

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 971**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A23L 1/308 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06716673 .6**

96 Fecha de presentación: **28.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1855550**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

54 Título: **COMPOSICIÓN NUTRITIVA CON PROBIÓTICOS.**

30 Prioridad:
28.02.2005 EP 05075486

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.02.2012

73 Titular/es:
**N.V. NUTRICIA
EERSTE STATIONSSTRAAT 186
2712 HM ZOETERMEER, NL**

72 Inventor/es:
**SPEELMANS, Gelske;
KNOL, Jan;
HAARMAN, Monique;
GARSSEN, Johan;
VRIESEMA, Adrianus, Johannes, Maria y
ALLES, Martine, Sandra**

74 Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 373 971 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

Composición nutritiva con probióticos

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

5 [0001] La presente invención se refiere a composiciones nutritivas comprendiendo al menos dos sacáridos prebióticos no digeribles diferentes y al menos una bacteria probiótica.

La composición nutritiva es especialmente adecuada para alimentar a lactantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Los lactantes están desprovistos de flora intestinal al nacimiento.

10 Como resultado del contacto con la madre durante el nacimiento y la alimentación posterior con leche humana o leche de fórmula, la flora intestinal se desarrolla rápidamente.

Durante el desarrollo, la flora intestinal sigue siendo inmadura y su equilibrio es frágil.

Los lactantes alimentados con leche humana son menos afectados por infecciones o enfermedades que los alimentados con fórmula para lactantes.

15 Por lo tanto, los lactantes alimentados con leche humana tienen menos infecciones gastrointestinales en cuanto a incidencia y duración, menos enfermedades atópicas, como alergia, eczema, menos cólicos y calambres, y menos estreñimiento que los alimentados con fórmula para lactantes.

También afecciones que ocurren más tarde en la vida, como obesidad infantil, diabetes y asma, se relacionan con el tipo de alimentación durante las primeras etapas de la vida, con los lactantes alimentados con leche humana con ventaja.

20 [0003] Generalmente, la flora intestinal de lactantes alimentados con leche humana se compone principalmente por bifidobacterias y lactobacilos.

La leche humana contiene oligosacáridos de leche humana, que son un factor de crecimiento para bifidobacterias en el intestino de los lactantes.

La flora de lactantes alimentados con fórmula es más diversa y contiene en general más especies *Bacteroides*, *Clostridium* y *Enterobacteriaceae*.

25 Los lactantes alimentados con fórmula tienen sobre una décima parte a aproximadamente dos-tercios el número de bifidobacterias de los lactantes alimentados con leche humana.

Bifidobacterias y lactobacilos se consideran importantes en el mantenimiento de una microbiota intestinal bien equilibrada y se ha postulado que bifidobacterias y lactobacilos tienen diferentes efectos en la promoción de la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de diarrea e infecciones intestinales.

30 Además, bifidobacterias y lactobacilos han mostrado jugar un papel en el sistema inmunológico del huésped.

[0004] El método hasta la fecha era para promover bifidobacterias en general, es decir, en el nivel de género.

El género bifidobacteria consiste en muchas especies diferentes, que difieren en el metabolismo, actividad enzimática, utilización oligo y polisacárida, composición de la pared celular e interacción con el sistema inmunológico del huésped.

Por lo tanto, no toda especie de bifidobacteria tiene el mismo efecto funcional en el lactante.

35 *B. adolescentis* es más predominante en la flora de adultos y lactantes alérgicos, y es menos común en heces de lactantes saludables.

B. animalis / *B. lactis* no es de origen natural en seres humanos.

En lactantes saludables, la flora de bifidobacterias está compuesta principalmente por *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum*.

40 Es el objetivo de la presente invención conseguir una flora en lactantes alimentados con fórmula que recuerda a la flora de lactantes alimentados con leche humana a nivel de especies de bifidobacteria.

La EP1145002 describe el uso de dos carbohidratos diferentes no digeribles para mejorar la flora intestinal.

Los carbohidratos pueden comprender especialmente galacto-oligosacáridos y fructo-polisacáridos.

[0005] Moro et al. en el *J Pediatr Gast Nutr*, 2002, vol 34, p 291-295 divulga un intento para proporcionar una flora intestinal en lactantes alimentados con biberón.

Este se consigue por la inclusión de una combinación 90/10 de galactooligosacáridos y fructooligosacáridos.

[0006] La EP 1 481 682 divulga composiciones que son beneficiosas para el tracto digestivo, comprendiendo probióticos y fructooligosacáridos obtenidos a partir de inulina.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 [0007] Los presentes inventores han descubierto que la alimentación de un lactante humano con una combinación de diferentes sacáridos no digeribles aumenta el nivel de bifidobacterias en heces y regula la población de bifidobacterias en el tracto intestinal a nivel de especie a un nivel que es similar a los niveles observados en los lactantes alimentados con leche humana, es decir, bajo en *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, y *B. adolescentis*.

10 No obstante, la concentración de *Bifidobacterium breve* (*B. Breve*) resultó ser relativamente baja en los lactantes alimentados con leche humana.

[0008] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición comprendiendo sacárido no digerible A y sacárido no digerible B y *B. breve*.

Esta composición puede usarse ventajosamente para igualar la distribución de especies de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal de un lactante alimentado con fórmula.

15 [0009] En otro aspecto, también se descubrió que la alimentación con fórmula para lactantes con una combinación de diferentes sacáridos no digeribles aumenta el nivel de lactobacilos en heces y regula la población de lactobacilos en el tracto intestinal a nivel de especie a un nivel que es similar a los niveles observados en los lactantes alimentados con leche humana.

20 No obstante, la concentración de *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) resultó ser relativamente baja en los lactantes alimentados con leche humana.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona una composición comprendiendo *B. breve* y *L. paracasei*, preferiblemente combinadas con sacárido no digerible A y sacárido no digerible B. Se descubrió que las poblaciones de estas bacterias se subdesarrollan en el tracto gastrointestinal de lactantes que recibían fórmula para lactantes.

25 Por lo tanto, esta combinación de bacterias probióticas puede ser usada ventajosamente para la alimentación de lactantes y simulan la flora intestinal de un lactante alimentado con leche humana.

LEYENDA DE LA FIGURA

30 [0010] Figura 1: Gráfico de hipersensibilidad de vía respiratoria como PenH relativo (pausa mejorada) frente a la concentración de metacolina en ratones que recibieron una combinación de *B. breve*, transgalacto-oligosacáridos y fructopolisacáridos; y un grupo de control de ratones que recibieron solución salina.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0011] La presente invención proporciona una composición con una viscosidad entre 1 y 6 mPa·s, una densidad calórica entre 10 y 250 kcal por 100 ml, comprendiendo *Bifidobacterium breve*, un sacárido no digerible A y un sacárido no digerible B, en la que:

35 a. sacárido no digerible A tiene un grado de polimerización entre 2 y 200 y al menos 60 % mol de las unidades totales monosacáridas del sacárido A son monosacáridos seleccionados de galactosa, fructosa y monosacáridos de glucosa; y

40 b. sacárido no digerible B tiene un grado de polimerización entre 2 y 200 y al menos 60 % mol de las unidades totales monosacáridas de sacárido B son monosacáridos seleccionados de galactosa, fructosa y monosacáridos de glucosa; y donde

i) el porcentaje de al menos un monosacárido seleccionado del grupo consistente en glucosa, fructosa y galactosa en el sacárido A es al menos 40 % mol superior al porcentaje del mismo monosacárido en el sacárido B; y/o

45 ii) el porcentaje de al menos un enlace glicosídico de sacárido A basado en enlaces glicosídicos totales de sacárido A es al menos 40% superior al porcentaje del mismo enlace glicosídico en el sacárido B; y/o

iii) el grado de polimerización del sacárido A es al menos 5 unidades monosacáridas menor que el grado de polimerización del sacárido B.

