

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 287**

51 Int. Cl.:

A23L 1/29 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 35/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2004 E 04763015 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1638416**

54 Título: **Empleo de una fórmula nutritiva para la función óptima de la barrera intestinal**

30 Prioridad:

23.06.2003 EP 03014040

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

31.07.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GARCIA-RODENAS, CLARA, LUCIA;
BERGONZELLI, GABRIELA;
ROCHAT, FLORENCE;
TURINI, MARCO, ENRICO;
CORTHEZY-THEULAZ, IRENE y
CHERBUT, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 416 287 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).

DESCRIPCION

Empleo de una fórmula nutritiva para la función óptima de la barrera intestinal

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición para la inducción de un modelo de maduración de la barrera intestinal similar a la observada con la alimentación con la leche materna, y capaz de mejorar la maduración de la barrera intestinal, por ejemplo, durante el estrés neonatal. En particular, la presente invención se refiere a una fórmula para niños que contiene una combinación de ingredientes específicos diseñados para proporcionar un efecto sinérgico a todo lo largo del tracto gastrointestinal y una función de barrera.

Antecedentes de la invención

15 Durante el desarrollo postnatal, el intestino del recién nacido experimenta un proceso de maduración que finaliza por el establecimiento de una barrera funcional para las macromoléculas y para las bacterias patógenas. Este fenómeno recibe el nombre de cierre del intestino y parece estar afectado por la dieta. Por consiguiente, diferentes estudios efectuados con niños (JPGN, 1995, 21: 383-6) y modelos animales (Pediatr Res, 1990, 28: 31-7) muestran que la maduración de la barrera es más rápida en la alimentación con leche materna que en los recién nacidos alimentados con una fórmula. Esto podría explicar la mayor prevalencia de una alergia e infección en niños alimentados con una fórmula que en aquellos alimentados con la leche materna.

Un número impresionante de diferentes mecanismos integran esta barrera, mecanismos que actúan sinérgicamente para proteger al anfitrión de agresiones lumbales. La primera barrera consiste en el epitelio intestinal, una monocapa continua de células epiteliales columnares selladas juntamente mediante complejos proteínicos, como por ejemplo uniones herméticas. La segunda barrera es una barrera no específica compuesta por mecanismos que protegen la superficie de las mucosas, como por ejemplo la saliva, la acidez gástrica, la capa de moco, la digestión proteolítica, el pH intestinal alcalino, la capa sin agitación y la peristalsis intestinal. El sistema inmune intestinal (GALT) es capaz de dar respuesta selectiva y específicamente, a las moléculas extrañas y a los microorganismos patógenos. Finalmente, y no menos importante, la flora intestinal protege directa e indirectamente contra la invasión del anfitrión por patógenos y macromoléculas con propiedades antigénicas. Además, el estrés físico debido por ejemplo a la antibioterapia, enfermedad o cirugía y el estrés psicológico inducido por ejemplo por la hospitalización o una prolongada separación de la madre, situaciones comunes en la población infantil prematura, puede perjudicar además la maduración de la barrera intestinal y el retraso del cierre. Por lo tanto, la flora microbiana ha mostrado afectar el estatus de los varios mecanismos de la barrera intestinal (la capa de moco, las uniones herméticas), y tanto el estrés físico como el estrés psicológico han sido relacionados con el aumento de la permeabilidad a las macromoléculas, a los solutos pequeños y a las bacterias.

En la técnica, han sido propuestos varios medios para aumentar la función de la barrera intestinal o la salud gastrointestinal de los niños. Por ejemplo, en la patente US 6132710 se han administrado cepas de *Lactobacillus salivarius* purificado, y de *Lactobacillus plantarum* para niños prematuros, para evitar los daños causados por la infección e inflamación del tejido de las mucosas, especialmente mediante administración nasogástrica para prevenir daños en el tejido gastrointestinal en la enterocolitis necrotizante neonatal.

45 Así pues, la patente JP 5030942 proporciona un alimento y una bebida que contiene el componente activo de la membrana de los glóbulos de grasa de la leche (MFGM), el cual puede controlar la permeabilidad de las substancias moleculares superiores, como por ejemplo la proteína a través del vaso intestinal. Es útil para la prevención y terapia de la enfermedad alérgica a los alimentos.

50 En el artículo "Growth, development and differentiation: a functional food science approach" (Crecimiento, desarrollo y diferenciación: un estudio científico de la comida funcional") (1998, British Journal of Nutrition) ("Revista Inglesa de Nutrición"), Koletzko et al., describe la influencia de los oligosacáridos en relación con la protección contra la infección por enteropatógenos.

55 En la patente WO 0035443A y en "Probiotics: A novel approach in the management of food allergy" (Probióticos: un nuevo enfoque en el tratamiento de la alergia a los alimentos") (Journal of Allergy and Clinical Immunology ("Revista de alergia e inmunología clínica"), Mosby - libro anual, inc. US vol 99 nº 2, 1997, páginas 179-185, Majamaa H et al.,) se describen el papel de los PUFAs y de los *Lactobacilli* en relación con la barrera de las mucosas.

