



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 161**

51 Int. Cl.:
A23L 1/09 (2006.01)
A23L 1/304 (2006.01)
A23L 1/302 (2006.01)
A23C 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98912118 .1**
86 Fecha de presentación : **30.03.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **0975235**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2000**

54 Título: **Productos nutricionales que contienen oligosacáridos.**

30 Prioridad: **31.03.1997 US 829157**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2007

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Chad 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500, US

72 Inventor/es: **Prieto, Pedro, A.;**
Kirchner, Stephen, J. y
Erney, Renee, M.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 265 161 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

Productos nutricionales que contienen oligosacáridos.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención tiene que ver, en general, con la composición de productos nutricionales sintéticos conteniendo oligosacáridos de la leche humana. Más específicamente, el producto nutricional sintético contiene al menos uno de los siguientes oligosacáridos: 3-fucosil-lactosa, lacto-N-fucopentosa III, lacto-N-fucopentosa II, difucosil-lactosa, 2'-fucosil-lactosa, lacto-N-fucopentosa I, lacto-N-neo-tetrosa o lacto-N-fucopentosa V.

Antecedentes de la invención

La leche humana es conocida por contener más de 100 diferentes oligosacáridos, algunos de los cuales están genéticamente determinados. Desafortunadamente, las similitudes estructurales de muchos de estos oligosacáridos ha hecho difícil aislar, identificar, y cuantificar muchos de estos oligosacáridos. La mayoría de los trabajos publicados sobre estos oligosacáridos han estudiado estos compuestos como clases antes que como oligosacáridos individuales.

El trabajo previo ha demostrado que ciertos oligosacáridos pueden ser beneficiosos biológicamente. Por ejemplo, se ha demostrado que los oligosacáridos que contienen N-acetilglucosamina (NAcGlc) estimulan el crecimiento del *Lactobacillus bifidus var pennsylvanicus*, el cual protege a los niños de infecciones gastrointestinales [Coppa, G. y col., *Pediatrics* 91:3 (1993) 637-641]. Otros informes indican que los oligosacáridos de la leche humana favorecen el crecimiento de la bacteria beneficiosa *Bifidobacterium bifidum*, que se supone está implicada en el desarrollo sano de los niños [Thurl, S. y col., *Journal of Chromatography* 568 (1991) 291-300]. En un estudio, la leche humana impidió la unión del *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* [Anderson, B. y col., *J. Infect. Dis.* 153 (1986) 232-237]. Este estudio probó además que esta disminución en la unión fue “debida, principalmente, a otros componentes que no son anticuerpos específicos” presentes en la leche, y puede estar causada por “los determinantes oligosacáridos, activos como receptores, en las glicoproteínas”. La unión neumocócica fue inhibida por fracciones de alto y bajo peso molecular, específicamente, lacto-N-tetrosa (LNT, Gal β 1-4NAcGlc β 1-4Gal β 1-4Glu) y lacto-N-neo-tetrosa (LNnT, Gal β 1-4NAcGlc β 1-3Gal β 1-4Glu) [Anderson, B. y col., *J. Infect. Dis.* 153 (1986) 232-237]. En general, los oligosacáridos pueden inhibir la unión de bacterias a células epiteliales, actuando como señuelos compitiendo con los receptores celulares. Adicionalmente, los oligosacáridos protegen a los niños de las infecciones virales y bacterianas de los tractos respiratorio, gastrointestinal y urogenital.

La genética juega un gran papel en la presencia o ausencia de ciertos oligosacáridos en la leche de diferentes donantes, un atributo que está unido al estatus del grupo sanguíneo Lewis del individuo. Los genes secretor y Lewis codifican glicosiltransferasas específicas. Estas enzimas, a su vez, producen diversos productos genéticos secundarios, específicamente oligosacáridos y otros glicoconjugados. La presencia o ausencia de glicosiltransferasas en la glándula mamaria lactante tiene un impacto directo en la existencia y cantidad de ciertas estructuras de carbohidratos encontradas en la leche humana de un donante dado.

A los oligosacáridos de la leche humana se les ha atribuido muchas funciones beneficiosas. Por esta razón, es conveniente el suplemento de fórmulas infantiles y otros productos nutricionales pediátricos con oligosacáridos de la leche humana. Una fórmula infantil complementada con oligosacáridos, cerca de los niveles naturales de tales oligosacáridos en la leche del pecho humano, serían sumamente beneficiosa. Se han obtenido los niveles naturales de oligosacáridos específicos de la leche humana, a partir de muestras de leche combinadas [Kobata, A., *Methods in Enzymology* 28 (1972) 262-271; Kunz, C. y col., *Acta Paediatr.* 82 (1993) 903-912], o utilizando métodos que requieren calentar las muestras, destruyendo de ese modo los oligosacáridos lábiles [Thurl, S. y col., *Analytical Biochemistry* 235 (1996) 202-206]. También, se han publicado promedios para algunas concentraciones de oligosacáridos [ver Thurl, S. y col., *Ana. Biochem.* 235 (1996) 202-206; Thurl, S. y col., *J. Chromat.* 565 (1991) 291-300], pero no se ha establecido la variabilidad de estos oligosacáridos debido a la gran cantidad de muestras de leche humana necesarias para lograr la significación estadística.

EP-A-0 313 533 revela un alimento, basado particularmente en leche de rumiante, que tiene añadido lacto-N-tetrosa en una cantidad eficaz gastrointestinalmente, y un proceso para su preparación.

WO-9524495 revela la producción transgénica de oligosacáridos y glicoconjugados. Los oligosacáridos son seleccionados, entre otros, de lactosa, 2'-fucosil-lactosa, lacto-N-tetrosa, lacto-N-neo-tetrosa, lacto-N-fucopentosa I, lacto-N-fucopentosa II, lacto-N-fucopentosa III. Se pueden producir productos nutricionales a partir de la leche transgénica u oligosacáridos aislados de la misma.

