

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 936**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/30** (2006.01)

**A23L 1/29** (2006.01)

**A61K 31/702** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2010 E 10730564 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2440073**

54 Título: **Mezcla sinérgica de beta-galacto-oligosacáridos con enlaces beta-1,3 y beta-1,4/1,6**

30 Prioridad:

**12.06.2009 WO PCT/NL2009/050331**

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

**28.11.2013**

73 Titular/es:

**N.V. NUTRICIA (100.0%)  
Eerste Stationsstraat 186  
2712 HM Zoetermeer, NL**

72 Inventor/es:

**STAHL, BERND y  
NAUTA, ALMA JILDOU**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 431 936 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**

Mezcla sinérgica de beta-galacto-oligosacáridos con enlaces beta-1,3 y beta-1,4/1,6

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a composiciones nutricionales que comprenden dos beta-galacto-oligosacáridos estructuralmente diferentes. Esta mezcla es especialmente adecuada para nutrición infantil.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Los oligosacáridos no digeribles (NDO) son un constituyente principal de la leche humana. Los NDO humanos promueven el crecimiento de una microbiota beneficiosa dominada bifidobacteria. Algunos NDO humanos son también conocidos por ser capaces de prevenir directamente la adhesión de patógenos y toxinas. La presencia de una microbiota rica en bifidobacteria está asociada a un riesgo reducido en enfermedades atópicas tales como dermatitis atópica, alergia alimenticia y asma y a un riesgo reducido en infecciones con patógenos. Se cree que los oligosacáridos no digeribles (NDO) son por lo tanto responsables de la incidencia inferior de infecciones y de enfermedades atópicas observadas en los bebés alimentados con leche humana en comparación con bebés alimentados de fórmula. Los NDO son un factor importante en el sistema inmunológico innato en la leche humana, por el cual la madre protege a los bebés, que tienen un sistema inmunológico adquirido inmaduro e ingenuo y un sistema inmunológico innato todavía no completamente desarrollado.

[0003] La leche humana es el alimento preferido para bebés. No obstante, no siempre es posible o deseable dar el pecho para alimentar un bebé. En tales casos las fórmulas infantiles o en lo sucesivo fórmulas son una buena alternativa. Estas fórmulas deberían tener una composición óptima para imitar los efectos beneficiosos de leche materna de la manera más próxima posible. Esta composición óptima incluye la presencia de NDO.

[0004] El documento WO 2007/101675 divulga una mezcla que comprende una cepa probiótica y al menos uno de dos N-oligosacáridos acetilados específicos, al menos uno de nueve oligosacáridos neutros específicos y al menos uno de los dos oligosacáridos sialilados específicos para la prevención o tratamiento de infecciones patógenas del tracto gastrointestinal, condiciones inmunológicas e infecciones del tracto gastrointestinal superior.

[0005] El documento WO 2007/067053 divulga una fórmula infantil que comprende los prebióticos derivados de plantas inulina y oligosacárido de ácido galacturónico y el transgalactooligosacárido prebiótico sintetizado a partir de lactosa para reducir infecciones.

[0006] El documento WO 2005/039597 se refiere al uso de oligosacáridos ácidos y oligosacáridos neutros para la mejora del sistema inmunológico y el tratamiento y/o prevención de trastornos relacionados con el sistema inmunológico.

[0007] El documento WO 01/642255 se refiere a una composición nutricional que comprende un prebiótico para realzar una respuesta inmune.

[0008] EP 1 644 482 se refiere a nuevas cepas de *Bifidobacterium bifidum* capaces de producir una nueva actividad enzimática de galactosidasa que convierte la lactosa en una nueva mezcla de galacto-oligosacáridos. La mezcla de oligosacáridos se puede incorporar en numerosos productos alimenticios o piensos para animales para mejorar la salud intestinal promoviendo del crecimiento de bifidobacteria en el intestino, y reprimiendo el crecimiento de la microflora patógena.

[0009] Se conoce que muchas fórmulas infantiles comprenden NDO, todavía se pueden hacer otras mejoras con relación a mezclas de NDO con un efecto mejorado en la microbiota intestinal y/o el sistema inmunológico innato.

50 Resumen de la invención

[0010] Los inventores encontraron sorprendentemente que una mezcla de beta-1,3 galacto-oligosacáridos y beta-1,4 y/o 1,6 galacto-oligosacáridos y preferiblemente también fructo-oligosacáridos, tiene un efecto mejorado en la estimulación del sistema inmunológico, en comparación con los componentes por separado. Se observó una respuesta de vacunación aumentada, indicativo de una respuesta de Th1 aumentada.

[0011] La presente combinación es por lo tanto especialmente ventajosa para sujetos humanos con una respuesta de Th1 reducida en comparación con adultos saludables, en particular bebés recién nacidos. La presente combinación es adecuada para el tratamiento y/o prevención de infecciones, y/o para apoyar la respuesta a la vacunación antes, durante y/o después de la vacunación. La presente combinación es especialmente adecuada para el tratamiento y/o prevención de

## ES 2 431 936 T3

enfermedades que se pueden prevenir y/o tratar por un aumento en la respuesta Th1 y/o en el equilibrio de Th1/Th2, en particular alergia, dermatitis atópica, asma, alergia alimenticia, rinitis alérgica (p. ej. alergia al polen), alergia a los ácaros del polvo y otras formas de hipersensibilidad como anafilaxia sistémica y urticaria aguda.