60 Por lo que respecta a la inmunidad de la barrera intestinal, la patente WO 9700078 proporciona un hidrolizado de proteína para regular a la baja las reacciones de hipersensibilidad y para promover la barrera inmunológica intestinal, lo cual se hace mediante las proteínas hidrolizantes con: (a) enzimas derivadas de una preparación

conteniendo bacterias gastrointestinales probióticas, e (ii) un sistema de proteasa similar al del *Lactobacillus GG*, y (b) pepsina y/o tripsina.

Aunque estos microorganismos o ingredientes producen un gran potencial de efectos beneficiosos para el individuo que los incorporan, existe una desventaja que reside en que dichos microorganismos o ingredientes sólo ejercen su efecto en partes limitadas del intestino y sobre mecanismos individuales de la barrera intestinal.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención se refiere, eliminando las desventajas de la técnica anterior, a proporcionar unos medios perfeccionados para promover simultáneamente la maduración de los varios mecanismos de la barrera intestinal y esto a lo largo de todo el intestino durante la alimentación con la fórmula, con el fin de inducir un modelo de maduración de la barrera intestinal similar a la observada en la alimentación con leche materna.

Resumen de la invención

Durante los estudios que han conducido a la presente invención, los presentes inventores observaron un inesperado efecto que implicaba que el objetivo antes mencionado podía ser solucionado proporcionando unas combinaciones específicas de ingredientes bioactivos que podían asociarse a los microorganismos capaces de suministrar por lo menos uno de dichos ingredientes a todo lo largo del intestino.

Por consiguiente, la presente invención proporciona el empleo de por lo menos un microorganismo seleccionado del grupo formado por el *Bifidobacterium CNCM 1-2170*, el *Bifidobacterium CNCM I-2168*, el *Bifidobacterium CNCM I-2169*, el *Lactobacillus johnsonii CNCM 1-1225*, el *Lactobacillus paracasei CNCM 1-2116*, el *Bifidobacterium lactis ATCC 27536* y el *Bifidobacterium longum BB536*, un lípido seleccionado del grupo formado por el ácido araquidónico (AA), el ácido docosahexanoico (DHA) y gangliósidos y un hidrato de carbono no digestible en la fabricación de una composición nutritiva para la inducción de un modelo de maduración de la barrera intestinal similar a la observada en la alimentación con leche materna.

La invención se extiende al empleo por lo menos de un microorganismo seleccionado del grupo formado por el *Bifidobacterium CNCM I-2170*, el *Bifidobacterium CNCM I-2168*, el *Bifidobacterium CNCM I-2169*, el *Lactobacillus johnsonii CNCM I-1225*, el *Lactobacillus paracasei CNCM 1-2116*, el *Bifidobacterium lactis ATCC 27536* y el *Bifidobacterium longum BB536*, un lípido seleccionado del grupo formado por el ácido araquidónico (AA), el ácido docosahexanoico (DHA) y gangliósidos y un hidrato de carbono no digestible en la fabricación de una composición nutritiva para el mantenimiento de la homeostasis de la barrera intestinal después de un estrés físico o psicológico.

Los microorganismos específicos se emplean como parte de las combinaciones para la administración de sustancias capaces de aumentar la maduración de la barrera intestinal en partes específicas del tracto gastrointestinal. Los microorganismos que difieren en su capacidad de sobrevivir en las diferentes partes del tracto gastrointestinal pueden ser incorporados en un cóctel. El lípido específico y el hidrato de carbono no digestible se añaden al cóctel de microorganismos con el fin de reforzar sus efectos mediante la estimulación de la valoración de los mecanismos de la barrera diferentes a los estimulados por los microorganismos.

Estas combinaciones de ingredientes podrían ser incluidas en fórmulas para niños prematuros y niños de edad temprana, de manera que al aumentar la maduración de la barrera podrían reducir también el riesgo de alergia e infección.

Otro objetivo de la presente invención se refiere al empleo de dichas combinaciones de ingredientes específicos para aumentar la maduración de la barrera intestinal y la función barrera en los niños, reduciendo de esta forma el riesgo de desarrollar una alergia e infección.

En otra versión, la presente invención se refiere al empleo de dichos ingredientes para aumentar la homeostasis de la barrera intestinal durante el periodo de lactancia en niños saludables y en aquellos que sufren de estrés físico o psicológico.

En un último aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la maduración de la barrera intestinal y una función óptima de barrera en los niños, el cual método comprende el paso de administración al individuo de una combinación de por lo menos un ingrediente seleccionado del grupo formado por grasas específicas u oligosacáridos no digestibles, estando dichos ingredientes asociados por lo menos con un microorganismo.

Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción, la expresión "fórmula para un peso de nacimiento bajo (LBW)", significa la fórmula específicamente diseñada para la alimentación del niño LBW. El niño LBW se define como un niño que pesa menos

de 2500 g en el momento de nacer. Este niño puede ser o bien un niño "prematuro" (es decir nacido antes de la semana 37 de gestación) o un niño "pequeño para la fecha" (es decir un niño nacido entre la semana 37 y la semana 41 de gestación, pero mostrando un crecimiento intrauterino retrasado). La fórmula LBW puede ser empleada tan pronto como la alimentación entérica sea posible y hasta que el niño LBW alcance un peso corporal similar al peso de nacimiento de un niño nacido en la fecha completa (2500 g - 4000 g) o para las próximas semanas hasta 5000 g.