[0012] En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición comprendiendo de 5 a 16 % en. de proteína, de 30 a 60 % en. de grasa y de 25 a 75 % en. de carbohidratos comprendiendo *Bifidobacterium breve* y *Lactobacillus paracasei*.

5 [0013] En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de la presente composición para la producción de una composición para la normalización de la bifidobacteria y/o población de especies de *Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal de lactantes alimentados con leche no humana o parcialmente humana a la bifidobacteria y/o población de especies de *Lactobacillus* de lactantes alimentados con leche humana.

10 [0014] En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de la presente composición para la producción de una composición para la prevención y/o el tratamiento de un trastorno gastrointestinal, trastorno inmunológico y/o trastorno endocrino, preferiblemente alergia a la leche vaca y/o infección.

Viscosidad

[0015] La presente composición tiene una viscosidad entre 1 y 6 mPa.s.

La baja viscosidad asegura una administración apropiada del líquido, por ejemplo, un paso apropiado a través del agujero de una boquilla.

15 También esta viscosidad se asemeja cercanamente a la viscosidad de la leche humana.

Además, una baja viscosidad produce un vaciado gástrico normal y un mejor aporte de energía, que es esencial para lactantes que necesitan la energía para un crecimiento y desarrollo óptimos.

La presente composición se prepara preferiblemente por adición de una composición en polvo con agua.

Normalmente, la fórmula para lactantes se prepara de esa manera.

20 La presente invención además también se refiere a una composición en polvo empaquetada, donde dicho embalaje dispone de las instrucciones para mezclar el polvo con una cantidad adecuada de líquido, dando así como resultado una composición líquida con una viscosidad entre 1 y 6 mPa.s.

[0016] La viscosidad del líquidos se determina usando un reómetro Physica Rheometer MCR 300 (Physica Messtechnik GmbH, Ostfilden, Alemania) a velocidad de cizallamiento de 95 s^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

25 **Bifidobacterium breve**

[0017] *Bifidobacterium breve* es una con bacteria gram-positiva anaeróbica ramificada con forma de barra.

La presente *B. breve* tiene preferiblemente al menos 95 % de identidad de la secuencia ARNr 16 S cuando se compara con el tipo de cepa de *B. breve* ATCC. 15700, más preferiblemente al menos 97% de identidad (Stackebrandt & Goebel, 1994, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846-849).

30 La bifidobacteria usada en la presente invención hibrida preferiblemente con la sonda de *B. breve* y da una señal con el método de ensayo de nucleasa 5' como se describe más adelante en este documento.

[0018] Cepas preferidas de *B. breve* son aquellas aisladas de las heces de lactantes saludables alimentados con leche humana.

35 Típicamente, estas están disponibles comercialmente de productores de bacterias de ácido láctico, pero pueden también aislarse directamente de heces, identificarse, caracterizarse y producirse.

Según una forma de realización preferida, la presente composición contiene al menos una *B. breve* seleccionada del grupo consistente en *B. breve* Bb-03 (Rhodia), *B. breve* M-16V (Morinaga), *B. breve* R0070 (instituto Rosell, Lallemand), DSM 20091, y LMG 11613.

Más preferiblemente, la *B. breve* es *B. breve* M-16V (Morinaga).

40 [0019] La presente composición contiene preferiblemente de 10^2 a 10^{13} unidades formadoras de colonias (CFU) *B. breve* por gramo de peso en seco de la presente composición, preferiblemente de 10^4 a 10^{12} , más preferiblemente de 10^5 a 10^{10} , de forma más preferida de 10^5 a 1×10^9 CFU *B. breve* por gramo de peso en seco de la presente composición.

45 [0020] Preferiblemente, la presente composición contiene de 10^4 a 10^{12} , más preferiblemente de 10^5 a 10^8 , de forma más preferida de 10^7 a 5×10^{10} unidades formadoras de colonias (CFU) *B. breve* por g del total de sacárido de A y B.

[0021] La dosis de *B. breve* según la presente invención se administra preferiblemente a una dosis diaria de 10^2 a 10^{13} , más preferiblemente de 10^5 a 10^8 , de forma más preferida de 10^8 a 5×10^{10} unidades formadoras de colonias (CFU).

Sacáridos no digeribles

[0022] La presente invención proporciona una composición que comprende sacárido no digerible A y sacárido no digerible B, de ahora en adelante sacárido A y sacárido B, respectivamente.

5 Sacárido A y sacárido B son sacáridos diferentes y tienen enlaces glicosídicos diferentes y/o grado de polimerización y/o composición monosacárida.

[0023] Además de los monosacáridos de galactosa, fructosa y glucosa, los sacáridos A y B puede contener otras unidades monosacáridas, como arabinosa, xilosa y manosa, hasta un total de 40%.

10 Se prefiere, no obstante, que al menos 75%, más preferiblemente al menos 90%, o incluso al menos 98 % mol de las unidades totales monosacáridas de sacárido de A y/o B sean monosacáridos seleccionados de monosacáridos de galactosa, fructosa y glucosa.

Se prefiere que la cantidad relativa de glucosa α -enlazada esté por debajo de 30%, especialmente por debajo de 15%.

[0024] El término sacárido A, como se usa en la presente invención, preferiblemente se refiere a una mezcla de sacáridos no digeribles.

15 El término sacárido B, como se usa en la presente invención, preferiblemente se refiere a una mezcla de sacáridos no digeribles.

Es una práctica común, debido a que el uso de sacáridos con, por ejemplo, una cadena larga es muy caro.

Preferiblemente y comúnmente, los elementos de esta mezcla difieren el uno del otro sólo en el número del monosacárido predominante.

20 Cuando el sacárido A y/o B son mezclas de sacárido, los promedios de los parámetros respectivos se usan para definir la presente invención.

Por ejemplo, si sacárido A es una mezcla de sacáridos individuales de 25 % en peso de Glu-Gal-Gal-Gal, 25 % en peso de Glu-Gal-Gal y 50 % en peso de Gal-Gal, la composición monosacárida media es de 85,4% de Gal y 14,6 % de Glu.

El grado medio de polimerización (DP) es 2,75.

25 [0025] El término sacárido no digerible se refiere a sacáridos que se mantienen sin digerir en el tracto gastrointestinal y alcanzan el intestino grueso no-absorbidos, es decir, sacáridos que no se digieren en el tracto superior intestinal de un humano, preferiblemente un lactante humano, por ejemplo, no digerido por los ácidos o enzimas presentes en el tracto intestinal humano.

Debe tenerse en cuenta, que sacáridos digeribles no son parte de los sacáridos A y B. Así, por ejemplo, glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa, lactosa, maltosa y las maltodextrinas se consideran que son digeribles.

30 [0026] Preferiblemente sacárido A y B son hidrosolubles.

Los sacáridos hidrosolubles son al menos 50% hidrosolubles, según un método descrito por L. Prosky et al, *J. Assoc. Anal. Chem* 71: 1017-1023, 1988.

[0027] En una forma de realización preferida, al menos 80 % en peso de sacárido no digerible A y B es fermentable.