### 5 Descripción detallada

[0012] La presente invención así concierne una composición nutricional que comprende al menos dos beta-galacto-oligosacáridos (BGOS) diferentes A y B donde

10 a) el BGOS A tiene la estructura de Gal<sub>n</sub>-Glu y/o Gal<sub>m</sub>, con n = 2 a 6 y m = 2 a 7 y comprende al menos un 80 % de la suma de los enlaces beta 1,4 y beta 1,6 entre dos residuos de galactosa, en base al número total de enlaces entre residuos de galactosa, y

15 b) el BGOS B tiene la estructura de Gal<sub>n</sub> - Glu y/o Gal<sub>m</sub>, con n = 2 a 6 y m = 2 a 7 y comprende al menos un 80 % de enlaces beta 1,3 entre dos residuos de galactosa, en base a los enlaces totales y

c) la proporción en peso entre BGOS A y BGOS B es de 1 a 5.

### Beta-galacto-oligosacáridos

20

[0013] La presente invención se refiere a una composición nutricional que comprende al menos dos beta-galacto-oligosacáridos diferentes A y B donde A tiene la estructura de Gal<sub>n</sub>-Glu y/o Gal<sub>m</sub>, con n = 2 a 6 y m = 2 a 7 y comprende al menos un 80 % de la suma de los enlaces beta 1,4 y beta 1,6 entre dos residuos de galactosa, en base a los enlaces totales, y donde B tiene la estructura de Gal<sub>n</sub>-Glu y/o Gal<sub>m</sub>, con n = 2 a 6 y m = 2 a 7 y comprende al menos un 80 % de enlaces beta 1,3 entre dos residuos de galactosa, en base al número total de enlaces entre residuos de galactosa y donde la proporción en peso entre A y B es de 1 a 5, más preferiblemente de 1,25 a 4, incluso más preferible de 1,5 a 3,5. Como ejemplo Gal-Gal y Gal-Gal-Glu tienen un % de enlaces entre dos residuos de galactosa de bien 0% o bien 100% de beta 1,3, o 0% o 100% de beta 1,4, o 0% o 100% de beta 1,6. Además, Gal-Gal-Gal y Gal-Gal-Gal-Glu tienen un % de enlaces entre dos residuos de galactosa de bien 0% o 50% o 100% de beta 1,3, o 0% o 50% o 100% de beta 1,4, o 0% o 50% o 100% de beta 1,6. Como un ejemplo se nota también que Gal-Gal-Gal o Gal-Gal-Gal-Glu pueden tener un % de enlaces entre dos residuos de galactosa de 50% de beta 1,4 y 50% de 1,6. Tal oligosacárido se encuentra bajo la definición de BGOS A.

25

30

[0014] Aquí el "al menos dos beta-galacto-oligosacáridos diferentes A y B" como se ha descrito anteriormente se denomina también "combinación de BGOS A y B". Aquí los beta-galacto-oligosacáridos (BGOS) también se puede denominar trans-galacto-oligosacáridos (TOS). BGOS y TOS se consideran sinónimos. BGOS se define como un oligosacárido de al menos dos unidades de monosacárido de galactosa enlazadas a través de un enlace beta. Opcionalmente en el extremo terminal está presente una unidad de glucosa terminal. BGOS según la presente invención tiene un grado de polimerización (DP) de 2 a 7.

35

40

[0015] Una vía adecuada para formar BGOS es tratar lactosa con beta-galactosidasa. Dependiendo de la especificidad de la enzima utilizada, una unidad de galactosa se hidroliza de la lactosa y se acopla a otra unidad de lactosa a través de un enlace beta para formar un trisacárido. Una unidad de galactosa también se puede acoplar a otra unidad de galactosa simple para formar un disacárido. Unidades de galactosa posteriores se acoplan para formar oligosacáridos. La mayoría de tales oligosacáridos formados tienen un DP de 7 o menor.

45

[0016] Una vía adecuada para preparar beta-1,6 y o beta-1,4 GOS, BGOS A, es utilizar la beta-galactosidasa de *Bacillus circulans*. Una fuente disponible comercialmente de BGOS es Vivinal-TOS de Borculo Domo, Países Bajos. Vivinal-GOS comprende BGOS principalmente con enlaces beta 1,4 y b1,6.

50

[0017] Una vía adecuada para producir beta-1,3 GOS, BGOS B, es utilizar la beta-galactosidasa de *S. thermophilus*. En particular utilizar beta-galactosidasa de la cepa CNCM I 1470 y/o CNCM I 1650 en un proceso como el descrito en el ejemplo 4 del documento FR2723960 o el ejemplo 6 del documento EP0778885. *S. thermophilus* CNCM I-1620 se depositó bajo el tratado de Budapest en 23 agosto 1995 en Collection Nationale de Cultures de Microorganismes van Institute Pasteur, Paris, Francia por Compagnie Gervais Danone. *S. thermophilus* CNCM I-1470 fue depositada bajo el tratado de Budapest en 25 agosto 1994 en Collection Nationale de Cultures de Microorganismes van Institute Pasteur, Paris, Francia por Compagnie Gervais Danone. Ambas cepas también han sido publicadas en el documento WO 96/06924.

55

Los BGOS de la presente invención son no digeribles. Ninguna enzima digestiva humana (incluyendo lactasa humana) es capaz de hidrolizar BGOS. Cuando BGOS es consumido por lo tanto alcanza el intestino grueso intacto y se encuentra disponible para la fermentación por la microbiota intestinal.

60

## ES 2 431 936 T3

[0018] Ambos BGOS A y B deberían estar presentes en cantidades suficientes con uno respecto al otro. Además, BGOS B debería estar presente en cantidades inferiores en comparación con BGOS A, ya que los NDO en la leche humana son más predominantes en enlaces glicosídicos beta 1,4 y beta 1,6 que en enlaces glicosídicos beta 1,3. Una mezcla de BGOS A y BGOS B con una cantidad relativamente inferior de BGOS B mostró un efecto mejorado en el sistema inmunológico. Por lo tanto, la proporción en peso entre A y B es de 1 a 5, más preferiblemente de 1.25 a 4, incluso más preferiblemente de 1.5 a 3.5. Tal proporción en peso asegura un efecto mejorado óptimo de la mezcla de BGOS A y B.

