidad durante el período perinatal en especies humanas.

Por tanto es un modelo característico que sirve para demostrar la capacidad de la lactoferrina como potenciador del desarrollo cerebral, aparte de cualquier otra intervención.

El peso del cerebro, tanto en el grupo de control con DEX como en los grupos suplementados con lactoferrina DEX, fue menor que en el grupo con vehículo de control. Sin embargo, la disminución del peso del cerebro es menor que la del peso corporal en los grupos suplementados con Lf, y por consiguiente el día postnatal 1 la relación entre el peso del cerebro y el peso corporal es mayor en el grupo de tratamiento con Dex Lf que en el grupo de control con Dex.

Curiosamente, el peso del cerebro en el grupo Dex Lf alcanzó al del grupo con vehículo de control el día postnatal 21.

La lactoferrina aumenta el metabolismo en el cerebro

Mediante análisis por LC se cuantificarán los 18 metabolitos siguientes, tanto del córtex como del hipocampo: alanina (Ala), aspartato (Asp), creatina (Cr), ácido γ-aminobutírico (GABA), glucosa (Glc), glutamato (Glu), glutamina (Gin), glutatión (GSH), glicerofosforilcolina (GPC), fosforilcolina (PCho), mio-inositol (Ins), lactato (Lac), N-acetilaspartato (NAA), N-acetilaspargilglutamato (NAAG), fosfocreatina (PCr), fosforiletanolamina (PE), escilo-inositol y taurina (Tau).

El objetivo fue visualizar los cambios en el desarrollo cerebral tras las exposiciones prenatales adversas, empleando técnicas de RM *in vivo* (con un escáner de 9,4 Tesla en la EPFL), y evaluar el efecto de las intervenciones nutricionales tempranas en el desarrollo y metabolismo del cerebro, principalmente durante el primer mes de vida en nuestros modelos de roedores. Para el metabolismo local específico del cerebro y del hipocampo se utilizaron imágenes Fast Spin-Echo (FSE) y edición de espectros de RMN-H¹. En suma, se captaron imágenes de FSE (TR/TE = 6000/80 ms; FOV = 25 x 25 mm y tamaño de matriz = 256 x 128) para situar el vóxel de MRS relevante (VOI = 1,5 x 1,5 x 2,5 mm³). Los imanes de primer y segundo orden se ajustaron mediante FASTMAP [Martin E, 2001, Ann Neurol 49: 518-521]. Las anchuras de las líneas de agua oscilaron entre 8 y 15 Hz. Los espectros, tanto del interior de la lesión cortical como del área cortical contralateral, se obtuvieron utilizando un método de espectroscopia ESPECIAL con un tiempo de eco ultra corto (TE/TR = 2,7/4000 ms). Este método combina la espectroscopia *in vivo* (ISIS) seleccionada por imágenes 1D en dirección vertical (Y) con un spin eco de corte selectivo en las direcciones X y Z, y proporciona una señal de intensidad completa localizable en la región excitada. Se adquirieron 35 hasta 70 series de FID (12 promedios de cada una), se corrigieron individualmente sus desvíos de frecuencia, se sumaron y se corrigieron los efectos de las corrientes residuales de Foucault utilizando la señal de agua de referencia.

Se obtuvieron los siguientes resultados, que se muestran en las figuras 5 y 6.

Hay diferencias significativas en la concentración de fosfocreatina (PCr), N-acetilaspargilglutamato (NAAG), N-acetil-aspartato (NAA), NAA + NAAG y creatina (Cr) + fosfocreatina (PCr) entre las crías con vehículo de control (n = 5) y

las crías con control de Dex (n = 4) 7 días después del nacimiento ($P < 0,05 \sim 0,01$). Sin embargo, el grupo de crías de Dex con tratamiento LF (n = 6) mostró una tendencia a revertir las concentraciones de los marcadores metabólicos anteriores encontrados en el grupo de control Dex el día P7, pero las diferencias no alcanzaron relevancia estadística, ni en el hipocampo ni en el córtex.

El N-acetilaspártato (NAA), o ácido N-acetilaspártico, es un derivado del ácido aspártico de fórmula $C_6H_9NO_5$ y peso molecular 175,139. El NAA es la segunda molécula más concentrada en el cerebro después del aminoácido glutamato. El NAA se sintetiza en las neuronas a partir del aminoácido aspartato y del acetyl coenzima A. Entre sus funciones principales se ha propuesto que:

- es una fuente de acetato para la síntesis de lípidos y mielina en los oligodendrocitos, es decir, las células gliales que mielinizan los axones neuronales
- es un precursor de la síntesis del importante dipéptido neuronal N-acetilaspartilglutamato
- es un osmolito neuronal que está involucrado en el balance de fluidos del cerebro
- el NAA también puede estar involucrado en la producción de energía a partir del aminoácido glutamato en las mitocondrias neuronales

La señal de NAA refleja concentraciones tisulares, tanto del NAA como del N-acetilaspartilglutamato (NAAG). Se ha referido que el NAA refleja la presencia de neuronas, de células de linaje oligodendroglial y de axones en el SNC (Urenjak J, 1993, J Neurosci 13: 981-989; Martin E, 2001, Ann Neurol 49: 518-521; Bjartmar C, 2002, Ann Neurol 51: 51-58). Se ha sugerido que el NAA(G) puede ser un portador del grupo acetilo entre las mitocondrias y el citoplasma de las células neuronales (Patel TB, 1979, Biochem J 184: 539- 546; Truckenmiller ME, 1985, J Neurochem 45: 1658-1662). Una disminución de la señal de NAA se interpreta en general como una reducción del número de neuronas, pero también puede reflejar una función alterada de las mitocondrias neuronales. El incremento de las proporciones de NAA/Cho en el tejido cerebral como resultado de la maduración se ha descrito anteriormente en detalle y ha sido confirmado en el presente estudio (van der Knaap MS, 1990, Radiology 176: 509-515; Kreis R, 2002, Magn Reson Med 48: 949-958).