Debido a estas dificultades, en la actualidad no está disponible una formulación infantil que contenga oligosacáridos cerca de los niveles naturales encontrados en la leche del pecho humano.

Breve sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición nutricional sintética que consta de uno o más oligosacáridos de la leche humana, en donde los oligosacáridos de la leche humana en la composición son seleccionados del grupo que se compone de:

- de 1.456 a 1.750 mg/litro de 3-fucosil-lactosa;
- de 507 a 1.100 mg/litro de lacto-N-fucopentosa III;
- de 361 a 750 mg/litro de lacto-N-fucopentosa II;
- de 393 a 1.450 mg/litro de difucosil-lactosa;
- de 2.240 a 2.400 mg/litro de 2'-fucosil-lactosa;
- de 845 a 1.650 mg/litro de lacto-N-fucopentosa I;
- de 258 a 450 mg/litro de lacto-N-neo-tetrosa; o
- de 120 a 1.600 mg/litro de lacto-N-fucopentosa V;

y dicha composición comprende, además, macronutrientes comestibles, en donde dicha composición es pretendida para su uso con niños normales sanos, chicos, adultos o con un sujeto que tenga necesidades especiales tales como las que acompañan a ciertos estados patológicos.

En una forma de realización preferida, los oligosacáridos de la leche humana están presentes en la composición en las cantidades siguientes:

- de 1.456 a 1.472 mg/litro de 3-fucosil-lactosa;
- de 507 a 578 mg/litro de lacto-N-fucopentosa III;
- de 361 a 429 mg/litro de lacto-N-fucopentosa II;
- de 393 a 494 mg/litro de difucosil-lactosa;
- de 2.240 a 2.260 mg/litro de 2'-fucosil-lactosa;
- de 845 a 912 mg/litro de lacto-N-fucopentosa I;
- de 258 a 279 mg/litro de lacto-N-neo-tetrosa; o
- de 120 a 154 mg/litro de lacto-N-fucopentosa V.

Conforme a una forma de realización, los macronutrientes son formulados para alimentar a un niño. Los macronutrientes pueden constar de uno o más de aceite de coco, aceite de soja, mono y diglicéridos, glucosa, lactosa de calidad alimentaria, suero electrodiálizado, leche desnatada electrodiálizada, suero lácteo, y proteína de soja. La composición puede constar, además, de uno o más vitaminas A, C, D, E y complejo B. Además, la composición puede comprender uno o más minerales de calcio, magnesio, manganeso, sodio, potasio, fósforo, cobre, zinc, cloruro, yodo, selenio y hierro.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un cromatograma de nueve oligosacáridos cuantificados de la leche humana.

La Figura 2 muestra dos cromatogramas comparando los perfiles de oligosacáridos de la leche humana de donantes secretor y no secretor. La Figura 2A muestra el perfil de oligosacáridos de la leche humana de un secretor. La Figura 2B muestra el perfil de oligosacáridos de la leche humana de un no secretor.

La Figura 3 muestra dos cromatogramas comparando los perfiles de oligosacáridos de la leche humana de donantes Lewis-positivos y Lewis-negativos. La Figura 3A muestra el perfil de oligosacáridos de la leche humana de un donante Lewis-positivo. La Figura 3B muestra el perfil de oligosacáridos de la leche humana de un donante Lewis-negativo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una formulación nutricional sintética que contiene por lo menos uno de los siguientes oligosacáridos en las cantidades arriba mencionadas:

Nombre	Abreviatura	Estructura
3-Fucosil-Lactosa	3-FL	Gal β 1-4(Fuca1-3)Glu
Lacto-N-Fucopentosa III	LNF-III	Gal β 1-4(Fuca1-3)NAcGlc β 1-3Gal β 1-4Glu
Lacto-N-Fucopentosa II	LNF-II	GAL β 1-3(Fuca1-4)NAcGlc β 1-3Gal β 1-4Glu
Difucosil-Lactosa	DFL	Fuca1-2Gal β 1-4(Fuca-3)Glu
2'-Fucosil-Lactosa	2'-FL	Fuca1-2Gal β 1-4Glu
Lacto-N-Fucopentosa I	LNF-I	Fuca1-2Gal β 1-3NAcGlc β 1-3Gal β 1-4Glu
Lacto-N-neo-Tetrosa	LNT	Gal β 1-4NAcGlc β 1-3Gal β 1-4Glu
Lacto-N-Fucopentosa V	LNF-V	Gal β 1-3NAcGlc β 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)Glu

Todos estos oligosacáridos son oligosacáridos de existencia natural, encontrados en la leche del pecho humano. Como se conoce en la técnica, Gal designa galactosa, NAcGlc designa N-acetilglucosamina, Glu designa glucosa, y Fuc designa fucosa.

La formulación nutricional sintética de la presente invención contiene macronutrientes comestibles, vitaminas y minerales en cantidades deseadas para un uso concreto. Las cantidades de tales ingredientes variarán dependiendo de si la formulación es pretendida para su uso con niños sanos normales, chicos, adultos o sujetos que tengan necesidades especiales tales como las que acompañan a ciertos estados patológicos (por ejemplo, trastornos metabólicos). Se comprenderá por las personas especializadas en la técnica que los componentes utilizados en una formulación nutricional de la presente invención son de origen semipurificado o purificado. Mediante semipurificado o purificado se quiere decir una materia que ha sido preparada por purificación de una materia natural o por síntesis. Estas técnicas son conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Code of Federal Regulations for Food Ingredients and Food Processing; Recommended Dietary Allowances, 10th ed., National Academy Press, Washington D. C. 1989).

