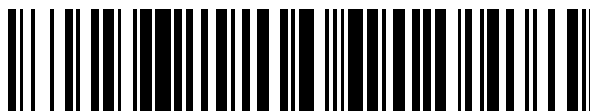


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 621**

51 Int. Cl.:

A23L 1/29 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23L 1/308 (2006.01)

A61K 31/702 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2007 E 07715912 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1993577**

54 Título: **Uso de sacáridos no digeribles para dar a un bebé el mejor comienzo después del nacimiento**

30 Prioridad:

10.03.2006 EP 06110973

20.04.2006 EP 06112822

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

12.05.2014

73 Titular/es:

**N.V. NUTRICIA (100.0%)
EERSTE STATIONSSTRAAT 186
2712 HM ZOETERMEER, NL**

72 Inventor/es:

**BEERMANN, CHRISTOPHER;
KNOL, JAN;
ALLES, MARTINE SANDRA;
STAHL, BERND y
BOEHM, GÜNTHER**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 459 621 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

Uso de sacáridos no digeribles para dar a un bebé el mejor comienzo después del nacimiento

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a una composición para estimular la salud de un bebé, administrando la composición a una mujer embarazada.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Para la madre es particularmente importante que el bebé se desarrolle bien durante el embarazo y obtenga un inicio óptimo cuando nace. Por lo tanto, mujeres embarazadas frecuentemente ingieren composiciones nutricionales que tiene como objetivo mejorar el crecimiento y desarrollo del niño no nacido.

15

[0003] Una cadena larga de ácidos grasos poliinsaturados (LC-PUFA) han sido descritos, para estimular el desarrollo cerebral del niño no nacido. Por esta razón, mujeres embarazadas (y en periodo de lactancia) ingieren composiciones nutricionales con LC-PUFA. EP705539 describe tal composición.

20

[0004] EP1296694 se refiere a profilaxis de alergias, y se refiere específicamente a la prevención primaria de enfermedades atópicas por la administración de bacterias probióticas, microbios beneficiosos presentes en una flora intestinal saludable, antes y después del nacimiento a niños de alto riesgo de enfermedades atópicas.

25

[0005] W02006113035 divulga el uso de Lactobacillus GG opcionalmente combinado con un prebiótico para evitar o tratar el desarrollo de alergias respiratorias por la administración posnatal y/o prenatal.

30

[0006] EP1597978 se refiere a composiciones nutricionales para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales o enfermedades de intestino irritable pero también para el tratamiento de alergias. EP1597978 divulga una composición de galactooligosacáridos y polifruetosa.

Resumen de la invención

35

[0007] Los inventores han descubierto, que la administración de un sacárido hidrosoluble no digerible a mujeres embarazadas mejora el sistema inmunológico del bebé no nacido. Se descubrió, que el niño no nacido tiene una expresión mejorada de los receptores CD14, y TLR 2 como presente en la membrana de enterocitos y monocitos.

40

[0008] Adicionalmente, se descubrió que el desarrollo de la flora intestinal del bebé alumbrado por una madre que ha ingerido el presente sacárido, es mejor en comparación con el desarrollo de la flora intestinal de un bebé alumbrado por una madre que no ha ingerido el presente sacárido.

45

[0009] Los inventores han descubierto, que el desarrollo de la flora intestinal del bebé mejora como resultado de una flora vaginal y/o intestinal mejorada de la madre que ingiere el presente sacárido. Después de la ingestión del presente sacárido, el crecimiento de las bifidobacterias y los lactobacilos en el tracto gastrointestinal de la madre es estimulado. Posteriormente, por la colonización cruzada, la flora vaginal de la madre es también mejorada a un contenido alto y una diversidad de las bifidobacterias y los lactobacilos. Durante el nacimiento, el intestino neonatal se inocula primero por una microflora intestinal y vaginal materna. Por lo tanto, una flora intestinal y vaginal ventajosa de la madre produce una flora mejorada del bebé en el primer periodo de vida.