[0019] Preferiblemente la composición nutricional según la presente invención comprende al menos 250 mg de la suma de BGOS A y B por 100 ml, más preferiblemente al menos 400 incluso más preferiblemente al menos 600 mg. Preferiblemente la composición no comprende más de 2500 mg de la suma de BGOS A y B por 100 ml, más preferiblemente no más de 1500 mg. Preferiblemente la composición nutricional según la presente invención comprende al menos un 1 % en peso de la suma de BGOS A y B en base al peso en seco, más preferiblemente al menos un 2 % en peso, incluso más preferiblemente al menos un 4 % en peso. Preferiblemente la composición no comprende más de un 20 % en peso de la suma de BGOS A y B en base al peso en seco de la composición total, más preferiblemente no más de un 10 % en peso. Cantidades inferiores suponen una composición menos eficaz, mientras que la presencia de cantidades más altas de BGOS pueden suponer efectos secundarios tales como trastornos osmóticos, dolor abdominal, hinchamiento, formación de gas y/o flatulencia.

[0020] Preferiblemente la composición según la presente invención también comprende fructo-oligosacáridos (FOS). Preferiblemente la preparación obtenida por el presente proceso comprende fructo-oligosacáridos. Fructo-oligosacáridos como se usa en la presente invención se refiere a carbohidratos compuestos por más de un 50%, preferiblemente más de un 65 % de unidades de fructosa basadas en subunidades monoméricas, en los que al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 75%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, de las unidades de fructosa están enlazadas a través de un enlace beta-glicosídico, preferiblemente un enlace glicosídico beta-2,1. Una unidad de glucosa puede estar presente en el extremo reductor de la cadena de unidades de fructosa. Preferiblemente el fructo-oligosacárido tiene un DP o DP medio en el rango de 2 a 250, más preferiblemente de 2 a 100, incluso más preferiblemente 10 a 60. Fructo-oligosacárido comprende levano, levano hidrolizado, inulina, inulina hidrolizada, y fructo-oligosacáridos sintetizados. Preferiblemente la preparación comprende fructo-oligosacáridos de cadena corta con un grado de polimerización medio (DP) de 3 a 6, inulina más preferiblemente hidrolizada o fructo-oligosacáridos sintéticos. Preferiblemente la preparación comprende fructo-oligosacáridos de cadena larga con un DP medio por encima de 20. Preferiblemente la preparación comprende tanto fructo-oligosacáridos de cadena corta como de cadena larga. Fructo-oligosacáridos adecuados para el uso en el proceso de la invención están también fácilmente disponibles comercialmente, por ejemplo RaftilineHP (Orafti). Preferiblemente la composición nutricional según la presente invención comprende al menos 25 mg de FOS por 100 ml, más preferiblemente al menos 40 incluso más preferiblemente al menos 60 mg. Preferiblemente la composición no comprende más de 250 mg FOS por 100 ml, más preferiblemente no más de 150 mg. Preferiblemente la composición nutricional según la presente invención comprende al menos un 0.15 % en peso de FOS en base al peso en seco, más preferiblemente al menos un 0.25 % en peso, incluso más preferiblemente al menos un 0.4 % en peso. Preferiblemente la composición no comprende más de un 1.5 % en peso de FOS en base al peso en seco de la composición total, más preferiblemente no más de un 1 % en peso. La presencia de FOS muestra otro efecto mejorado en el sistema inmunológico.

### Composición nutricional

[0021] La presente combinación de BGOS A y B está presente preferiblemente en una composición nutricional. La composición de la presente invención no es leche humana. La presente composición se administra preferiblemente enteralmente, más preferiblemente por vía oral.

[0022] La presente composición es preferiblemente una fórmula nutricional, preferiblemente una fórmula infantil. La presente composición puede ser ventajosamente aplicada como una nutrición completa para bebés. La presente composición preferiblemente comprende lípidos, proteínas y carbohidratos digeribles y se administra preferiblemente en forma líquida. La presente invención incluye alimento seco, preferiblemente un polvo que se acompaña con instrucciones para mezclar dicha mezcla de alimento seco con un líquido adecuado, preferiblemente con agua.

[0023] La presente invención proporciona ventajosamente una composición donde los lípidos proporcionan del 5 al 50% de las calorías totales, las proteínas proporcionan del 5 al 50% de las calorías totales, y los carbohidratos digeribles proporcionan del 15 al 85% de las calorías totales. La presente invención proporciona ventajosamente una composición donde los lípidos proporcionan del 20 al 50% de las calorías totales, las proteínas proporcionan del 5 al 30% de las calorías totales, y los carbohidratos digeribles proporcionan del 30 a 70% de las calorías totales. Preferiblemente, en la presente composición los lípidos proporcionan del 35 al 50% de las calorías totales, las proteínas proporcionan del 7,5 al 12,5% de las calorías totales, y los carbohidratos digeribles proporcionan del 40 al 55% de las calorías totales. Para el cálculo del % de calorías totales para las proteínas, el total de energía proporcionado por las proteínas, péptidos y aminoácidos debe ser tomado en cuenta.

