



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 314 826**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/29** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**A61K 31/01** (2006.01)

**A61K 31/702** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

**A61K 31/733** (2006.01)

**A23L 1/0528** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06113191 .8**

96 Fecha de presentación : **17.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1685763**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54

Título: **Sinergismo de GOS y polifruetosa.**

30

Prioridad: **17.05.2004 EP 04076479**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2009**

73

Titular/es: **N.V. Nutricia**  
**Eerste Stationsstraat 186**  
**2712 HM Zoetermeer, NL**

72

Inventor/es: **Speelmans, Gelske;**  
**Govers, Maria Johanna Adriana Petronella;**  
**Knol, Jan y**  
**Van Tol, Eric Alexander Franciscus**

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 314 826 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

Sinergismo de GOS y polifruetosa.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la nutrición y la salud humana. Proporciona mezclas sinérgicas no-vedosas de hidratos de carbono prebióticos, especialmente mezclas de galacto-oligosacáridos (GOS, por ejemplo TOS) y polifruetosa (por ejemplo, inulina), así como composiciones nutritivas que comprenden las mismas. Las composiciones nutritivas tienen efectos provechosos cuando son suministradas a bebés alimentados a biberón o parcialmente alimentados a biberón y tienen también efectos de mejora en la salud cuando son ingeridas por adultos con problemas intestinales, tales como la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) o el síndrome del intestino irritable (IBS).

15 **Antecedentes de la invención**

La microflora del intestino grueso humano (normalmente dividida en intestino ciego, colon y recto) juega un papel crucial tanto en la nutrición como en la salud humana. La composición bacteriana está influida y puede ser modulada por la ingesta dietética. Los hidratos de carbono que han pasado por el estómago e intestino delgado son metabolizados por las bacterias y están formados como un producto final principal del metabolismo de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), tales como acetato, propionato, butirato y valerato, que son posteriormente liberados en la sangre. Otros productos terminales de fermentación bacteriana, incluyen, por ejemplo lactato y succinato. Las cantidades y composiciones totales (cantidades relativas) de estos productos finales tienen a su vez un efecto profundo en el crecimiento bacteriano, pH, exclusión de especies patógenas, etc. Un método para influir beneficiosamente en la flora microbiana y la salud humana es la administración de prebióticos. Los “prebióticos” fueron definidos como “ingredientes nutritivos no digeribles”, que afectan provechosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon y, por tanto, mejorar la salud de los huéspedes (Gibson and Roberfroid 1995, J. Nutr. 125, 1401-1412). Los criterios que debe cumplir un compuesto para poder ser clasificado como prebiótico son: 1) no debe ser hidrolizado ni absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal (estómago, intestino delgado), 2) debe ser fermentado selectivamente por una o más bacterias potencialmente provechosas en el colon, 3) debe alterar la microbiota colónica hacia una composición más saludable y 4) debe preferiblemente inducir efectos que sean provechosos para la salud del sujeto. Los prebióticos comúnmente usados son los así denominados hidratos de carbono no digeribles (o “fibras dietéticas solubles”), que pasan sin digerir por la parte superior del tracto gastrointestinal al intestino grueso. Estos incluyen, por ejemplo, fructooligosacáridos (FOS), oligofruetosa, inulina y transgalacto-oligosacáridos (TOS). Debería ser advertido que en la bibliografía hay frecuentemente contradicción entre el uso de varios términos, tales como fructooligosacárido, inulina, oligofruetosa e inulo-oligosacáridos, y el mismo término puede ser usado para compuestos o composiciones diferentes.

Son bacterias provechosas conocidas, que son estimuladas por la absorción de prebióticos, las bacterias de ácido láctico, tales como *Lactobacilli* y *Bifidobacteria*, y los beneficios para la salud han sido atribuidos a este efecto estimulador. Por ejemplo, han sido descritos los efectos provechosos de la inulina y de los fructanos tipo inulina, tales como la oligofruetosa, sobre la función intestinal (Jenkins *et al.* 1999, J. Nutrition 129, 1431S-1433S) y este efecto se piensa que es debido a un efecto bifidogénico, que se refiere a un efecto estimulante del crecimiento selectivo en el total de las bifidobacterias, medido bien *in vivo* a través de las cuentas de bifidobacterias fecales o *in vitro* (véase p. ej. Roberfroid, ser J Clin Nutr 2001, 73(suppl), 406S-409S).

La leche humana también parece tener un efecto bifidogénico, puesto que las bacterias dominantes que se estabilizan en bebés alimentados a pecho son las bifidobacterias. Por el contrario, la colonización bacteriana de bebés alimentados con fórmula láctea no está dominada por bifidobacterias y es más diversa en especies bacterianas (Harmen *et al.* 2000, J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 30, 61-67). Se piensa que los oligosacáridos encontrados en la leche humana son responsables del efecto bifidogénico o prebiótico y se han hecho esfuerzos para modificar la fórmula para bebés de manera que se asemeje lo más posible a la leche humana y especialmente para que tenga el mismo o un efecto prebiótico muy similar a la leche humana. Esto ha sido hecho añadiendo prebióticos a la fórmula de leche para bebés (Boehm *et al.* Acta Paediatr. Suppl. 2003, 441, 64-67 and Moro *et al.* 2002, J Pediatr Gastroenterol Nutr 34, 291-295). Por ejemplo, al suplemento de fórmula de leche bovina con una mezcla de oligosacáridos que comprende transgalactooligosacáridos (TOS) e inulinaHP se le ha atribuido aumento del recuento fecal de bifidobacterias en bebés alimentados a biberón (Boehm *et al.* 2002, Arch Dis Child 86, F178-F181).

También, al suplemento de la fórmula de leche para bebés con TOS e inulina se le ha atribuido tener un efecto bifidogénico, y reducir el pH fecal (Boehm *et al.* 2003 *supra*; Moro *et al.* 2003, Acta Paediatr. Suppl. 441:77-79; Marini *et al.* 2003, Acta Paediatr. Suppl. 441:80-81; Boehm *et al.* 2002, Arch. Dis. Child Fetal. Neonata. Ed. 86:F178-F181; Moro *et al.* 2002, J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 34:291-295; Schmelzle *et al.* 2003, J Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 36:343-51).

Después de la fermentación de prebióticos por bacterias de ácido láctico son producidos ácidos orgánicos y disminuye el pH. Los *Lactobacilli* producen o bien lactato o lactato y acetato (un ácido graso de cadena corta; SCFA). El lactato puede estar como L-lactato o D-lactato. Las bifidobacterias, por otra parte, producen L-Lactato y acetato, pero no D-lactato. Las bifidobacterias (y otras bacterias de ácido láctico) normalmente no llevan a la producción de gases, tales como H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>. Estos tampoco producen otros SCFA, tales como propionato, butirato, isobutirato, valerato e

isovalerato. La presencia de SCFA, tales como isobutirato e isovalerato, son indicativos de la fermentación de hidratos de carbono por otras especies bacterianas, tales como *Clostridia* y *Bacteroides* o *Enterobacteriaceae*, o son indicativos de la fermentación de proteínas (de las cuales las bifidobacterias tienen poca capacidad). También, otras bacterias intestinales son capaces de producir acetato o lactato, tales como *Propionibacteria*, *Enterococci* y *Pediococci*.

5 Previamente se ha informado que la toma de determinados hidratos de carbono prebióticos aumenta las cantidades (relativas) de *Bifidobacteria* y/o *Lactobacilli*. Al mismo tiempo se ha observado una formación aumentada de SCFA y una reducción del pH. Pero también se ha informado con la introducción de prebióticos en la dieta, tales como inulina o GOS, sobre la formación de gases, que resultan en síntomas no deseados tales como flatulencia y dolor abdominal. Además, no sólo se ha informado sobre el acetato sino también sobre el aumento en, por ejemplo, el butirato, que no es deseable. En consecuencia ha sido descrita una escala de efectos no deseables, que resultan del consumo de nutrición suplementada con ciertos prebióticos.

15 En el colon y heces de bebés alimentados a pecho el SCFA encontrado de forma predominante es el acetato. Además, se han encontrado concentraciones elevadas de lactato. Estas cantidades (relativas) son superiores a las observadas en adultos (donde las concentraciones de lactato son generalmente inapreciables) o en bebés alimentados con fórmula láctea estándar. Posteriormente, las concentraciones de propionato y especialmente butirato son muy inferiores en el colon y en las heces de bebés alimentados a pecho que en adultos e incluso inferiores que en bebés alimentados con fórmula láctea estándar para bebés. El pH de las heces es mínimo en bebés alimentados a pecho. Como se ha mencionado anteriormente, es deseable proporcionar composiciones nutritivas, especialmente composiciones de fórmula láctea, que, cuando son consumidas, dan como resultado una microflora intestinal muy parecida a la de los bebés alimentados a pecho.

25 Han sido descritos muchos efectos del SCFA y el lactato en la salud y un pH del colon bajo. Del pH más bajo y de la presencia de ácidos orgánicos se ha descrito que tienen un efecto antipatógeno, y que proporcionan una ventaja para las bacterias ácido tolerantes, tales como las bacterias del ácido láctico (incluyendo *Bifidobacteria*). También se ha informado sobre los efectos de SCFA en la pared intestinal. SCFA son una fuente de energía de colonocitos y de ese modo ayudan a la integridad de la barrera intestinal. Los SCFA están también implicados en los efectos en la peristalsis, el metabolismo del ácido biliar, la absorción de agua y la diferenciación celular (véase p. ej. EP1105002). Los SCFA son conocidos por estimular la producción de moco y están implicados en la absorción mineral y producción de moco.

35 El documento no prepublicado WO 2005/039319 describe composiciones que comprenden *Bifidobacterium breve* y galacto-oligosacáridos y polifruktosa que tienen un efecto beneficioso en los trastornos inmunológicos incluyendo alergia y eczema o enfermedades atópicas.

40 El documento no prepublicado WO 2005/039597 describe composiciones que comprenden oligosacáridos ácidos y posiblemente una mezcla de dos oligosacáridos neutros diferentes, tales como galacto-oligosacáridos y polifruktosa, que tienen un efecto beneficioso en los trastornos relacionados con el sistema inmunitario incluyendo alergia, atopía y eczema.

### Descripción detallada de la invención

45 Los inventores presentes sorprendentemente descubrieron que GOS (especialmente TOS) y polifruktosa (especialmente inulina), cuando son administrados juntos, proporcionan varios efectos beneficiosos que no pueden ser explicados por un aumento del número de bifidobacterias intestinales y que no se deben, por tanto, al efecto bifidogénico descrito para TOS o inulina HP en la técnica anterior (p. ej. en Boehm *et al.* 2002, *supra*). En particular, se descubrió de forma imprevista que acto seguido de la administración de GOS y mezclas de polifruktosa, hubo un aumento de las cantidades totales formadas de SCFA, un aumento de las cantidades relativas de acetato y lactato y una reducción del pH fecal de los bebés, y estos efectos no estaban correlacionados con una cantidad de *Bifidobacteria* aumentada (relativa). Además de una cantidad y perfil provechoso de SCFA y una cantidad aumentada de lactato, fue observada una reducción en la formación de gases. Además, se ha descubierto que el lactato mismo tiene efectos provechosos hasta ahora desconocidos en el colon, puesto que se descubrió que aumenta la secreción de prostaglandina E1 y prostaglandina E2. Este efecto fue previamente sólo proporcionado para SCFA, especialmente el acetato (Willemsen *et al.* 2003, Gut 52, 1442-1447). Las composiciones que comprenden lactato, y las composiciones que comprenden prebióticos que estimulan la producción de lactato, pueden en consecuencia ser usadas para estimular la producción de mucina y soportar la integridad de la barrera mucosal (mucoprotección). Se descubrió además que el lactato disminuye las contracciones espontáneas y la tensión en los músculos del colon, dando como resultado un alivio de calambre y dolor.

60 Las composiciones prebióticas son por lo tanto novedosas en tanto en cuanto no aumentan o no de manera significativa el número de *Bifidobacteria*, mientras que suponen un aumento en las cantidades totales de SCFA, cambios provechosos en el perfil de SCFA (aumentos de acetato, reducción de butirato y propionato), aumento de ácido láctico (y dando como resultado una contracción beneficiosa y efectos reductores de la tensión y efecto muco-estimulante), una reducción del pH fecal, una reducción de la formación de gases, y una formación más gradual de SCFA (incluyendo la formación en la parte distal del colon), es decir, en conjunto, un patrón óptimo de productos de fermentación (más L-Lactato, menos butirato etc.). Todos estos cambios hacen que el entorno del colon se asemeje más al de los bebés alimentados a pecho. En una forma de realización de la invención el uso de mezclas de GOS y polifruktosa en

## ES 2 314 826 T3

cantidades eficaces para la preparación de composiciones que llevan a un entorno del colon esencialmente similar al de los bebés alimentados a pecho, es proporcionado por lo tanto en la presente.

Los efectos provechosos encontrados fueron significativamente más pronunciados después de la coadministración que cuando fue administrada o bien GOS o bien polifruktosa (p. ej. TOS o inulina) sola, indicando que GOS y polifruktosa actúan sinérgicamente. En la técnica anterior no fueron realizados estudios donde los efectos individuales de la administración de TOS e inulina fueran directamente comparados con la coadministración de estos dos tipos de compuestos y claramente no pueden ser comparados estos estudios individuales entre sí y son inadecuados para identificar los efectos sinérgicos.