El ácido N-acetilaspartilglutámico (N-acetilaspartilglutamato o NAAG) es un neuropéptido que figura en tercer lugar como neurotransmisor más prevalente en el sistema nervioso de los mamíferos. NAAG consta de ácido N-acetilaspártico (NAA) y ácido glutámico acoplado mediante un enlace peptídico. El NAAG fue descubierto como un péptido específico del sistema nervioso en 1965 por Curatolo y sus colegas (Isaacks RE, 1994, Neurochem Res 19: 331-338), pero no se estudió de forma exhaustiva durante casi 20 años. Cumple los criterios de un neurotransmisor, incluyendo su concentración en las neuronas, su inclusión en las vesículas sinápticas, su liberación de manera dependiente del calcio y su hidrólisis en el espacio sináptico por acción enzimática. El NAAG activa un receptor específico, el receptor metabotrópico de glutamato tipo 3. Es sintetizado enzimáticamente a partir de sus dos precursores y es catabolizado por NAAG peptidasas en la sinapsis. La inhibición de estos últimos enzimas tiene efectos terapéuticos potencialmente importantes en modelos animales de varios problemas y trastornos neurológicos.

El mio-inositol es un componente crucial de las células vivas y participa en varias funciones fisiológicas. Es un osmolito importante y también sirve como precursor del fosfatidilinositol. El mio-inositol se ha utilizado como marcador de células gliales (Isaacks RE, 1994, Neurochem Res 19: 331-338). El Lac puede servir de combustible para el cerebro, pero también para la síntesis de mielina (Sánchez-Abarca LI, 2001, Glia 36:321-329).

Una disminución de la relación N-acetilaspártato/colina (NAA/Cho) en recién nacidos a término con asfisia predice un resultado adverso del desarrollo neurológico (Groenendaal F, 1994, Pediatr Res 35: 148-151; Peden CJ, 1993, Dev Med Child Neurol 35: 502-510; Roelants-van Rijn AM, 2001, Pediatr Res 49: 356-362). El mio-inositol (ml), que es uno de los osmorreguladores del cerebro, se puede encontrar en los astrocitos y está considerado un marcador de células gliales (Isaacks RE, 1994, Neurochem Res 19: 331-338).

La lactoferrina mejora la densidad neuronal y la supervivencia de las neuronas, y es capaz de reparar y/o de revertir el daño de las células neuronales.

Se llevó a cabo un examen morfológico después de la adquisición de RM. Se recogieron cortes contiguos a nivel del cuerpo estriado y del hipocampo dorsal y lateral para evaluar la arquitectura cortical y del hipocampo y la lesión de la sustancia blanca. Los tipos de células específicas se marcaron empleando inmunohistoquímica para determinar las respuestas celulares específicas. Se realizó un marcaje específico de neuronas (NeuN), astrocitos (GFAP) y glía radial (Nestina), junto con marcadores de mielinización de la materia blanca (MBP). La breve metodología fue la siguiente:

Los días P7 y P21, respectivamente, las crías de cada grupo se anestesiaron profundamente con ketalar (50 mg/ml; 0,2-0,5 ml, i.p.). Los animales se perfundieron intracardialmente con NaCl al 0,9% y después con paraformaldehído al 4%. Los cerebros se extrajeron, se pesaron y se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4% durante la noche, luego en sacarosa al 30% durante al menos 24 h, y se conservaron a -80°C hasta el momento de seccionarlos. Se cortaron secciones coronales (de 10 μm) a nivel del hipocampo dorsal, en un criostato (Microm Cryo-Star HM 560M, Microm International, Alemania). Se recogieron tres secciones a intervalos de 200 μm de cada animal. Inmunohistoquímica: el tejido cerebral se procesó para tener inmunorreactividad a MBP (1:400, marca, ciudad, país) mediante el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Las secciones se bloquearon

en albúmina de suero bovino al 4% (BSA, marca, ciudad, país), luego se incubaron con el anticuerpo primario durante 24 horas a 4°C, después con el anticuerpo secundario (1:200, marca, ciudad, país) y luego con el complejo avidina-biotina (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Las secciones se hicieron reaccionar con el cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB, marca, ciudad, país) en peróxido de hidrógeno al 0,01% y después se cubrieron con un portaobjetos.

El mismo protocolo se aplicó a la inmunohistoquímica de fluorescencia con nestina (1:500, marca, ciudad, país), GFAP (1:400, marca, ciudad, país) y NeuN (1:200, marca, ciudad, país), pero las secciones no se incubaron con el complejo avidina-biotina y no se hicieron reaccionar con DAB.

Cada grupo experimental y sus correspondientes controles se tiñeron simultáneamente. Al omitir el tratamiento con anticuerpos primarios no tuvo lugar la tinción.

Los análisis cuantitativos se efectuaron mediante el sistema de escaneo MetaMorph® (Software de imágenes de Meta, Molecular Devices Corporation, Pennsylvania, EUA). Se agruparon los valores de cada animal y para cada grupo se calculó un promedio de las medias $\pm$ ESM. Las mediciones se realizaron en diapositivas codificadas, ciegas para el observador, y los códigos no se revelaron hasta la conclusión de los análisis.

Se obtuvieron los siguientes resultados, que se muestran en la figura 7.

El análisis histológico reveló que la suplementación con LF a las crías con Dex ($n = 5$) aumentaba significativamente la morfología de los núcleos y la densidad neuronal en la zona CA2-CA3 del hipocampo, en comparación con las crías de control con Dex el día P7. Una disminución de la densidad neuronal en el córtex el día P7 sugiere pérdida neuronal. La densidad neuronal es similar a la del grupo normal con control de vehículo (figura 7). La lactoferrina administrada en este periodo de tiempo particular del desarrollo influirá en la densidad neuronal del hipocampo y en una zona de gran vulnerabilidad a la desnutrición y a las anomalías cerebrales relacionadas con el estrés, lo cual implica que la administración de LF aumenta la supervivencia y la protección de las neuronas, por ejemplo, en una rata RCIU joven.

La suplementación con lactoferrina aumenta la expresión génica del factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC).

La figura 8 demuestra que la suplementación con lactoferrina en la dieta incrementó significativamente la expresión génica del factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC) el día 7 postnatal.

El FNDC es un factor neurotrófico que promueve la diferenciación, supervivencia y plasticidad neuronal del sistema nervioso periférico y del sistema nervioso central (SNC). Es una molécula clave involucrada en muchos aspectos del desarrollo y maduración neuronal. En el SNC el FNDC provoca una potenciación duradera que está relacionada con la plasticidad sináptica. El FNDC promueve la neurogénesis. En concreto, el FNDC promueve el crecimiento de las neuritas y aumenta la expresión de proteínas sinápticas, que son necesarias para establecer conexiones o funciones sinápticas durante el desarrollo. Por lo tanto la lactoferrina en la dieta juega un papel, tanto de desarrollo neurológico como de neuroprotección.