En una forma de realización preferida, la formulación nutricional sintética de la presente invención es un producto nutricional entérico infantil. Por consiguiente, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona una formulación nutricional que es apropiada para alimentar niños. La fórmula comprende, además de los oligosacáridos anteriormente descritos, vitaminas y minerales en cantidades diseñadas para proporcionar las necesidades nutricionales diarias de los niños. Es importante observar que los factores antimicrobianos en la leche humana, o en fórmulas infantiles, pueden alcanzar el tracto respiratorio de un niño directamente, como resultado de regurgitación e inhalación de estos factores durante y después de la alimentación. La mucosa del tracto respiratorio puede, por lo tanto, conseguir protección directa de esta manera.

Los componentes macronutricionales incluyen, por ejemplo, grasas comestibles, carbohidratos y proteínas. Grasas comestibles ejemplares son el aceite de coco, aceite de soja, y mono y diglicéridos. Carbohidratos ejemplares son la glucosa, lactosa (comestible) de calidad alimentaria y almidón de maíz hidrolizado. Una fuente típica de proteína sería, por ejemplo, proteína de soja, suero electrodiálizado, o leche desnatada electrodiálizada, o suero lácteo, o los hidrolizados de estas proteínas, aunque están también disponibles y se pueden utilizar otras fuentes de proteína. Estos macronutrientes serían añadidos en forma de compuestos nutricionales comúnmente aceptados, en una cantidad equivalente a la presente en la leche humana o partiendo de una base energética, esto es, según la base de calorías.

La fórmula infantil incluiría, preferentemente, las vitaminas y minerales siguientes: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, selenio, yodo, y vitaminas A, E, D, C, y complejo B.

La fórmula infantil puede ser esterilizada y posteriormente utilizada partiendo de la base de lista para alimentar (LPA), o almacenada en un líquido concentrado o polvo. El polvo se puede preparar, por ejemplo, secando por pulverización la fórmula infantil preparada como se indica antes, y la fórmula puede ser reconstituida, por ejemplo, rehidratando el concentrado. Las fórmulas nutricionales infantiles son bien conocidas en la técnica y disponibles comercialmente (por ejemplo, Similac[®] y Alimentum[®] de Ross Products Division, Abbott Laboratories).

Los niveles reales de dosificación de los oligosacáridos en las formulaciones de la presente invención pueden ser variados con el fin de obtener una cantidad de principio activo que sea eficaz para obtener una respuesta deseada para

ES 2 265 161 T3

una composición y método de administración concretos. El nivel de dosificación seleccionado, por lo tanto, depende del efecto terapéutico deseado, de la vía de administración, de la duración de administración deseada y otros factores.

5 En una forma de realización preferida, los oligosacáridos están presentes en la formulación cerca de los niveles naturales de tales oligosacáridos encontrados en la leche del pecho humano.

10 Los oligosacáridos utilizados en la formulación nutricional de esta invención pueden ser preparados de cualquier manera, preferentemente mediante síntesis química. Por ejemplo, los oligosacáridos para su uso en esta invención pueden ser sintetizados químicamente mediante la transferencia enzimática de unidades sacárido de porciones donantes a porcionesceptoras, utilizando glicosiltransferasas como se describió en la Patente U.S. 5.288.637 y WO96/10086. El método preferido para sintetizar los oligosacáridos implica la transferencia enzimática de unidades de sacárido de nucleótidos-sacárido a aceptores de sacáridos, utilizando glicosiltransferasas donde los nucleótidos-sacárido y las glicosiltransferasas utilizados están en una forma no purificada.

15 Adicionalmente, los oligosacáridos utilizados en la formulación nutricional deberían estar en forma purificada y libres de toxinas bacterianas, virus y otros contaminantes perjudiciales.

Ejemplo 1

20 *Extracción de Oligosacáridos de Muestras de Leche Humana*

Recolección/Almacenamiento de Muestras de Leche Humana: Se recogieron muestras de leche a través de 5 diferentes medios:

- 25 1. El Centro para Investigación Pediátrica, Eastern Virginia Medical School, Norfolk, VA.
2. La Universidad de Chile, División Ciencias Médicas Oriente, Santiago, Chile.
3. El Departamento de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Nutrición, Méjico.
- 30 4. El Estudio Clínico N° W93-180, Abbott Internacional Division, North Chicago, IL.
5. El Children's Hospital, Columbus, Ohio.
- 35 6. Dr. Milo Hilty, Ross Laboratories, Columbus, Ohio.

Todas las muestras fueron recogidas mediante bombeo externo, y fueron almacenadas congeladas hasta el transporte a Abbott Laboratories, Ross Products Division, Columbus, Ohio, donde fueron mantenidas a -70°C hasta analizar.

40 *Extracción de Oligosacáridos de Muestras de Leche:* Las muestras de leche a ensayar fueron descongeladas lentamente a temperatura ambiente. Después de mezclar bien, se pipetearon 0'75 ml en filtros de corte Centricon de peso molecular 10.000 (Amicon Inc., Beverly, MA). Las muestras de leche fueron centrifugadas durante 2 horas a 2.000 FCR a 15-18°C. Aproximadamente, para cada muestra se obtuvo 100 a 400 μ l de filtrado incoloro transparente. Los filtrados fueron almacenados congelados a -70°C hasta su uso.