La expresión "fórmula para niños de temprana edad" significa una fórmula específicamente diseñada para alimentar los niños durante los primeros 4-6 meses de vida y cumpliendo la totalidad de sus necesidades nutritivas.

La composición de la invención comprende las sustancias especificadas en la reivindicación 1 y la reivindicación 2. De acuerdo con un primer aspecto, las sustancias siguientes pueden formar parte de la combinación la cual puede aumentar la maduración de la barrera a lo largo de todo el intestino durante la alimentación con la fórmula:

- hidratos de carbono no digeribles, como por ejemplo los fructo-oligosacáridos (FOS), los galacto-oligosacáridos (GOS), la inulina, la goma arábiga, los xilo-oligosacáridos, el almidón resistente y similares, y
- LC-PUFA como por ejemplo el ácido araquidónico (AA) o el ácido docosahexanoico (DHA)
- Oligosacáridos de la leche humana, como por ejemplo la sialilactosa, y/o
- gangliósidos como por ejemplo los contenidos en el suero de la leche de búfalo delactosada, y/o
- fracciones de leche o colostrum, como por ejemplo la caseína ácida, la caseína de cuajo o la caseína micelar, el sebo ácido, dulce o ultra, las membranas de glóbulos de grasa, y similares, y/o
- proteína hidrolizada extensiva, como por ejemplo la que se obtiene de la hidrólisis de la proteína del suero, y/o
- poliaminas, como por ejemplo la espermina, o la espermidina y/o uno o más precursores de la poliamina, en particular la ornitina y la arginina.

Los hidratos de carbono no digeribles son oligosacáridos derivados de la leche. Uno o más de los mismos pueden ser empleados en las dosis totales desde aproximadamente 0,01 hasta 5 g/100 ml y de preferencia desde 1 hasta 2 g/100 ml. Una mezcla de dos o más hidratos de carbono puede ser empleada, oscilando cada hidrato de carbono desde un 5% hasta un 95 % de la mezcla de carbohidratos.

La composición contiene AA, DHA. Por ejemplo, puede emplearse una cantidad efectiva de AA y DHA. El AA está presente en una cantidad total desde aproximadamente 0,01 hasta un 6,0 % en peso de todos los ácidos grasos de la composición, de preferencia en una cantidad total desde un 0,1 hasta un 1%. El DHA está incluido en una cantidad total desde aproximadamente un 0,01 hasta aproximadamente un 6,0 % en peso del total de los ácidos grasos de la composición, de preferencia en una cantidad total desde un 0,1 hasta un 1%. El ratio AA - DHA efectivo, es aproximadamente desde 1 : 1 hasta 2,5 : 1, y de preferencia desde 1 : 1 hasta 2 : 1. La fuente de los LC-PUFA puede ser los lípidos del huevo, el aceite fúngico, el aceite de pescado bajo en EPA, el aceite de algas, etc..

Los gangliósidos, una segunda clase de lípidos, pueden también ser añadidos a la combinación de ingredientes, por ejemplo en una cantidad desde aproximadamente 1 hasta 20 micromoles/litro de fórmula, y de preferencia desde 6 hasta 15 micromoles/litro. La fuente de gangliósidos puede ser la leche de vaca, el colostrum de vaca, pero de preferencia la leche de búfalo, el suero de la leche o el colostrum, la leche de cabra, el colostrum o el suero y/o derivados de los mismos.

La combinación puede contener también poliaminas, en particular la espermidina, la espermina o la putrescina y/o uno o más precursores de la poliamina, en particular la ornitina y la arginina. Pueden emplearse en una cantidad desde aproximadamente 10 hasta 2.000 microg/100 g de fórmula sólida. La poliamina se selecciona de preferencia por lo menos de dos o más del grupo formado por la espermina, la espermidina, la putrescina y la cadaverina. De preferencia, la composición contiene aproximadamente desde un 10 hasta un 90 % de espermina, desde un 10 hasta un 90% de espermidina, desde un 0 hasta un 90 % de putrescina y desde un 0 hasta un 20 % de cadaverina.

De preferencia, las fracciones de la leche (enriquecida con los factores de crecimiento) pueden estar en forma de proteínas de la membrana de los glóbulos de grasa, caseína ácida, caseína de cuajo o micelar, sebo ácido, dulce o ultra, hidrolizados de proteína de suero de leche, por ejemplo. Pueden emplearse en una cantidad de aproximadamente desde 0,01 hasta 7 g/100 ml de la fórmula, y de preferencia desde 0,5 hasta 3 g/100 ml. El microorganismo se selecciona a partir de Bad 4, B 128, B129, *Lactobacillus johnsonii* o *Lactobacillus paracasei* ST11, todos los cuales son libremente adquiribles a partir del Depository Institutes (Instituto de Depósito) con los números de registro CNCM I-2168, CNCM I-2169, CNCM I-2170, CNCM I-1225 y CNCM I-2116, respectivamente. También puede emplearse el *Bifidobacterium lactis* (Bb12 (ATCC27536)). Pueden adquirirse en Hansen (Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Alle, P.O. Box 407, DK-2970 Hoersholm, Dinamarca). También puede emplearse el *Bifidobacterium longum* BB536 (proporcionado por Morinaga).