## ES 2 431 936 T3

- 5 [0024] La presente composición comprende preferiblemente al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en lípidos animales, excluyendo lípidos humanos, y lípidos vegetales. Preferiblemente la presente composición comprende una combinación de lípidos vegetales y al menos un aceite seleccionado del grupo que consiste en aceite de pescado, aceite animal, aceite de algas, aceite fúngico, y aceite bacteriano. La presente composición preferiblemente comprende ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA). Los LC-PUFA son ácidos grasos o cadenas de ácido graso con una longitud de 20 a 24 átomos de carbono, preferiblemente 20 o 22 átomos de carbono que comprenden dos o más enlaces insaturados. Los LC-PUFA se pueden proporcionar como ácidos grasos libres, en forma de triglicérido, en forma de diglicérido, en forma de monoglicérido, en forma de fosfolípido, o como una mezcla de uno de más de los anteriores.
- 10 [0025] La proteína usada en la composición nutricional se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en proteínas animales no humanas (preferiblemente proteínas de leche), proteínas vegetales (preferiblemente proteínas de soja y/o proteínas de arroz), hidrolizados de las mismas, aminoácidos libres y sus mezclas derivadas. La presente composición contiene preferiblemente caseína, lactosuero, caseína hidrolizada y/o proteína de lactosuero hidrolizada. Preferiblemente la proteína comprende proteínas intactas, proteínas de lactosuero de bovino más preferiblemente intactas y/o proteínas de caseína bovina intactas.
- 15 [0026] La presente composición contiene preferiblemente carbohidratos digeribles seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, almidón y maltodextrinas, más preferiblemente lactosa.
- 20 [0027] Preferiblemente la composición comprende *Bifidobacterium breve*. *Bifidobacterium breve* es una bacteria gram-positiva anaeróbica ramificada en forma de barra. La presente *B. breve* preferiblemente tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de ARNr 16 S cuando se compara con la cepa tipo de *B. breve* ATCC 15700, más preferiblemente al menos un 97% de identidad (Stackebrandt & Goebel, 1994, Int. J. Syst. Bacteriol. 44:846-849).
- 25 [0028] Las cepas preferidas de *B. breve* son aquellas aisladas de las heces de bebés saludables alimentados con leche humana. Típicamente, éstas están comercialmente disponibles de productores de bacterias de ácido láctico, pero también pueden ser aisladas directamente de heces, identificadas, caracterizadas y producidas. La *B. breve* puede ser viable o no viable. Según una forma de realización preferida, la *B. breve* es la cepa *B. breve* CNCM I-2219 depositada bajo el tratado de Budapest el 31 de mayo de 1999 en Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) en Paris, Francia por la Compagnie Gervais Danone como se publicó en el documento EP 1189517. Se descubrió que la presencia de esta cepa tuvo como resultado una mejora adicional de la respuesta de vacunación.
- 30 [0029] La presente composición preferiblemente comprende una cantidad de *Bifidobacterium breve* viable y/o no viable. En caso de *B. breve* viable, una cantidad de al menos  $10^3$  unidades formadoras de colonias (CFU) por g de peso en seco de la composición, o, en caso de *B. breve* no viable, una cantidad equivalente a al menos  $10^3$  cfu por g de peso en seco de la composición está presente preferiblemente. La presente composición preferiblemente comprende de  $10^3$  a  $10^{13}$  cfu de *B. Breve* o en caso de *B. Breve* no viable la equivalencia a  $10^3$  a  $10^{13}$  cfu por gramo de peso en seco de la presente composición, preferiblemente  $10^4$  a  $10^{12}$ , más preferiblemente  $10^5$  a  $10^{11}$ , de la forma más preferible  $10^5$  a  $10^{10}$  cfu, o la equivalencia de cfu de *B. breve* por gramo de peso en seco de la presente composición. Una cantidad de *Bifidobacterium breve* no viable equivalente a al menos  $10^3$  cfu por g en peso seco implica *Bifidobacterium breve* no viable en una cantidad que es la equivalente a una cantidad de al menos  $10^3$  cfu de *B. breve* viable por g de peso en seco. El equivalente de cfu se puede determinar mediante la realización del ensayo 5'nucleasa con las sondas y cebadores *B. breve* como se describe en el documento WO 2005039319 en el producto (es decir, una fórmula infantil) que comprende *B. breve* no viable y comparar éste con una curva de calibración obtenida a partir de un producto comparable (por ejemplo una fórmula infantil estándar) al que se han adicionado cantidades conocidas de cfu de *B. breve* viable seco. Las bifidobacteria viables secas pueden obtenerse comercialmente como se ha descrito anteriormente. El valor de cfu en la curva de calibrado hecha por *B. breve* vivas que tiene la misma respuesta de ensayo 5'nucleasa que el producto que comprende las *B. breve* inactivadas es considerado como la cantidad equivalente en cfu de *B. breve* no viable. Alternativamente, la cantidad de cfu por g de peso en seco se puede determinar en una composición justo antes del paso de inactivación. Preferiblemente las *B. breve* se matan por calor.
- 40 [0030] Es también importante que el alimento líquido no tenga una densidad calórica excesiva, y no obstante todavía proporcione calorías suficientes para alimentar el sujeto. Por lo tanto, el alimento líquido tiene preferiblemente una densidad calórica entre 0.1 y 2.5 kcal/ml, incluso más preferiblemente una densidad calórica de entre 0.5 y 1.5 kcal/ml, de la forma más preferible entre 0.6 y 0.8 kcal/ml.
- 45 [0031] La composición nutricional de la presente invención se encuentra preferiblemente en forma líquida. Tiene preferiblemente una viscosidad limitada para que se pueda aplicar como e. g. alimentos líquidos para bebé y alimentos clínicos líquidos que se pueden administrar como alimento a través de una tetina, un tubo o una paja, mientras se mantenga la viscosidad baja. En una forma de realización preferida, la presente composición tiene una viscosidad inferior a 600 mPa.s, preferiblemente inferior a 250 mPas, más preferiblemente inferior a 60 mPa.s, incluso más preferiblemente inferior a 35
- 50