Esta interacción sinérgica novedosa de GOS y polifruktosa (p. ej. TOS e inulina), y los efectos *in vivo* de la coadministración de los mismos conduce a usos nuevos de las composiciones que comprenden tanto GOS como polifruktosa en cantidades (sinérgicas) adecuadas, tales como el tratamiento o la prevención de cólicos y/o calambres abdominales, hinchazón abdominal, flatulencia, dolor abdominal, estreñimiento, IBS, IBD, alergia y/o mucoprotección aumentada del intestino. Además, una composición que comprende lactato (D-lactato y/o L-Lactato, preferiblemente L-Lactato) puede ser usada para tratar o prevenir uno o más de estos síntomas o trastornos.

Así, de forma imprevista, la fermentación de las mezclas específicas de prebióticos (GOS y polifruktosa) por la flora intestinal trae como consecuencia una formación pronunciada y cinéticamente ventajosa de SCFA y lactato y un modelo mejorado de productos metabólicos finales. Como consecuencia, se producen muchos efectos provechosos, tales como efectos en la producción de moco, efectos antiinflamatorios, efectos en la percepción del dolor y efectos en los calambres/cólico abdominales (ambos por medio de la relajación del colon y reducción de contracciones espontáneas). Las composiciones nutritivas que comprenden estas mezclas de prebióticos pueden también ser usadas para adultos que tengan problemas intestinales, tales como IBD o IBS o una integridad disminuida de la barrera intestinal debida a la desnutrición.

### Definiciones

Los “polisacáridos” se refieren a las cadenas de hidratos de carbono de unidades de monosacáridos con una longitud de cadena de al menos 10 unidades. Por el contrario, los “oligosacáridos” tienen una longitud de cadena inferior a 10 unidades.

El “grado de polimerización” o “DP” se refiere al número total de unidades de sacáridos en una cadena de oligo o polisacáridos. El “DP promedio” se refiere al DP promedio de oligosacáridos o cadenas de polisacáridos en una composición, sin tener en cuenta posibles mono o disacáridos (que son preferiblemente eliminados si están presentes). El DP promedio de una composición se utiliza para distinguir las composiciones. Además el % de unidades de sacáridos, tal como el % de glucosa y % de unidades de fructosa de una composición son distintivos.

“Polifruktosa” o “polifruktano” o “fructopolisacárido” se refiere a un hidrato de carbono polisacárido que comprende una cadena de unidades de fructosa con enlaces  $\beta$  con un grado de polimerización de 10 o más y comprende, por ejemplo, inulina (p. ej. inulina, HP) levano y/o un “tipo mezclado de polifruktano” (véase abajo).

La “inulina” o “inulina no hidrolizada” o “inulina HP” se utiliza en este caso para referirse a cadenas de fructosa terminadas en glucosa con la mayoría de cadenas (al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%) con un grado de polimerización (DP) de 10 o más. La inulina puede así ser descrita como  $GF_n$ , donde G representa una unidad de glucosilo, F representa una unidad de fructosilo y n es el número unidades de fructosilo enlazadas entre sí, siendo n 9 o más. La proporción G/F es aproximadamente de 0,1 a 0. Una parte pequeña de las moléculas de inulina, no obstante, puede que no tenga unidad glucosa terminal. El DP promedio es preferiblemente al menos 15, más preferiblemente 20 o más, tal como 20, 21, 22, 23, 25, 30, 40, 60, 70, 100, 150 o más en la presente. En la inulina las unidades de fructosa están enlazadas con un enlace  $\beta(2 \rightarrow 1)$ . Una inulina adecuada es por ejemplo aquella comercialmente disponible como Raftiline®HP (Orafti) con un DP promedio > 23.

La “inulina hidrolizada” u “oligofruktosa” se refiere a mezclas de cadenas de fructosa terminadas en glucosa y fructosa, con un DP inferior a 10. Así, la inulina hidrolizada puede ser descrita como una mezcla de cadenas  $GF_n$  y cadenas  $F_n$  (donde G es una unidad de glucosilo, F es una unidad de fructosilo y n = 1-8). La inulina hidrolizada es un producto de hidrólisis (enzimático o ácido) o un producto de inulina parcialmente hidrolizado, que resulta del seccionamiento de enlaces  $\beta(2 \rightarrow 1)$  de fructosil-fructosa. El término inulina hidrolizada también comprende inulina hecha sintéticamente o inulina hecha recombinantemente que tenga el mismo carácter estructural.

El “levano” o “levulano” o “levulina” o “levulosano” se refiere a un polisacárido que consiste en polifruktosa donde las unidades de fructosa son enlazadas con enlaces  $\beta(2 \rightarrow 6)$ . Una fracción de glucosa inicial puede estar presente, pero no es necesaria. El grado de polimerización está por encima de 10.

En los “polifruktanos de tipo mezclado” las unidades de fructosa son enlazadas con enlaces  $\beta(2 \rightarrow 1)$  y  $\beta(2 \rightarrow 6)$ . Los polifruktanos de tipo mezclado están ramificados y tienen un DP > 10.

Los “GOS” o “galactooligosacáridos”, o “trans-galactooligosacáridos” o “TOS” se refieren a oligosacáridos compuestos de unidades de galactosa, con un DP de 10 o menos y un DP promedio de 2, 3, 4, 5 o 6. Una unidad de glucosa

puede estar presente en el extremo en el que se reduce la cadena. Preferiblemente los GOS contienen al menos 2/3 unidades de galactosa. Los más preferidos son los trans-galactooligosacáridos (TOS) con enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1-4). Tales GOS son por ejemplo los encontrados en Vivinal®GOS (comercialmente disponible por Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Netherlands), que comprenden trans-galactooligosacáridos con enlaces glicosídicos  $\beta$ (1-4) y enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1-4).

“SCFA” o “ácidos grasos de cadena corta” se refiere a ácidos grasos con unas longitudes de cadena de carbono de hasta C6, producidos como un producto final de fermentación bacteriana intestinal, tal como acetato (C2), propionato (C3), butirato e isobutirato (C4), valerato e isovalerato (C5) y otros. La expresión “iC4-5” se refiere a la suma de isobutirato, valerato e isovalerato.

Una “cantidad sinérgicamente eficaz” se refiere a una cantidad de GOS y polifruktosa (por ejemplo TOS e inulina) que, cuando son coadministrados, confiere uno (o más) efectos fisiológicos específicos (como se describe en algún otro lugar en la presente), donde el efecto total de la coadministración es mayor que la suma del efecto de la administración individual de GOS o polifruktosa. Por ejemplo, si el efecto de administración de GOS solos es X y el efecto de la administración de polifruktosa sola es Y, entonces el efecto de la coadministración de GOS y polifruktosa es mayor que X+Y y por ejemplo el efecto de la coadministración de  $1/2$  de la concentración de GOS más el % de concentración de polifruktosa tiene un efecto mayor que  $1/2 X + 1/2 Y$ , etc.

La “coadministración” de dos o más sustancias se refiere a la administración de estas sustancias a un individuo, bien en una composición o en composiciones separadas (kit de partes; como una composición combinada) que son administradas al mismo tiempo (simultáneamente) o dentro de un corto período de tiempo (uso separado o secuencial, p. ej. en unos minutos u horas).

“Enteral” se refiere aquí a la entrega directa en el tracto gastrointestinal de un sujeto (p. ej. oralmente o por medio de un tubo, catéter o estoma).

El término “que comprende” debe ser interpretado como que especifica la presencia de las partes declaradas, fases o componentes, pero no excluye la presencia de una o más partes, fases o componentes adicionales.

“Bebé” se refiere aquí a seres humanos de 0-36 meses, preferiblemente de 0-18 meses, o más preferiblemente de 0-12 meses de edad.

“Bebés alimentados a pecho” se refiere a bebés exclusivamente alimentados con leche materna. “Bebés no o parcialmente alimentados a pecho” son bebés no exclusivamente alimentados con leche materna. Esto incluye bebés alimentados con al menos un biberón (aproximadamente 80 ml) de leche de fórmula al día.

El “porcentaje” o “promedio” generalmente se refiere a porcentajes promedios en peso, a menos que se especifique otra cosa o a menos que esté claro que se entiende otra base.

En una forma de realización la presente invención proporciona varios usos novedosos de composiciones que comprenden tanto GOS como polifruktosa en cantidades adecuadas (sinérgicamente eficaces).

#### Usos y métodos según la invención

En los varios usos descritos aquí, un sujeto es preferiblemente un sujeto humano, más preferiblemente un bebé, tal como un bebé recién nacido hasta los 12 meses. Especialmente se refiere a bebés alimentados a biberón o parcialmente alimentados a biberón. De forma alternativa, un sujeto puede también ser un niño, adolescente o adulto. En particular, los problemas intestinales, tales como pero no limitados a la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), el síndrome del intestino irritable (IBS), flatulencia, calambres abdominales, cólico, hinchazón abdominal, dolor abdominal, etc., que pueden también suponer fatiga, depresión o cambios de humor, pueden ser evitados y/o tratados usando las composiciones según la invención. También puede ser mejorada la producción de mucosa y pueden ser evitadas o tratadas las alergias que resultan de un funcionamiento subóptimo del intestino. También la función de la barrera intestinal puede ser mejorada en pacientes con una función deteriorada de la barrera como resultado de desnutrición, cirugía, quimioterapia etc.

Las composiciones que comprenden tanto GOS como polifruktosa, tales como las composiciones que comprenden TOS e inulina, pueden ser usadas en una forma de realización para inducir la producción de SCFA en el intestino grueso de un sujeto y para aumentar significativamente la cantidad total (intestinal y/o fecal) de SCFA producidos a continuación de la administración y/o para modificar significativamente las cantidades relativas de SCFA (intestinales y/o fecales) producidos, en particular para aumentar la cantidad relativa (intestinal y/o fecal) de acetato del total de SCFA, y/o para aumentar significativamente la cantidad (absoluta y relativa) de lactato intestinal producido, y/o para reducir o prevenir significativamente la formación de gases intestinales, y/o para extender la producción de SCFA a la parte distal del colon, y/o para reducir significativamente el pH en el intestino grueso y el pH fecal. También, puede ser disminuida la suma del butirato intestinal y/o fecal, isobutirato, valerato y/o isovalerato en relación a los SCFA totales. Estos efectos son conseguidos a continuación de la administración, sin que tengan un efecto significativo en el número total y/o relativo de bifidobacterias intestinales. Las composiciones para el tratamiento o profilaxis de

## ES 2 314 826 T3

cualquier enfermedad o trastorno o molestia asociados a o provocados por uno o más de estos efectos intestinales están provistos en la presente.

5 La presente invención proporciona el uso de galactooligosacáridos y polifru-  
6 posición para el tratamiento o la prevención de hinchazón abdominal, formación de gases, dolor abdominal y/o flatu-  
7 lencia. En otra forma de realización la presente invención proporciona el uso de galactooligosacáridos y polifru-  
8 cta para la producción de una composición para el tratamiento o la prevención de alergia, eczema o enfermedades atópi-  
9 cas. En otra forma de realización la presente invención proporciona el uso de galactooligosacáridos y polifru-  
10 cta para la producción de una composición para el tratamiento y/o la prevención de cólicos y/o para la relajación de contrac-  
11 ciones del colon, preferiblemente la contracción tónica y/o fásica. En otra forma de realización la presente invención  
12 proporciona el uso galactooligosacáridos y polifru-  
13 cta para la producción de una composición para el tratamiento o la  
14 prevención del síndrome del intestino irritable o la enfermedad inflamatoria del intestino. En otra forma de realización  
15 adicional la presente invención proporciona el uso de galactooligosacáridos y polifru-  
16 cta para la producción de una  
17 composición para el aumento del funcionamiento de la barrera intestinal y/o la producción de moco en el intestino  
18 grueso.

19 A menos que se especifique lo contrario, un “aumento significativo” (de por ejemplo SCFA, acetato o lactato) se  
20 refiere aquí a un aumento de al menos el 5%, preferiblemente al menos del 10%, más preferiblemente al menos el  
21 20% o más, en comparación con la cantidad producida cuando son administradas por separado o bien GOS o bien  
22 polifru-  
23 cta (p. ej. inulina). De forma similar, a menos que se especifique otra cosa, una “reducción significativa” (de,  
24 por ejemplo, la formación de gas) se refiere a una reducción de al menos el 5%, preferiblemente al menos el 10%, más  
25 preferiblemente al menos el 20%, 25%, 50% o más (p. ej. 70%, 80%, 90%, 100%) en comparación con la cantidad  
26 producida cuando es administrada la polifru-  
27 cta (p. ej. inulina) sola.

28 Un aumento en la cantidad total de SCFA producidos como producto de fermentación de las composiciones de  
29 GOS y las de polifru-  
30 cta puede también ser medido como una reducción significativa del pH de muestras fecales  
31 de los sujetos, reflejando una disminución *in vivo* del pH en el intestino grueso. En bebés se descubrió que el pH  
32 fecal disminuyó a aproximadamente un pH de 5.8 o menos, tal como un pH de 5.6, 5.5 o 5.4 o 5.2 acto seguido de  
33 la coadministración de TOS y polifru-  
34 cta (p. ej. inulina), mientras que el pH de los bebés alimentados por fórmula  
35 estándar fue alrededor de o por encima de 6, tal como aproximadamente un pH de 5.9, 6.8 o incluso 7.0. Una reduc-  
36 ción significativa del pH se refiere en consecuencia a una reducción del pH en al menos un 15% o 0,9 unidades en  
37 comparación con los bebés alimentados con fórmula estándar.