La expresión génica es el proceso por el que la información codificada por un gen se convierte en una proteína. Nuestro estudio es el primero en analizar el efecto de la suplementación con lactoferrina en el análisis genómico del nivel de FNDC en el cerebro, utilizando un método bien establecido.

En resumen, el ARN total del hipocampo se extrajo utilizando el Kit RNeasy Mini® según el protocolo del fabricante (Qiagen, Basilea, Suiza). Se transcribieron de manera inversa 2,5 microgramos de ARN total utilizando 800 unidades de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (Invitrogen, Basilea, Suiza), en presencia de 0,3 unidades/microlitro de RNAsin (Promega Corp, Madison, WI), 7,5 microM de cebadores aleatorios (oligo(dN)6), dNTP 1,2 mM y 12 microM de DTT. La expresión de los ADNc de FNDC de rata se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real empleando un sistema de detección ABI step one plus (Applied Biosystems, Rotkreuz, Suiza) y se normalizó utilizando el gen constitutivo ribosomal 36B4. Los productos de la PCR se cuantificaron con el kit de reactivos SYBR Green Core (Applied Biosystems, Rotkreuz, Suiza) y los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA) respecto a los valores del grupo de control. Los cebadores se diseñaron utilizando el software Primer Express (Applied Biosystems, Rotkreuz, Suiza).

Datos de comportamiento animal:

La lactoferrina (bLF) de leche bovina se suplementó a las madres de las ratas durante la gestación y la lactancia (6 semanas en total) a un nivel de dosificación de 1 g/kg/día para probar los beneficios de la bLF en el comportamiento de los animales en 4 grupos diferentes: (1) vehículo de control (CE), (2) control-DEX (CD), (3) vehículo de lactoferrina (LE) y (4) lactoferrina-Dex (LD) a los 4,5 meses de edad utilizando un sistema IntelliCage.

La prueba de adaptación libre (relevante para la prueba de campo abierto) consistió en colocar ratas en el IntelliCage, un entorno nuevo durante 3 días, para controlar el movimiento de la rata y su interacción con el entorno (número de

visitas diferentes de las esquinas). Se controló el comportamiento exploratorio / curiosidad para analizar cómo las ratas se adaptaban al nuevo ambiente.

- 5 Los resultados demostraron que las ratas con DEX de control tenían una menor actividad exploratoria / curiosidad con el IntelliCage en comparación con las ratas con vehículo de control (control normal), vehículo bLF y bLF-DEX a lo largo de los 3 días del ensayo. Las diferencias entre el grupo de control-Dex y los grupos de vehículo de control bLf-Dex son significativas al día 3 del ensayo de adaptación libre ($P < 0,05$). Estos resultados sugirieron que la suplementación prenatal con LF mejoró el comportamiento de ansiedad, incluyendo más actividad exploratoria, curiosidad e interacción con el nuevo entorno de los animales adultos sanos, con lesiones cerebrales en la vida temprana, a los 4.5 meses de edad (figura 9). Los datos obtenidos sugieren un pronunciado efecto protector de la LF sobre las neuronas y un efecto algo menor en el desarrollo neurológico (fig. 1).
- 10

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Composición ingerible que contiene lactoferrina a una concentración de 2 g–25 g/100 kcal de composición para usar en el tratamiento y/o prevención de un desarrollo retardado del cerebro y/o del sistema nervioso.
- 2.** Composición para usar según la reivindicación 1, que está seleccionada del grupo constituido por productos alimenticios, comida de animales, composiciones farmacéuticas, formulaciones nutricionales, nutracéuticos, bebidas, aditivos alimentarios y fórmulas de alimentación infantil.
- 10 **3.** Composición para usar según cualquier reivindicación precedente, en la cual la lactoferrina se aporta mediante una leche o fracción de suero de leche enriquecida en lactoferrina.
- 4.** Composición para usar según cualquier reivindicación precedente, que incluye una fuente proteica, una fuente de lípidos y una fuente de hidratos de carbono.
- 15 **5.** Composición para usar según cualquier reivindicación precedente, en la cual la fuente proteica está contenida en un intervalo de 2 hasta 6 g/100 kcal de composición.
- 20 **6.** Composición para usar según cualquier reivindicación precedente, en la cual más del 50% en peso de la fuente proteica es proteína de suero de leche.
- 7.** Composición para usar según cualquier reivindicación precedente, en la cual la fuente de lípidos contribuye entre un 30 y 55% a la energía total de la composición y/o la fuente de hidratos de carbono contribuye entre un 35 y 65% a la energía total de la composición.
- 25 **8.** Composición para usar según cualquier reivindicación precedente, que además comprende al menos 70 mg/l aproximadamente de ácido siálico total, al menos 0,1% en peso aproximadamente de ácido graso omega-3 respecto al total de ácidos grasos y/o al menos 0,25% aproximadamente de ácidos grasos omega-6 respecto al total de ácidos grasos.
- 30 **9.** Composición para usar según cualquier reivindicación precedente, la cual debe administrarse en una cantidad correspondiente a una ingestión de al menos 0,01 g de lactoferrina por kg de peso corporal y día.
- 10.** Composición para usar según cualquier reivindicación precedente, la cual está destinada a limitar y/o prevenir el retardo del crecimiento neuronal inducido por estrés y las funciones cognitivas asociadas en los bebés.
- 35 **11.** Composición para usar según cualquier reivindicación precedente, que sirve para reparar un desarrollo tardío del cerebro y/o del sistema nervioso y/o para proteger las células neuronales en el cerebro.
- 12.** Composición para usar según cualquier reivindicación precedente, que sirve para tratar o prevenir un desarrollo tardío de la visión, una migración neural retardada y/o un desarrollo cognitivo retardado.
- 40 **13.** Composición para usar según cualquier reivindicación precedente, que sirve para tratar o para prevenir una deficiente capacidad de aprendizaje, un rendimiento mental alterado o un periodo de atención reducido.
- 45 **14.** Composición para usar según una de las reivindicaciones 10-13, la cual se debe administrar a las madres durante el embarazo, a las madres durante la lactancia, a bebés prematuros o nacidos a término, a bebés nacidos con bajo peso, a bebés con restricción del crecimiento intrauterino y a los bebés, niños pequeños, niños mayores y/o adolescentes.
- 50