35 El término "fermentable", como se utiliza en este caso, se refiere a la capacidad para sufrir descomposición por microorganismos en la parte inferior del tracto gastrointestinal (p. ej. colon) para moléculas más pequeñas, en particular, ácidos grasos de cadena corta y lactato.

La fermentabilidad de sacárido no digerible A y B se determina preferiblemente por el método descrito en *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 1418-1424 (1991).

40 En una forma de realización más preferida, al menos 80 % en peso de sacárido no digerible A y B son prebióticos. "Prebióticos" se definen como ingredientes de alimentos no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o más especies bacterianas en el colon y, así, beneficiosamente afectan el huésped (Gibson y Roberfroid, *J. Nutr.* 125: 1401-1412(1995)).

Composición monosacárida

45 [0028] Al menos 60 % mol, preferiblemente al menos 75 % mol, más preferiblemente al menos 90 mol, de forma más preferida al menos 98 % mol, de las unidades monosacáridas totales de sacárido de A y B son monosacáridos seleccionados de monosacáridos de galactosa (gal), fructosa (fru) y glucosa (glu).

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el porcentaje de al menos un monosacárido seleccionado del grupo consistente en glucosa, fructosa y galactosa en el sacárido A es al menos 40 % mol superior al porcentaje del mismo monosacárido en el sacárido B, preferiblemente al menos 50 % mol, más preferiblemente al menos 75 % mol, incluso más preferiblemente al menos 90 % mol.

5 Una mayor diversidad de monosacáridos estimula una población más amplia de bacterias intestinales provechosas.

[0029] Preferiblemente al menos 50 % en peso, preferiblemente al menos 75 % en peso del peso acumulativo de sacárido de A y B son sacáridos no digeribles con un DP de 2-8.

Usando una mezcla con un alto porcentaje de peso de sacáridos pequeños, la fermentabilidad y el efecto de estimulación en el crecimiento de las bacterias del ácido láctico y bifidobacterias aumentarán.

10 [0030] El porcentaje de un monosacárido en el sacárido puede ser calculado simplemente dividiendo la cantidad de la unidad monosacárida respectiva (p. ej. glucosa) en el sacárido por la cantidad total de las unidades monosacáridas en ese sacárido y multiplicándolo por 100.

Cuando el sacárido es una mezcla de sacárido, la aportación de cada sacárido individual en la mezcla de sacárido debe ser tomado en la cuenta.

15 El porcentaje de una mezcla de sacárido puede determinarse simplemente hidrolizando completamente la mezcla y determinando el porcentaje molar para cada monosacárido.

[0031] Preferiblemente el sacárido A contiene al menos 40 % mol galactosa, más preferiblemente al menos 67 % mol galactosa, más preferiblemente al menos 75 % mol galactosa.

20 Preferiblemente el sacárido B contiene al menos 30 % mol fructosa, más preferiblemente al menos 67 % mol fructosa, incluso más preferiblemente al menos 75 fructosa % en peso.

[0032] Por ejemplo, en el caso en el que sacárido A es una mezcla de glu-(gal)_{n=2-7} con una composición monosacárida media de 20 % mol glucosa y 80 % mol galactosa y sacárido B es una mezcla de glu-(fru)_{n=2-7} y (fru)_{n=2-7} con una composición media monosacárida de 10 % mol glucosa y 90 % mol fructosa, la diferencia en a) glucosa es 10 % mol;

25 b) fructosa es 90 % mol; y c) galactosa 80 % mol.

En este ejemplo, la galactosa cumple el criterio de que el porcentaje de al menos un monosacárido seleccionado del grupo consistente en glucosa, fructosa y galactosa en el sacárido A es al menos 40 % mol mayor que el porcentaje del mismo monosacárido en el sacárido B.

Grado de polimerización

30 [0033] Sacárido A y B tienen un grado de polimerización (DP) entre 2 y 200.

Preferiblemente al menos 80 % en peso, más preferiblemente al menos 95 % en peso, de forma más preferida al menos 98 % en peso del peso acumulativo de sacárido de A y B tiene un grado de polimerización (DP) por debajo de 100, más preferiblemente por debajo de 60, de forma más preferible por debajo de 40.

El DP inferior reduce ventajosamente la viscosidad y aumenta la fermentabilidad de los sacáridos no digeribles.

35 Preferiblemente al menos 50 % en peso, preferiblemente al menos 75 % en peso de sacárido A no son sacáridos digeribles con un DP de 2-8.

Usando una mezcla con un alto porcentaje de peso de sacáridos pequeños, la fermentabilidad y el efecto de estimulación en el crecimiento de las bacterias del ácido láctico y bifidobacterias aumentará.

40 [0034] Según una forma de realización preferida de la presente invención, el DP de sacárido A es al menos 5 unidades monosacáridas inferior al grado de polimerización de sacárido B, preferiblemente al menos 10, incluso más preferiblemente al menos 15.

La incorporación de un sacárido con un grado aumentado de polimerización reduce la carga osmótica, lo que es ventajoso para la nutrición de un lactante y mejora la estimulación prebiótica de la flora intestinal también a partes más distales del colon.

45 [0035] Preferiblemente, el sacárido A tiene un DP de 2-15, más preferiblemente 2-8.

Preferiblemente el sacárido B tiene DP de 8-100.

Los sacáridos A y B con un DP diferente pueden tener una composición monosacárida igual o ligeramente diferente.

Cuando los sacáridos A y B tienen diferente DP y composición monosacárida similar, entonces la diferencia en DP medio entre sacárido A y sacárido B es preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10, incluso más preferiblemente al menos 15.

Preferiblemente, sacárido A y B tienen una composición monosacárida diferente (ver arriba) y un DP diferente.

- 5 [0036] Por ejemplo, si el sacárido A es una mezcla de glu-fru_{m=2-7} y fru_{m=2-6} con un DP medio de 4,5 unidades monosacáridas y sacárido B es glurfru_{n=12-100} con un DP medio de 25 unidades monosacáridas; entonces la diferencia en la media de DP es (25-4,5 =) 20,5.

Enlace glicosídico

- 10 [0037] En una forma de realización preferida de la presente invención, el porcentaje de al menos un enlace glicosídico de sacárido A basado en enlaces glicosídicos totales de sacárido A es al menos un 40% mayor al porcentaje del mismo enlace glicosídico en el sacárido B, preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 75%.

El término "enlace glicosídico", como se usa en la presente invención, se refiere a un enlace C-O-C formado entre los anillos de dos monosacáridos cíclicos por eliminación de agua.

Una mayor diversidad en enlaces glicosídicos estimula una gama más amplia de bacterias provechosas.

- 15 [0038] Los enlaces glicosídicos difieren en que ellos unen de manera covalente átomos de carbono en las unidades monosacáridas en posiciones numeradas diferentes, y/o ellos forman enlaces α o β .

Ejemplos de distintos enlaces glicosídicos que ocurren en sacáridos no digeribles son enlace $\beta(1,3)$, $\alpha(1,4)$, $\beta(2,1)$, $\alpha(1,2)$, y $\beta(1,4)$.

- 20 [0039] Preferiblemente los enlaces glicosídicos en el sacárido A comprenden al menos 40% $\beta(1,4)$ y / o $\beta(1,6)$ enlaces glicosídicos, más preferiblemente al menos 75%.

Los enlaces glicosídicos en el sacárido B preferiblemente comprenden al menos 40% $\beta(2,1)$ enlaces glicosídicos, más preferiblemente al menos 75%.