38 Otro efecto beneficioso de la coadministración de GOS y polifru-  
39 cta en cantidades adecuadas es que la com-  
40 posición de SCFA es significativamente diferente que cuando son administrados o bien GOS o bien polifru-  
41 cta. Especialmente la cantidad relativa de butirato es reducida significativamente, mientras que la cantidad relativa de ace-  
42 tato es aumentada significativamente. Las composiciones pueden, así, ser usadas para alterar no sólo cantidades totales  
43 de SCFA, sino también las proporciones de SCFA. En bebés a los que se coadministró TOS y polifru-  
44 cta (p. ej. inuli-  
45 na), los niveles de SCFA relativos se asemejaban más a los niveles encontrados en aquellos alimentados a pecho, con  
46 proporciones de acetato: propionato: butirato generalmente de aproximadamente 80-85%: 10-15%: 1-5%, mientras  
47 que en bebés alimentados con fórmula láctea estándar las proporciones fueron generalmente de alrededor de 69-74%:  
48 16-19%: 5-6% (como se muestra en los ejemplos). Así, especialmente las cantidades relativas de acetato son aumen-  
49 tadas y las cantidades relativas de propionato y butirato son disminuidas por las composiciones según la invención. La  
50 coadministración de GOS y polifru-  
51 cta resulta en proporciones de acetato: propionato: butirato, que se asemejan a  
52 las de los bebés alimentados a pecho mucho más que las de los bebés alimentados con fórmula (que producen niveles  
53 elevados de butirato y propionato y niveles relativamente bajos de acetato). El efecto en las proporciones relativas de  
54 SCFA puede ser medido por métodos conocidos en la técnica, tales como la cromatografía gaseosa de muestras fecales  
55 en varios puntos en el tiempo después de la administración, bien usando estudios *in vivo* o sistemas de fermentación  
56 *in vitro* como se describe p. ej. en los Ejemplos. Una “composición de SCFA significativamente modificada” o una  
57 “cantidad de acetato aumentada significativamente” se refiere a la cantidad de acetato (% de SCFA totales) siendo  
58 más elevada en al menos aproximadamente un 4%, 5%, 10%, 15%, o más, cuando no son administrados ni GOS ni  
59 polifru-  
60 cta o cuando GOS o polifru-  
61 cta son administrados individualmente. Preferiblemente las cantidades relativas  
62 de propionato y/o butirato son inferiores que cuando no son administrados ni GOS ni polifru-  
63 cta o cuando GOS o  
64 polifru-  
65 cta son administrados individualmente. En una forma de realización, la composición según la invención es  
66 conveniente para aumentar el acetato intestinal y/o fecal hasta aproximadamente más del 85%, tal como 86%, 87%,  
67 88%, 90% o más, de los SCFA totales.

68 Otro efecto provechoso adicional observado cuando son coadministrados GOS y polifru-  
69 cta es una reducción  
70 significativa de los SCFA ramificados, en comparación con la proporción de SCFA ramificados encontrados cuando  
71 se administra sólo GOS o sólo polifru-  
72 cta. Una “reducción significativa de los SCFA ramificados”, como se utiliza  
73 en este caso, se refiere a una reducción de al menos el 70% en comparación con la concentración encontrada en bebés  
74 no alimentados con prebióticos o que da como resultado una proporción fecal inferior al 1,5% de los SCFA totales.  
75 La proporción de los SCFA ramificados con respecto a los SCFA totales puede ser medida dividiendo la suma de los  
76 SCFA ramificados, es decir, isobutirato, más isovalerato más valerato, entre la suma total de SCFA, es decir, acetato,  
77 más propionato, más butirato, más isobutirato, más isovalerato, más valerato, etc. La reducción de la proporción de  
78 los SCFA ramificados es provechosa para la salud del sujeto, puesto que los SCFA ramificados son perjudiciales. Esto  
79 indica menor degradación proteica, que no es deseada porque la fermentación proteica resulta en un aumento del pH  
80 y en la formación de agentes perjudiciales tales como H<sub>2</sub>S.

## ES 2 314 826 T3

Una reducción significativa de butirato se refiere a una reducción de al menos el 50% en comparación con la concentración encontrada en bebés no alimentados con prebióticos o dando como resultado una proporción fecal inferior al 4% de los SCFA totales. En una forma de realización la composición según la invención es adecuada para disminuir la suma de butirato, isobutirato, valerato e isovalerato intestinales (y/o fecales) por debajo del 7% de los SCFA totales, tal como 6,5%, 6%, 5%, 4% o menos de los SCFA totales.

En otra forma de realización, las composiciones que comprenden GOS y polifruktosa son adecuadas para aumentar la duración de la fermentación dentro del colon. En particular, la fermentación bacteriana estará todavía activa en las partes más distales del colon acto seguido de la coadministración, según está indicado por la producción de SCFA en la parte distal del colon. No se ha producido o sólo muy poco SCFA en la parte distal del colon acto seguido de la administración de composiciones que comprenden sólo GOS o sólo polifruktosa. Además, la fermentación rápida en el comienzo del colon es observada acto seguido de la coadministración, que es especialmente importante para efectos antipatógenos y es también observada en bebés alimentados a pecho. En conjunto, esto indica que las composiciones son adecuadas para establecer y/o mantener un modelo de fermentación relativamente homogéneo a lo largo del colon de un sujeto y para extender la fermentación y la producción de SCFA al extremo distal del colon. Los SCFA, y muy probablemente también otros productos de fermentación, especialmente el lactato, son en consecuencia producidos a lo largo del colon, al principio, en la mitad y en el extremo del colon.

En otra forma de realización, la coadministración de GOS y polifruktosa en cantidades sinérgicas puede ser usada para aumentar significativamente la producción de lactato, como puede ser determinado de nuevo analizando las muestras fecales de los sujetos de prueba y de los sujetos de control, comprendiendo las composiciones recibidas o bien solamente GOS o solamente polifruktosa o composiciones base equivalentes sin prebióticos. Un “aumento significativo del lactato” se refiere al menos al 5%, 10%, 20% o incluso el 50% o más de lactato, que es producido en sujetos a los que son coadministradas composiciones que comprenden GOS y polifruktosa, en comparación con los sujetos a los que no son administrados ni GOS ni polifruktosa. Por ejemplo, los bebés alimentados con leche de fórmula estándar suplementada con 6 g/l de mezclas de TOS/inulina (90%: 10%) produjeron en 16 semanas aproximadamente el 16% de lactato (como % de los ácidos totales), mientras que los bebés alimentados con fórmula estándar produjeron aproximadamente el 0,6% y los bebés alimentados a pecho produjeron aproximadamente el 35% de lactato. Aunque no se alcance la cantidad de lactato producida por los bebés alimentados a pecho, la suplementación de la fórmula de leche estándar con mezclas de TOS e inulina llevaron a un aumento significativo en la producción de lactato. Como se muestra en los Ejemplos, se descubrió que el lactato tenía efectos inesperadamente provechosos. De forma similar al acetato, aumentó la producción de prostaglandina E1 y prostaglandina E2 y resultó en una expresión de mucina epitelial mejorada. La mucosa intestinal juega un papel importante en la salud humana, puesto que sirve como una barrera respecto a patógenos, alérgenos y carcinógenos infecciosos. Las composiciones que influyen positivamente en el desarrollo y/o integridad de la mucosa pueden en consecuencia ser usadas para ayudar al desarrollo de una mucosa saludable en bebés recién nacidos y para ayudar al establecimiento de una mucosa saludable en bebés alimentados a biberón o parcialmente alimentados a biberón y en sujetos que sufren de síntomas o enfermedades que resulten de o estén asociadas a un funcionamiento inadecuado de la mucosa intestinal. Por ejemplo, los problemas intestinales, tales como la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD, por ejemplo colitis o enfermedad de Crohn) o el síndrome del intestino irritable (IBS) pueden ser tratados o evitados, o el agente patógeno y/o la entrada a través de la mucosa puede ser reducida u otros problemas inmunológicos pueden ser evitados o reducidos, tales como el desarrollo de asma. También puede ser evitada o reducida la pérdida de integridad de la barrera intestinal como resultado de la desnutrición, cirugía, quimioterapia etc.

Además, las contracciones espontáneas y la tensión abdominal fue reducida significativamente de una manera dependiente de la dosis siguiendo la administración de D- o L-Lactato. Las composiciones según la invención pueden así ser usadas para aumentar los niveles de lactato intestinal y de ese modo tratar o prevenir síntomas tales como el dolor abdominal, cólico, contracciones abdominales, tensión abdominal y similares.

Puesto que se descubrió que el lactato mismo tenía efectos previamente desconocidos, es también un objeto de la invención proporcionar composiciones que comprendan lactato en cantidades adecuadas, que pueden ser usadas para tratar o prevenir los síntomas y trastornos antes descritos. En una forma de realización las composiciones comprenden sólo lactato en cantidades adecuadas, mientras que en otra forma de realización las composiciones de GOS y polifruktosa descritas aquí comprenden además lactato para seguir aumentando los niveles de lactato intestinal. Una composición de este tipo según la invención comprende TOS e inulina en cantidades sinérgicamente eficaces y además comprende lactato en cantidades adecuadas. En una forma de realización se proveen composiciones que son adecuadas para aumentar el lactato intestinal y/o fecal hacia aproximadamente 10 mM/kg de heces.

Se entiende que cuando se hace referencia al análisis de las muestras fecales ésta es una medida indirecta del efecto *in vivo* real. Asimismo, pueden ser realizados ensayos *in vitro*, donde las poblaciones bacterianas son reproducidas *in vitro* y son agregadas cantidades adecuadas de composiciones a los cultivos. En particular, puede ser usado el sistema de fermentación *in vitro* descrito en los ejemplos.

La coadministración de composiciones que comprenden GOS y polifruktosa puede en consecuencia ser usada para conseguir uno o más de los siguientes efectos fisiológicos:

- un aumento significativo de los SCFA totales

## ES 2 314 826 T3

- una disminución significativa del pH
- una composición de SCFA significativamente modificada
- 5 - una reducción significativa de los SCFA ramificados
- una reducción significativa de la producción de gas por mol de SCFA producido
- 10 - una fermentación más larga e incluso más homogénea, incluyendo la fermentación incluso en las partes más distales del colon, y/o
- una formación inicial elevada de SCFA y/o formación de ácido láctico en la parte más proximal del colon
- 15 - promover la producción de SCFA en el principio, en la mitad y en el extremo del colon
- un aumento significativo de ácido láctico (absoluto y/o relativo) y/o
- un aumento de la cantidad relativa de L-Lactato como una proporción del ácido láctico total formado.

20 En una forma de realización preferida al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o todos estos efectos son significativamente modificados cuando se usan las composiciones que comprenden tanto GOS como polifruktosa, en comparación con la administración de composiciones que comprenden sólo GOS o polifruktosa, o ni GOS ni polifruktosa. En particular, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o todos estos efectos son significativamente más importantes acto seguido de la coadministración de una (cantidad sinérgicamente eficaz) de GOS y polifruktosa que la suma del(os) efecto(s) de la

25 administración de GOS y polifruktosa individualmente.

Las composiciones sinérgicas según la invención son, en consecuencia, particularmente adecuadas para formar y/o mantener una microflora saludable dentro de un intestino grueso de bebé después de la administración de una cantidad sinérgicamente eficaz. En una forma de realización preferida un bebé es alimentado solamente con una

30 composición de base, tal como una fórmula láctea, suplementada con una cantidad sinérgicamente eficaz de GOS y polifruktosa dentro de las primeras semanas después del nacimiento. Una composición preferida es, en consecuencia, una composición dietética para bebés. En otra forma de realización un bebé es sólo parcialmente alimentado de una composición según la invención. En una forma de realización la composición es utilizada para tratar o prevenir los síntomas seleccionados de uno o más de los siguientes: formación de gas, flatulencia, colitis, hinchazón abdominal, calambres abdominales, dolor abdominal, IBS, IBD, alergia y/o como un mucoprotector. GOS y polifruktosa pueden,

35 así, ser usados para la preparación de una composición o una composición combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de la flatulencia, formación de gas excesiva, colitis, hinchazón abdominal, calambres abdominales, dolor abdominal, IBS, IBD, alergia, disminución del funcionamiento de la barrera intestinal y/o como un mucoprotector. El sujeto puede en este caso ser cualquier sujeto, desde un bebé, niño, adolescente hasta un adulto.

40 Claramente, las composiciones de base a las que son agregados GOS y polifruktosa en cantidades sinérgicamente eficaces, variarán dependiendo de la edad del sujeto, el modo de administración y de los síntomas principales que deben de ser tratados o evitados. Para bebés por ejemplo la composición de base es preferiblemente una fórmula líquida o en polvo para bebés o una fórmula para la fase siguiente, mientras que para adultos puede ser más adecuada una composición (líquida, semilíquida o sólida) suplementaria de nutrientes o alimentación por sonda.

45 En una forma de realización preferida GOS y polifruktosa son coadministrados en una cantidad sinérgicamente eficaz adecuada para aumentar significativamente la cantidad total de SCFA intestinal formada y/o para mejorar significativamente la composición intestinal de SCFA (especialmente para aumentar significativamente el porcentaje de acetato en relación con la cantidad total de SCFA) y/o para aumentar significativamente la producción de lactato y/o para bajar el pH intestinal y/o reducir significativamente la formación de gas intestinal.