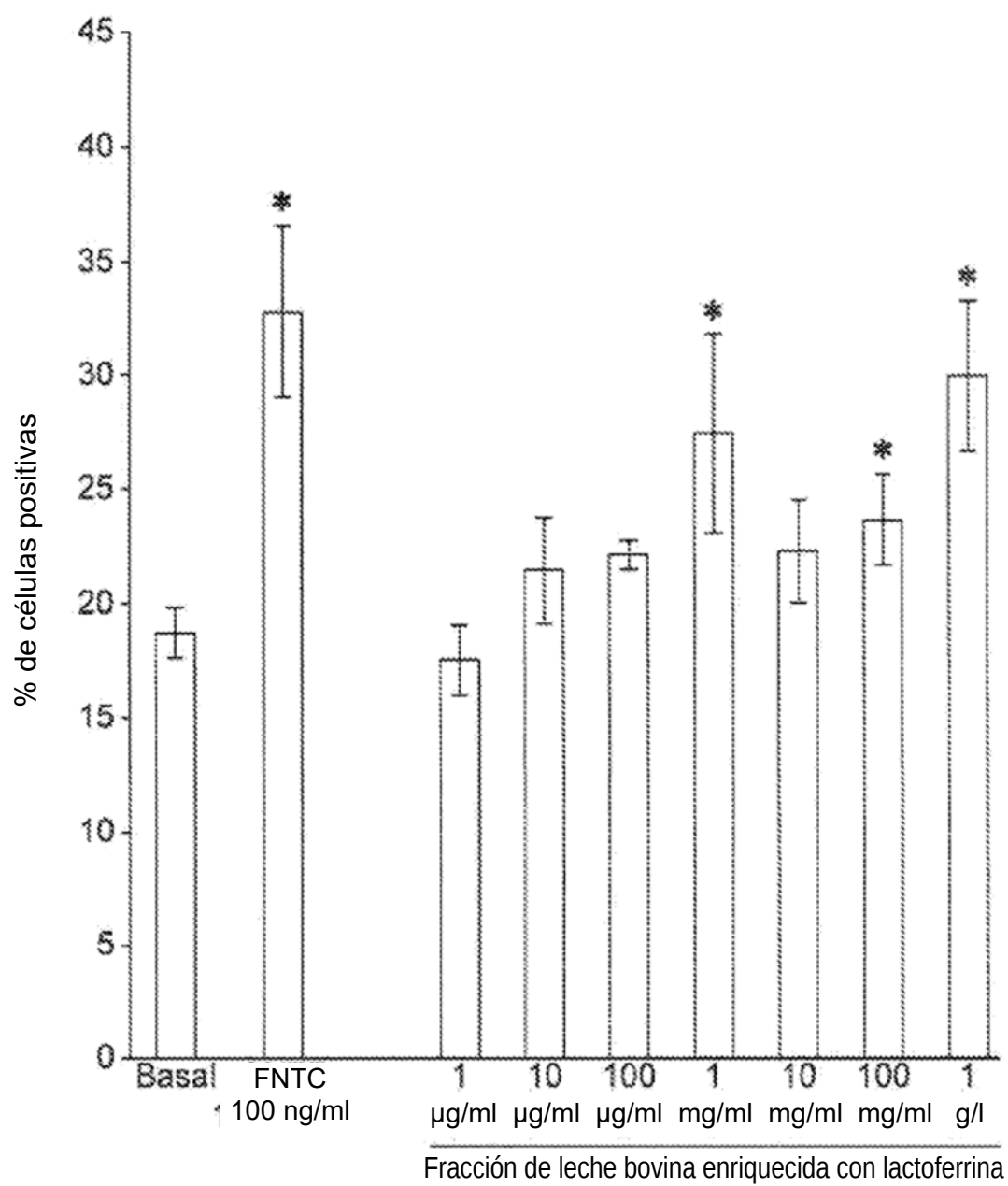


FIG. 1

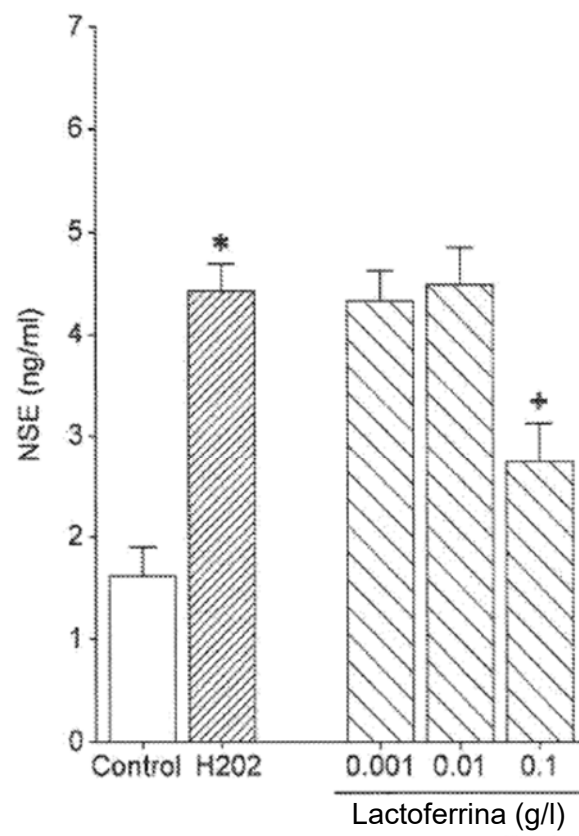


FIG. 2