Una vez un microorganismo ha sido seleccionado y opcionalmente pretratado, dicho microorganismo puede ser incluido en una fórmula LBW, una fórmula para niños de temprana edad o una fórmula de seguimiento, o en un alimento para bebé como un polvo obtenido mediante secado por congelación o secado por pulverización, por ejemplo en una cantidad desde 10^5 hasta 10^{13} cfu/100 g.

5 Los ingredientes antes citados se administran convenientemente en forma de un producto aceptable para el consumidor, como por ejemplo un portador o soporte ingerible, respectivamente. Ejemplos para dichos portadores o soportes son una composición farmacéutica o una composición alimenticia o una composición para pienso de animales domésticos. Ejemplos no limitantes para dichas composiciones son la leche, el yogur, la cuajada, el queso, las leches fermentadas, los productos fermentados basados en la leche, los productos fermentados basados en los cereales, los polvos basados en la leche, las fórmulas para niños, las suspensiones líquidas de bacterias, un suplemento oral seco, un suplemento oral húmedo, la alimentación por sonda seca o la alimentación por sonda húmeda.

Las composiciones nutritivas están presentes de preferencia en forma de una dieta completa, de tal manera que cuando se emplea como la única fuente de nutrición cubren esencialmente toda la energía diaria, el nitrógeno, los lípidos, las vitaminas, los minerales y los elementos en trazas. Sin embargo la composición nutritiva puede estar también en forma de un suplemento.

En una versión preferida, la presente invención proporciona una fórmula para niños, la cual puede estar en forma de una fórmula para niños de bajo peso en el momento de nacer o para niños de edad temprana, por ejemplo. Puede contener además de la combinación de ingredientes específicos como se ha mencionado más arriba, una fuente de proteínas, una fuente de hidratos de carbono y una fuente de lípidos.

La fuente de proteínas puede ser cualquier proteína dietética adecuada, por ejemplo, proteínas animales (como por ejemplo las proteínas de la leche, las proteínas de la carne y las proteínas de huevo), proteínas vegetales (como por ejemplo, las proteínas de la soja, del trigo, del arroz o de los guisantes), mezclas de aminoácidos libres o una combinación de los mismos. Las proteínas de la leche como por ejemplo la caseína, las proteínas del suero de la leche, y las proteínas de la soja son particularmente preferidas. En una versión preferida, la fuente de proteínas contiene aproximadamente desde 1,8 hasta aproximadamente 4 gramos por 100 kcal de la fórmula.

30 Si la fórmula incluye una fuente de grasas, la fuente de grasas proporciona de preferencia aproximadamente desde un 5 % hasta aproximadamente un 55 % de la energía de la fórmula nutritiva; o aproximadamente de 3 a 7 gramos por 100 kcal de fórmula; los lípidos para completar la fuente de grasa puede ser cualquier grasa adecuada o mezcla de grasas. Las grasas vegetales son particularmente adecuadas; por ejemplo el aceite de soja, el aceite de palma, el aceite de coco, el aceite de cártamo, el aceite de girasol, el aceite de maíz, el aceite de canola, las lecitinas y similares. Las grasas animales como por ejemplo las grasas de la leche pueden también añadirse si se desea.

Si la fórmula incluye una fuente de hidratos de carbono, dicha fuente de hidratos de carbono proporciona de preferencia aproximadamente desde un 40 % hasta aproximadamente un 80 % de la energía de la fórmula nutritiva o aproximadamente desde 6 gramos hasta aproximadamente 15 gramos por 100 kcal de fórmula, por ejemplo. Puede emplearse cualquier hidrato de carbono adecuado, por ejemplo la sucrosa, la lactosa, la glucosa, fructosa, los sólidos del jarabe de maíz, y las maltodextrins, y mezclas de las mismas. Pueden ser incluidos las vitaminas y los minerales adecuados en la fórmula nutritiva de la manera habitual para cumplir las normas apropiadas. Uno o más emulsionantes de calidad alimenticia pueden ser incorporados en la fórmula nutritiva si se desea, por ejemplo los ésteres del ácido diacetil-tartárico con los monodiglicéridos, la lecitina y los mono y diglicéridos. Pueden incluirse sales y estabilizadores similarmente adecuados.

Esta fórmula puede administrarse de preferencia por vía entérica, por ejemplo en forma de un polvo, de un concentrado líquido o de una bebida lista para beber. Puede ser preparada de cualquier manera adecuada, por ejemplo mezclando juntamente la fuente de proteínas dietéticas, la fuente de hidratos de carbono, y la fuente de grasas, en proporciones adecuadas. Si se utilizan, los emulsionantes pueden estar incluidos en la mezcla. Las vitaminas y los minerales pueden añadirse en este punto, pero habitualmente se añaden más tarde para evitar la degradación térmica. Cualesquiera vitaminas lipofílicas, emulsionantes, y similares, pueden disolverse en la fuente de grasas antes de la mezcla. El agua, de preferencia el agua que ha sido sometida a una ósmosis inversa, puede mezclarse a continuación en forma de una mezcla líquida. La temperatura del agua es convenientemente aproximadamente de unos 50 °C hasta aproximadamente 80 °C para ayudar a la dispersión de los ingredientes. Pueden emplearse licuefactores comercialmente adquiribles para formar la mezcla líquida. La mezcla líquida se homogeneiza a continuación; por ejemplo en dos etapas.