45 *Eliminación del Exceso de Lactosa:* Para el análisis de oligosacáridos, es necesario eliminar el exceso de lactosa para cuantificar las cantidades menores de oligosacáridos presentes. Para cumplir esto, se diluyó 186 μ l de filtrado mezclado congelado con 14 μ l de alcohol isopropílico. Se inyectaron 100 μ l de esta dilución en una columna de Biogel P2 para cromatografía de exclusión granulométrica (BioRad Inc., Hércules, CA), equipada con un detector de índice de refracción y un recolector de fracciones. Las muestras fueron eluidas utilizando un flujo de 1'0 ml/min. de AIP al 7% filtrado, desgasificado, suministrado con una bomba HPLC. Se recogieron fracciones de 4'0 ml. Con la excepción del volumen vacío (fracción n° 1, conteniendo compuestos de peso molecular muy grande), se desecaron todas las fracciones antes del granel de lactosa. Se descartaron las fracciones conteniendo exceso de lactosa, y aquellas que eluyeron de la columna más tarde. Las fracciones deseadas fueron desecadas durante la noche en un Speed-Vac Savant equipado con un separador refrigerado y bomba de vacío. Ellas fueron combinadas/resuspendidas en 800 μ l de AIP al 7%, y analizadas.

Ejemplo 2

60 *Identificación y Cuantificación de Oligosacáridos de Muestras de Leche Humana*

Análisis de Oligosacáridos mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alta Presión: Se analizaron muestras del Ejemplo 1 utilizando un sistema BioLC de Dionex, equipado con un detector electroquímico de impulsos. Se conectaron en serie, mediante un tubo muy corto, dos columnas analíticas CarboPac PA-1, y estaban precedidas por una columna de guarda del mismo material. Las condiciones fueron como sigue:

ES 2 265 161 T3

- Sensibilidad: 0'300 μ C
- Tiempo de aplicación: 75 minutos
- Ancho de pico: 8'0 segundos
- Umbral del pico: 25'00
- Área de rechazo del pico: 1.000
- Volumen de muestra: 20 μ l

El programa de gradientes fue:

- 0-60 minutos: NaOH 5 mM hasta NaOH 500 mM
- 60'1-75 minutos: NaOH 5 mM

El programa del DEI fue:

Forma de onda

Tiempo (seg)	Potencial (V)
0'00	0'05
0'40	0'05
0'41	0'75
0'60	0'05
0'61	-0'15
1'00	-0'15

Integración

Comienzo (seg)	Final (seg)
0'20	0'40

Con cada aplicación del instrumento se analizó una serie de 8 patrones de oligosacáridos, desde 50 hasta 200 ppm. Todos los patrones fueron comprados de V-Labs Inc. (Covington, LA). Los cálculos del contenido de oligosacáridos en cada muestra fueron determinados a partir de estas curvas patrón. Se analizó un blanco de AIP al 7% con cada aplicación del instrumento, y su cromatograma fue restado del cromatograma de cada muestra y patrón para mejorar las líneas de base de todos. Se descubrió que no tenía efecto en la integración real de los picos individuales.

Determinación de Lactosa en Filtrados: Los extractos de oligosacáridos fueron descongelados a temperatura ambiente y mezclados con remolino para mezclarlos bien. Cada uno fue diluido 1:1.000 con AIP al 7%, y mezclados. Se analizaron las muestras y una serie de patrones de lactosa, utilizando el método siguiente:

Análisis de Lactosa mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alta Presión: Se analizaron las muestras para lactosa utilizando el sistema Dionex descrito antes, empleando esta vez una única columna analítica CarboPac PA-1 con guarda. Las condiciones fueron como sigue:

- Sensibilidad: 0'200 μ C
- Tiempo de aplicación: 45 minutos
- Ancho de pico: 8'0 segundos
- Umbral del pico: 25'00
- Área de rechazo del pico: 1.000
- Volumen de muestra: 20 μ l

ES 2 265 161 T3

El programa de gradientes fue:

- 0-12 minutos: NaOH 100mM
- 12' 1-20 minutos: AcONa 42 mM en NaOH 100 mM
- 20' 1-27 minutos: AcONa 60 mM en NaOH 100 mM
- 27' 1-32 minutos: AcONa 300 mM en NaOH 100 mM
- 32' 1-45 minutos: NaOH 100 mM

El programa del DEI fue:

Forma de onda

Tiempo (seg)	Potencial (V)
0'00	0'05
0'40	0'05
0'41	0'75
0'60	0'75
0'61	-0'15
1'00	-0'15

Integración

Comienzo (seg)	Final (seg)
0'20	0'40

Se prepararon, diluyeron 1:100, y analizaron una serie de patrones de lactosa, desde 2'5-25 g/l. Las concentraciones de lactosa se calcularon a partir de estas curvas patrón.

Resultados

La Figura 1 muestra un cromatograma estándar de nueve oligosacáridos encontrados en la leche humana. La elución/retención de cada oligosacárido fue determinada utilizando patrones de carbohidrato individuales. Siete de los nueve carbohidratos estudiados fueron bien resueltos a partir de sus picos vecinos: 3-Fucosil-lactosa (3-FL, Gal β -4(Fuc α 1-3)Glu) coeluida con el componente menor Lacto-difucohexosa I (LDFH-I, Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)NAcGlc β 1-3Gal β 1-4Glu) en aquellas muestras de donantes que secretaron el gen Lewis; y LNT coeluida con el componente menor Lacto-N-neo-hexosa (LNnH, Gal β 1-4NAcGlc β 1-3(Gal β 1-4NAcGlc β 1-6)Gal β 1-4Glu). La Figura 2 muestra dos cromatogramas que comparan los perfiles de oligosacáridos de leche humana de donantes secretor (Figura 2A) y no secretor (Figura 2B). En los cromatogramas se puede observar la clara presencia o ausencia de 2'-FL, DFL, y LNF-I, como se pronosticó por la presencia o ausencia de la fucosiltransferasa necesaria para colocar fucosa en la posición alfa 1-2 de una galactosa terminal. Los secretores explicaron 199 de los 232 sujetos ensayados, o el 86% de la población. La Figura 3 muestra dos cromatogramas que comparan leche humana de sujetos Lewis-positivo (Figura 3A) y Lewis-negativo (Figura 3B). Los individuos Lewis-positivos poseen la fucosiltransferasa necesaria para colocar fucosa en la posición alfa 1-4 de N-acetilglucosamina. Hubo 224 donantes Lewis-positivos (o el 97%) en este grupo.