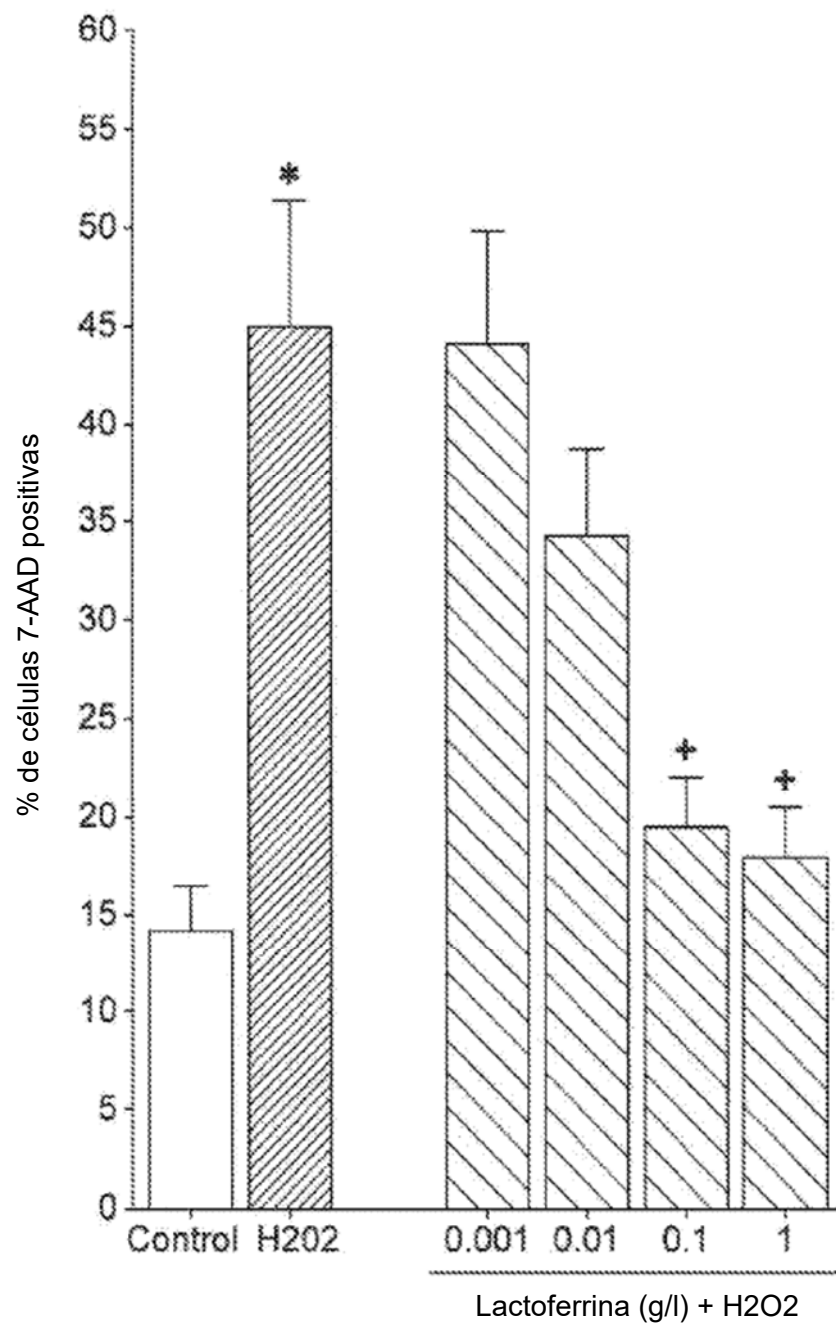


FIG. 3

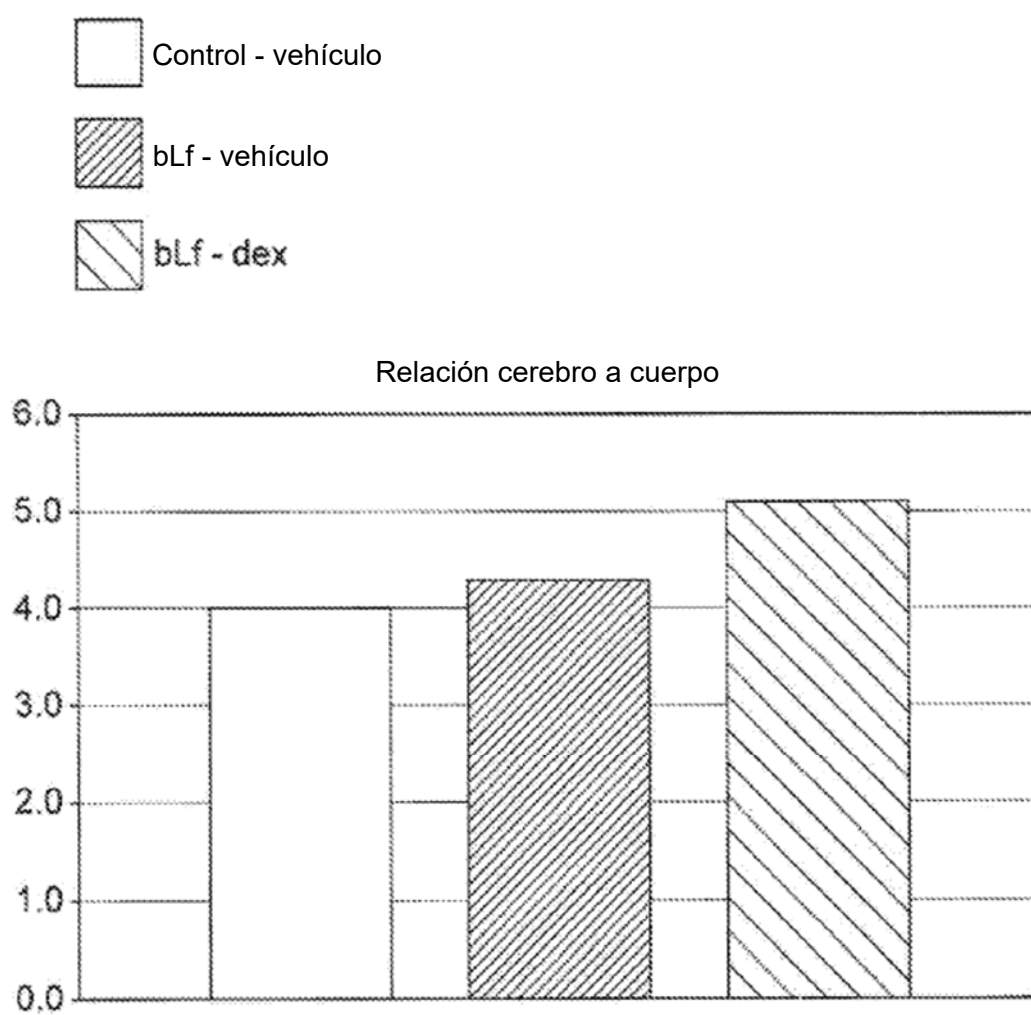


FIG. 4a