La mezcla líquida puede ser tratada térmicamente a continuación para reducir la carga bacteriana. Por ejemplo, la mezcla líquida puede ser rápidamente calentada a una temperatura en el margen desde aproximadamente 80 °C hasta aproximadamente 150 °C durante aproximadamente 5 segundos hasta aproximadamente 5 minutos. Esto

puede efectuarse mediante la inyección de vapor, en autoclave o mediante un intercambiador de calor, por ejemplo un intercambiador del calor de placa. La mezcla de líquido puede a continuación enfriarse desde aproximadamente 60 °C hasta aproximadamente 85 °C, por ejemplo mediante un enfriamiento relámpago. La mezcla líquida puede a continuación ser homogeneizada de nuevo; por ejemplo en dos etapas desde aproximadamente 7 MPa hasta aproximadamente 40 MPa en la primera etapa y aproximadamente desde 2 MPa hasta aproximadamente 14 MPa en la segunda etapa. La mezcla homogeneizada puede a continuación enfriarse de nuevo para añadir cualquier componente sensible al calor, como por ejemplo vitaminas y minerales. El pH y el contenido de sólidos de la mezcla homogeneizada se estandariza convenientemente en este punto.

Si se desea producir una fórmula nutritiva en polvo, la mezcla homogeneizada se transfiere a un aparato adecuado de secaje, como por ejemplo un secador por pulverización o un secador por congelación y se convierte en polvo. El polvo debería tener un contenido en humedad inferior a aproximadamente el 5% en peso.

Si se desea producir una fórmula líquida, la mezcla homogeneizada se envasa de preferencia asépticamente en contenedores adecuados. El llenado aséptico de los contenedores puede efectuarse mediante un precalentamiento de la mezcla homogeneizada (por ejemplo desde aproximadamente 75 hasta 85 °C) y a continuación inyectando vapor en la mezcla homogeneizada para alcanzar la temperatura desde aproximadamente 140 hasta 160 °C, por ejemplo, aproximadamente a 150 °C. La mezcla homogeneizada puede a continuación enfriarse, por ejemplo mediante un enfriamiento relámpago, a una temperatura desde aproximadamente 75 hasta 85 °C. La mezcla homogeneizada puede a continuación ser homogeneizada, enfriada de nuevo a aproximadamente la temperatura ambiente y envasada en contenedores. Un aparato adecuado para efectuar el envasado aséptico de esta naturaleza puede adquirirse en el comercio. La fórmula líquida puede estar en forma de una fórmula lista para alimentar con un contenido de sólidos desde aproximadamente un 10 hasta aproximadamente un 14% en peso o puede estar en forma de un concentrado; habitualmente un contenido de sólidos desde aproximadamente un 20 hasta aproximadamente un 26% en peso. Pueden añadirse saborizantes a las fórmulas líquidas de manera que las fórmulas se obtengan en forma de cómodas bebidas, sabrosas, listas para beber.

Las composiciones pueden ser particularmente diseñadas para niños saludables, niños que padecen alteraciones en la microflora intestinal, como por ejemplo después de un tratamiento con antibióticos, y niños que padecen de estrés físico y psicológico como resultado, por ejemplo, de una enfermedad, una intervención quirúrgica, una hospitalización, una prolongada separación de la madre, con el fin de aumentar la maduración de la barrera intestinal y reducir de esta forma el riesgo de alergia y de infección. La cantidad de fórmula necesaria para alimentar al niño variará en función de factores como por ejemplo la condición del niño, el peso corporal del niño, la edad del niño, y si la fórmula es la sola fuente de nutrición. En general se administra la composición nutritiva suficiente para proporcionar al niño aproximadamente desde 1 g de proteína hasta aproximadamente 4,0 g de proteína por kilo de peso corporal por día suplementado con los ingredientes de acuerdo con la presente invención en la cantidad que se ha indicado más arriba. La composición nutritiva se emplea como suplemento de otros alimentos, la cantidad de la composición nutritiva que se administra diariamente puede consecuentemente ser disminuida.

Los siguientes ejemplos no limitativos, ilustran además la invención. Los mismos están precedidos de una breve descripción de las figuras.

La figura 1 representa la concentración en plasma de FITC-dextrano (A) y de HRP (B) en ratas manipuladas (NS-) ó en ratas privadas de la madre (MS) el día PND 36, alimentadas con una dieta de control (-C) ó bien con una dieta suplementada (-S). El plasma fue recogido 150 minutos después de la administración de la solución del ensayo de permeabilidad mediante una sonda intragástrica. Se representa la media \pm SEM de 8 animales. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Ejemplo 1: efectos del LC-PUFA, Lactobacillus paracasei CNCM I-2116 y FOS/GOS sobre la permeabilidad intestinal

Empiezan a documentarse los efectos específicos del estrés neonatal sobre la barrera intestinal. Diferentes estudios en ratas muestran que la privación materna intermitente durante el período neonatal da como resultado una mayor permeabilidad intestinal en el destete y después durante la vida. Con este estudio, pretendemos dictaminar el efecto de la alimentación con una dieta suplementada con una mezcla de LC-PUFA, una bacteria probiótica y oligosacáridos no digestibles sobre la permeabilidad intestinal de ratas jóvenes que han padecido un protocolo de privación materna durante el período neonatal.