Abajo, en la Tabla I, se proporciona un resumen de los datos recogidos. Se utilizó leche de un total de 232 donantes, con varios donantes contribuyendo a una serie de muestras de leche. Estas muestras fueron utilizadas para determinar el cambio en la concentración de cada oligosacárido durante todo el periodo de lactancia. Con el fin de desarrollar una concentración normal promedio de los azúcares, se promediaron sus valores.

ES 2 265 161 T3

TABLA I

Intervalos de Concentración de Oligosacáridos en todas las Muestras Analizadas

	Promedio (ppm)	Mínimo (ppm)	Máximo (ppm)	Media (ppm)	n: *	%; **
3-FL	1.456'00	0'00	3.457'00	1.472'00	230'00	99'10
LNF-III	578'00	0'00	2.108'00	507'00	231'00	99'60
LNF-II	429'00	0'00	1.470'00	361'00	184'00	79'30
DFL	494'00	0'00	2.441'00	393'00	199'00	85'80
Lactosa	68.440'00	26.910'00	124.370'00	66.960'00	232'00	100'00
2'-FL	2.240'00	0'00	4.484'00	2.260'00	200'00	86'20
LNF-I	912'00	0'00	3.291'00	845'00	200'00	86'20
LNnT	279'00	0'00	831'00	258'00	229'00	98'70
LNF-V	154'00	0'00	2.265'00	120'00	153'00	65'90
LNT	744'00	0'00	2.740'00	687'00	231'00	99'60

“n: *” indica el número de muestras ensayadas que contenían el oligosacárido en cuestión.

“%; **” es el porcentaje de muestras que contenían el oligosacárido. Los promedios fueron calculados para únicamente aquellas muestras que contenían el azúcar; si una muestra no contenía, no se incluyó el valor “cero”.

25

Los valores encontrados arriba en la Tabla I varían notablemente de los aceptados en la bibliografía. En la mayor parte de la publicación reciente sobre esta materia, Thurl y col. [*Analytical Biochemistry* 235 (1996) 202-206] publicaron un método que separa y cuantifica los oligosacáridos individuales de la leche humana, incluyendo oligosacáridos neutros y ácidos, y lactosa. En esta publicación, Thurl y col. describen el método utilizado y cinco resultados de un donante. La Tabla II, abajo, compara los resultados del estudio de Thurl y col. con los resultados de la Tabla I, así como los resultados de otros dos estudios que cuantificaron realmente los azúcares individuales. Los otros dos estudios están descritos en Kobata, A., *Methods in Enzymology* 28 (1972) 262-271, y Kunz, C. y col., *Acta Paediatr.* 82 (1993) 903-912. Los resultados de la presente invención, presentados en la Tabla I, promediaron las concentraciones para un gran número de sujetos aleatorios. Los otros estudios discutidos arriba determinaron los valores de, a lo sumo, 4 muestras de sujetos diferentes.

30

35

TABLA II

Comparación de las Concentraciones Promedio de Oligosacáridos de Varias Fuentes (en mg/l)

40

	Presente invención	Thurl y col.	Kunz y col.	Kobata
3-FL	1.456'00	460'00		
LNF-III	578'00	280'00		50'00
LNF-II	429'00	200'00	500-1.000	20'00
DFL	494'00	170'00		
2'-FL	2.240'00	184'00		
LNF-I	912'00	670'00	1.000-1.500	200'00
LNnT	279'00	110'00		60'00
LNF-V	154'00			

55

El método utilizado por Kobata y col. empleó deslipidación por centrifugación, eliminación de proteínas por extracción con etanol, y una serie complicada de etapas de cromatografía en papel y en capa fina para llegar a las concentraciones listadas. Este método tarda aproximadamente un mes para acabar, y deja mucha cabida para el error y pérdidas o degradación de alguno de los compuestos más complejos. Thurl y col. utilizaron un tratamiento térmico para desactivar cualquier materia con riesgo biológico que pudiera estar presente en la leche, una etapa que también puede degradar los azúcares fucosilados sensibles al calor. Se ha demostrado que el calor y el pH ácido pueden degradar incluso los oligosacáridos más básicos, incluyendo la LNnT y las fucosil-lactosas. Cada uno de los oligosacáridos cuantificados en la presente invención fueron sometidos al procedimiento íntegro (utilizando patrones auténticos) y analizados, con pérdidas no perceptibles en ninguna etapa. Además, las muestras de leche humana fueron reforzadas con varios de los estándares a niveles elevados, con excelentes recuperaciones por todo el procedimiento.

65

ES 2 265 161 T3

Ejemplo ilustrativo de una formulación infantil, lista para alimentar, conteniendo oligosacáridos, no siendo parte de la invención

Una formulación infantil lista para alimentar, conteniendo los oligosacáridos 3-fucosil-lactosa, lacto-N-fucopentosa III, lacto-N-fucopentosa II, difucosil-lactosa, 2'-fucosil-lactosa, tiene la siguiente composición [147'9 ml (5 onzas líquidas) = 100 cal]:

Nutrientes	Por 100 calorías
Proteína	2'14 g
Grasa	5'40 g
Carbohidratos	10'7 g
3-Fucosil-lactosa	206'0 mg
Lacto-N-fucopentosa III	72'0 mg
Lacto-N-fucopentosa II	51'3 mg
Difucosil-lactosa	55'8 mg
2'-Fucosil-lactosa	318'1 mg
Agua	133'0 mg
Ácido linoleico	1.300'0 mg