50

[0010] Como resultado del sistema inmunológico estimulado y una flora intestinal óptima dominada por Ips géneros bifidobacteria y Lactobacillus el bebé ha reducido las posibilidades de desarrollar trastornos inmunológicos relacionados, tales como enfermedades atópicas, pero también trastornos gastrointestinales, tales como infecciones, inflamación intestinal, diarrea o estreñimiento.

55

[0011] En otro aspecto se descubrió sorprendentemente que la administración de este sacárido no digerible, afectaba beneficiosamente el sistema inmunológico de los bebés. Se descubrió que el sistema inmunológico del niño antes del alumbramiento, se prepara hacia una respuesta de Th1 más rápida después del nacimiento. Como resultado de ello las posibilidades de desarrollar trastornos inmunológicos relacionados, tales como enfermedades atópicas, son aún más reducidas.

60

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS

[0012] La presente invención proporciona el uso de un sacárido hidrosoluble no digerible, para la producción de una composición para

65

- i) mejorar el desarrollo de la flora intestinal de un bebé después del nacimiento;
- ii) fortalecer el sistema inmunológico de un bebé antes del nacimiento; y/o;

iii) fortalecer el sistema inmunológico y/o prevenir trastornos relacionado con el sistema inmunológico del bebé después del nacimiento;

donde la composición se administra a una mujer embarazada de dicho bebé con la condición de que la composición no comprenda *Lactobacillus G G*.

Sacárido hidrosoluble no digerible

[0013] La composición usada en el presente método comprende sacáridos hidrosolubles no digeribles. El término "no-digerible" como se usa en la presente invención se refiere a sacáridos que no son digeridos en el intestino por la acción de ácidos o enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo superior humano (intestino delgado y estómago), pero que son fermentados por la flora intestinal humana. Mono- y disacáridos tal como glucosa, galactosa, fructosa, sacarosa y lactosa son digeribles. El término "fermentable" como se utiliza en este caso se refiere a la capacidad de someterse a la conversión por microorganismos en la parte inferior del tracto gastrointestinal (p. ej. colon) en moléculas más pequeñas, en particular ácidos grasos de cadena corta y lactato. El presente sacárido es hidrosoluble, que se puede determinar con el método descrito por L. Prosky et al, J. Assoc. Anal. Chem 71: 1017-1023, 1988.

[0014] Los presentes sacáridos preferiblemente tienen un grado de polimerización (DP) de al menos 2 y preferiblemente menos de 100 unidades monosacáridas, preferiblemente menos de 60, incluso más preferiblemente menos de 40, de la forma más preferible menos de 10. Preferiblemente, el presente sacárido hidrosoluble, no digerible es un sacárido que comprende galactosa. Un sacárido con un grado relativamente-bajo de polimerización tiene una fermentabilidad mejorada por lactobacilos y/o bifidobacterias y además no tiene la desventaja tecnológica de aumentar la viscosidad.

Galactosa no digerible, hidrosoluble, que comprende sacáridos

[0015] El presente sacárido es preferiblemente una galactosa hidrosoluble no digerible, que contiene sacáridos (de ahora en adelante designada "GAL-oligo"), que preferiblemente comprende al menos 50% de unidades de galactosa basadas en el número total de unidades monosacáridas del sacárido. GAL-oligo tiene un efecto bifidogénico mejorado en comparación con otros sacáridos hidrosolubles no digeribles. La leche materna también comprende una concentración alta de GAL-oligo y bebés que se alimentan de leche materna tienen una flora intestinal más rica en bifidobacterias que bebés que se alimentan de una fórmula de leche para bebés estándar. Preferiblemente el presente GAL-oligo contiene al menos 60% unidades de galactosa basadas en el número total de unidades monosacáridas presentes en el sacárido, más preferiblemente, al menos 65%.