Es provisto el uso de composiciones que comprenden una cantidad sinérgicamente eficaz de GOS y polifruktosa para el tratamiento y/o la prevención de cólicos y/o calambres abdominales, hinchazón abdominal y/o flatulencia, dolor abdominal, IBS, IBD y/o alergia. Es también proporcionado el uso de tales composiciones para aumentar la

55 mucoprotección y reforzar la barrera intestinal. Se entiende que no se hace referencia necesariamente a una composición, pero que GOS y polifruktosa pueden estar presentes en composiciones separadas, que proporcionen una cantidad sinérgicamente eficaz cuando son coadministrados.

A través de estos cambios en los niveles de SCFA, del perfil y del pH intestinal, las composiciones son capaces de

60 causar uno o más de los siguientes efectos provechosos mencionados a continuación:

- a) la permeabilidad intestinal en el lugar de producción de SCFA es disminuida. Esto es importante para prevenir la enfermedad y mantener la salud, especialmente para prevenir el desarrollo de alergias. El descubrimiento de que la coadministración de GOS y polifruktosa causa una fermentación más homogénea y
- 65 extiende la fermentación a la parte distal del colon es importante en este aspecto, puesto que la permeabilidad del intestino, incluyendo las partes distales del colon, puede ser reducida de forma homogénea y el intestino puede de este modo ser mantenido homogéneamente en un estado saludable.



## ES 2 314 826 T3

- b) La motilidad o movimiento peristáltico del intestino es mejorado, que reduce o previene el estreñimiento, un problema común observado en bebés alimentados con fórmula.
- 5 c) La disminución de la cantidad de contracciones espontáneas y la tensión de los músculos colónicos que trae como consecuencia menos calambres y menos dolor abdominal.
- d) Es aumentada la absorción del calcio, que es importante para la mineralización ósea y desarrollo óseo del sujeto, especialmente si el sujeto es un bebé.
- 10 e) Pueden ser reducidos síntomas secundarios de salud reducida, tales como fatiga, depresión y fluctuación de humor.
- f) La producción de moco de la mucosa intestinal es mejorada significativamente, lo que proporciona protección contra la fijación patógena y colonización. En particular, se descubrió que los niveles de lactato estaban correlacionados positivamente con la producción de moco. Las composiciones según la invención pueden por lo tanto ser usadas para estimular la producción de moco.
- 15 g) El metabolismo de la bilis puede ser modificado a niveles y/o modelos como aquellos observados en los bebés alimentados a pecho.
- 20 h) El crecimiento de microorganismos intestinales patógenos es inhibido a lo largo de todo el colon.

Una composición que comprende una cantidad sinérgicamente eficaz de GOS y polifruetosa puede en consecuencia ser usada para mantener o establecer (p. ej. en un bebé recién nacido, prematuro o bebé nacido a término o en un bebé no alimentado o parcialmente alimentado a pecho, u otros sujetos, tales como adultos, uno o más de los efectos fisiológicos mencionados arriba y mantener o mejorar la salud del sujeto para asegurar o establecer unas condiciones saludables para el intestino grueso y una actividad óptima del intestino grueso.

25

En particular, la incidencia, duración y/o gravedad de enfermedades, trastornos o síntomas tales como cólico y/o calambres abdominales, hinchazón y/o flatulencia abdominal, dolor abdominal, IBS, IBD y/o alergia, infección patógena intestinal (p. ej. bacterias, virus, hongos), diarrea, eczema, alergia inducida por asma y otras enfermedades atópicas, y/o estreñimiento pueden ser reducidos, anulados o evitados por la administración de una composición según la invención. Las composiciones según la invención pueden también ser usadas para relajar las contracciones del colon, preferiblemente las contracciones fásicas y/o tónicas.

30

35

### Composiciones según la invención

Las composiciones adecuadas para los usos anteriormente descritos comprenden tanto polifruetosa como GOS en cantidades sinérgicamente eficaces. Las composiciones comprenden GOS/polifruetosa en proporciones que van desde 3/97 a 97/3, preferiblemente 5/95 a 95/5, más preferiblemente 90/10 a 45/55. Todas las proporciones individuales entre estos puntos finales están comprendidas aquí, tales como 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 55/45, 60/40, 70/30, 80/20, 85/15, 90/10, etc.

40

Las dosificaciones requeridas y la proporción de GOS/polifruetosa para alcanzar el efecto sinérgico (óptimo) puede variar, dependiendo del tipo de composición y del método y frecuencia de administración. Algunos ejemplos están provistos, no obstante, abajo. Un experto en la materia puede determinar fácilmente qué dosificaciones de cada componente son requeridas para conseguir el mejor efecto fisiológico y qué proporción de GOS/polifruetosa es la más adecuada. Por ejemplo, si el objetivo principal es aumentar el nivel total de SCFA acto seguido de la administración oral de una composición que comprende GOS y polifruetosa, un experto en la materia hará varias composiciones (que comprendan GOS más polifruetosa, GOS solo, polifruetosa sola) y comparará su eficacia para inducir niveles elevados de SCFA usando bien pruebas *in vivo* o *in vitro*, como se conocen en la técnica. Se entiende que cuando se hace referencia a “dosificación diaria” o “dosificación por día”, esto no implica que la dosificación deba ser administrada al sujeto en una vez.

45

50

Una fórmula sinérgicamente eficaz para bebés puede, por ejemplo, consistir en una composición de base (p. ej. fórmula para bebés estándar) comprendiendo aproximadamente 4 g/l, 5 g/l o más de una mezcla de GOS y polifruetosa, donde la proporción de GOS respecto a la polifruetosa puede variar como se describe en otro lugar en la presente (p. ej. 90% GOS: 10% polifruetosa).

55

La polifruetosa puede, por ejemplo, ser levano y/o inulina. La polifruetosa, tal como levano o inulina, para el uso en las composiciones puede ser bien extraída de fuentes naturales (plantas o bacterias) o puede ser hecha por *de novo* síntesis o por tecnologías de ADN recombinante como son conocidas en la técnica. Los métodos de extracción, separación por tamaños y purificación de inulina han sido descritos, por ejemplo en De Leenheer (1996), US6569488 y US5968365. Los métodos de producción recombinante han sido descritos por ejemplo en US6559356. La síntesis generalmente implica el uso de moléculas de sacarosa y enzimas con actividad de fructosil transferasa. La inulina adecuada para el uso en las composiciones está también ya comercialmente disponible, p. ej. Raftiline®HP, Orafiti.

60

65

## ES 2 314 826 T3

Las inulinas vegetales generalmente tienen un grado de polimerización muy inferior que las inulinas bacterianas (hasta 150, en comparación con hasta 100.000 en bacterias). Las fuentes vegetales incluyen especies dicotiledóneas, tales como *Compositae*. Ejemplos de especies que producen cantidades relativamente grandes de inulina, principalmente en sus raíces, bulbos o tubérculos, son achicoria, espárrago, dalia, aguaturma, ajo, y otros (véase Kaur y Gupta, J. BioSci. 2002, 27, 703-714). Puesto que la inulina preferiblemente no debería comprender oligofruktosa, la hidrólisis debería ser evitada o la oligofruktosa y/o mono- o disacáridos presentes deberían ser eliminados antes del uso.

Especialmente preferida es la polifruktosa con un PD de al menos 10, 15, 20, 50, 70, 100, 120, 130, 150, 200, 300, 500 o más. Las polifruktosas, tales como levanos, pueden ser hidrolizadas para evitar problemas de viscosidad asociados a cadenas demasiado largas, en tanto en cuanto sea retenido un PD de 10 o más.

Los levanos también pueden ser obtenidos de fuentes naturales tales como plantas (p. ej. monocotiledóneas) levadura, hongos, bacterias, o hechos químicamente o usando la tecnología del ADN recombinante.

Los GOS pueden ser obtenidos de fuentes naturales, tales como plantas (p. ej. achicoria, soja) o bacterias, o pueden ser hechos sintéticamente o por tecnología de ADN recombinante como se conoce en la técnica. Los GOS pueden ser  $\beta$ -galactooligosacáridos o  $\alpha$ -galactooligosacáridos o una mezcla de ambos. En particular, los residuos de galactosa son enlazados por enlaces  $\beta(1-4)$  y  $\beta(1-6)$  glicosídicos (trans GOS o TOS). Los GOS adecuados para el uso en las composiciones están también ya comercialmente disponibles, p. ej. Vivinal®GOS, Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Holanda. Los GOS pueden también ser derivados de lactosa, por tratamiento enzimático de lactosa con  $\beta$ -galactosidasa o por hidrólisis de poliglucano. En una forma de realización preferida son usados TOS. En una forma de realización la polifruktosa preferida es inulina HP, de modo que la combinación de TOS e inulina HP es también una forma de realización preferida aquí.

Otras composiciones proporcionadas son las composiciones que comprenden lactato en cantidades adecuadas, en particular para los usos anteriormente descritos. Cantidades adecuadas de lactato pueden variar, y pueden por ejemplo oscilar entre 1 y 30 gramos al día.

Las composiciones según la invención pueden ser bien composiciones alimentarias, composiciones suplementarias alimentarias o composiciones farmacéuticas. Aparte de polifruktosa y GOS (y/o lactato) éstas pueden comprender ingredientes adicionales. Para composiciones suplementarias alimentarias estos deberían ser aptos para el consumo humano y fisiológicamente aceptables. "Alimentos" se refiere a composiciones dietéticas líquidas, sólidas o semisólidas, especialmente composiciones alimentarias totales (sustitutos de comidas), que no requieren toma de nutrientes adicionales o composiciones suplementarias alimentarias. Las composiciones suplementarias alimentarias no reemplazan completamente la ingesta de nutrientes por otros medios. Los alimentos y composiciones suplementarias alimentarias son en una forma de realización preferida alimentos para bebés o suplementos alimentarios, alimentos o suplementos alimentarios para bebés nacidos prematuramente, alimentos para bebés, alimentos para niños, etc., que son administrados preferiblemente enteralmente, preferiblemente oralmente varias veces al día. Los alimentos o composiciones suplementarias alimentarias son particularmente adecuados para bebés no alimentados a pecho o parcialmente alimentados a pecho. También, la composición puede ser provechosamente administrada a bebés en su periodo de adaptación a alimentos sólidos o a bebés que están pasando de la alimentación a pecho a la alimentación a biberón. La composición puede también formar parte de un suplemento enriquecedor de leche humana.

En una forma de realización la composición es una fórmula para bebés o de continuación, como p. ej. se conoce en la técnica, especialmente como se describe en la Directiva de la Comisión europea 91/321/EEC y las enmiendas a la misma, pero puede ser modificada para comprender una cantidad eficaz de polifruktosa y GOS. La fórmula para bebés o de continuación puede ser a base de leche (leche de vaca, leche de cabra, etc.), fórmula láctea para bebés (IMF) o soja para bebés intolerantes a la lactosa o puede contener aminoácidos como fuente de nitrógeno para bebés con problemas de alergia o de absorción. Las fórmulas comercialmente disponibles para bebés o de continuación comprenden, en consecuencia, una base de proteína de leche o proteína de soja, grasa, vitaminas, hidratos de carbono digeribles y minerales en cantidades diarias recomendadas y pueden ser polvos, concentrados líquidos o composiciones listas para alimentar.

La administración de la fórmula modificada para bebés o de continuación resulta en unas condiciones del intestino grueso que se asemejan a aquellas de los bebés alimentados a pecho, como puede ser determinado por los análisis del pH fecal, composición bacteriana, la producción y perfiles de SCFA, la producción de gas, etc. Cuando la composición es una bebida, preferiblemente el volumen (que comprende la dosis efectiva diaria) consumido o administrado sobre una base diaria está en la gama de aproximadamente 100 a 1500 ml, más preferiblemente aproximadamente de 450 a 1000 ml al día. Cuando la fórmula es un sólido preferiblemente la cantidad (que comprende la dosis diaria efectiva) consumida o administrada sobre una base diaria está en la gama de aproximadamente 15 a 220 g/día, preferiblemente aproximadamente 70 a 150 g/día de polvo de fórmula.

Una dosis efectiva diaria de GOS y polifruktosa oscila entre aproximadamente 1 y 30 g/día, preferiblemente entre aproximadamente 2 y 10 g/día para bebés y preferiblemente para adultos entre aproximadamente 5 y 20 g/día.

Los alimentos o composiciones suplementarias alimentarias según la invención pueden comprender adicionalmente otros ingredientes activos, tales como vitaminas (A, B1, B2, B3, B5, B12, C, D, E, K, etc.), probióticos (p. ej. *bifidobacteria*, *lactobacilli*, etc.), otros prebióticos, fibras, lactoferrina, inmunoglobulinas, nucleótidos, y simi-

lares. Nutrientes, tales como proteínas, lípidos y otros hidratos de carbono (p. ej. hidratos de carbono digeribles, hidratos de carbono no digeribles, hidratos de carbono solubles o insolubles) pueden estar presentes en varias cantidades. Los hidratos de carbono típicos insolubles no digeribles presentes en la nutrición para bebés son polisacáridos de soja, almidón resistente, celulosa y hemicelulosa. Los hidratos de carbono típicos solubles y digeribles para el uso en la nutrición para bebés son por ejemplo maltodextrina, lactosa, maltosa, glucosa, fructosa, sacarosa y otros mono o disacáridos o mezclas derivadas. La composición puede también comprender otros ingredientes inactivos y portadores, tales como p. ej. glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina de sodio, talco, carbonato magnésico y similares. Las composiciones pueden también comprender agua, electrolitos, aminoácidos esenciales y no esenciales, oligoelementos, minerales, fibra, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, emulsionantes y estabilizadores (tales como lecitina de soja, ácido cítrico, ésteres de mono- o diglicéridos), conservantes, aglutinantes, fragancias, y similares. Lípidos adecuados para las composiciones, especialmente para alimentos para bebés o suplementos alimentarios, son grasas lácteas, lípidos vegetales, tales como aceite de canola, aceite de alazor, aceite de girasol, aceite de oliva, aceites marinos, etc. o fracciones o mezclas derivadas de los mismos que comprenden ácidos grasos adecuados (poliinsaturados y/o saturados).