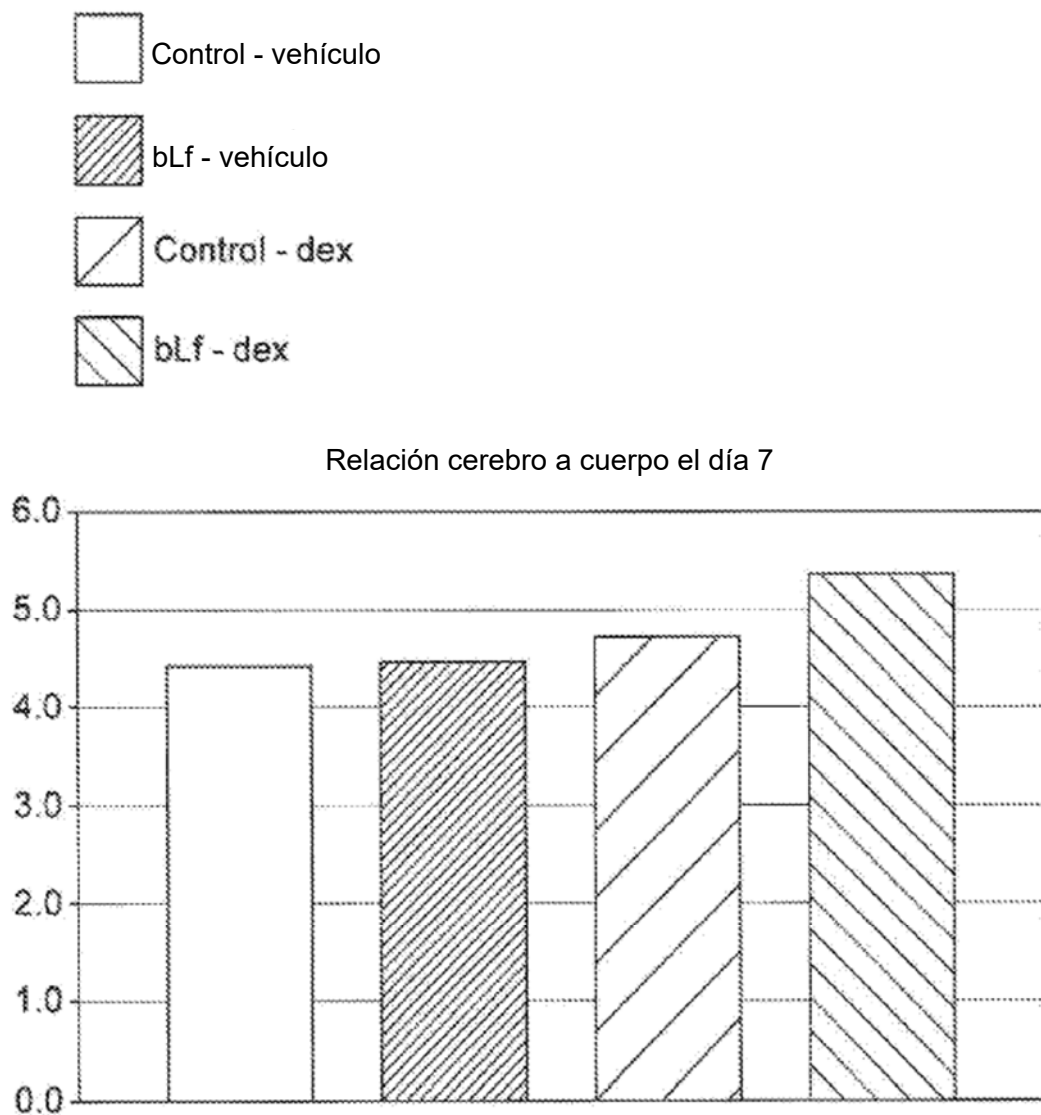


FIG. 4b

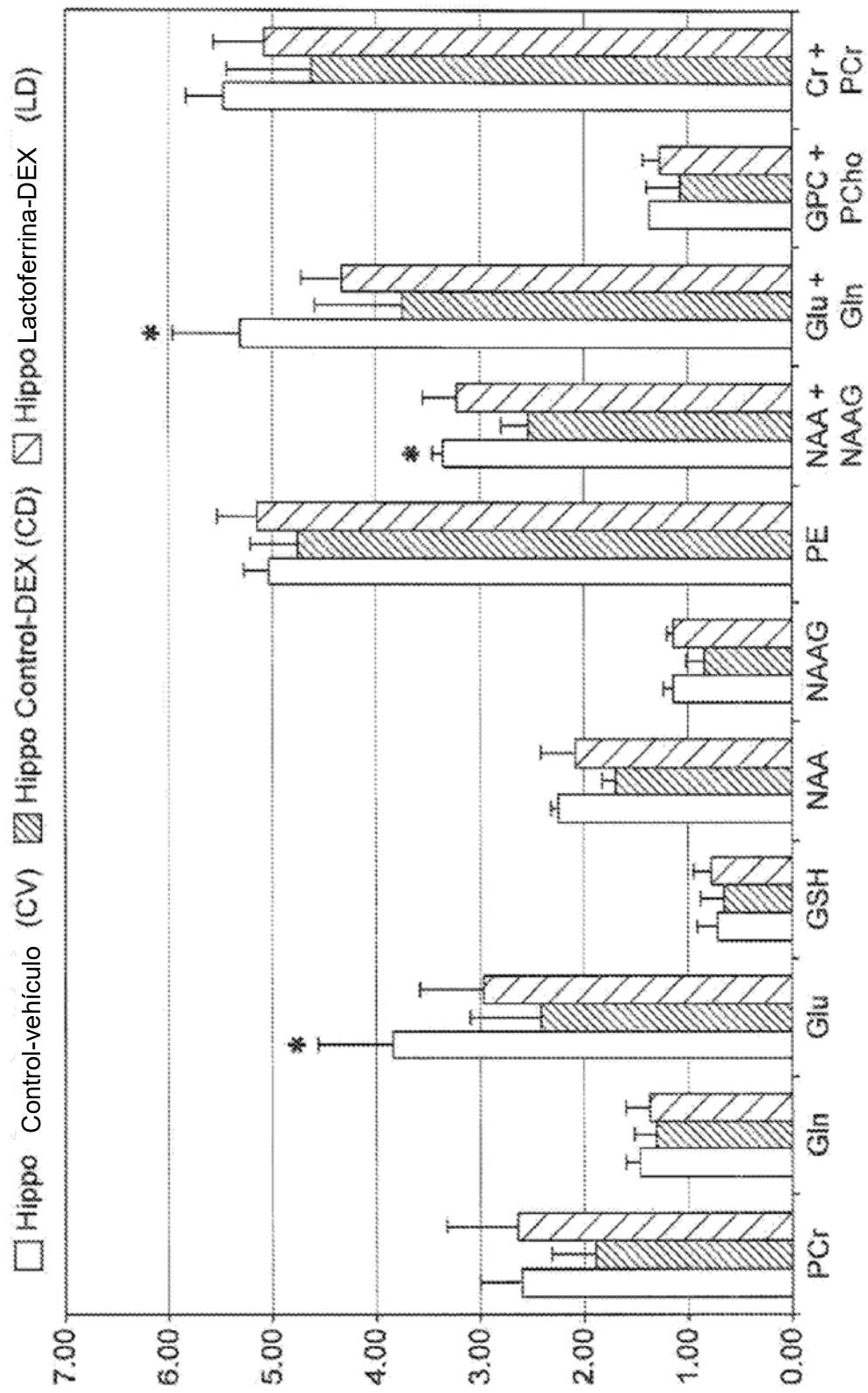
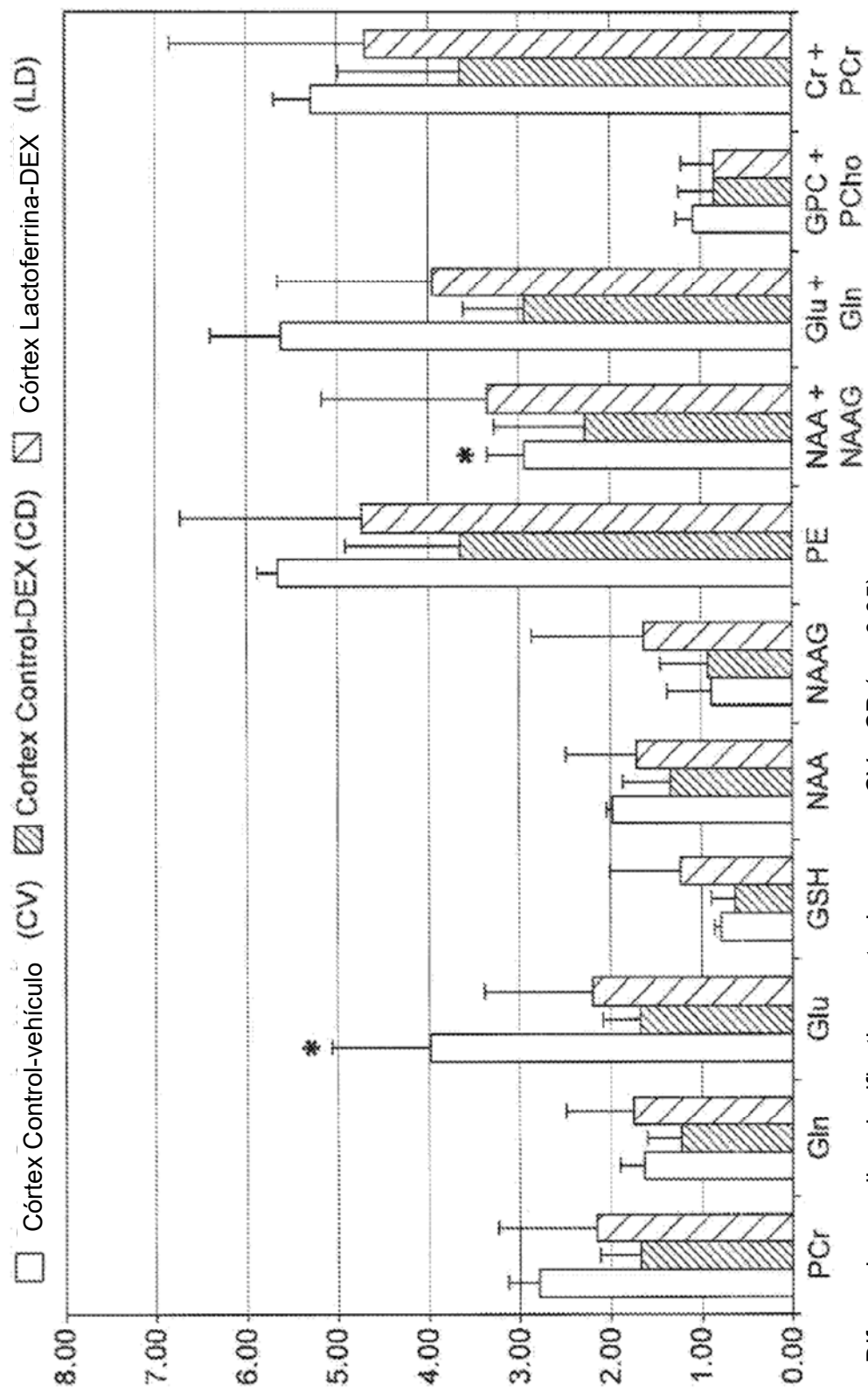


FIG. 5



* Diferencias medias significativas entre los grupos CV y CD ($p < 0,05$)