[0016] El presente GAL-oligo comprende preferiblemente al menos dos unidades de sacáridos terminales, donde al menos una unidad de sacárido terminal es seleccionada del grupo que consiste en glucosa y la galactosa; y al menos una unidad de sacárido terminal es seleccionada del grupo que consiste en galactosa y fucosa. Preferiblemente al menos 75% de los sacáridos del GAL-oligo son β -enlazados, preferiblemente 100%.

[0017] El término "terminal sacárido" se refiere a un sacárido que se liga a otra unidad de sacárido (p. ej. galactosa, glucosa, fructosa o fucosa). El presente GAL-oligo contiene preferiblemente no más de 4 sacáridos terminales, preferiblemente no más de 2. En una forma de realización preferida, el GAL-oligo comprende al menos una galactosa terminal y una selección de al menos glucosa terminal y al menos una fucosa terminal. Incluso más preferiblemente, el presente GAL-oligo comprende al menos una galactosa terminal y al menos una glucosa terminal. Preferiblemente el presente Gal-oligo contiene 2 unidades de sacáridos terminales y tiene un grado de polimerización (DP) de 2 a 60.

[0018] Preferiblemente el GAL-oligo es seleccionado del grupo que consiste en transgalactooligosacáridos, galactooligosacáridos, lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (neo-LNT), fucosil-lactosa, LNT fucosilada y neo-LNT fucosilado. Preferiblemente el GAL-oligo es sialilado. Preferiblemente el GAL-oligo es seleccionado del grupo que consiste en sialilactosa, sialilfucosilactosa, sialilactosamina y sialil-LNT y sialil-neo-LNT, más preferiblemente sialilactosa. En una forma de realización particularmente preferida el presente método comprende la administración de transgalactooligosacáridos ([galactosa]_n-glucosa; donde n es un número entero entre 1 y 60, es decir 2, 3, 4, 5, 6, ..., 59,60; preferiblemente n es seleccionado de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10). Preferiblemente los sacáridos de los transgalactooligosacáridos son β -enlazados. Transgalactooligosacáridos (TOS) están por ejemplo presentes en una composición que se ha vendido bajo la marca registrada Vivinal™ (Borculo Domo Ingredients, Países Bajos). Otras fuentes adecuadas de TOS son Cup- oligo y Bi² muno.

Diferentes hidrosacáridos no digeribles

[0019] Para conseguir un efecto aún mejor con relación a la flora intestinal y/o (la mejora) del sistema inmunológico del bebé, la presente composición preferiblemente comprende dos sacáridos hidrosolubles diferentes no digeribles, que difieren entre sí en la estructura. Cada sacárido no digerible hidrosoluble es fermentado por diferentes especies de microorganismos en la flora vaginal y/o intestinal y/o en una ubicación diferente en el tracto intestinal, dando como resultado una flora mejorada y una mayor diversidad de bacterias.

[0020] La presente invención proporciona una composición que preferiblemente comprende un sacárido A hidrosoluble no digerible y un sacárido B hidrosoluble no digerible. Sacárido A y sacárido B tienen diferentes enlaces glicosídicos, un grado diferente de polimerización y/o una composición monosacárida diferente. Preferiblemente, el sacárido A es un GAL-oligo.

[0021] Según una forma de realización preferida de la presente invención, el porcentaje de al menos una unidad de monosacárido seleccionado del grupo que consiste en glucosa, fructosa y galactosa en el sacárido A es de al menos 40% mayor al porcentaje de la misma unidad de monosacárido en el sacárido B, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 75%, incluso más preferiblemente al menos 90%. Una diversidad aumentada de unidades monosacáridas estimula una población más amplia de bacterias intestinales (beneficiosas), dando como resultado una flora mejorada. El porcentaje de una unidad monosacárida en el sacárido puede ser simplemente calculado dividiendo el número de las unidades de monosacárido respectivas (p. ej. glucosa) presente en el sacárido entre el número total de las unidades de monosacárido presentes en este sacárido.