Vitaminas	Por 100 calorías
Vitamina A	300 UI
Vitamina D	60 UI
Vitamina E	3'0 UI
Vitamina K	8 µg
Tiamina (Vit. B ₁)	100 µg
Riboflavina (Vit. B ₂)	150 µg
Vitamina B ₆	60 µg
Vitamina B ₁₂	0'25 µg
Niacina	1.050 µg
Ácido fólico (folacín)	15 µg
Ácido pantoténico	450 µg
Biotina	4'4 µg
Vitamina C (ácido ascórbico)	9 mg
Colina	16 mg
Inositol	4'7 mg

Minerales	Por 100 calorías
Calcio	73 mg
Fósforo	56 mg
Magnesio	7'5 mg
Hierro	1'8 mg
Zinc	0'75 mg
Manganeso	30 µg
Cobre	75 µg
Yodo	15 µg
Sodio	44 mg
Potasio	108 mg
Cloruro	62 mg

La formulación infantil anteriormente descrita puede ser utilizada cuando se necesite una fórmula infantil, tal como si la decisión se hace para discontinuar el amamantamiento antes de 1 año de edad, si se necesita un complemento al amamantamiento o como alimentación rutinaria si no se adopta el amamantamiento.

ES 2 265 161 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición nutricional sintética constando de uno o más oligosacáridos de la leche humana, en donde los oligosacáridos de la leche humana en la composición son seleccionados del grupo que se compone de:

de 1.456 a 1.750 mg/litro de 3-fucosil-lactosa;

de 507 a 1.100 mg/litro de lacto-N-fucopentosa III;

10 de 361 a 750 mg/litro de lacto-N-fucopentosa II;

de 393 a 1.450 mg/litro de difucosil-lactosa;

15 de 2.240 a 2.400 mg/litro de 2'-fucosil-lactosa;

de 845 a 1.650 mg/litro de lacto-N-fucopentosa I;

de 258 a 450 mg/litro de lacto-N-neo-tetrosa; o

20 de 120 a 1.600 mg/litro de lacto-N-fucopentosa V;

y dicha composición comprende además macronutrientes comestibles,

25 en donde dicha composición es pretendida para su uso con niños sanos normales, chicos, adultos o con un sujeto que tenga necesidades especiales tales como las que acompañan a ciertos estados patológicos.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde dicho macronutrientes comestibles son formulados para alimentar a un niño.

30 3. La composición de la reivindicación 1 ó 2 en donde los macronutrientes comprenden al menos uno de aceite de coco, aceite de soja, mono y diglicéridos, glucosa, lactosa de calidad alimentaria, suero electrodiálizado, leche desnatada electrodiálizada, suero lácteo, y proteína de soja.

35 4. La composición de la reivindicación 1 ó 2, constando además de al menos una de las vitaminas A, C, D, E y complejo B.

5. La composición de la reivindicación 1 ó 2, constando además de al menos uno de calcio, magnesio, manganeso, sodio, potasio, fósforo, cobre, zinc, cloruro, yodo, selenio y hierro.

40 6. La composición de la reivindicación 1, en donde los oligosacáridos de la leche humana están presentes en las cantidades siguientes:

de 1.456 a 1.472 mg/litro de 3-fucosil-lactosa;

45 de 507 a 578 mg/litro de lacto-N-fucopentosa III;

de 361 a 429 mg/litro de lacto-N-fucopentosa II;

50 de 393 a 494 mg/litro de difucosil-lactosa;

de 2.240 a 2.260 mg/litro de 2'-fucosil-lactosa;

de 845 a 912 mg/litro de lacto-N-fucopentosa I;

55 de 258 a 279 mg/litro de lacto-N-neo-tetrosa; o

de 120 a 154 mg/litro de lacto-N-fucopentosa V.

60 7. Un proceso para fabricar una composición nutricional sintética constando de uno o más oligosacáridos de la leche humana, en donde los oligosacáridos de la leche humana en la composición son seleccionados del grupo que se compone de:

de 1.456 a 1.750 mg/litro de 3-fucosil-lactosa;

65 de 507 a 1.100 mg/litro de lacto-N-fucopentosa III;

de 361 a 750 mg/litro de lacto-N-fucopentosa II;

ES 2 265 161 T3

de 393 a 1.450 mg/litro de difucosil-lactosa;
de 2.240 a 2.400 mg/litro de 2'-fucosil-lactosa;
5 de 845 a 1.650 mg/litro de lacto-N-fucopentosa I;
de 258 a 450 mg/litro de lacto-N-neo-tetrosa; o
10 de 120 a 1.600 mg/litro de lacto-N-fucopentosa V;

y dicha composición comprende además macronutrientes comestibles,

en donde dicha composición es pretendida para su uso con niños sanos normales, chicos, adultos o con un sujeto que tenga necesidades especiales tales como las que acompañan a ciertos estados patológicos, dicho proceso comprendiendo la etapa de preparar dichos oligosacáridos mediante síntesis química.

8. El proceso de la reivindicación 7, en donde dichos macronutrientes comestibles son formulados para alimentar a un niño.

9. El proceso de la reivindicación 7 u 8, en donde los macronutrientes comprenden al menos uno de aceite de coco, aceite de soja, mono y diglicéridos, glucosa, lactosa de calidad alimentaria, suero electrodiálizado y leche desnatada electrodiálizada, suero lácteo, y proteína de soja.

10. El proceso de la reivindicación 7 u 8, en donde dicha composición consta además de al menos una de las vitaminas A, C, D, E y complejo B.

11. El proceso de la reivindicación 7 u 8, en donde dicha composición consta además de al menos uno de calcio, magnesio, manganeso, sodio, potasio, fósforo, cobre, zinc, cloruro, yodo, selenio y hierro.