## ES 2 431 936 T3

mPa.s, de la forma más preferible inferior a 6 mPa.s, a una velocidad de cizalladura de 100 s<sup>-1</sup> a 20 °C. Siempre que el término viscosidad se utilice en el presente documento, se refiere al parámetro físico que se determina según el siguiente método: la viscosidad se puede determinar usando un reómetro Carri-Med CSL. La geometría usada es de forma cónica (cono acrílico de 6 cm y 2 grados) y el espacio entre placa y geometría se fija en 55 µm. Una velocidad de cizalladura de rampa continua lineal se usa de 0 a 150 s<sup>-1</sup> en 20 segundos. Cabe señalar que una composición en polvo con las instrucciones para preparar una solución acuosa, por ejemplo añadiendo agua en una proporción determinada y que luego tiene como resultado una viscosidad como se especifica está también englobada por la invención.

### Aplicación

[0032] Se encontró que la presente combinación de BGOS A y B estimula sinérgicamente el sistema inmunológico. En particular se aumentó la respuesta de vacunación, que es indicativo de una respuesta de Th1 aumentada. El efecto de la combinación de estos dos componentes es superior a los efectos de los componentes por separado. La presente combinación puede ser usada ventajosamente en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, y así la invención concierne un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un mamífero, dicho método comprendiendo la administración de la presente composición que comprende BGOS A y B al mamífero. En otras palabras, la invención también concierne el uso de una composición que comprende BGOS A y B según la presente invención para la producción de una composición, preferiblemente una composición nutricional, para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad. En otras palabras la invención concierne una composición o composición nutricional que comprende una composición que comprende BGOS A y B según la presente invención para el uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad. Preferiblemente el mamífero es un humano, incluso más preferiblemente un bebé humano. Así la invención también concierne el uso de una composición que comprende BGOS A y B según la presente invención para la producción de una composición, preferiblemente una composición nutricional, para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un bebé. O en otras palabras la invención concierne una composición o composición nutricional que comprende BGOS A y B según la presente invención para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad en un bebé. En el contexto de esta invención, un bebé tiene una edad comprendida entre 0 y 6 años, preferiblemente una edad entre 0 y 4 años, preferiblemente una edad entre 0 y 2 años, preferiblemente una edad entre 0 y 1 año.

[0033] La invención concierne un método para proporcionar nutrición para un bebé, dicho método comprendiendo la administración de la presente composición que comprende BGOS A y B al bebé. En otras palabras, la invención también concierne el uso de una composición que comprende BGOS A y B según la presente invención para la producción de una composición nutricional para suministrar nutrición para un bebé. En otras palabras la invención concierne una composición o composición nutricional que comprende BGOS A y B según la presente invención para el uso en la provisión de nutrición para un bebé o para el uso en la alimentación de un bebé.

[0034] La presente composición que comprende BGOS A y B puede ser usada ventajosamente para aumentar la respuesta Th1, aumentar el equilibrio Th1/Th2, restaurar el desequilibrio en las respuestas Th1/Th2, mantener un equilibrio de Th1/Th2 favorable y/o para el tratamiento y prevención de trastornos que se asocian a un desequilibrio Th1/Th2. Por lo tanto, composiciones promocionadas para por ejemplo estimular la maduración del sistema inmunológico, mejoran la resistencia a patógenos por aumento del sistema inmunológico y/o sostienen el sistema inmunológico son parte de la presente invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con el sistema inmunológico, dicho método comprendiendo la administración a dicho mamífero de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la presente composición que comprende BGOS A y B. En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para aumentar la respuesta inmune en un mamífero dicho método comprendiendo la administración al mamífero de la presente composición que comprende BGOS A y B.

[0035] El sistema inmunológico de bebés humanos recién nacidos se caracteriza por un exceso de respuesta de Th2. Durante la maduración del sistema inmunológico, la respuesta de Th1 aumenta y el equilibrio Th1/Th2 varía a valores observados para adultos saludables. Por lo tanto, la presente combinación es especialmente ventajosa para bebés humanos. La presente invención apoya la maduración del sistema inmunológico en bebés. En otra forma de realización, el método de la invención se refiere a la administración de la presente composición que comprende BGOS A y B a seres humanos en un rango de edad entre 0 y 6 años, preferiblemente en un rango de edad entre 0 y 4 años, preferiblemente en un rango de edad entre 0 y 2 años, más preferiblemente en un rango de edad entre 0 a 1 año. En una forma de realización preferida el presente método se refiere a la estimulación de la maduración del sistema inmunológico en sujetos humanos en un rango de edad 0-6 años, preferiblemente en el rango de edad de 0 a 4 años, preferiblemente en el rango de edad de 0 a 2 años, más preferiblemente en el rango de edad de 0 a 1 año.

[0036] Un equilibrio de Th1/Th2 demasiado bajo conduce a una sensibilidad extrema hacia componentes extraños que podrían llevar a una variedad de reacciones inmunológicas, por ejemplo alergias y enfermedades relacionadas tales como dermatitis atópica, asma, alergia alimenticia, rinitis alérgica (e. g. alergia de polen), alergia a los ácaros del polvo y otras formas de hipersensibilidad como anafilaxia sistémica y urticaria aguda. Por lo tanto, la presente composición que

## ES 2 431 936 T3

comprende BGOS A y B es especialmente ventajosa para el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en alergia, alergia alimenticia, dermatitis atópica, asma, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, alergia a los ácaros del polvo y urticaria. La presente composición que comprende BGOS A y B aumenta el equilibrio Th1/Th2.