Las proteínas adecuadas para las composiciones especialmente para alimentos para bebés o suplementos alimentarios, incluyen caseína, lactosuero, leche desnatada condensada, soja, carne bovina, colágeno, maíz y otras proteínas de planta o proteínas hidrolizadas, aminoácidos libres, etc. Preferiblemente, las proteínas comprendidas en alimentos para bebés o composiciones suplementarias alimentarias están en gran parte hidrolizadas y/o parcialmente hidrolizadas para reducir el riesgo de alergias. Las composiciones alimentarias para bebés según la invención preferiblemente comprenden todas las vitaminas y minerales esenciales en la dieta diaria o semanal en cantidades nutricionalmente significativas, tales como las cantidades diarias mínimas recomendadas.

La composición alimentaria o suplementaria alimentaria puede también hacerse en una forma de realización en base a (es decir, partiendo desde o comprendiendo) una base alimentaria. Puede, por ejemplo, estar basada en o comprender un producto lácteo, tal como un producto lácteo fermentado, incluyendo pero no limitado a leche, yogur, una bebida a base de yogur o lactosuero. Tales composiciones pueden en cierto modo ser preparadas de una forma conocida *per se*, p. ej. añadiendo una cantidad eficaz de polifruktosa y GOS o TOS a un alimento o base alimentaria adecuado. Otras bases alimentarias adecuadas pueden ser bases vegetales, bases de carne y similares.

La composición alimentaria o suplementaria alimentaria según la invención puede ser usada bien como un tratamiento y/o profilácticamente. Esto quiere decir que pueden ser administradas bien después de que hayan sido diagnosticados problemas o enfermedades gastrointestinales en un sujeto o, de forma alternativa, antes de la incidencia de los síntomas (por ejemplo, para pacientes con alto riesgo de desarrollar problemas gastrointestinales). Por ejemplo, si los síntomas asociados a la enfermedad o el funcionamiento subóptimo en el intestino grueso, tales como estreñimiento, flatulencia, alergias, cólicos, dolor abdominal, calambres abdominales, IBD, IBS son observados, la administración de la composición ayudará en el reestablecimiento de unas condiciones saludables del intestino grueso o evitará el desarrollo de tales síntomas.

En una forma de realización las composiciones son administradas profilácticamente, para soportar el desarrollo de una microflora saludable y/o condiciones saludables del intestino grueso. Unas “condiciones saludables del intestino grueso” se refiere a una fisiología y actividad intestinal normal, especialmente la absorción normal de nutrientes, agua, resistencia de la mucosa a fijaciones patógenas, colonización e infección, etc. como puede ser determinado por el análisis fecal y la producción de gas. Especialmente, se refiere a una fisiología y actividad óptima. Cualquier funcionamiento subóptimo del intestino grueso trae como consecuencia síntomas como los descritos y puede ser determinado por el análisis fecal y/o la producción de gas. Las enfermedades o trastornos intestinales que resultan de un funcionamiento subóptimo están incluidos en la presente.

Las composiciones farmacéuticas para el tratamiento o profilaxis de trastornos intestinales o los síntomas del funcionamiento intestinal subóptimo, tales como IBD, colitis, IBS y/o integridad de la barrera aumentada pueden comprender ingredientes adicionales biológicamente activos, tales como fármacos, proteínas biológicamente activas o péptidos, probióticos, y otros. Las formas de realización descritas para alimentos o composiciones suplementarias de alimentos se aplican también a composiciones farmacéuticas.

Las composiciones según la invención puede presentarse en cualquier forma de dosificación, tal como líquida, sólida, semisólida, comprimidos, bebidas, polvos, etc., dependiendo del método de administración. La administración a un sujeto es preferiblemente oral, aunque para algunos usos puede ser adecuada la alimentación rectal o tubular (introduciendo un tubo directamente en el estómago, duodeno, o intestino delgado o intestino grueso).

Es otra forma de realización de la invención proporcionar un método para la producción de una composición según la invención añadiendo una cantidad sinérgicamente eficaz de GOS (o TOS) y polifruktosa a una base de composición adecuada, como se ha descrito anteriormente.

Los siguientes ejemplos no limitativos describen el efecto sinérgico de GOS y polifruktosa. A menos que se declare otra cosa, la práctica de la invención empleará métodos convencionales estándar de la biología molecular, farmacología, inmunología, virología, microbiología o bioquímica. Dichas técnicas son descritas en Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY,

## ES 2 314 826 T3

en Volúmenes 1 y 2 de Ausubel *et al.* (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA y Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985), Microbiology: A Laboratory Manual (6th Edition) por James Cappuccino, Laboratory Methods in Food Microbiology (3rd edition) por W. Harrigan (Author) Academic Press.

5

### Leyenda de las figuras

#### Figura 1

10

Formación de acetato, propionato y butirato después de 48 h de fermentación *in vitro* de TOS, inulina, una mezcla de TOS/inulina 9/1 y una mezcla de oligofruktosa e inulina 1/1 por heces frescas obtenidas de bebés.

#### Figura 2

15

Cantidades relativas de acetato, propionato y butirato formados después de 48 h de fermentación *in vitro* de TOS, inulina, una mezcla de TOS/inulina 9/1 y una mezcla de oligofruktosa e inulina 1/1 por heces frescas obtenidas de bebés. La suma de acetato más propionato más butirato formada fue establecida al 100% para cada una de las fibras evaluadas.

20

#### Figura 3

25

Formación de gas después de 48 h de fermentación *in vitro* de TOS, inulina, una mezcla de TOS/inulina 9/1 y una mezcla de oligofruktosa e inulina 1/1 por heces frescas obtenidas de bebés. La cantidad de gas formado (ml se refería a la cantidad de SCFA totales formados (en mM por g fibra)

#### Figura 4

30

Efectos de las mezclas de SCFA (acetato/propionato/butirato en una proporción de 90/5/5 en una base molar) y de L- lactato.

Figura 4A: efecto de 0, 0,1, 0,5, 1 y 4 mM de la mezcla de SCFA o L-Lactato en expresión de muc-2 en un cocultivo CCD18/T84 (n=6). Las barras de error muestran el SEM. El aumento a 1 y 4 mM de la mezcla de SCFA y 0,5, 1 y 4 mM de L-Lactato es estadísticamente significativo.

35

Figura 4B: el efecto de 0, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de la mezcla de SCFA o L-Lactato en la respuesta espontánea de PGE1 y PGE2 en las células CCD18 (n=7). Las barras de error muestran el SEM. El aumento de PGE1 a 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de la mezcla de SCFA y 100  $\mu\text{M}$  de L-Lactato es estadísticamente significativo. El aumento de PGE2 a 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de la mezcla de SCFA y 250  $\mu\text{M}$  de L-Lactato es estadísticamente significativo ( $P < 0,05$ )

40

#### Figura 5

45

Los efectos del acetato sódico y del L-Lactato sódico en la contracción espontánea en la parte distal y proximal del colon. El blanco (establecido a una tensión de 1 g) es del 0%. La tensión después de la adición de 40 mM de KCl se estableció en el 100%.

### Ejemplos

50

#### Ejemplo 1

*Los estudios de la fermentación in vitro muestran efectos sinérgicos en los modelos de fermentación*

##### 1.1 Materiales y métodos

55

###### *Microorganismos*

Los microorganismos fueron obtenidos de heces frescas de bebés alimentados a biberón. El material fecal fresco de los bebés de 1 a 4 meses fue agrupado y puesto en un medio de conservación durante 2 h.

60

###### *Composiciones/sustrato*

Como sustrato fueron usados o bien prebióticos (TOS; TOS (de VivinalGOS, Borculo Domo Ingredients, Holanda) y mezcla de inulina (raftilinHP de Orafiti, Bélgica) en una proporción de 9/1 (p/p); inulina; mezcla de oligofruktosa e inulina en una proporción de 1/1 (p/p), o bien no fue usado ninguno (blanco).

65

## ES 2 314 826 T3

### *Medios*

Medio de McBain & MacFarlane: agua de peptona tamponada 3,0 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l, mucina (microvellosidades intestinales) 0,8 g/l, triptona 3,0 g/l, L-cisteína-HCl 0,4 g/l, sales de bilis 0,05 g/l,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2,6 g/l,  $NaHCO_3$  0,2 g/l, NaCl 4,5 g/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g/l,  $CaCl_2$  0,228 g/l,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,005 g/l. Biberones Scott de 500 ml fueron rellenos con el medio y esterilizados durante 15 minutos a 121°C.

Medio tamponado:  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2,6 g/l,  $NaHCO_3$  0,2 g/l, NaCl 4,5 g/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g/l,  $CaCl_2$  0,228 g/l,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,005 g/l. El pH fue ajustado a  $6,3 \pm 0,1$  con  $K_2HPO_4$  o  $NaHCO_3$ . Biberones Scott de 500 ml fueron rellenos con el medio y esterilizados durante 15 minutos a 121°C.

Medio de conservación: 20,0 g/l de peptona tamponada, 0,5 g/l de L-cisteína-HCl, 0,5 g/l de sodio tioglicolato, 1 pastilla de resazurina por litro. El pH fue ajustado a  $6,7 \pm 0,1$  con 1 M de NaOH o HCl. El medio fue hervido en el microondas. Los biberones de suero de 30 ml fueron rellenos con un medio de 25 ml y esterilizados durante 15 minutos a 121°C.

Las heces frescas fueron mezcladas con el medio de conservación. Las heces frescas pueden ser conservadas de esta forma durante varias horas a 4°C.

Suspensión fecal: la solución en conserva de heces fue centrifugada a 13.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue eliminado y las heces fueron mezcladas con el medio de McBain & Mac Farlane en una proporción en peso de 1:5.

### *Fermentación*

3,0 ml de la suspensión fecal fueron combinados con 85 mg de glucosa o prebiótico o sin adición (blanco) en un biberón y mezclados íntegramente. Una muestra de  $t=0$  fue retirada (0,5 ml). 2,5 ml de la suspensión resultante fueron transportados en un tubo de diálisis en un biberón de 60 ml relleno de 60 ml del medio tamponado. El biberón fue bien cerrado e incubado a 37°C. Las muestras fueron tomadas del tubo de diálisis (0,2 ml) o del tampón de diálisis (1,0 ml) con una jeringa hipodérmica después de 3, 24, y 48 horas e inmediatamente puestas sobre hielo para detener la fermentación.

### *Determinación de los ácidos grasos de cadena corta y lactato*

Véase el Ejemplo 2. Los valores fueron corregidos para el blanco.

### *Determinación del gas*

A  $t=3$ ,  $t=24$  y  $t=48$  la presión del gas en el espacio superior del biberón de 60 ml fue medida por un medidor de presión de gas (Druckmessumformer, Econtronic, Alemania) pinchando una jeringa hipodérmica de 6 ml a través del tapón de caucho del biberón y retirada del gas del espacio superior por esta jeringa hasta que la presión de gas fue de 0 bares. El volumen en la jeringa era el volumen de gas formado. Los valores fueron corregidos para el blanco.

## 1.2 Resultados

La fermentación *in vitro* se efectuó usando las siguientes muestras:

- 1.) 85 mg de TOS (de VivinalGOS, Borculo Domo Ingredients, Holanda)
- 2.) 85 mg de inulina (RaftilinHP, de Orafti, Bélgica)
- 3.) 85 mg de TOS/inulina con una proporción de TOS/inulina de 9/1 (p/p) Y
- 4.) 85 mg de (raftilosaP95, de Orafti, Bélgica)/inulina (raftilinaHP) en una proporción de OF/inulina de 1/1 (p/p).

### *La cantidad total producida de SCFA*

Los resultados son mostrados en la Figura 1. La Figura 1 muestra que la mezcla de TOS/inulina resultó en una cantidad significativamente más elevada de SCFA por g fibra que los componentes aislados, pero también más elevada que la mezcla de oligofructosa (OF) e inulina. También fueron analizados 85 mg de TOS/inulina en una proporción de 1/1 (datos no mostrados), que también proporcionó un efecto sinérgico.

### *Producción de L- y D-lactato*

L- y D-lactato podrían ser sólo determinados en  $t=3$ . La tabla 1 muestra los productos metabólicos finales formados en aquel punto en el tiempo.