12. El proceso de la reivindicación 7, en donde los oligosacáridos de la leche humana están presentes en la composición en las cantidades siguientes:

de 1.456 a 1.472 mg/litro de 3-fucosil-lactosa;
35 de 507 a 578 mg/litro de lacto-N-fucopentosa III;
de 361 a 429 mg/litro de lacto-N-fucopentosa II;
de 393 a 494 mg/litro de difucosil-lactosa;
40 de 2.240 a 2.260 mg/litro de 2'-fucosil-lactosa;
de 845 a 912 mg/litro de lacto-N-fucopentosa I;
45 de 258 a 279 mg/litro de lacto-N-neo-tetrosa; o
de 120 a 154 mg/litro de lacto-N-fucopentosa V.

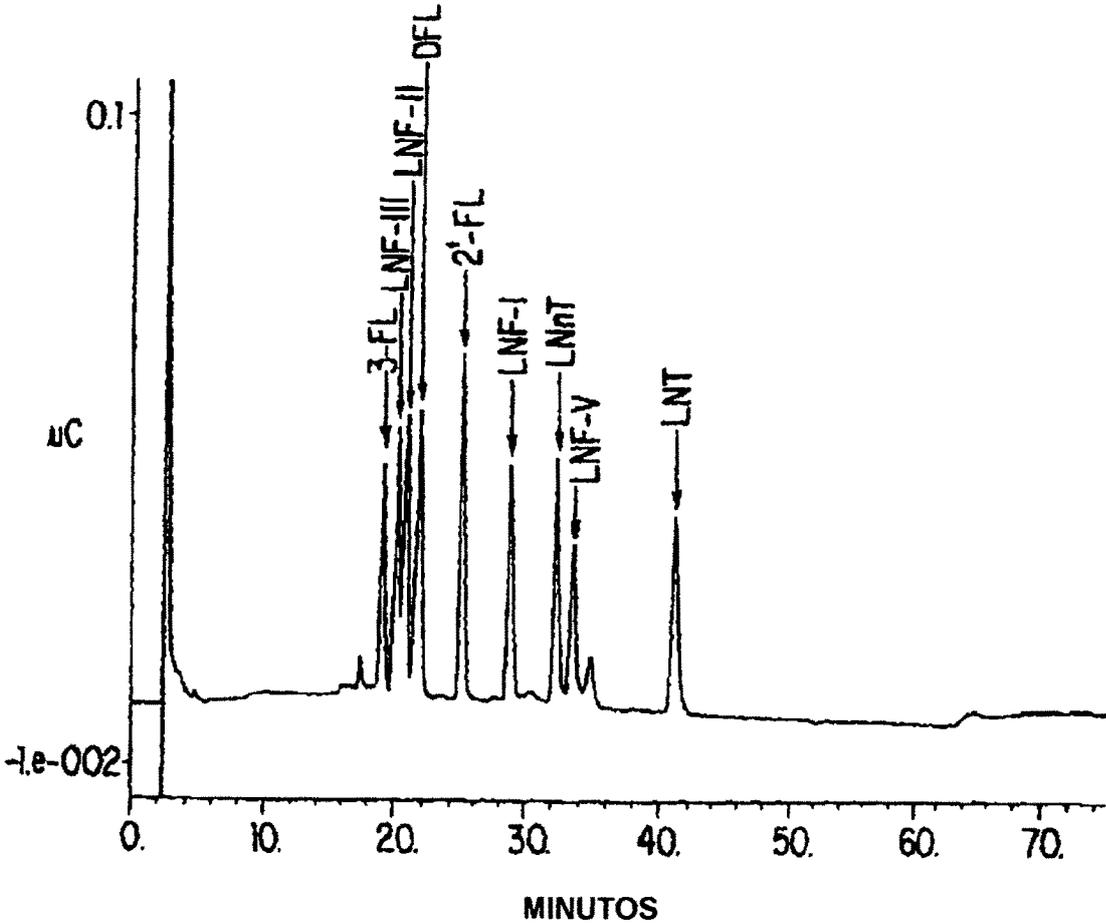


FIG. 1

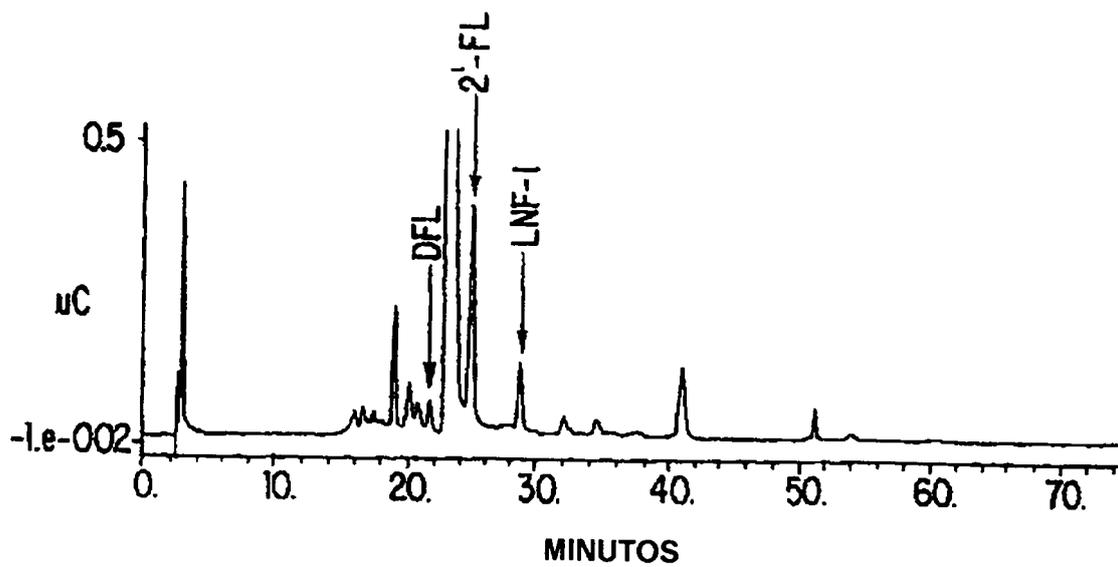


FIG. 2A

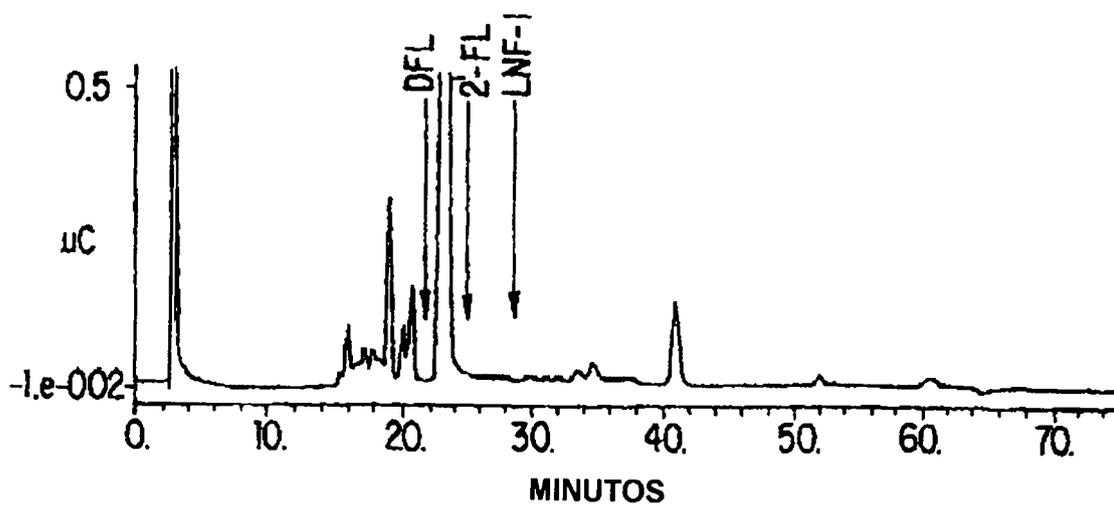


FIG. 2B

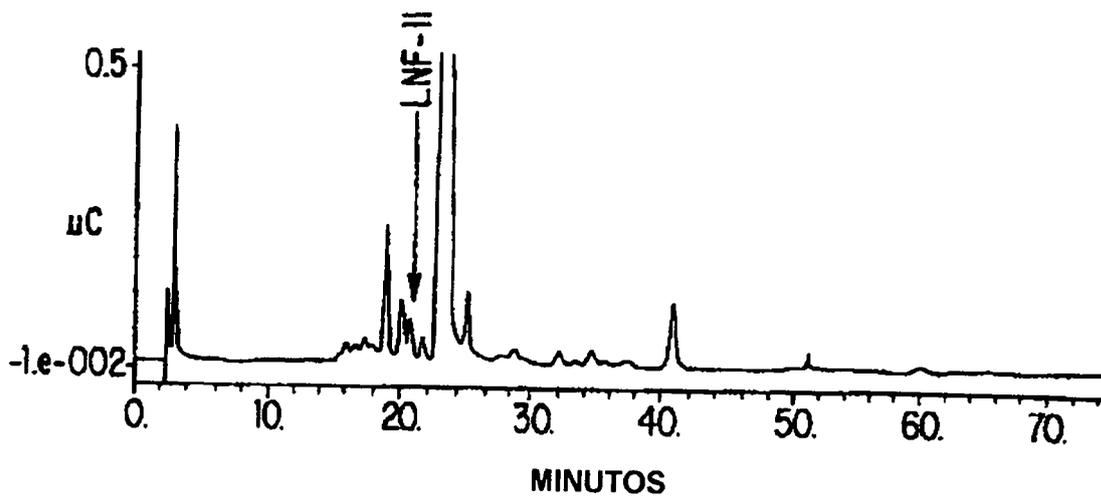


FIG. 3A

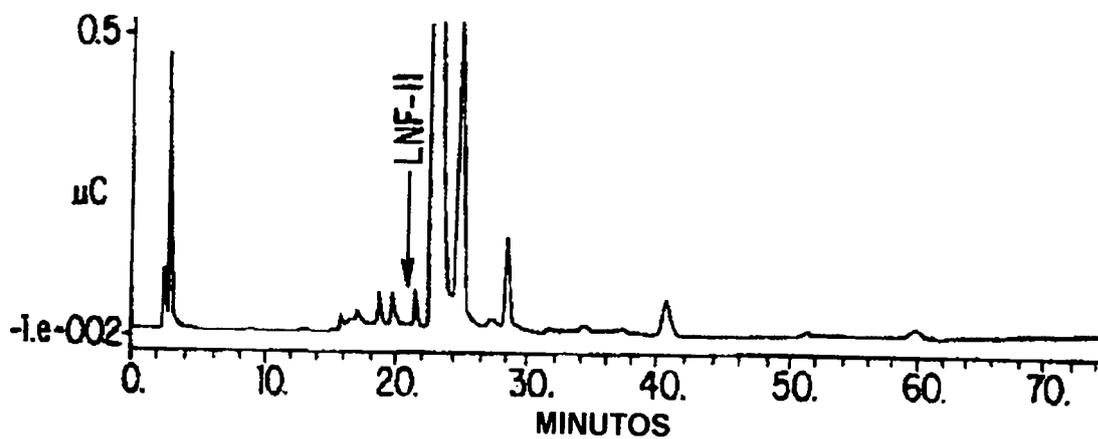


FIG. 3B