Métodos:

Animales

Se adquirieron ratas hembras Long-Evans Hooded preñadas primíparas en Janvier (France), que llegaron a nuestras instalaciones de cuidado de los animales, sobre el día 12 de de gestación. Fueron alojadas individualmente hasta la entrega, a temperatura y humedad constante, y se mantuvieron en un ciclo 12 : 12 de oscuridad:luz. Comida y agua se proporcionaron ad libitum. Las condiciones de alojamiento se mantuvieron durante toda la duración del protocolo.

Un día después de la entrega (el día 2 postnatal – PND 2), se sacaron las presas de sus jaulas de maternidad y se determinó el sexo de los cachorros. Se formaron al azar camadas estandarizadas de 8 cachorros machos para la crianza.

Estrés neonatal

Las hembras sementales y sus cachorros se asignaron a una de las dos condiciones de cría: 1) grupos de separación materna, expuestos a períodos de 180 minutos de separación materna diaria desde el día PND 2 hasta el día 14 (MS), ó 2) controles manipulados, expuestos a una manipulación diaria (pesado y 15 minutos de manipulación) pero no una separación materna (NS).

A las 9 de la mañana, las hembras sementales se sacaron de su jaula casa y se mantuvieron en jaulas de espera durante las 3 horas del período de separación (hembras sementales MS), ó durante los 15 minutos del período de manipulación (hembras sementales NS). Cada camada de MS se sacó del nido, se pesó, y se colocó todo el grupo en una jaula de aislamiento en una habitación adyacente. Las jaulas de aislamiento se mantuvieron a $32,0 \pm 0,5$ °C. Al final del período de separación, los cachorros fueron devueltos a su jaula casa y se revolcaron en el lecho sucio antes de reunirlos con la madre de cría. Las camadas de los grupos NS fueron tratadas de manera similar pero en lugar de 3 horas de período de separación fueron manipuladas con cuidado durante 15 minutos.

El cincuenta por ciento del lecho sucio de la jaula casa fue reemplazado con lecho limpio una vez a la semana.

Protocolo de los experimentos

Los cachorros fueron definitivamente separados de sus madres de cría el día PND 15. En este momento los cachorros de cada grupo fueron randomizados por el peso y distribuidos en 2 grupos de animales MS y 2 grupos de animales NS. Los cachorros de cada uno de los cuatro grupos fueron alojados juntamente (8 animales/jaula) hasta el día PND 21. A continuación, se alojaron individualmente hasta el final del estudio.

Desde el día PND 15 al día PND 36, los animales recibieron, o bien la dieta de control (grupos MS-C y NS-C) ó bien la dieta suplementada (grupos MS-S y NS-S) ad libitum. La dieta fue reemplazada por un lote fresco cada mañana.

El día PND 36, - después de 30 minutos de ayuno y 150 minutos antes del sacrificio- los animales recibieron 1 ml/100 g de una solución BW para el ensayo de permeabilidad mediante una sonda intragástrica. La solución contenía 100 mg/ml de FITC-dextrano 70 kDa (Sigma FD-70S) y 20 mg/ml de peroxidasa de rábano picante (tipo II HRP, Sigma P8250).

Para el sacrificio, los animales fueron anestesiados con isoflurano. Se sacaron muestras de sangre de la aorta dorsal. El plasma se obtuvo por centrifugación y se empleó al cabo de unas horas para el análisis de los ensayos de permeabilidad.

Dietas

Los animales fueron alimentados a partir del día PND 15 hasta el día PND 36 con dietas semisintéticas adaptadas nutritivamente (AIN 93 G modificada) cuya composición se muestra en la tabla 1. La dieta suplementada (S) contenía los siguientes ingredientes funcionales: *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (llamado ST11) ($\times 10^{10}$ ST11 100 g de dieta); 0,4 g/100 g de dieta fructo-oligosacáridos (FOS Raftiline HP, Orafti SA, Bélgica), 3,6 g/100 g de dieta galacto-oligosacáridos (GOS, Vivinal GOS 10, Borculo Domo Ingredients, Países Bajos), 2 g/100 g de ácidos grasos, ácido araquidónico (AA, ARASCO, Martek, USA), y 2 g/100 g de ácidos grasos, ácido docosahexaenoico (DHA, DHASCO, Market, USA). La dieta de control (C) contenía MRS fresco - reemplazando el ST11 -, maltodextrina (Glucidex D12, Roquette Frères, Francia) y lactosa (Fluka, 61340) - en lugar de los oligosacáridos - y una proporción aumentada de manteca de coco y aceite de maíz –reemplazando DHASCO y ARASCO.