## ES 2 314 826 T3

TABLA 1

*Productos metabólicos finales (mM/g fibra) formados después de 3 horas de fermentación in vitro*

	Acetato	Propionato	Butirato	L-lactato	D-lactato
TOS	0,23	0	0	0,14	0,03
Inulina	0	0	0	0,00	0,00
TOS/inulina	0,40	0	0	0,17	0,04
OF/inulina	0,30	0	0	0,04	0,02

Se observa de nuevo una formación sinérgica más elevada de lactato para la mezcla de TOS/inulina en comparación con los componentes individuales de TOS e inulina. En comparación con la mezcla de OF e inulina el porcentaje de lactato (basado en los ácidos totales) y la proporción de L-/D-lactato es más elevada en la mezcla de TOS/inulina.

### *Cantidades relativas de SCFA*

La Figura 2 muestra el modelo de productos de fermentación después de 48 h. La mezcla de TOS/inulina muestra un porcentaje significativamente más elevado de acetato que los componentes individuales, que es también superior que para la mezcla de oligofruktosa (OF) e inulina. Las heces de los bebés alimentados a pecho muestran un porcentaje elevado de acetato, de forma que la mezcla de TOS/inulina resulta en un modelo de productos de fermentación que se asemeja mucho al de los bebés alimentados a pecho.

### *Formación de gas*

Los resultados están mostrados en la Figura 3. Respecto a la formación de gas, TOS y la mezcla de TOS/inulina forman la cantidad mínima de gas por SCFA por mM formado. La inulina y la mezcla de OF/inulina muestran una cantidad mucho más elevada de formación de gas. Por mM formado de SCFA la cantidad de gas es mínima en la mezcla de TOS/inulina.

### *Cinética de formación de SCFA*

La Tabla 2 muestra la cinética de formación de SCFA. La combinación de TOS/inulina muestra todavía una formación elevada de SCFA entre 24 y 48 h, indicando que en la parte distal del colon todavía son formados SCFA que tiene un efecto provechoso en la permeabilidad del colon, formación de moco y efectos antipatógenos etc. También durante las 3 primeras h es formada la cantidad más elevada de SCFA, como es el caso de los oligosacáridos de leche humana (datos no mostrados). Una fermentación rápida al comienzo del colon es importante debido a los efectos antipatógenos.

TABLA 2

*Cinética de formación de SCFA (mM) SCFA (blanco corregido)*

	Intervalo de tiempo (horas)		
	0-3 hrs	3-24 hrs	24-48 hrs
Prebióticos			
TOS	0,23	3,85	0,13
TOS/inulina HP	0,40	4,49	0,24
Inulina HP	0,00	3,05	0,05
OF/inulina HP	0,11	4,26	0,00
OF = oligofruktosa			

## Ejemplo 2

*Estudio clínico con TOS/inulina: un aumento relativo de acetato y disminución relativa de butirato no están correlacionados con un aumento de bifidobacterias. TOS e inulina tienen un efecto sinérgico*

5

## 2.1 Materiales y métodos

63 mujeres embarazadas que habían decidido alimentar a pecho y 57 que decidieron no hacerlo, fueron reclutadas durante su último trimestre de embarazo. Los bebés con un peso al nacimiento normal, sin anomalía congénita, enfermedad congénita ni enfermedad gastrointestinal fueron inscritos dentro de los 3 días después del parto. El estudio fue aprobado por el comité ético del Medical Center, St. Radboud, Nijmegen, Holanda. Fue obtenido el consentimiento informado por escrito de los padres antes de la inscripción en el estudio. Los bebés de madres que habían decidido no alimentar a pecho fueron aleatorizados y asignados doble ciegos a uno de dos grupos de fórmula (OSF, SF). El grupo de fórmula estándar (SF; n=19) recibió una fórmula regular para bebés, no suplementada (Nutrilon I, Nutricia, Holanda). Los datos composicionales principales de la fórmula estándar a dilución estándar de 131 g/l están provistos en la Tabla 3. El grupo de fórmula prebiótica (OSF; n=19) recibió la misma fórmula estándar para bebés suplementada con una mezcla de 6 g/l de transgalacto-oligosacáridos (TOS; Vivinal GOS, Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Holanda) e inulina (PF; RaftilineHP, Orafiti active food ingredient, Tienen, Bélgica). La mezcla comprendía el 90% de TOS y el 10% de inulina (polifruktosa). Las fórmulas del estudio fueron administradas *ad libitum* durante el periodo de estudio. Las madres que decidieron alimentar a pecho para que siguieran alimentando a pecho durante el curso del estudio y fueron asistidas por consultores de lactancia cuando lo necesitaron. Al terminar la alimentación a pecho sus bebés recibieron una de dos fórmulas. Se evaluó la adaptabilidad contando el número de botes de fórmula sin usar durante cada visita y comparando la cantidad de fórmula consumida con la ingesta de alimentos registrada.

25

TABLA 3

*Composición de la fórmula estándar por litro*

30

Energía	kcal	670
Proteína	g	14
Proporción de caseína/lactosuero		40/60
Grasa	g	35
Hidratos de carbono totales	g	75
Lactosa	g	75
<b>Minerales</b>		
Calcio	mg	540
Fósforo	mg	270
Magnesio	mg	50
Sodio	mg	190
Potasio	mg	680
Cloruro	mg	430
Hierro	mg	5
Zinc	mg	5

65

*Cuestionarios*

Se recogieron datos demográficos, clínicos y antropométricos de la madre antes del parto. Se obtuvo información del parto de las madres en el día 5 después del parto. Se obtuvo información sobre la ingesta de alimentos, tolerancia a la fórmula, características de la deposición, salud y datos antropométricos de los bebés a través de los cuestionarios en el día 5, 10, 28 después del nacimiento y a partir de ahí una vez cada 4 semanas hasta finalizar el estudio.

10 *Muestras fecales*

Se pidió a los padres que tomaran muestras fecales de sus bebés, en el día 5, 10, 28 después del nacimiento y a partir de ahí una vez cada 4 semanas. Las muestras fueron tomadas del pañal, cuanto antes después de la defecación, recogidas en recipientes para heces (Greiner Labortechnik, Holanda) y almacenadas inmediatamente a -20°C por el progenitor y transportadas en un congelador portátil al laboratorio por los investigadores.

*Preparación de las muestras fecales*

Para la determinación de los SCFA, 1 gramo de las muestras fue descongelado en agua helada diluida 10x en MilliQ y homogeneizado durante 10 minutos usando un homogeneizador Stomacher (IUL Instruments, Barcelona, España). Se mezclaron 350 µl de heces homogenizadas con 200 µl al 5% (v/v) de ácido fórmico, 100 µl 1,25 g/l de ácido 2-etilbutírico (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Holanda) y 350 µl de MilliQ. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 14.000 rpm para eliminar las partículas grandes y el sobrenadante fue almacenado a -20°C. Para el análisis del FISH y mediciones de ácido láctico, se descongelaron las muestras en agua helada, diluidas 10x (p/v) en suero salino tamponado con fosfato, pH 7.4 (PBS) y se homogeneizaron durante 10 minutos usando un "stomacher". Las heces homogenizadas fueron almacenadas a -20°C.

30 *Hibridación fluorescente in situ*

Se realizó el análisis de FISH como está descrito (Langendijk *et al*, 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61:3069-3075.) con algunas ligeras modificaciones. Se aplicaron muestras fijadas en paraformaldehído a portaobjetos de cristal cubiertos de gelatina (portaobjetos de [1 cm<sup>2</sup>/pocillo] 8 pocillos de PTFE cubiertos, CBN labsuppliers, Drachten, Holanda) y se secaron al aire. Las muestras secas fueron deshidratadas en etanol al 96% durante 10 minutos. Se precalentó y se añadió a las muestras secas un tampón de hibridación (20 mM de tris-HCl, 0,9 M de NaCl, 0,1% de SDS [pH 7.1]) con 10 ng/l de una sonda específica de *Bifidobacterium* marcada con Cy3 Bif164mod (5'-CAT CCG GYA TTA CCA CCC). Bif 164 mod es la versión modificada de la sonda S-G-Bif-a-0164-a-A-18 (( Langendijk *et al*, 1995, Appi. Environ. Microbiol. 61:3069-3075). Las placas fueron incubadas durante toda la noche en una cámara oscura húmeda a 50°C. Después de la hibridación se lavaron las placas durante 30 minutos en 50 ml de tampón de lavado precalentado (20 mM Tris-HCl, 0,9 M NaCl [pH 7.2]) y brevemente enjuagadas en MilliQ. Para colorear todas las bacterias, las muestras fueron incubadas con 0,25 ng/l de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de colorear con DAPI las placas fueron enjuagadas brevemente en MilliQ, fueron secadas, se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) y se cubrieron con un cubreobjetos. Se analizaron las placas automáticamente usando un microscopio de epifluorescencia Olympus AX70 con software de análisis de imagen automatizado (Análisis 3.2, Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Alemania). El porcentaje de bifidobacterias por muestra fue determinado analizando 25 posiciones microscópicas elegidas de forma aleatoria. En cada posición se determinó el porcentaje de bifidobacterias contando todas las células con un juego de filtros DAPI (SP 100, Chroma Technology Corp., Brattleboro, U.S.A.) y contando todas las bifidobacterias usando un juego de filtros Cy3 41007, Chroma Technology, Brattleboro, U.S.A.).

*Análisis de ácidos grasos de cadena corta*

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), ácido acético, propiónico, n-butírico, iso-butírico y n-valérico fueron determinados cuantitativamente por un cromatógrafo de gas (GC) Varian 3800 (Varian Inc., Walnut Creek, U.S.A.) equipado con un detector de ionización de llamas. Se inyectaron 0,5 µl de la muestra a 80°C en la columna (Stabilwax, 15 x 0,53 mM, espesor de película 1,00 µM, Restek Co., U.S.A.) usando helio como gas de soporte (3,0 psi). Tras la inyección de la muestra, el horno fue calentado a 160°C a una velocidad de 16°C/min, seguido del calentamiento a 220°C a una velocidad de 20°C/min y finalmente fue mantenido a una temperatura de 220°C durante 1,5 minutos. La temperatura del inyector y detector era de 200°C. Se usó ácido 2-etilbutírico como estándar interno.

*Análisis del lactato*

Se descongelaron las heces homogenizadas en hielo y se centrifugaron durante 5 minutos a 14.000 rpm. Se calentaron 100 µl de sobrenadante durante 10 minutos a 100°C para inactivar todas las enzimas. Se determinó el lactato enzimáticamente, usando un kit de detección de ácido de L-Lactato con D- y L-lactato-deshidrogenasa (Boehringer



Mannheim, Mannheim, Alemania). Solo se determinó el lactato en aquellas muestras fecales que eran suficientemente grandes.

#### 5 *Análisis del pH*

Tras el almacenamiento a -20°C, se descongelaron muestras fecales y se midió directamente el pH en las heces a temperatura ambiente usando un medidor de pH Handylab (Scott Glas, Mainz, Alemania) equipado con un electrodo de pH Inlab 423 (Mettler-Toledo, Columbo, U.S.A.)

10

#### *Análisis de los datos*

15 Antes del estudio, los cálculos de potencia mostraron que para detectar una diferencia en el porcentaje de bifidobacterias entre el grupo de la fórmula de intervención y el grupo de fórmula estándar del 30% con un SD del 25%, deberían ser incluidos 13 bebés por grupo. Como se preveía un abandono del 30% en los grupos alimentados con fórmula, se incluyeron en el estudio más bebés de los calculados. Fue usado el paquete estadístico SPSS (versión 11/0) para el análisis estadístico de los resultados. En todos los valores fue controlada su normalidad por inspección visual de las parcelas de probabilidad normal. Las diferencias en el porcentaje de bifidobacterias, el pH, las cantidades relativas de SCFA y lactato entre los grupos fueron evaluadas en cuanto a su importancia usando el análisis de varianza. En caso de una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), los grupos fueron comparados usando el método Bonferroni *post hoc*. Dado que no es posible la asignación doble ciega de alimentación a pecho y con biberón y para asegurar una aleatoriedad adecuada, no fue realizado ningún análisis estadístico para comparar la alimentación a pecho con cualesquiera otros grupos alimentados con fórmula. Los datos del grupo alimentado a pecho sólo son dados cuando el bebé haya sido  
25 solamente alimentado a pecho en aquel punto en el tiempo.

#### 2.2 Resultados

30 En total, 120 (bebés por grupo fueron incluidos. 57 bebés comenzaron la alimentación con fórmula directamente después del nacimiento y fueron igualmente divididos entre los grupos de fórmula. De los 63 bebés que fueron alimentados a pecho directamente después del nacimiento, 24 se pasaron a la alimentación de fórmula antes la edad de 16 semanas y 5 bebés abandonaron. Las características de los sujetos de estudio están mostradas en la tabla 4. En los grupos alimentados con fórmula, 9 bebés abandonaron el estudio dentro de las 16 primeras semanas después del nacimiento (4 en el grupo SF, 5 en el grupo OSF. Las razones para el abandono incluyeron: cólicos, sospecha de alergia a la leche de vaca, estreñimiento y problemas prácticos.