5 [0037] Un aumento en la respuesta de Th1 conduce a un aumento en la respuesta contra las bacterias patógenas y/o virus. Por lo tanto, la presente composición que comprende BGOS A y B es adecuada para el tratamiento y/o prevención de infecciones. La presente composición que comprende BGOS A y B puede ser usada ventajosamente para el tratamiento y/o  
10 prevención de infecciones intestinales, diarrea, inflamación intestinal, infecciones sistémicas y/o infecciones del tracto respiratorio.

[0038] También se descubrió que la presente combinación puede ser utilizada idóneamente para apoyar procesos de  
15 vacunación, por ejemplo mejora los efectos de un proceso de vacunación. La presente combinación es adecuada para apoyar la respuesta de vacunación antes, durante y/o después vacunación. Por lo tanto, la presente composición que comprende BGOS A y B se utiliza ventajosamente en el tratamiento y/o prevención de infecciones, y/o para uso en el realce de la respuesta de vacunación.

[0039] Por lo tanto, la presente combinación es ventajosa para sujetos humanos que sufren deficiencias inmunológicas, en particular seres humanos ancianos que sufren inmunosenescencia, seres humanos que sufren SIDA o están infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, y/o pacientes con cáncer, en particular pacientes con cáncer que son o han sido  
20 sometidos a quimioterapia, radiación y pacientes con cáncer que son caquéticos.

[0040] La presente combinación se utiliza ventajosamente como nutrición para personas mayores. Las personas mayores tienen una respuesta de Th1 disminuida. Las personas mayores son especialmente vulnerables a complicaciones por infección vírica. En una forma de realización preferida la presente composición que comprende BGOS A y B se usa para el  
25 tratamiento y/o prevención de la inmunosenescencia en personas mayores. En una forma de realización, la presente invención concierne la provisión de nutrición para un anciano. Un anciano es una persona con una edad de 55 años o más, en particular de edad de 65 o más.

[0041] Así en varias formas de realización, la presente invención concierne el uso de una composición que comprende  
30 BGOS A y B según la presente invención para la producción de una composición, preferiblemente una composición nutricional, para

- estimular el sistema inmunológico,
- aumentar la respuesta de vacunación,
- 35 - prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en asma, alergia, dermatitis atópica, conjuntivitis alérgica, alergia a los ácaros del polvo, urticaria y rinitis alérgica,
- uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en infecciones, diarrea, e inflamación intestinal,
- 40 - mejorar el sistema inmunológico, dicha mejora siendo seleccionada del grupo que consiste en aumentar la respuesta de Th1, aumentar el equilibrio de Th1/Th2, y disminuir la respuesta de Th2,
- tratamiento y/o prevención de inmunosenescencia en seres humanos ancianos
- VIH y/o pacientes de SIDA,
- pacientes con cáncer, en particular pacientes con cáncer que están o han sido sometidos a quimioterapia y/o radiación y  
45 pacientes con cáncer que son caquéticos,
- pacientes que sufren de enfermedad pulmonar obstructiva crónica y/o
- pacientes que sufren de diabetes.

[0042] En el contexto de la presente invención, "prevención" de una enfermedad o cierto trastorno también significa  
50 "tratamiento de una persona en riesgo" de una enfermedad o cierto trastorno.

[0043] La mezcla de BGOS A y B que difiere en enlaces tiene como resultado preferiblemente una fermentación mejorada, y/o una microbiota intestinal mejorada, preferiblemente enriquecida con bacterias productoras de ácido láctico, en particular bifidobacteria y/o lactobacilos en comparación con los componentes individuales solos. Se forma preferiblemente un aumento de acetato o lactato. La producción de ácidos orgánicos tiene como resultado preferiblemente una reducción del  
55 pH intestinal. En una forma de realización la invención concierne el uso de una composición que comprende BGOS A y B según la presente invención para la producción de una composición, preferiblemente una composición nutricional, para el uso en la mejora de la microbiota intestinal. Preferentemente, la microbiota intestinal se mejora mediante el aumento de la cantidad y/o actividad de bacterias productoras de ácido láctico. Preferiblemente las bacterias productoras de ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste en bifidobacteria y lactobacilos.

60

**Ejemplos**

Ejemplo 1: efecto mejorado de BGOS A y B en el aumento de respuesta de Th1

5 Métodos:

[0044] El efecto de dietas que comprenden (a) una combinación de BGOS A y fructo-oligosacáridos (b) BGOS B y (c) una combinación de BGOS A y B y fructo-oligosacáridos fue evaluado en un modelo de ratón donde una respuesta para un antígeno se mide por una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). Esta respuesta DTH en las orejas después de un desafío local con un antígeno presente en una vacuna es una medida de la proliferación celular de Th1. Durante la respuesta a la infección y/o vacuna las células Th1 proliferan en respuesta al desafío con el antígeno. Estas células Th1 infiltran la oreja cuando la oreja es posteriormente desafiada con el antígeno y causan inflamación. La infiltración con las células Th1 en la oreja lleva aproximadamente 24 h y la inflamación se ve por lo tanto retardada. Cuantas más células Th1 hayan proliferado durante la vacunación inicial y/o infección, mayor es la DTH observada en el desafío con el antígeno.