FIG. 6

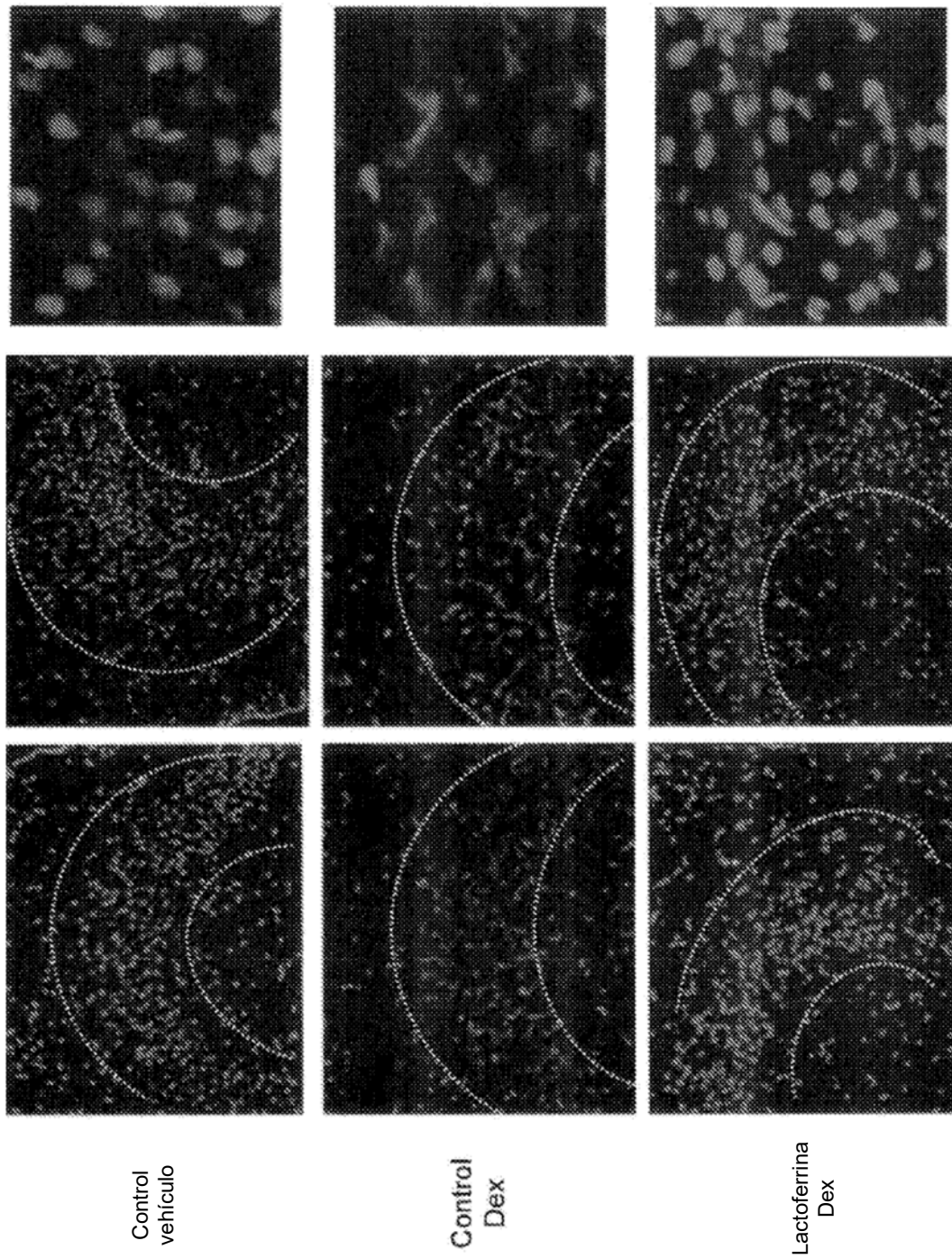


FIG. 7

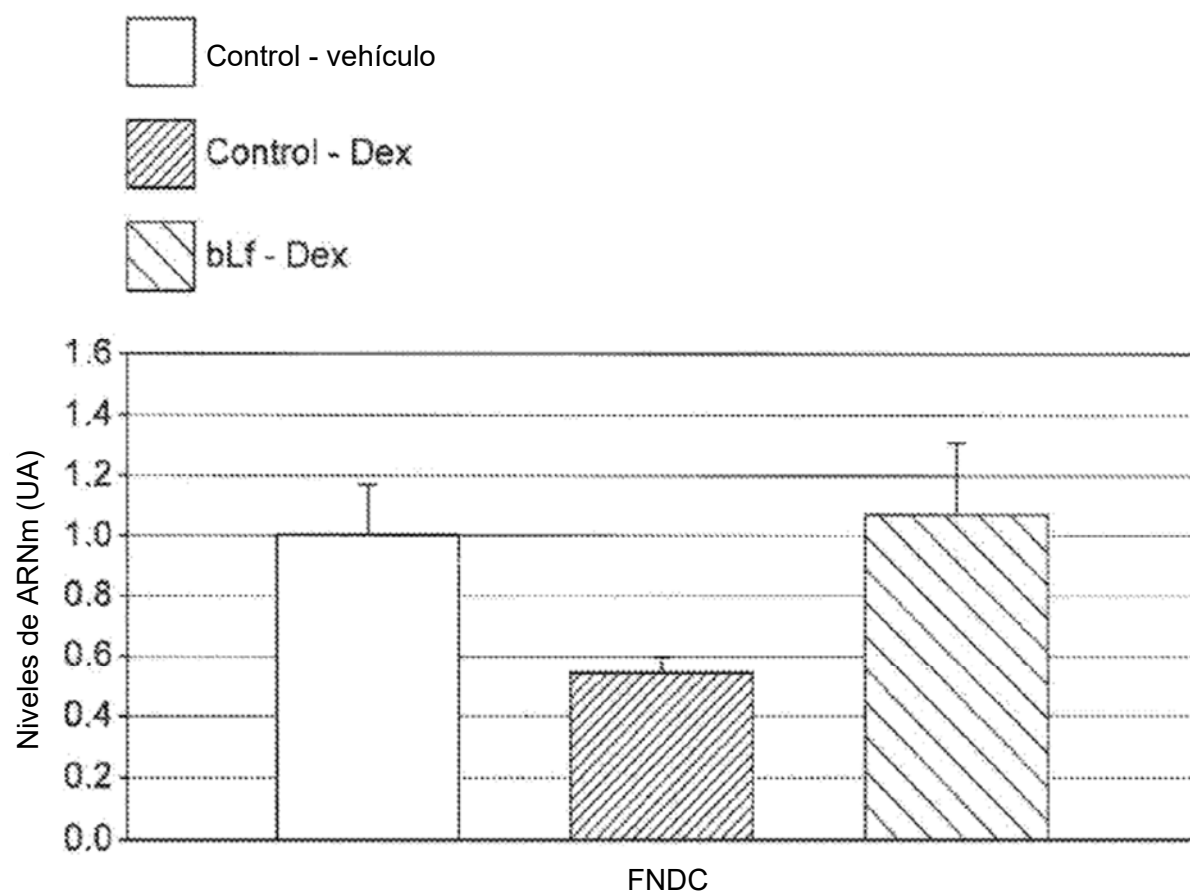


FIG. 8

FIG. 9