35

TABLA 4

40

*Características de los objetos del estudio*

45

50

55

60

65

		Fórmula estándar, SF N=19	Fórmula prebiótica, OSF N=19	Leche materna, BF N=63
Sexo	Masculino	5	12	33
	Femenino	14	7	30
Lugar de nacimiento	En casa	7	8	40
	Hospital	12	11	23
Modo de parto	vaginal	14	16	59
	Cesárea	5	3	4
Peso al nacer		3600±501	3318±602	3651±601

*Bifidobacterias fecales*

Los porcentajes de bifidobacterias en las heces a la edad de 5 días, 10 días, 4, 8, 12, y 16 semanas de los grupos alimentados están mostrados en la tabla 5 y las cantidades en la tabla 5. El grupo OSF tiende a tener un % en bifidobacterias más elevado que el grupo SF a partir de las cuentas bacterianas totales de todas las edades, pero las diferencias no eran estadísticamente diferentes. De forma imprevista, el porcentaje de *Bifidobacteria* en los bebés alimentados a pecho era también relativamente bajo y estaba alineado con los grupos alimentados con fórmula. Los datos preliminares también muestran un aumento de *Lactobacilli* en el grupo BF y OSF, pero las cantidades de *Lactobacilli* en la flora fecal son al menos de un orden de magnitud inferior que las *Bifidobacteria*, el modelo global cambia muy poco.

*Resultados del pH*

Los valores de pH medidos en las heces de los bebés alimentados con fórmula están mostrados en la Tabla 6. El nivel mínimo de pH fue encontrado en bebés alimentados a pecho. El pH fecal de las heces de bebés alimentados con fórmula OSF era inferior que el del grupo SF ( $p < 0,045$  en todas las edades excepto el día 5).

*Resultados de los SCFA*

La cantidad total de SCFA en las heces está mostrada en la tabla 5 abajo.

El porcentaje de los diferentes SCFA a partir de los SCFA totales está mostrado en la Tabla 6. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la concentración total de SCFA entre los grupos alimentados con fórmula. También la cantidad de SCFA es comparable a la de los otros grupos de alimentación. No obstante, ya después de 10 días, las diferencias en los perfiles de SCFA pueden ser vistas entre los bebés alimentados por OSF o los bebés alimentados por OSF o leche materna en comparación con los bebés alimentados con fórmula estándar. Los bebés alimentados con fórmula conteniendo GOS y polifruktosa y alimentados con leche materna, tienen porcentajes más elevados de acetato y porcentajes inferiores de propionato, butirato, iC4-6 SCFA en comparación con los bebés alimentados con fórmula estándar.

*Resultados de lactato*

Las concentraciones de lactato (mmol/kg heces) de todos grupos están mostradas en la Tabla 6. Ya a la edad de 5 días, la fórmula OS (no firmada) y los grupos alimentados a pecho tienen cantidades más elevadas de lactato en comparación con el grupo de fórmula estándar. La cantidad relativa de lactato (como un porcentaje de la suma de SCFA y lactato) es máxima en bebés alimentados a pecho y mínima en bebés alimentados con fórmula estándar. Los bebés alimentados con una fórmula que contiene una cantidad intermedia relativa de TOS/inulina tienen una cantidad relativa de acetato. El porcentaje de lactato en bebés alimentados con OSF a las 16 semanas (con respecto a los ácidos totales) difiere significativamente de aquel de los bebés alimentados con SF.

(Tabla pasa a página siguiente)

# ES 2 314 826 T3

TABLA 5

*Concentración de lactato y cantidad total de SCFA (mM/kg heces) y de Bifidobacteria (\* 1,10<sup>13</sup>/kg heces) pH entre el nacimiento y las 16 semanas de edad. Media ± SEM. Salvo el pH, no se encontraron diferencias estadísticas*

		Lactato	SCFA	pH	Bifidobacteria
5 días	SF	13,5±7,7	54,7±12,6	5.93±0.15	0,58±0,49
	OSF	10,7±4,3	56,5±7,7	5.49±0.15	1,20±2,24
	BF	13,3±2,8	48,7±4,4	5.27±0.07	0,47±0,39
10 días	SF	4,6±3,0	62,0±7,9	6.88±0.15	0,96±0,83
	OSF	9,7±3,6	62,3±7,2	5.95±0.20	1,10±0,99
	BF	15,1±3,2	54,7±4,9	5.35±0.07	0,48±0,61
4 semanas	SF	2,6±1,4	68,3±10,3	6.77±0.21	0,97±0,96
	OSF	9,9±3,4	83,1±8,8	<u>5.88±0.18*</u>	1,20±0,55
	BF	22,8±4,4	59,8±4,8	5.45±0.12	0,56±0,64
8 semanas	SF	7,6±6,8	76,5±13,2	6.80±0.20	0,89±0,56
	OSF	24,4±5,3	76,0±8,4	<u>5.68±0.18*</u>	1,00±0,52
	BF	30,9±5,3	62,8±5,4	5.27±0.15	0,58±0,59
12 semanas	SF	14,1±9,4	73,9±11,9	6.88±0.20	0,91±0,80
	OSF	18,4±7,0	76,1±12,1	<u>5.60±0.18*</u>	1,30±0,99
	BF	42,1±7,1	60,4±4,9	5.29±0.17	1,40±1,38
16 semanas	SF	1,7±1,2	68,6±14,0	7.09±0.15	1,00±0,80
	OSF	18,5±5,7	67,7±11,7	<u>5.60±0.20*</u>	1,30±0,76
	BF	45,1±9,0	59,2±6,9	5.68±0.24	0,89±0,78

ES 2 314 826 T3

TABLA 6

*Cantidades relativas de SCFA (% de la cantidad total de SCFA, lactato (% de ácidos totales), % de Bifidobacteria entre el nacimiento y las 16 semanas de edad*

Día / semana		Acetato	Propionato	Butirato	Suma iC4-C5	% de Bifidobacteria	Lactato
5d	SF	84,3±3,4	12,9±3,2	1,7±0,5	1,1±0,4	45±3.6	13.8±18.5
	OSF	85,8±5,1	12,0±4,7	0,5±0,5	1,7±0,7	50±8.6	8.7±13.3
	BF	89,5±1,8	7,0±1,5	1,6±0,4	2,0±0,4	54±4.1	12.5±14.0
10d	SF	70,9±2,0	21,3±2,6	4,6±1,1	3,2±0,5	65±6.0	4.3±10.8
	OSF	84±2,4*	13,5±2,3	1,4±0,4*	1,1±0,4	61±6.3	8.2±9.8
	BF	89,3±1,9	5,8±1,3	2,3±0,3	2,6±0,4	42±4.1	13.4±13.8
4s	SF	71,8±2,8	17,8±3,3	5,0±1,1	5,5±2,6	52±5.4	6.9±16.4
	OSF	77,7±2,2	15,4±2,0	5,8±2,2	1,1±0,3	71±4.5	8.4±10.7
	BF	91,0±1,8	4,3±1,2	2,6±0,6	2,1±0,4	47±5.4	19.6±17.0
8s	SF	74,6±2,9	16,4±2,0	6,1±1,2	2,9±0,7	50±6.3	3.5±9.9
	OSF	83,5±2,7	11,4±2,1	3,7±1,2	1,4±0,4	64±4.1	17.7±15.2
	BF	91,2±1,6	5,4±1.4	1,9±0,5	1,6±0,3	41±4.5	21.7±13.4
12s	SF	73,9±2,9	17,8±3,3	5,0±1,1	3,2±0,5	56±5.4	5.4±11.9
	OSF	86,5±2,1	11,2±1,8	1,2±0,3*	1,0±0,4	60±5.0	13.6±13.2
	BF	86,1±3,3	7,5±2,2	3,0±0,7	3,5±0,8	59±4.5	30.2±16.3
16s	SF	69,9±3,9	19,6±2,7	5,6±0,9	4,9±0,8	52±6.3	0.6±0.9
	OSF	82,2±5,3	14,3±4,9	2,1±0,5*	1,5±0,4*	69±7.7	16.4±12.0*
	BF	89.7±2.7	6,4±2,1	1,6±0,4	2,2±0,5	47±6.3	35.6±20.4
<p>p&lt;0,05 en comparación con SF; SF= alimentados don fórmula estándar, OSF = SF suplementado con GO+inulina; BF= alimentados a pecho</p>							

Lo expuesto anteriormente demuestra que en las heces de bebés alimentados con esta combinación de GOS y polifruetosa baja el pH, que se forma más lactato, y que es formado un modelo de ácido (acetato y lactato) que se asemeja más al de los bebés alimentados a pecho y que este efecto no puede ser atribuido al aumento cuantitativo de *Bifidobacteria*.

Ejemplo 3

*Los efectos provechosos de lactato y mezcla de SCFA en la expresión de Muc-2, PGE1 y PGE2*

3.1 Material y métodos

El efecto de lactato y una mezcla SCFA fue analizado como se ha descrito en Willemsen, LEM, Koetsier MA, van Deventer SJH, van Tol EAF (2003), Gut 52:1442-1447, con las siguientes modificaciones: fue probado lactato y una mezcla de acetato/propionato/butirato 90/5/5. Para los experimentos de la producción de moco fue usado un

cocultivo de células CCD18 y T84, mientras que para los experimentos de producción de PGE1 y PGE2 fue usado un monocultivo de células CCD18.

### 5 3.2 Resultados

Los SCFA, en una mezcla de 90/5/5 (acetato/propionato/butirato), y la dosis de L-Lactato inducen dependientemente la expresión MUC-2 en un cocultivo de células CCD18 y T84, como se puede observar en la Figura 4A. También la concentración de PGE1 y PGE2 aumenta en las células CCD18, como se puede observar en la Figura 4B. A concentraciones más elevadas de ácidos orgánicos añadidos los aumentos alcanzan estadísticamente importancia.

#### Ejemplo 4

### 15 Efecto del lactato en contracción de colon

#### 4.1 Material y métodos

Las ratas alistar macho (CKP/Harlan, Wageningen/Horst, Holanda) fueron alojadas bajo condiciones de temperatura controlada y ciclo ligero y se les proporcionó libre acceso a alimentos granulados y agua. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de N<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub> e isoflurano, el abdomen fue abierto y el colon fue eliminado inmediatamente. El tejido fue colocado en el tampón de Krebs-Henseleit pH 7,4 (composición en mM: 118,0 NaCl, 4,75 KCl, 1,18 MgSO<sub>4</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa, 1,17 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 24,9 NaHCO<sub>3</sub>).

El colon fue cortado en una parte distal y una proximal y fue enjuagado con un tampón Krebs-Henseleit mientras el contenido fecal fue suavemente extraído. Para aproximarse a las condiciones *in vivo* tanto como fuera posible, se unieron longitudinalmente segmentos completamente intactos de 1 cm a un transductor de fuerza isométrica (F30 tipo 372, HSE, Alemania) en 20 ml de baños orgánicos con camisa de agua (Schuler, HSE, Alemania) (37°C) conteniendo un tampón de Krebs-Henseleit gasificado continuamente con el 95% de O<sub>2</sub>-5% de CO<sub>2</sub>. Los segmentos fueron extendidos gradualmente a una tensión de reposo de 1 g y se les permitió equilibrarse durante 45 minutos con lavados intermitentes. Las tensiones de los segmentos en reposo y en respuesta a los diferentes estímulos fueron amplificadas por un módulo amplificador transductor (HSE, Alemania) y registradas en un registrador de varios inscriptores (Rikadenki, HSE, Alemania).

Los segmentos fueron incubados con 40 mM de KCl durante 5 minutos y las respuestas contráctiles fueron medidas. El KCl fue enjuagado con tres lavados consecutivos a intervalos de 5 minutos. Los segmentos fueron luego incubados con concentraciones en aumento hasta 100 mM de acetato o sodio-L-lactato. Las soluciones ácidas fueron preparadas frescas en agua destilada. NaOH fue añadido al acetato para obtener un pH neutro. Al final de la incubación con un ácido graso fueron añadidos 40 mM de KCl, para determinar si la respuesta contráctil de KCl fue influida por el ácido graso. Antes de una incubación nueva a los segmentos se les permitió equilibrarse durante 45 minutos en un tampón fresco de Krebs-Henseleit con lavados intermitentes.

El protocolo experimental consistió en dos secciones proximales y distales del colon. Para el análisis de los datos (n=3), el nivel de contracción inducido por los estímulos fue definido como la tensión en g después de 5 minutos de incubación. Los datos obtenidos a partir de los segmentos idénticos (proximal o distal) fueron usados para calcular un valor medio y cada segmento servía como su propia muestra de control.

#### 4.2 Resultados

Como se puede observar en la Figura 5, acetato sódico y especialmente el sodio-L-lactato reducen la tensión de contracciones tónicas. Los efectos de relajación son más elevados en la parte distal del colon que en la parte proximal del colon.

También el número de contracciones espontáneas, las contracciones fásicas, disminuyen en la parte proximal del colon después de la adición de acetato sódico y sodio-L-lactato, mientras que no se han observado efectos en la parte distal del colon.

En la parte proximal del colon las contracciones tónicas como una respuesta a KCl, no obstante, son comparables en presencia o ausencia de 25 mM de acetato sódico o sodio L-lactato. A concentraciones más elevadas se observa una relajación significativa incluso después de la adición de KCl.