Combinación

- 25 [0040] En una forma de realización particularmente preferida, los presentes sacárido A y B difieren en al menos dos aspectos seleccionados del grupo de enlace glicosídico, grado de polimerización y composición monosacárida.

Preferiblemente, los presentes sacáridos A y B difieren en el grado de polimerización y en al menos un aspecto seleccionado del grupo de enlace glicosídico y composición monosacárida.

Más preferiblemente, los presentes sacárido A y B difieren en el grado de polimerización y en la composición monosacárida.

- 30 De forma más preferida, los tres aspectos son diferentes.

La administración de mezclas de sacáridos de diferente tamaño, diferentes "clases" y/o "estructuras" sinérgicamente estimula la flora intestinal, que ventajosamente influencia la salud.

Concentración de sacárido A y B

- 35 [0041] La presente composición preferiblemente comprende al menos 5 mg de sacárido A por 100 ml, preferiblemente al menos 50 mg de sacárido A por 100 ml, incluso más preferiblemente al menos 0,1 g de sacárido A por 100 ml, de forma más preferida al menos 0,5 g de sacárido A por 100 ml.

Preferiblemente la presente composición no contiene más de 10 g de sacárido A por 100 ml, preferiblemente no más de 2,0 g por 100 ml.

- 40 La presente composición preferiblemente comprende al menos 5 mg de sacárido B por 100 ml, preferiblemente al menos 10 mg de sacárido B por 100 ml, incluso más preferiblemente al menos 25 mg de sacárido B por 100 ml, de forma más preferida al menos 50 mg de sacárido B por 100 ml.

Preferiblemente la presente composición no contiene más de 10 g de sacárido B por 100 ml, preferiblemente no más de 1 g de por 100 ml.

- 45 [0042] La proporción de peso entre sacárido A y sacárido B es preferiblemente entre 0,01 y 100, más preferiblemente entre 0,5 y 100, incluso más preferiblemente entre 4 y 100, de forma más preferida entre 24 y 99.

Una alta proporción de peso es particularmente ventajosa cuando el sacárido A tiene un DP bajo y el sacárido B tiene un DP relativamente alto.

Asegura un equilibrio óptimo entre osmolalidad y fermentabilidad.

[0043] Sacárido A y sacárido B comprenden preferiblemente entre 5 y 100 % en peso basado en el peso total de los sacáridos no digeribles en la presente composición, más preferiblemente de 50 a 100 % en peso.

5 [0044] Sacáridos no digeribles A y B según la presente invención se administran preferiblemente en una dosis diaria de 0,1 a 30 g (peso del sacárido A + peso del sacárido B), más preferiblemente de 0,5 a 15 g, más preferiblemente de 3 a 10 g.

Sacáridos preferidos

[0045] Sacárido no digerible A es preferiblemente un sacárido seleccionado de β -galactooligosacáridos, α -galactooligosacáridos y (arabino-)galactanos.

10 Según una forma de realización más preferida, sacárido A es β -galactooligosacárido, más preferiblemente trans-galactooligosacárido (TOS).

Preferiblemente sacárido A comprende β -galactooligosacáridos con enlaces glicosídicos β (1,4) y/o β (1,6) y una glucosa terminal.

15 TOS está, por ejemplo, disponible comercialmente bajo el nombre comercial Vivinal®GOS (Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Países Bajos).

[0046] Sacárido no digerible B es preferiblemente un sacárido seleccionado de fructopolisacáridos y fructooligosacáridos.

20 Los términos fructopolisacáridos, polifruktosa, polifruktano y fruktano se usan aquí de forma intercambiable y se refieren a polisacáridos comprendiendo unidades de fruktosa β -enlazado, que se unen preferiblemente por enlaces glicosídicos β (2,1) y/o β (2,6).

Preferiblemente, el fructopolisacárido contiene un terminal β (2,1) glucosa glicosídicamente enlazada.

Preferiblemente, el fructopolisacárido contiene al menos 7 unidades de fruktosa β -enlazado.

En otra forma de realización preferida, inulina se usa como sacárido B. La inulina es un tipo de fructopolisacárido en el que al menos 75% de los enlaces glicosídicos son enlaces β (2,1).

25 Típicamente, la inulina tiene una longitud de cadena media de entre 8 y 60 unidades monosacáridas.

Fructopolisacárido adecuado para el uso en las composiciones está disponible comercialmente bajo el nombre comercial, por ejemplo, Raftiline®HP (Orafti).

[0047] En un otra forma de realización preferida, el sacárido B es un fructooligosacárido.

30 Un fructooligosacárido es un sacárido comprendiendo unidades de fruktosa β -enlazado, que se une preferiblemente por enlaces glicosídicos β (2,1) y/o β (2,6).

El fructooligosacárido contiene preferiblemente una β (2,1) glucosa glicosídica unida al extremo reductor.

Preferiblemente, el fructooligosacárido contiene de 2 a 6 unidades de fruktosa β -enlazado .

Una fuente adecuada de fructooligosacárido es Raftilose® (Orafti), o Actilight (Beghin-Meiji).

Lactobacillus paracasei

35 [0048] En una forma de realización preferida, la presente composición comprende *Lactobacillus paracasei*.

Esta bacteria se ha encontrado que está presente en cantidades limitadas en lactantes alimentados con leche no humana.

40 Por consiguiente, la administración de una composición comprendiendo sacárido no digerible A, sacárido no digerible B, *B. breve*, y *L. paracasei* permite la normalización de bifidobacterias a nivel de especie, pero también permite la normalización de la población de especies de *Lactobacillus* a un nivel equivalente del presente en el tracto gastrointestinal de lactantes alimentados con leche humana.

Esto es importante, ya que especies *Lactobacillus* diferentes ejercen efectos diferentes en el huésped.

Por ejemplo, *L. delbrueckii* forma D-lactato que puede provocar acidosis en lactantes prematuros, mientras que *L. paracasei* forma L-lactato.

[0049] Preferiblemente la presente cepa de *Lactobacillus* tiene al menos 95, más preferiblemente al menos 97 % de identidad de la secuencia de ARNr 16S cuando se compara con el tipo de cepa de *L. paracasei* ATCC 25032 (Stackebrandt & Goebel, 1994, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846-849).

5 El *Lactobacillus* usado en la presente invención híbrida preferiblemente con la sonda de *L. paracasei* y da una señal con el método de ensayo de nucleasa 5' como se describe más adelante en este documento.

[0050] Las cepas de *L. paracasei* preferidas son aquellas aisladas de las heces de lactantes saludables alimentados con leche humana.

Diferentes cepas de *L. paracasei* están disponibles comercialmente de productores de bacterias de ácido láctico, pero también pueden aislarse directamente de heces, identificarse, caracterizarse y producirse.

10 Según una forma de realización preferida, la presente composición contiene al menos *L. paracasei* seleccionada del grupo consistente en *L. paracasei* F19 (Arla, Suecia), *L. paracasei* LAFTI L26 (DSM Food Specialties, Países Bajos) y *L. paracasei* CRL 431 (Chr. Hansen, Dinamarca), LMG 12165 y LMG 11407.

15 [0051] La presente composición contiene preferiblemente de 10^2 a 10^{13} unidades formadoras de colonias (CFU) de *L. paracasei* por gramo de peso en seco de la presente composición, preferiblemente de 10^4 a 10^{12} , más preferiblemente de 10^5 a 10^{10} , de forma más preferible de 10^5 a 1×10^9 CFU *L. paracasei* por gramo de peso en seco de la composición.