[0045] Como fuente de BGOS A se utilizó Vivinal-GOS (Borculo Domo Ingredients, Países Bajos) fue usado. Como fuente de fructo-oligosacárido (FPS) se utilizó RaftilineHP, Orafiti, Tiense, Bélgica. Las dietas (a) y (c) comprendían una proporción en peso de oligosacáridos no digeribles Vivinal GOS: FPS de 9: 1 y un 1 % en peso de la suma de oligosacáridos no digeribles de Vivinal GOS y FPS en base al peso total de la dieta de ratón. Vivinal GOS comprende al menos un 67 % en peso de BGOS A, el resto siendo principalmente disacáridos Gal-Glu no digeribles. Las dietas (b) y (c) comprendían como fuente de BGOS B una preparación obtenida tras la incubación de lactosa con una cepa *S. thermophilus* CNCM 1- 1620 en un método como se describe en el documento FR2723960 ejemplo 4. De esta preparación un 3 % en peso fue añadido en base al peso de la dieta total. La cantidad de un BGOS en esta preparación fue aproximadamente 245 mg/g. La cantidad de BGOS B fue aproximadamente 223 mg/g, el resto de BGOS siendo BGOS A. El resto de la preparación contenía principalmente lactosa y disacáridos no digeribles Gal-Glu. De los BGOS la mayoría consistían en trisacáridos (aproximadamente un 88 %) y tetrasacáridos (aproximadamente 12 % en peso).

[0046] Ratones hembra, de 6 semanas de edad, C57B1/6 (Harlan Nederland BV, Horst, Países Bajos) fueron alojados en grupos bajo un régimen regular de 12 horas de luz/oscuridad. El tamaño de grupo fue 10 animales por grupo y 3 animales en los grupos de control negativo. A los animales se les dio dietas semi-sintéticas (Research Diet Services, Wijk bij Duurstede, Países Bajos). Se hicieron dietas de control según las especificaciones AIN93G (Reeves et al (1993) J Nutrition 123 (11): 1923-31), las dietas suplementadas de oligosacáridos se basaron en estas especificaciones.

[0047] Se comenzaron las vacunaciones después de un periodo de 20 días de adaptación al nuevo alojamiento y a las dietas. A día 0, una muestra sanguínea fue recogida antes de vacunación. A día 1, la primera vacunación fue administrada subcutáneamente. Después de tres semanas, se dio una revacunación (día 22). Nueve días después de la reinyección (día 31), se midió el espesor auricular basal con un micrómetro exterior Digimatic (Mitutoyo, Veenendaal, Países Bajos) y una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) fue inducida por inyección i.c. (intracutánea) de una solución de antígeno en el pabellón auricular del ratón. A 24 h a partir de entonces (día 32), se midió la respuesta DTH, se tomó una muestra sanguínea y los ratones fueron sacrificados. El resultado obtenido es el espesor de la oreja después de 24 h de ser sustraído con el espesor de oreja a t=0.

[0048] Las vacunaciones consistían en inyecciones i. c. (intracutánea) de 100 µl de una mezcla 1: 1 de solución antigénica y adyuvante Stimune (Specol, Cedi-diagnostics BV, Lelystad, Países Bajos). La solución antigénica fue una dilución 1: 100 de Influvac 2002/2003 (Solvay Pharmaceuticals, Weesp, el Países Bajos) en PBS. Influvac es una vacuna trivalente de proteína, que contiene 3x3011 g/ml de hemaglutinina de tres cepas diferentes de gripe. Para las respuestas DTH, los ratones fueron inyectados i. c. con 25 µl de Influvac dializado en ambas orejas como desafío DTH.

50 Resultados:

[0049] Las dietas que contienen una combinación de un 1 % en peso de BGOS A indujeron un aumento estadísticamente significativo del 100 % en la respuesta DTH (véase tabla 1). BGOS B también indujo un aumento estadísticamente significativo del 112 % en la respuesta DTH. Sorprendentemente una combinación de BGOS A y B mostró el mayor aumento de respuesta de 192%.

[0050] Estos resultados son indicativos de otro efecto mejorado, proporcionado por la administración de BGOS A y BGOS B en el aumento de respuesta de Th1

## ES 2 431 936 T3

Tabla 1: Respuesta DTH

Grupo:	DTH medio $\mu\text{m}$ (S.E.)	$\Delta$ DTH $\mu\text{m}$	DTH relativo
Simulado	24. 3 (0.6)	0	0
Placebo	66. 5 (0.3)	42.2	1.00
Grupo a BGOS A	108,9 (0,3)*	84.6	2.00
Grupo b BGOS B	113,6 (0,3)*	89.3	2.12
Grupo c BGOS A + B	147,6 (0,2)*a à	123.2	2.92
* p < 0,05 comparado con placebo			
a p < 0.05 comparado con grupo a y b			

5

[0051] Los resultados de este experimento son una indicación de que la presente invención puede utilizarse ventajosamente como apoyo en la respuesta de vacunación. Los resultados de este experimento son también una indicación de que esto se puede utilizar ventajosamente en sujetos con una respuesta de Th1 baja, en particular bebés. Los resultados de este experimento son también una indicación de que esto puede usarse ventajosamente en sujetos con una respuesta de Th1 baja, en particular personas mayores que sufren o tienen riesgo de sufrir inmunosenescencia, pacientes de VIH, pacientes de SIDA y/o pacientes con cáncer que están o han sido sometidos a quimioterapia y/o radiación o que son caquéticos, pacientes que sufren COPD y/o pacientes que sufren diabetes. Este modelo es indicativo de cambios inmunológicos básicos, que pueden ser beneficiosos en todos los trastornos con un mal funcionamiento del sistema inmunológico. Es conocido que bebés, personas mayores, personas infectadas con VIH, pacientes con cáncer, pacientes con COPD y/o pacientes con diabetes tienen un sistema inmunológico que no funciona a capacidad completa. Para todos los anteriores es una ayuda adicional posiblemente beneficiosa.