Se prepararon lotes frescos de dietas cada semana, distribuidas en dosis diarias, las cuales se acondicionaron en sacos de aluminio en atmósfera de N₂ y presión negativa y congelado a -20°C hasta que se utilizaron.

Tabla 1. Composición de las dietas

	Dieta de control	Dieta suplementada
	(por 100 g de dieta)	
Caseinato de K (g)	20,00	20,00
Almidón de maíz (g)	32,95	32,95
Maltodextrina (g)	20,74	12,58
Sucrosa (g)	10,00	10,00
Lactosa (g)	4,26	-----
Raftilin HP (g)	-----	0,42
Vivinal GOS 10 (g)	-----	12,00
Mezcla de grasas (g) (ver más abajo para la composición)	7,00	7,00
Mezcla de minerales (AIN-93-G) (g)	3,50	3,50
Mezcla de vitaminas (AIN-93-VX) (g)	1,00	1,00
L-cisteína (g)	0,30	0,30
Tartrato ácido de colina DAR 10 (g)	0,25	0,25
MRS (ml)	0,80	-----
Cultivo ST11 (5×10^{10} cfu/ml) (ml)		0,8
Mezcla de grasas:	g/100 g de mezcla de grasas	
Aceite de soja	25,12	26,44
Trisun 80	-----	2,59
Manteca de coco	30,26	27,12
Aceite de maíz	44,63	34,22
ARASCO	-----	4,70
DHASCO	-----	4,93

5 Se analizaron las muestras de permeabilidad en el plasma de los animales. La concentración de FITC-dextrano se determinó en un fluorímetro a λ_{ex} 485 nm/ λ_{em} 535 nm. La HRP se analizó empleando el sustrato de TNB (Sigma T0440), y midiendo el OD del producto de reacción a 340 nm.

Estadística

10 Los datos están expresados como la media \pm SEM. La normalidad y la homocedasticidad de los datos se comprobaron en cada grupo. Las comparaciones se hicieron mediante ANOVA de dos vías (dos factores: el estrés neonatal y la dieta) seguidos por un Fisher Least Significant Difference ("Mínima Diferencia Significativa de Fischer") (LSD) para dictaminar las diferencias entre los grupos.

15 Resultados

20 Los resultados están representados en la figura 1. Como se esperaba, la concentración de dextrano y HRP fué o tendió a ser mayor en los animales que habían padecido el protocolo de privación materna (MS-C versus NS-C). Inversamente, los animales MS alimentados con la dieta de suplemento mostraron una concentración en dextrano y HRP que fué o tendió a ser menor que la encontrada en los animales MS alimentados con la dieta de control (MS versus MS-C) y no significativamente diferente de los animales que no habían padecido el estrés neonatal.

25 Llegamos a la conclusión de que la separación de la madre aumenta en las ratas las proteínas de la permeabilidad intestinal y otras macromoléculas y que una mezcla de ingredientes funcionales conteniendo LC-PUFA, oligosacáridos y un lactobacillus, restaura la permeabilidad intestinal a niveles normales.

Ejemplo 2: fórmula para niños nacidos con poco peso

30 La fórmula tiene la siguiente composición (por 100 g de polvo): grasa total 24 g, proteína total 14,4 g, hidratos de carbono totales 55,9, aceite de AA enriquecido (fúngico) 0,87 g, aceite de DHA enriquecido (aceite de pescado bajo en EPA) 0,44 g, FOS / inulina (70/30) 12 g, *S. thermophilus* Th4 (Chris Hansen) (polvo seco por congelación, $10E12$ cfu/g) 0,1 g, *B. lactis* ATCC 27536 (polvo seco por congelación, $5 \times 10E12$ cfu/g) 0,15 g, mezcla de Spermine / Spermidine (1/1) 0,1 mg, sodio 180 g, potasio 530 mg, cloruro 280 mg, fósforo 320 mg, calcio 490 mg, magnesio 54 mg, manganeso 34 μ g, vitamina A 1500 IU, vitamina D 490 IU, vitamina E 9,8 IU, vitamina C 79 mg, vitamina K1 59 μ g, vitamina B1 0,29 mg, vitamina B2 0,66 mg, vitamina B6 0,37 mg, niacina 4,9 mg, ácido fólico 290 μ g, ácido pantoténico 2,3 mg, vitamina B12 1,1 μ g, biotina 11 μ g, colina 37 mg, inositol 22 mg, taurina 39 mg, carnitina 7,9 mg, hierro 7,4 mg, yodo 49 μ g, cobre 0,44 mg y zinc 3,7 mg.

La fórmula se reconstituye mezclando 142 g de polvo con 900 ml de agua para dar 1 litro de preparación lista para beber. La composición dada más arriba puede variar para acomodarse a las directivas locales respecto a las cantidades de ingredientes específicos. Otros elementos en trazas (por ejemplo, selenio, cromo, molibdeno, fluoruro) pueden ser añadidos en una cantidad adecuada, de acuerdo con la edad.