[0052] Preferiblemente, la presente composición contiene de 10^4 a 10^{12} , más preferiblemente de 10^5 a 10^{11} , de forma más preferida de 10^7 a 5×10^{10} unidades formadoras de colonias (CFU) *L. paracasei* por g del total de los sacáridos A y B.

20 [0053] La dosis de *L. paracasei* según la presente invención se administra preferiblemente en una dosis diaria de 10^2 a 10^{13} , más preferiblemente de 10^5 a 10^{11} , de forma más preferida de 10^8 a 5×10^{10} unidades formadoras de colonias (CFU).

Combióticos

25 [0054] En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona una composición comprendiendo de 5 a 16 % en. de proteína, de 30 a 60 % en. de grasa, y de 25 a 75 % en. de carbohidratos comprendiendo *Bifidobacterium breve* y *Lactobacillus paracasei*.

La administración de la combinación de estas bacterias se cree que estimula la salud gastrointestinal del lactante.

Las características composicionales preferidas, tipos de bacterias e indicaciones médicas como se describe en este documento para la composición con sacárido A y B y *B. breve* se aplican igualmente a la composición con *B. breve* y *L. paracasei*.

30 Sacárido A y/o sacárido B, como se describe en este caso, pueden combinarse ventajosamente con *B. breve* y *L. paracasei*.

Cuando *L. paracasei* está presente en la composición de la invención, un único tipo de sacárido no digerible puede bastar para obtener del efecto deseado.

35 Por otro lado, cuando *L. paracasei* no está presente, la invención tiene que ver particularmente con composiciones con sacáridos A y B en una proporción de peso entre 95:5 y 99:1.

[0055] Otros microorganismos además de *B. breve* y/o *L. paracasei* pueden estar presentes también, aunque ninguna otra mejora sustancial se obtendrá.

Estos otros microorganismos pueden comprender otras especies de bifidobacteria u otras especies de *Lactobacillus* o incluso otras bacterias de ácido láctico.

40 Bifidobacterias preferidas son *B. longum* y/o *B. infantis*.

Lactobacilos preferidos son *L. casei* y/o *L. acidophilus*.

Macronutrientes

[0056] La presente composición contiene preferiblemente grasa, carbohidrato y proteína.

45 [0057] Preferiblemente la presente composición contiene un carbohidrato digerible seleccionado del grupo consistente en maltodextrina, almidón, lactosa, maltosa, glucosa, fructosa y sacarosa.

Preferiblemente la presente composición contiene lactosa.

Preferiblemente al menos 35 % en peso, más preferiblemente al menos 50 % en peso, de forma más preferida al menos 75 % en peso del carbohidrato digerible es lactosa.

Cuando está en forma líquida, la presente composición comprende preferiblemente de 6 a 19 g de carbohidratos digeribles por 100 ml, más preferiblemente de 6 a 10 g por 100 ml.

5 [0058] Preferiblemente de 10% a 80% del contenido energético total de la presente composición es proporcionado por carbohidrato digerible.

Más preferiblemente, la presente composición contiene 25 a 75 % cn. de carbohidrato.

% en. es la forma abreviada del porcentaje de energía y representa la cantidad relativa de cada constituyente que contribuye al valor calórico total de la preparación.

10 El valor calórico está proporcionado por carbohidratos digeribles, proteína y grasa.

[0059] Ingredientes típicos para uso como una fuente lípida incluyen grasa animal, grasa vegetal y aceite de fermentación microbiana.

La grasa es una fuente de energía importante y de importancia máxima para un desarrollo apropiado de un lactante.

15 La presente invención contiene preferiblemente ácido linoléico (LA; un ácido graso de omega 6) y ácido α -linoléico (ALA; un ácido graso de omega 3).

La composición preferiblemente comprende de 0,3 a 1,5 g de LA por 100 ml y de 0,05 a 5 g de ALA por 100 ml.

La proporción de peso LA/ALA se encuentra preferiblemente entre 5 y 15.

Preferiblemente la presente composición comprende ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC PUFA), más preferiblemente ácido eicosapentanoico (AEP) y/o ácido docosahexaenoico (ADH).

20 En una forma de realización preferida, la composición comprende ácido araquidónico (ARA).

Preferiblemente la composición comprende de 1 a 25 mg, más preferiblemente de 4 a 15 mg de ADH por 100 ml.

Preferiblemente la composición comprende de 2 a 50 mg, más preferiblemente de 6 a 30 mg de ARA por 100 ml.

La presencia de LC-PUFA afecta ventajosamente a la colonización de lactobacilos y/o bifidobacterias, especialmente de *Lactobacillus paracasei*.

25 La presente composición preferiblemente comprende de 30 a 60 % en. de grasa, más preferiblemente de 39 a 50 % en. de grasa.

La composición preferiblemente comprende de 2,1 a 6,5 g de grasa por 100 ml.

[0060] Preferiblemente la presente composición comprende de 5 a 16 %, en., más preferiblemente 8 a 12 % en. de proteína.

30 Preferiblemente la presente composición comprende una proteína seleccionada del grupo consistente en caseína, lactosuero, leche desnatada, proteína de soja, proteína de guisante, colágeno, proteína de arroz y/o proteína de maíz.

Preferiblemente al menos 25 % en peso, más preferiblemente al menos 50 % en peso, de forma más preferida al menos 90 % en peso de la proteína de la presente composición es proporcionado por proteína hidrolizada y/o aminoácido libre.

35 El uso de proteína hidrolizada y/o aminoácidos libres reduce el riesgo de alergia, particularmente alergia a la leche de vaca.

Cuando la composición está en forma líquida, preferiblemente comprende de 1,0 a 6,0 g, más preferiblemente de 1,0 a 2,5 g de proteína por 100 ml.

[0061] La presente composición es preferiblemente líquida.

40 Irregularidades intestinales (p. ej. heces duras, volumen de deposición insuficiente, diarrea) son un problema importante en muchos lactantes y sujetos enfermos que reciben alimentos líquidos.

Por lo tanto, la presente composición preferiblemente tiene una osmolalidad entre 50 y 500 mOsm/kg, más preferiblemente entre 100 y 400 mOsm/kg.

Con esta osmolalidad, la presente composición es especialmente adecuada para el tratamiento y/o la prevención de diarrea.

[0062] Es también importante que la presente composición no tenga una densidad demasiado calórica, no obstante, todavía proporciona calorías suficientes para alimentar al sujeto.

5 Por lo tanto, el alimento líquido tiene preferiblemente una densidad calórica de entre 10 y 250 kcal por 100 ml, incluso más preferiblemente una densidad calórica de entre 50 y 90 kcal/ml, de forma más preferida de entre 60 y 71 kcal por 100 ml.

La densidad óptima calórica también contribuye a la incidencia reducida de diarrea.

[0063] Las presente composiciones comprenden preferiblemente minerales, oligoelementos y vitaminas, colina, taurina, camitina, mioinositol y/o mezclas derivadas.

10 Preferiblemente la presente composición contiene taurina, que reduce los síntomas del asma (*Adv. Exp. Med. Biol.* 2003 526:403-10).

La taurina actúa sinérgicamente con los componentes en la presente composición.

Preferiblemente la presente composición comprende nucleótidos.

Preferiblemente, la composición comprende citidina 5'-monofosfato, uridina 5'-monofosfato, adenosina 5'-monofosfato, guanosina 5'-monofosfato, e inosina 5'-monofosfato.