10

15

### Ejemplo 2: fórmula de leche infantil

20

[0052] Una fórmula infantil fue preparada usando como ingredientes leche desnatada, proteína de lactosuero, lactosa, grasa vegetal, minerales, vitaminas y oligoelementos como se conoce en la técnica. Como fuente de BGOS B se utilizó una preparación obtenida tras la incubación de lactosa con cepa *S. thermophilus* CNCM I-1620 en un método como se describe en el documento FR2723960 ejemplo 4 y también se describe en el ejemplo 1. La concentración final en base al peso en seco de la fórmula infantil de composición total fue 5.4 % en peso. Como fuente de BGOS se utilizó un Vivinal GOS. Adicionalmente se utilizaron fructooligosacáridos (Raftilin CV). Los ingredientes fueron pasteurizados, mezclados, homogeneizados, esterilizados y secados con pulverización hasta conseguir un polvo como se conoce en la técnica.

25

[0053] La composición final de la fórmula infantil después de la reconstitución como una fórmula preparada para la bebida comprende por 100 ml:

30

- 68 kcal
- 1,45 g de proteína (caseína y proteína de lactosuero de leche; parcialmente hidrolizada)
- 8,6 g de carbohidratos digeribles (principalmente lactosa y maltodextrina)
- 3,1 g grasas (grasas principalmente vegetales)
- 0,8 g que comprenden oligosacáridos no digeribles

35

- o de los cuales 0,08 g fructooligosacáridos (fuente raftininHP)
- o de los cuales 0,22 g de oligosacáridos no digeribles formados por la cepa *S. thermophilus* (aproximadamente 73 % en peso BGOSB, 07, 3 % en peso BGOS A y el resto de disacáridos no digeribles Gal-Glu)
- o de los cuales 0,5 g oligosacáridos no digeribles como presentes en Vivinal GOS (al menos un 67 % en peso BGOSA, el resto principalmente disacáridos no digeribles Gal-Glu)

40

Oligoelementos, minerales, vitaminas y otros micronutrientes (taurina, colina, inositol, nucleótidos, carnitina) como se conoce en la técnica.

45

**REIVINDICACIONES**

1. Composición nutricional que comprende al menos dos beta-galacto-oligosacáridos diferentes A y B donde
- 5 a) A tiene la estructura de Gal<sub>n</sub>-Glu y/o Cal<sub>m</sub>, con n = 2 a 6 y m = 2 a 7 y comprende al menos un 80 % de la suma de los enlaces beta 1,4 y beta 1,6 entre dos residuos de galactosa, en base al número total de enlaces entre residuos de galactosa, y
- b) B tiene la estructura de Gal<sub>n</sub>-Glu y/o Gal<sub>m</sub>, con n = 2 a 6 y m = 2 a 7 y comprende al menos un 80 % de los enlaces beta 1,3 entre dos residuos de galactosa, en base a los enlaces totales y
- 10 c) la proporción en peso entre A y B es de 1 a 5.
2. Composición según la reivindicación 1 que comprende al menos un 1 % en peso de la suma de beta-galacto-oligosacáridos A y B en base al peso en seco.
- 15 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además fructo-oligosacáridos.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende de un 5 a un 50 % de proteínas, de un 15 a un 85 % de carbohidratos y de un 5 a un 50 % de lípidos considerados en calorías.
- 20 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además *Bifidobacterium breve* viva o inactivada.
6. Composición según la reivindicación 5 que comprende de 10<sup>3</sup> a 10<sup>13</sup> cfu de *B. Breve* o en caso de *B. breve* no viable de 10<sup>3</sup> a 10<sup>13</sup> equivalencia de cfu por gramo de peso en seco de la presente composición.
- 25 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para el uso en la alimentación de un bebé.
8. Composición para el uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad, donde la composición es una composición nutricional que comprende al menos dos beta-galacto-oligosacáridos diferentes A y B donde
- 30 a) A tiene la estructura de Gal<sub>n</sub>-Glu y/o Gal<sub>m</sub>, con n = 2 a 6 y m = 2 a 7 y comprende al menos un 80 % de la suma de enlaces beta 1,4 y beta 1,6 entre dos residuos de galactosa, en base al número total de enlaces entre residuos de galactosa, y
- b) B tiene la estructura de Gal<sub>n</sub>-Glu y/o Gal<sub>m</sub>, con n = 2 a 6 y m = 2 a 7 y comprende al menos un 80 % de enlaces beta 1,3 entre dos residuos de galactosa, en base a los enlaces totales y
- 35 c) la proporción en peso entre A y B es de 1 a 5.
9. Composición para el uso según la reivindicación 8, que es para el uso en la estimulación del sistema inmunológico.
- 40 10. Composición para el uso según la reivindicación 8 o 9, que es para el uso en el aumento de la respuesta de la vacunación.
11. Composición para el uso según la reivindicación 8, donde la enfermedad es seleccionada del grupo que consiste en asma, alergia, dermatitis atópica, conjuntivitis alérgica, alergia a los ácaros de polvo, urticaria y rinitis alérgica.
- 45 12. Composición para el uso según la reivindicación 8, donde la enfermedad es seleccionada del grupo que consiste en infecciones, diarrea, e inflamación intestinal.
13. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 12, que es para el uso en
- 50 - mejora del sistema inmunológico, dicha mejora siendo seleccionada del grupo que consiste en aumento de la respuesta de Th1, aumento del equilibrio de Th1/Th2, y disminución de la respuesta de Th2,
- tratamiento y/o prevención de la inmunosenescencia en seres humanos ancianos,
- pacientes de VIH y/o de SIDA,
- 55 - pacientes con cáncer, en particular pacientes con cáncer que están o han sido sometidos a quimioterapia y/o radiación y pacientes con cáncer que son caquéticos,
- pacientes que padecen enfermedad pulmonar obstructiva crónica y/o
- pacientes que padecen diabetes.
- 60 14. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 13, que es para el uso en la mejora de la microbiota intestinal mediante el aumento de la cantidad y/o actividad de bacterias productoras de ácido láctico.