[0022], Preferiblemente los sacáridos hidrosolubles no digeribles 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 la forma más preferible al menos 98 % en peso del peso acumulativo del sacárido A y B hidrosoluble, no digerible tiene un grado de polimerización (DP) debajo de 100, más preferiblemente debajo de 60, de la forma más preferible debajo de 40. El inferior DP reduce ventajosamente la viscosidad y aumenta la fermentabilidad de los sacáridos no digeribles. Preferiblemente, al menos 50 % en peso, más preferiblemente al menos 75 % en peso del peso acumulativo de los sacáridos A y B, hidrosolubles no digeribles tienen un DP de 2 a 8. Usando una mezcla con un porcentaje de peso alto de sacáridos con un bajo DP la fermentabilidad y el efecto estimulador en el crecimiento de las bacterias del ácido láctico y bifidobacteria será aumentada.

[0023] Según una forma de realización preferida de la presente invención, el DP del sacárido A soluble en agua no digerible es al menos 5 unidades de monosacárido inferior al DP del sacárido B hidrosoluble no digerible, preferiblemente al menos 10, incluso más preferiblemente al menos 15. Incluir un sacárido con un grado aumentado de polimerización reduce la carga osmótica, y produce una fermentación prolongada a lo largo del colon, mejorando así la estimulación de bacterias beneficiosas también en partes más distales del colon. Preferiblemente, el sacárido A hidrosoluble no digerible tiene un DP de 2-10, más preferiblemente 2-8. Preferiblemente, el sacárido B hidrosoluble agua no digerible tiene DP de 11-100. Los sacáridos A y B hidrosolubles, no digeribles con un diferente DP pueden tener el mismo o una composición monosacárida ligeramente diferente, preferiblemente diferentes composiciones de monosacáridos.

[0024] En una forma de realización preferida de la presente invención el porcentaje de al menos un enlace glicosídico de un sacárido A hidrosoluble no digerible basado en enlaces glicosídicos totales presentes en sacárido A es al menos 40% mayor que el porcentaje del mismo enlace glicosídico en sacárido B hidrosoluble no digerible, 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 unidades de monosacárido cíclicas por la eliminación de agua. Una diversidad aumentada en enlaces glicosídicos estimula una gama mas amplia de bacterias beneficiosas. Los enlaces glicosídicos difieren en que de manera covalente enlazan átomos de carbono en las unidades de monosacárido en posiciones diferentemente numeradas, y/o que estos forman enlaces α o β . Ejemplos de diferentes enlaces glicosídicos que tienen lugar en sacáridos hidrosolubles, no digeribles son enlaces β (1,3), α (1,4), β (2,1), α (1,2), y β (1,4). Preferiblemente los enlaces glicosídicos en sacárido A hidrosoluble, no digerible comprenden al menos 40% de enlaces glicosídicos β (1,4), más preferiblemente al menos 75%. Los enlaces glicosídicos en sacárido B hidrosoluble, no digerible comprenden preferiblemente al menos 40% de enlaces glicosídicos β (2,1) , más preferiblemente al menos 75%.

[0025] En una forma de realización preferida la presente composición contiene una combinación de Gal-oligo y un sacárido hidrosoluble no digerible seleccionado del grupo que consiste en fructopolisacáridos (tal como inulina), más preferiblemente una combinación de GAL-oligo que tiene un DP entre 2 y 10 y un sacárido hidrosoluble no digerible seleccionado del grupo que consiste en fructopolisacáridos y fiuctooligosaccharidos, de la forma más preferible una combinación de transgalactooligosacáridos e inulina.

[0026] Preferiblemente el Sacárido A y un Sacárido B están en una proporción en peso de 3/97 a 97/3, más preferiblemente 5/95 a 95/5. Tener ambos sacáridos A y B presentes en una proporción relativa suficiente, tendrá un mejor efecto en la flora. De la forma más preferible la proporción en peso del Sacárido A a B es 2/3 a 95/5. Un exceso ligero del sacárido A, que es preferiblemente un GAL- oligo y/o un oligosacárido, se prefiere aún más porque este tendrá un mejor efecto en la flora.

Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA)

[0027] Preferiblemente, la presente composición comprende adicionalmente ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y/o cadenas de acilo de grasas poliinsaturadas de cadena larga (LC-PUFA). El término LC-PUFA en la presente invención se refiere a un ácido graso o cadena de acilo graso con una longitud de 20 carbonos o más y al menos dos enlaces insaturados. Preferiblemente, la composición comprende un LC-PUFA seleccionado del grupo que consiste en

- ácidos eicosapentaenoicos y/o cadena de acilo (EPA), ácido docosahexaenoico y/o cadena de acilo (DHA) y ácido araquidónico y/o cadena de acilo (AA). En una forma de realización la composición comprende DHA. En otra forma de realización la composición comprende AA. Más preferiblemente la composición comprende DHA y AA. LC-PUFA refuerzan ventajosamente el sistema inmunológico del bebé por nacer. Por lo tanto, la administración de una composición que comprende tanto un oligosacárido hidrosoluble no digerible y LC-PUFA a una mujer embarazada tendrá un efecto mejorado en el sistema inmunológico del bebé en comparación con el sacárido hidrosoluble, no digerible.
- [0028] La proporción en peso EPA/DHA es preferiblemente 1 o inferior más preferiblemente inferior a 0,5. Los LC-PUFA se pueden proporcionar como ácidos grasos libres, en la forma de triglicéridos, en la forma de fosfolípido, o como una mezcla de uno de más de los anteriores. La presente composición preferiblemente comprende al menos uno de AA y DHA en la forma de fosfolípido. Preferiblemente la proporción en peso DHA para AA es entre 0.1 y 20, más preferiblemente entre 0.5 y 5.
- [0029] Preferiblemente la composición comprende de 50 a 3000 mg LC-PUFA por dosis diaria, más preferiblemente de 100 a 1500 mg, de la forma más preferible 200 a 500 mg.

Otros componentes

- [0030] En una forma de realización preferida la composición adicionalmente comprende probióticos. Probióticos en la presente invención se refieren a microorganismos, que con la administración ejercen un efecto beneficioso en el huésped. Los probióticos tienen efectos beneficiosos en la flora intestinal, flora vaginal y/o el sistema inmunológico de mujeres embarazadas y su bebé por nacer, por lo tanto la combinación de un sacárido hidrosoluble, no digerible y probióticos tendrán un efecto superior en la flora intestinal y/o sistema inmunológico de ambos. Preferiblemente, los probióticos son seleccionados del grupo que consiste en el *Lactobacillus* y la *Bifidobacterium*. Más preferiblemente, el probiótico es seleccionado del grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus* group, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *Bifidobacterium infantis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. breve*, *B. longum*, y *B. bifidum*. Incluso más preferiblemente, los probióticos son *L. paracasei* y/o *B. breve*, puesto que la administración de sacárido hidrosoluble no digerible estimula la mayoría de las especies de poblaciones de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en la misma medida, pero estimula *B. breve* y *L. paracasei* en menor medida. Puesta que las bifidobacterias son más dominantes en la flora intestinal de los bebés que los lactobacilos, *B. breve* son las más preferidas. Preferiblemente, los probióticos están presentes en una dosis diaria de 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) a 1×10^{13} (ufc), más preferiblemente 1×10^7 a 1×10^{11} , de la forma más preferible 1×10^8 a 1×10^{10} de cada probiótico diferente.
- [0031] La composición comprende adicionalmente vitaminas y minerales beneficiosos para mujeres embarazadas. Frecuentemente, suplementos que comprenden vitaminas y minerales son ingeridos por mujeres embarazadas para su beneficio o el del feto. La inclusión de estas vitaminas y minerales en la presente composición reduce convenientemente la cantidad de composiciones que se deben tomar por mujeres embarazadas. Preferiblemente, la composición comprende al menos un componente, más preferiblemente al menos tres componentes, de la forma más preferible al menos seis componentes seleccionados del grupo que consiste en ácido fólico, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina A, vitamina D, hierro, zinc, y yodo. Preferiblemente, estos componentes están presentes en una dosis diaria de 25 a 100 % de la cantidad diaria recomendada (RDA), más preferiblemente entre 45 a 100 %. Preferiblemente la vitamina A se suministra como β -caroteno.