15 Preferiblemente la composición comprende de 0,75 a 10, más preferiblemente de 1,5 a 5 mg nucleótidos por 100 ml.

La presencia de nucleótidos ayuda ventajosamente la supervivencia y/o el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, especialmente *B. breve* y/o *L. paracasei*.

Preferiblemente la presente composición contiene ácidos orgánicos, aromatizantes y/o colorantes.

Aplicaciones

20 [0064] La composición según la presente invención se ha encontrado que es particularmente útil como una nutrición para lactantes.

25 También la composición es especialmente adecuada para la normalización de la bifidobacteria y/o la población de *Lactobacillus*, según la distribución de especies en lactantes alimentados con leche humana en el tracto gastrointestinal de lactantes que fueron alimentados con leche no humana o parcialmente humana, en particular, los lactantes nacidos prematuramente, lactantes nacidos maduramente, al igual que lactantes que están en el periodo de adaptación de alimentos sólidos.

Por lo tanto la presente invención proporciona un método para la administración de nutrición a un lactante humano, dicho método comprendiendo la administración al lactante de la presente composición.

30 [0065] Preferiblemente el lactante tiene una edad de entre 0 y 36 meses, incluso más preferiblemente de entre 0 y 18 meses, de forma más preferida entre 0 y 12 meses.

[0066] La flora gastrointestinal tiene un efecto importante en trastornos tales como trastornos gastrointestinales, trastornos inmunológicos y/o trastornos endocrinos.

35 Por lo tanto, en otro aspecto, la presente composición puede usarse ventajosamente en la producción de un medicamento para el uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de trastornos gastrointestinales, trastornos inmunológicos y/o trastornos endocrinos.

Particularmente, alergia, rinitis alérgica, hipersensibilidad alimentaria, dermatitis atópica, eczema, asma, diarrea, inflamación intestinal, infección, estreñimiento, calambres intestinales, cólicos, obesidad infantil y/o diabetes pueden tratarse adecuadamente con la presente composición.

40 En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o la prevención de dermatitis atópica, eczema, alergia y/o infección.

En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o la prevención de alergia y/o infección.

45 La presente composición puede usarse ventajosamente en la producción de un medicamento para el uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de trastornos gastrointestinales, trastornos inmunológicos y/o trastornos endocrinos en un lactante.

La incidencia reducida de estas enfermedades se debe a la flora intestinal optimizada, particularmente, la población optimizada de especies de bifidobacterias y/o la población optimizada de especies *Lactobacillus*.

La presente invención proporciona particularmente el uso de la presente composición para la producción de una composición para la prevención y/o el tratamiento a la alergia a la leche de vaca y/o infección.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Estudio clínico

5 [0067] En este estudio, el efecto de una nutrición de lactantes conteniendo transgalactooligosacáridos y fructopolisacáridos en bifidobacterias intestinales y lactobacilos se evaluó.

El estudio fue realizado y las muestras fecales fueron analizadas como se describe en WO2005/039319

10 [0068] Lactantes fueron asignados de forma aleatoria a uno de dos grupos de tratamiento: un grupo (grupo SF) recibiendo una fórmula para lactantes estándar (Aptamil 1 Milupa) y; un grupo (grupo GFSF) recibiendo fórmula de estándar complementada con 0,72 g/100ml de transgalacto-oligosacáridos (GOS, Vivinal™ (Borculo Domo Ingredients, Países Bajos) y 0,08 g/100ml de fructopolisacáridos (inulina, Raftilin HP, Orafti, Bélgica).

Un grupo de lactantes alimentados con leche humana se incluyó como un grupo de referencia (grupo HMF).

[0069] La cuantificación relativa de las distintas bifidobacterias y especies de *Lactobacillus* en muestras fecales se determinó por ensayos de nucleasa 5' dúplex.

15 Las sondas y cebadores se diseñaron y validaron para especies de bifidobacteria como se describe en WO2005/039319 y para *Lactobacillus*.

Las sondas y cebadores para especies de *Lactobacillus* se muestran en la tabla 1.

F es el cebador directo, R es el cebador inverso y P es la sonda.

20 La tabla 2 muestra el cebador final óptimo y concentraciones de sonda usadas en el ensayo de nucleasa 5' dúplex para *Lactobacillus*.

La cantidad total de bifidobacteria se determinó también con ayuda de FISH, como describió anteriormente (Langendijk et al.1995 *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3069-75.).

Tabla 1: Cebadores diseñados y sondas para uso en los ensayos de nucleasa 5'

	Cebadores & sondas	Secuencia (5' → 3')
<i>L. acidophilus</i>	F	GAAAGAGCCCAAACCAAGTGATT
	R	CTTCCCAGATAATTCAACTATCGCTTA
	P	TACCACTTTGCA GTCCTACA
<i>L. casei</i>	F	CTATAAGTAAGCTTTGATCCGGAGATTT
	R	CTTCCTGCGGGTACTGAGATGT
	P	ACAAGCTATGAATTCACT TGC
<i>L. delbrueckii</i>	F	CACTTGTACGTTGAAACTGAATATCTTAA
	R	CGAACTCTCTCGGTCGCTTT
	P	CCGAGAATCATTGAGATC
<i>L. fermentum</i>	F	AACCGAGAACACCGCGTTAT
	R	ACTTAACCTTACTGATCGTAGATCAGTCA
	P	TAATCGCATACTCAACTAA
<i>L. paracasei</i>	F	ACATCAGTGTATTGCTTGTTCAGTGAATAC

	R	CCTGCGGGTACTGAGATG TTTC
	P	TGCCGCCGGCCAG
<i>L. plantarum</i>	F	TGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAT
	R	TGTTCTCGGTTTCATTATGAAAATA
	P	ACATTCTTCGAACTTTGT
<i>L. reuteri</i>	F	ACCGAGAACACCGCGTTATTT
	R	CATAACTTAACCTAAACAATCAAAGAT TGTCT
	P	ATCGCTAACTCAATTAAT
<i>L. rhamnosus</i>	F	CGGCTGGATCACCTCCTTT
	R	GCTTGAGGGTAATCCCCT CAA
	P	CCTGCACACACGAAA
Genus <i>Lactobacillus</i>	F	TGGATCCCTTGGCACTAGGA
	R	AAATCTCCGGATCAAAGCTTACTTAT
	P	TATTAGTTCCGTCCTTCATC
All bacteria*	F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT
	R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
	P	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC
* Sondas y cebadores fueron derivados de Nadkami et al, 2002, <i>Microbiology</i> 148:257- 266 .		

Tabla 2: Cebador final optimizado y concentraciones de sonda usadas en los distintos ensayos de nucleasa 5' dúplex

Objetivo	Ensayo de nucleasa 5'	Cebador directo (nM)	Cebador inverso (nM)	Sonda (nM)
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	900	900	200
	Genus <i>Lactobacillus</i>	900	900	200
<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>	900	900	200
	Genus <i>Lactobacillus</i>	300	300	50
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. delbrueckii</i>	300	300	100
	Genus <i>Lactobacillus</i>	900	900	200
<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	300	300	100
	Genus <i>Lactobacillus</i>	300	300	100
<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>	300	300	100

	Genus <i>Lactobacillus</i>	300	300	100
<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	300	300	100
	Genus <i>Lactobacillus</i>	300	300	100
<i>L. reuteri</i>	<i>L. reuteri</i>	300	300	100
	Genus <i>Lactobacillus</i>	900	900	200
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	900	450	200
	Genus <i>Lactobacillus</i>	150	100	100
Genus	Genus <i>Lactobacillus</i>	600	600	100
<i>Lactobacillus</i>	All bacteria	300	300	100

[0070] Resultados:

El porcentaje del género bifidobacteria como un porcentaje de bacterias totales fue 75, 47 y 68% en los grupos HMF, SF y GFSF, después de un periodo de alimentación de 6 semanas, respectivamente.