65

**Referencias citadas en la descripción**

Esta lista de referencias citada por el solicitante es sólo para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque las referencias han sido compiladas con gran cuidado, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP renuncia a toda responsabilidad en este respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- 10 • EP 1105002 A [0009]
- WO 2005039319 A [0010]
- WO 2005039597 A [0011]
- 15 • US 6569488 B [0057]
- US 5968365 A [0057]
- 20 • US 6559356 B [0057]

**Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción**

- 25 • **GIBSON ROBERFROID** *J. Nutr.*, 1995, vol. 125, 1401-1412 [0002]
- **JENKINS et al.** *J. Nutrition*, 1999, vol. 129, 1431S-1433S [0003]
- **ROBERFROID** *Am J Clin Nutr*, 2001, vol. 73, 406S-409S [0003]
- 30 • **HARMSSEN et al.** *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2000, vol. 30, 61-67 [0004]
- **BOEHM et al.** *Acta Paediatr.*, 2003, vol. 441, 64-67 [0004]
- 35 • **MORO et al.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002, vol. 34, 291-295 [0004]
- **BOEHM et al.** *Arch Dis Child*, 2002, vol. 86, F178-F181 [0004]
- **MORO et al.** *Acta Paediatr.*, 2003, vol. 441, 77-79 [0005]
- 40 • **MARINI et al.** *Acta Paediatr.*, 2003, vol. 441, 80-81 [0005]
- **BOEHM et al.** *Arch. Dis. Child Fetal. Neonata. Ed.*, 2002, vol. 86, F178-F181 [0005]
- 45 • **MORO et al.** *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2002, vol. 34, 291-295 [0005]
- **SCHMELZLE et al.** *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2003, vol. 36, 343-51 [0005]
- **WILLEMSSEN et al.** *Gut*, 2003, vol. 52, 1442-1447 [0012]
- 50 • **KAUR GUPTA** *J. Biosci.*, 2002, vol. 27, 703-714 [0058]
- **SAMBROOK RUSSELL** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press* 2001. vol. 1 and 2, [0074]
- 55 • **AUSUBEL et al.** *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA, 1994*, [0074]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences Mack Publishing Company 1985*. [0074]
- 60 • *Microbiology: A Laboratory Manual* [0074]
- **W. HARRIGAN** *Laboratory Methods in Food Microbiology Academic Press* [0074]
- **LANGENDIJK et al.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, 3069-3075 [0101] [0101]
- 65 • **WILLEMSSEN, LEM KOETSIER MA VAN DEVENTER SJH VAN TOL EAF** *Gut*, 2003, vol. 52, 1442-1447 [0112]

## ES 2 314 826 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de galacto-oligosacáridos y polifruetosa para la producción de una composición para el tratamiento o la prevención de alergia, eczema o enfermedades atópicas, donde el volumen de la composición administrada en una base diaria está en la gama de 100 a 1500 ml.
2. Uso según la reivindicación 1, donde la composición es para el tratamiento o la prevención de eccema o enfermedades atópicas.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1, donde la composición es para el tratamiento o la prevención de la alergia.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la cantidad de galacto-oligosacáridos: polifruetosa tiene una proporción de 3:97 a 97:3.
- 15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el galacto-oligosacárido es transgalacto-oligosacárido y/o la polifruetosa es inulina.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la polifruetosa es inulina con un grado promedio de polimerización de 20 o superior.
- 20 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la dosis diaria de galacto-oligosacáridos y polifruetosa varía de aproximadamente 1 a 30 g/día, preferiblemente de aproximadamente 2 a 10 g/día.
- 25 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición además comprende proteína, lípidos, e hidratos de carbono distintos de galacto-oligosacáridos y polifruetosa.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición es una composición de alimentos o una composición suplementaria de alimentos.
- 30 10. Uso según la reivindicación 9, donde la composición es un alimento para bebés.
11. Uso según la reivindicación 10, donde la composición es una fórmula para bebés o una fórmula de continuación.
- 35 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición comprende al menos 4 g/l de una mezcla de galacto-oligosacáridos y polifruetosa.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el volumen de la composición administrada en una base diaria está en la gama de aproximadamente de 450 a 1000 ml.
- 40 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las proteínas están extensamente hidrolizadas o parcialmente hidrolizadas.

45

50

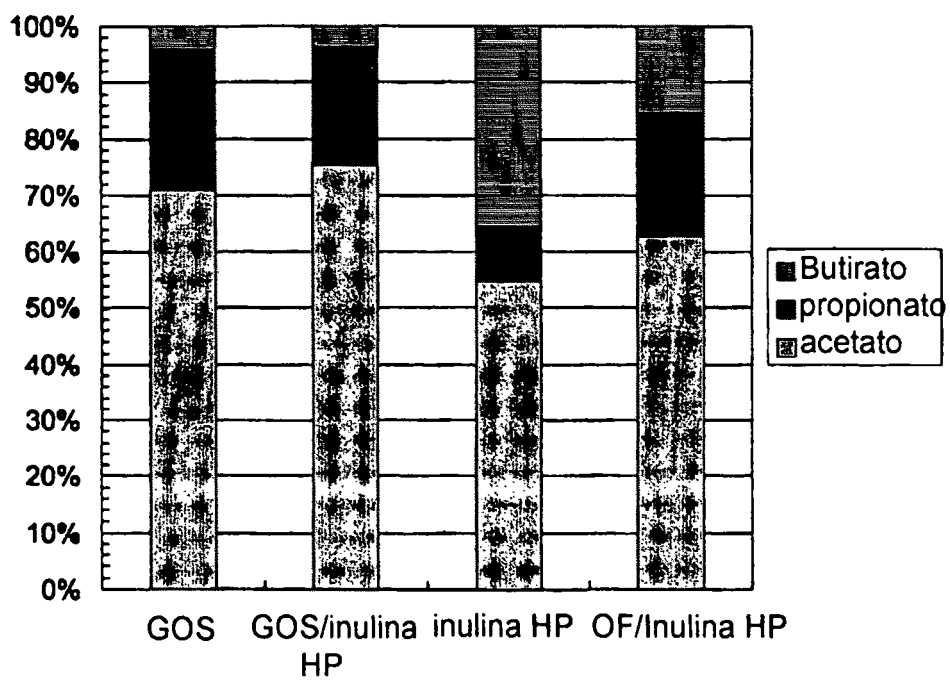
55

60

65

**Fig 1**

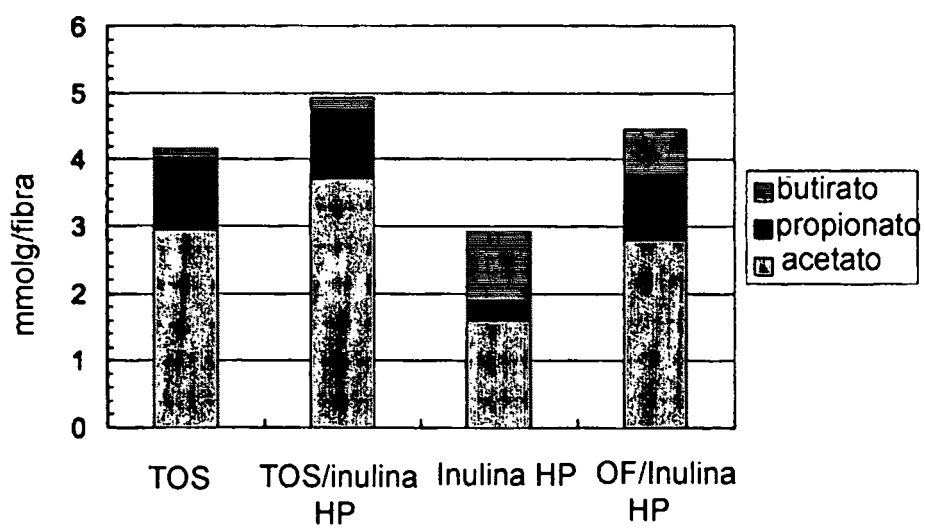
**Modelo de formación de SCFA**





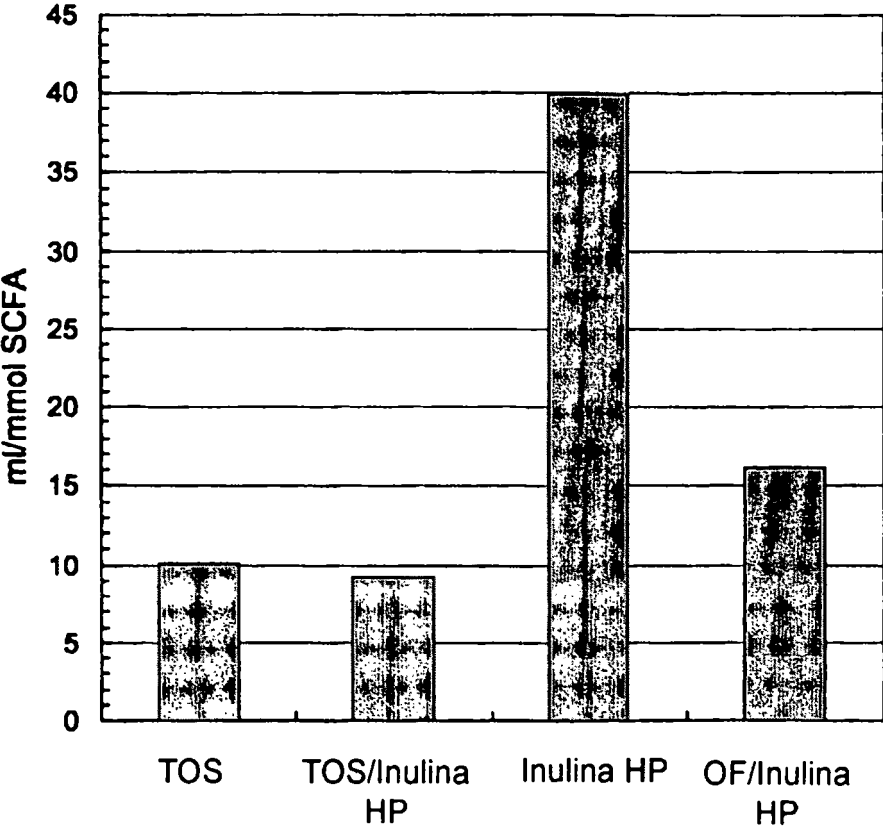
**Fig 2**

**Formación de SCFA**



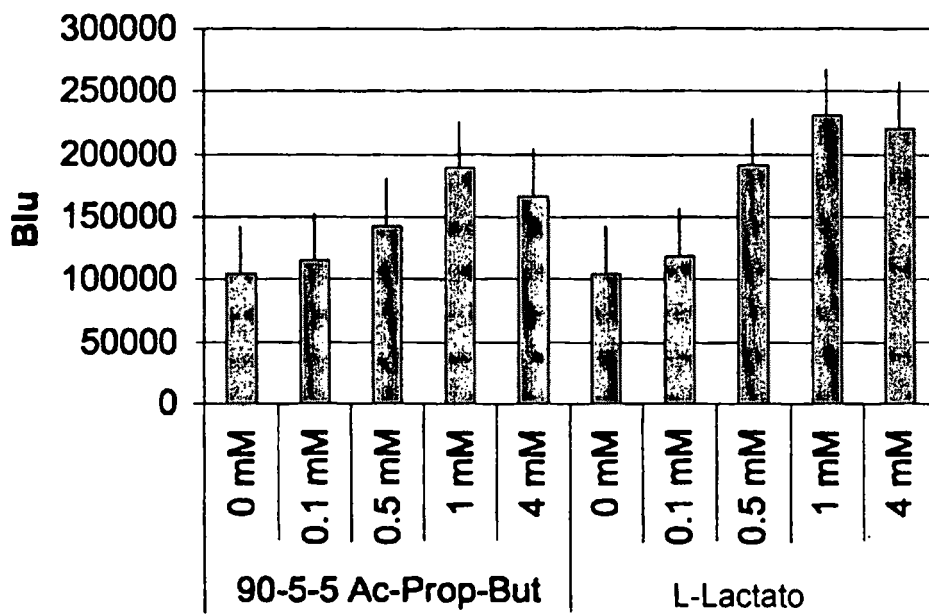
**Fig 3**

**Formación de gas**



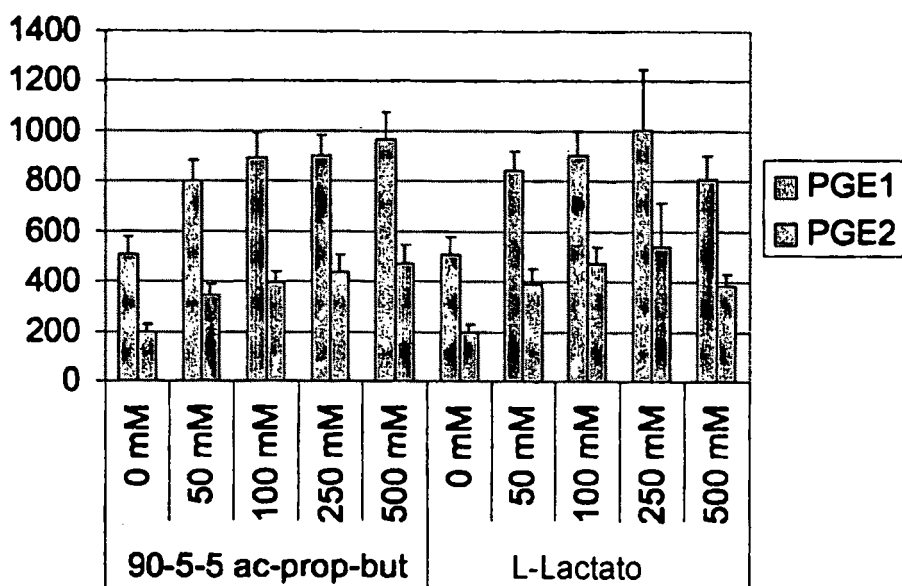
**Fig 4a**

**A: Expresión de moco**



**Fig 4b**

**B: Síntesis de prostaglandina**



**Fig 5**

Contracciones tónicas