5

Ejemplo 3: fórmula para niños de edad temprana

Se prepara una fórmula para niños de edad temprana (desde el nacimiento hasta los 4-5 meses) en forma de polvo. La fórmula tiene la siguiente composición (por 100 g de producto): grasa total 25,8 g, proteína total 11,5 g, hidratos de carbono totales 57,8 g, aceite de AA enriquecido (fúngico) 1 g, aceite de DHA enriquecido (aceite de pescado bajo en EPA) 1 g, FOS / inulina (70/30) 12 g, *L. paracasei* CNCM I- 2116 (polvo secado por pulverización, 10E 12 cfu/g) 0,1 g, *B. longum* BB 536 (Morinaga) (polvo secado por pulverización, 5 x 10E 12 cfu/g) 0,1 g, sodio 120 mg, potasio 460 mg, cloruro 360 mg, fósforo 160 mg, calcio 320 mg, magnesio 35 mg, manganeso 40 µg, vitamina A 1500 IU, vitamina D 310 IU, vitamina E 6,1 IU, vitamina C 41 mg, vitamina K1 42 µg, vitamina B1 0,31 mg, vitamina B2 0,69 mg, vitamina B6 0,38 mg, niacina 3,8 mg, ácido fólico 46 µg, ácido pantoténico 2,3 mg, vitamina B12 1,1 µg, biotina 11 µg, colina 38 mg, inositol 23 mg, taurina 41 mg, carnitina 8,2 mg, hierro 6,1 mg, yodo 25 µg, cobre 0,31 mg y zinc 3,8 mg.

La fórmula se reconstituyó mezclando 132 g de polvo con 900 ml de agua para dar 1 litro de preparación lista para beber. La composición dada más arriba puede variar para acomodarse a las directrices locales con respecto a las cantidades de ingredientes específicos. Otros elementos en trazas (por ejemplo el selenio, el cromo, el molibdeno, el fluoruro) pueden ser añadidos en cantidades adecuadas de acuerdo con la edad.

Ejemplo 4. Fórmula para niños de edad temprana

Una fórmula de partida para niños se prepara como en el ejemplo 3, pero reemplazando la FOS / inulina por la sialilactosa en una cantidad de 0,5 g. En esta fórmula la mitad de la proteína total será suministrada en forma de hidrolizado extensivo de proteína de suero de leche.

30

REIVINDICACIONES

1. Empleo por lo menos de un microorganismo seleccionado del grupo formado por el *Bifidobacterium* CNCM I-2170, el *Bifidobacterium* CNCM 1-2168, el *Bifidobacterium* CNCM 1-2169, el *Lactobacillus johnsonii* CNCM 1-1225, el *Lactobacillus paracasei* CNCM I- 2116, el *Bifidobacterium lactis* ATCC 27536, y el *Bifidobacterium longum* BB 536, un lípido seleccionado del grupo formado por el ácido araquidónico (AA), el ácido docosahexanoico (DHA), y un oligosacárido no digestible que es un oligosacárido derivado de la leche en la fabricación de una composición nutritiva para inducir un modelo de maduración de la barrera intestinal similar al observado con una alimentación con el pecho de la madre.
2. Empleo de por lo menos un microorganismo seleccionado del grupo formado por el *Bifidobacterium* CNCM I-2170, el *Bifidobacterium* CNCM I-2168, el *Bifidobacterium* CNCM I-2169, el *Lactobacillus johnsonii* CNCM 1-1225, el *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-2116, el *Bifidobacterium lactis* ATCC 27536, y el *Bifidobacterium longum* BB 536, un lípido seleccionado del grupo formado por el ácido araquidónico (AA), el ácido docosahexanoico (DHA), y un oligosacárido no digestible que es un oligosacárido derivado de la leche en la fabricación de una composición nutritiva para mantener una homeostasis de la barrera intestinal después de un estrés físico o psicológico.
3. El empleo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición está en forma de una dieta completa, un suplemento o un medicamento.
4. El empleo de la reivindicación 3, en donde la composición es una fórmula para un niño de peso bajo de nacimiento, un niño de edad temprana, o un niño de seguimiento, o un alimento para bebés.

20

25

FIG 1 A

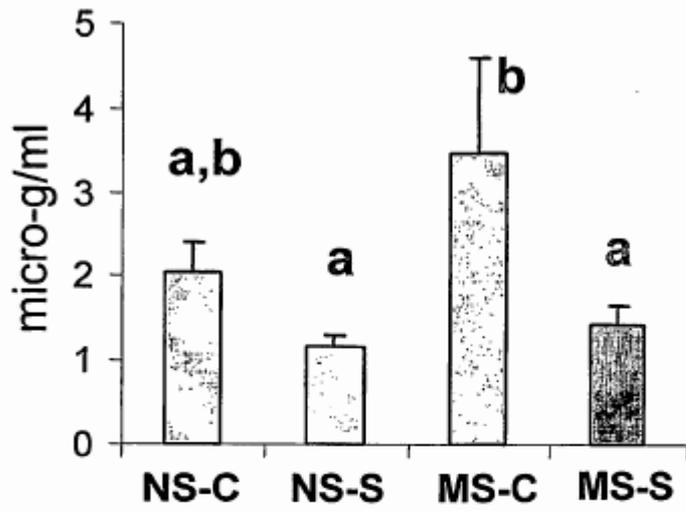


FIG 1 B