5 I La cantidad de Lactobacilos fue de 3,9, 0,4, y 4,2%, respectivamente.

Las diferencias entre los grupos GFSF y SF fueron significativas estadísticamente.

[0071] En la tabla 3 el porcentaje de especies de bifidobacteria relativas a la cantidad total de bifidobacterias se muestra.

10 Tabla 3: porcentaje de especies de bifidobacteria con respecto al número total de bifidobacterias en las heces de lactantes alimentados con leche humana (HMF) y lactantes que recibieron una fórmula estándar (SF) o una fórmula estándar complementada con TOS/polifruktosa (GFSF) después de un periodo de alimentación de 6 semanas.

Especies	HMF % (SE)	GFSF % (SE)	SF % (SE)
<i>B. catenulatum</i>	1,9(0,6)	1,4(1,0) ^b	8,1 (4,1) ^b
<i>B. adolescentis</i>	0,3 (0,9) ^a	0,2(0,1) ^a	2,(.1,9)
<i>B. breve</i>	11,7 (9,6)	5,4 (10,8)	4,9 (10,7) ^a
<i>B. longum</i>	7,3 (13,9)	5,4 (10,7)	6,2 (9,4)
<i>B. bifidum</i>	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)
<i>B. angulatum</i>	<0,0 (0,0)	<0,1 (0,2)	<0,1 (0,0)
<i>B. infantis</i>	32,0 (18,9)	32,1 (20,0)	37,8 (18,4)
<i>B. dentium</i>	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)
^a : una disminución significativa durante el periodo del estudio			
^b : una diferencia signiificante entre los grupos GFSF y SF.			

[0072] Una gran variedad de especies de bifidobacteria está presente en los tres grupos diferentes.

Además, una reducción significativa en *B. adolescentis* es visible en lactantes alimentados con leche humana y lactantes que reciben GFSF a diferencia de lactantes que reciben una fórmula estándar.

Después de 6 semanas de alimentación, *B. adolescentis* es mucho mayor en lactantes alimentados con SF que en lactantes que fueron GFSF o alimentados con leche humana.

- 5 El análisis de las muestras fecales de lactantes GFSF muestra una gran variedad en la flora de bifidobacterias similar a los lactantes alimentados con leche humana.

Los perfiles de lactantes alimentados con leche humana y los lactantes que recibieron GFSF también mostraron menos *B. catenulatum* (+ *B. pseudocatenulatum*) que el perfil de lactantes que recibieron una fórmula estándar.

- 10 *B. infantis* y *B. longum* parecen ser predominantes en lactantes alimentados con leche humana al igual que en lactantes que recibieron una fórmula estándar (SF) o una fórmula estándar complementada con prebióticos (GFSF).

También *B. breve* fue dominante en los tres grupos, pero en el grupo que recibió leche humana *B. breve* como un % de bifidobacterias totales fue más alto (11,7 %) como en los grupos SF (4,9 %) y GFSF (5,4%).

[0073] En la tabla 4 la distribución de especies de lactobacilos en las heces de los lactantes alimentados de manera diferente se proporciona.

- 15 Tabla 4: Porcentaje de especies de *Lactobacillus* con respecto al número total de lactobacilos en las heces de lactantes alimentados con leche humana (HMF) y lactantes que recibieron una fórmula estándar (SF) o una fórmula estándar complementada con TOS/fructopolisacáridos (GFSF) después de un periodo de alimentación de 6 semanas.

Especies	HMF % (SE)	GFSF % (SE)	SF % (SE)
<i>L. acidophilus</i>	23,5 (4,5) ^a	24.5 (3.9) ^a	19,2 (4,1)
<i>L. casei</i>	6,0 (1,8) ^a	10,7 (2,5) ^a	8,3 (2,0) ^a
<i>L. delbrueckii</i>	<0,001 (0,00)	0,01 (0,01) ^{bc}	6,9 (2,8) ^{ac}
<i>L. fermentum</i>	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)	0,05 (0,03)
<i>L. paracasei</i>	22,1 (6,1) ^a	16,8 (4,2) ^a	5,6 (3,3)
<i>L. plantarum</i>	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)
<i>L. reuteri</i>	1,4 (0,6)	1,3 (0,4)	6,4 (3,2)
<i>L. rhamnosus</i>	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)

^a: un aumento significativo durante el periodo de estudio
^b: una reducción significativo durante el periodo de estudio
^c: una diferencia significativo entre el GFSF y SF grupo

- 20 [0074] Como se puede observar en la tabla 4, una gran variedad de especies de *Lactobacillus* está presente en los lactantes alimentados con leche humana y en los alimentados con fórmula estándar.

No obstante, la distribución de especies no es similar en los lactantes alimentados con leche humana y en los alimentados con fórmula estándar.

Una reducción en *L. delbrueckii* es visible en lactantes alimentados con leche humana a diferencia de lactantes que reciben una fórmula estándar, en los que un aumento se observa.

- 25 Después de 6 semanas de alimentación, un aumento significativo de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. Paracasei* se observa en lactantes alimentados con leche humana, mientras que el aumento de *L. acidophilus* y *L. paracasei* no es significativo en lactantes alimentados con fórmula.

En comparación con lactantes alimentados con leche humana, los lactantes alimentados con fórmula tienden a tener concentraciones relativas mayores de *L. fermentum* y *L. reuteri*.

Sorprendentemente, el análisis de las muestras fecales de lactantes GFSF muestra una gran variedad en la flora de *Lactobacillus* similar a los lactantes alimentados con leche humana.

La distribución de especies en lactantes alimentados GFSF es muy similar a la que se observa en lactantes alimentados con leche humana.

- 5 Como se observa en lactantes alimentados con leche humana, los lactantes alimentados GFSF han disminuido relativamente las cantidades de *L. delbrueckii*, *L. reuteri* y *L. fermentum* y aumentado las cantidades de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. paracasei*.

Las cantidades relativas de *L. paracasei* en lactantes alimentados GFSF tiende a ser inferior a las de los lactantes alimentados con leche humana, sin embargo.

- 10 [0075] Estos resultados son indicativos de que la alimentación con una mezcla de sacáridos no digeribles A y B, que comprenden al menos 60, especialmente al menos 98 mol % de una o más unidades monosacáridas seleccionadas del grupo consistente en galactosa, fructosa y glucosa y que A y B difieren en la estructura química produce una distribución de especies de bifidobacterias y lactobacilos similar a la observada en lactantes alimentados con leche humana (es decir, relativamente disminuyeron *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum* y/o *L. reuteri* y relativamente aumentaron *B. longum*, *B. infantis*, *B. Breve*, *L. casei*, *L. paracasei* y/o *L. acidophilus*).

- 15 También estos resultados son indicativos de que la administración de esta mezcla de sacárido no digerible A y B en combinación con *B. breve* o con *B. breve* más *L. paracasei* devolverán la flora intestinal a lactantes, de manera que imita a la de los lactantes alimentados con leche humana con respecto a la bifidobacteria y distribución de especies de *Lactobacillus*, haciendo que la flora intestinal recuerde a la de los lactantes alimentados con leche humana tendrán un efecto provechoso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos gastrointestinales, trastornos inmunológicos y/o trastornos endocrinos en lactantes.

Ejemplo 2: Efecto en reacción alérgica

[0076] Ratones Balb/C macho sin patógeno específico se obtuvieron de Charles River (Maastricht, Países Bajos).

Alimento y agua se proporcionaron *ad libitum* y los ratones se usaron cuando tenían de 6-9 semanas de edad.

- 25 [0077] Los ratones fueron sensibilizados por dos inyecciones i.p. con 10 µg de ovoalbúmina adsorbida en 2,25 mg de hidróxido de aluminio en 100 µl de solución salina o solución salina sola en los días 0 y 7.

Los ratones fueron desafiados en los días 35, 38 y 41 por inhalación de aerosoles de ovoalbúmina en una cámara de exposición de plexiglás durante 20 minutos.

- 30 Los aerosoles fueron generados pulverizando una solución de ovoalbúmina (10 mg/ml) en la solución salina usando un nebulizador Pari LC Star (Pari respiratory Equipment, Richmond, VA, EEUU).

[0078] Los ratones fueron tratados a diario con 1×10^9 *Bifidobacterium breve* CFU y 25 mg de una mezcla de oligosacáridos transgalacto- y fructopolisacáridos (9:1) (TOS / mezcla de fructopolisacárido del ejemplo 2) por vía oral mediante alimentación forzada (0,2 ml, solución de sal fisiológica) empezando el día 28 hasta el final del experimento (es decir, día 42)

- 35 Como control, 0,2 ml de solución de sal fisiológica se administró por medio de alimentación forzada.

[0079] Receptividad de vía respiratoria para metacolina inhalada pulverizada se determinó 24 horas después del desafío de aerosol final, en ratones conscientes incontrolados usando pletismografía de cuerpo entero (BUXCO, EMKA, París, Francia).

La respuesta de vía respiratoria fue expresada como pausa mejorada (PenH).

- 40 [0080] Resultados: mediciones en la muestra de hiper-receptividad de vía respiratoria que en comparación con el control de los ratones que recibieron el *B. breve*, TOS y fructopolisacárido muestran una hiper-receptividad de vía respiratoria reducida estadísticamente, indicativo de una reacción asmática bajada.

- 45 En la figura 1, la hiper-receptividad de vía respiratoria se fija como PenH relativo (pausa mejorada) frente a la concentración de metacolina para ratones que recibieron una combinación de *B. breve* + una mezcla de TOS / fructopolisacárido y un grupo de control de ratones que recibieron solución salina en su lugar.

Los valores fijados de PenH relativo se obtienen después de sustracción de los valores en blanco obtenidos para ratones no sensibilizados a la ovoalbúmina y normalización al valor obtenido para el grupo de control a la concentración de máxima de metacolina.

Ejemplo 3

[0081] Una fórmula de leche de lactante conteniendo por 100 ml de producto final una viscosidad de $2,0 \pm 0,2$ mPa.s y:

	13 % energía de proteína (caseína y lactosuero)	2,2 g
	49 % energía de carbohidratos digeribles	8,6 g
5	37 % energía de grasa	3,0 g
	TOS (presente en Vivinal GOS) (DP medio entre 2 y 4)	0,72 g
	FOS (Raftiline HP) (DP medio entre 23-25)	0,08 g
	<i>B. breve</i>	$1,6 \times 10^8$ CFU
	<i>L. paracasei</i>	$1,6 \times 10^8$ CFU

REIVINDICACIONES

1. Composición con una viscosidad entre 1 y 6 mPa.s, una densidad calórica entre 10 y 250 kcal por 100 ml, comprendiendo *Bifidobacterium breve*, un sacárido no digerible A y un sacárido no digerible B, donde:
- 5 a. el sacárido no digerible A tiene un grado de polimerización entre 2 y 200 y al menos 60 % mol de las unidades totales monosacáridas de sacárido A se seleccionan de monosacáridos del grupo consistente en galactosa, fructosa y monosacáridos de glucosa; y
- 10 b. el sacárido no digerible B tiene un grado de polimerización entre 2 y 200 y al menos 60 % mol de las unidades totales monosacáridas de sacárido B se seleccionan de monosacáridos del grupo consistente en galactosa, fructosa y monosacáridos de glucosa; y donde
- 15 i) el porcentaje de al menos un monosacárido seleccionado del grupo consistente en glucosa, fructosa y galactosa en el sacárido A es al menos un 40 % mol mayor que el porcentaje del mismo monosacárido en el sacárido B; y/o
- 20 ii) el porcentaje de al menos un enlace glicosídico del sacárido A basado en enlaces glicosídicos totales del sacárido A es al menos un 40% mayor que el porcentaje del mismo enlace glicosídico en el sacárido B; y/o
- iii) el grado de polimerización del sacárido A es al menos 5 unidades monosacáridas menor que el grado de polimerización de sacárido B.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por el hecho de que la proporción de peso entre sacárido A y sacárido B se sitúa entre 24 y 99.
- 25 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada por el hecho de que
- i) el porcentaje de al menos un monosacárido seleccionado del grupo consistente en glucosa, fructosa y galactosa en el sacárido A es al menos 40 % mol mayor que el porcentaje del mismo en el sacárido B; y
- 30 ii) el grado de polimerización del sacárido A es al menos 5 unidades monosacáridas menor que el grado de polimerización del sacárido B.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes comprendiendo además *Lactobacillus paracasei*.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el hecho de que la cadena de sacárido del sacárido A comprende al menos 67 % mol unidades de galactosa basadas en la cantidad total de unidades monosacáridas de cadena de sacárido presentes en el componente A.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el hecho de que la cadena de sacárido de sacárido B comprende al menos 67 % mol unidades de fructosa basadas en las unidades totales monosacáridas presentes en el sacárido B.
- 40 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo de 10^2 a 10^{13} unidades formadoras de colonias de *Bifidobacterium breve* por g de peso en seco de la composición.
- 45 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo al menos de 5 a 16 % en. de proteína, de 30 a 60 % en. de grasa y de 25 a 75 % en. de carbohidratos.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo al menos 5 mg de sacárido A por 100 ml y/o al menos 5 mg de sacárido B por 100 ml.
- 50 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo al menos 0,75 mg de nucleótidos por 100 ml.
11. Composición comprendiendo de 5 a 16 % en. de proteína, de 30 a 60 % en. de grasa y de 25 a 75 % en. de carbohidratos comprendiendo *Bifidobacterium breve* y *Lactobacillus paracasei*.
- 55 12. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para la producción de una composición nutritiva para el uso en un método para la administración de nutrición a un lactante, dicho método comprende la administración de la composición nutritiva al lactante.
- 60 13. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para la producción de una composición para la normalización de las poblaciones de las especies de *Bifidobacterium* y/o de *Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal de lactantes alimentados con leche no humana o parcialmente humana a las poblaciones de especies de *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus* de lactantes alimentados con leche humana.

14. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para la producción de una composición para la prevención y/o el tratamiento de un trastorno gastrointestinal, trastorno inmunológico y/o trastorno endocrino.
- 5 15. Uso según la reivindicación 14, caracterizado por el hecho de que el trastorno se selecciona del grupo consistente en alergia, infección, rinitis alérgica, hipersensibilidad alimentaria, dermatitis atópica, eczema, asma, diarrea, diarrea vírica, inflamación intestinal, estreñimiento, calambres intestinales, cólicos, obesidad infantil y diabetes.
16. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para la producción de una composición para la prevención y/o el tratamiento de alergia, dermatitis atópica, eczema y/o infección.

Fig 1