La composición

- [0032] La composición comprende el sacárido hidrosoluble, no digerible que se puede administrar a las mujeres embarazadas en forma de una barra, una cápsula, una pastilla, un líquido, o un polvo.
- [0033] Preferiblemente, la composición es un líquido a base de leche, que comprende grasas, proteínas y carbohidratos digeribles. Preferiblemente el contenido de grasa del líquido a base de leche es inferior a 2 g/l con el de mantener baja la cantidad de calorías por ser consumidas. Preferiblemente este líquido a base de leche se envasa en una botella o tetrabrik con un volumen de 50 a 1000 ml, más preferiblemente de 60 a 500, de la forma más preferible de 75 a 125 ml. Preferiblemente, la composición es una barra, es decir una composición sólida, masticable con una actividad de agua debajo de 0,8, preferiblemente debajo de 0,65. Preferiblemente, la composición es un polvo, envasado en el sobre que comprende de 1 a 10 g, más preferiblemente 1,5 a 7 g, de la forma más preferible 2 a 5 g.

Dosis

- [0034] En el presente método, preferiblemente el presente sacárido se administra a las mujeres embarazadas en una cantidad entre 0,5 y 50 g al día, preferiblemente entre 3 y 25 g al día de la forma más preferible entre 6 y 12 g al día. Preferiblemente, esta dosis diaria se administra en una ración al día. Preferiblemente, esta dosis diaria se divide en 2 o 3 o 4 raciones, que son consumidos 2,3 o 4 veces al día, respectivamente.
- [0035] Preferiblemente, la composición se administra a las mujeres embarazadas al menos 2 semanas antes de la fecha prevista para el parto, más preferiblemente al menos 6 semanas, de la forma más preferible al menos 12 semanas.

Aplicaciones

[0036] Dependiendo de la jurisdicción debe entenderse que en la parte a continuación donde se menciona un método de un tratamiento determinado, dicho método comprende una administración de una cantidad eficaz de una composición como se ha descrito anteriormente o administrar una cantidad eficaz de al menos un sacárido hidrosoluble no digerible a una embarazada, este también se refiere al uso de al menos un sacárido hidrosoluble no digerible para la preparación de una composición para dicho fin. Ambas maneras de poner la presente invención en palabras están también cubierto por la redacción como la presente composición que se usa para un fin determinado o la administración de la presente composición se usa para un fin determinado.

[0037] Es provisto un método para mejorar la flora intestinal y/o el sistema inmunológico de un bebé, comprendiendo dicho método una administración de la composición de la presente invención, es decir una composición que comprende sacáridos hidrosolubles no digeribles, a una mujer embarazada de dicho bebé.

[0038] En una forma de realización el sistema inmunológico del bebé es reforzado. Reforzar el sistema inmunológico en la presente invención se refiere a mejorar, estimular y/o reforzar el sistema inmunológico. Preferiblemente la mejora, la estimulación y/o el refuerzo es con respecto a un grupo de control, que en el contexto de esta invención significa respecto a una embarazada que no ha ingerido un sacárido hidrosoluble no digerible. Los inventores observaron que la administración de un sacárido hidrosoluble no digerible condujo al sistema inmunológico neonatal hacia una respuesta Th1 y/o mejoró el equilibrio Th1/Th2. Se descubrió que antes del parto el sistema inmunológico del niño no nacido se prepara por refuerzo de los receptores CD14 y TLR 2.

[0039] En una forma de realización, la administración de un sacárido hidrosoluble no digerible a mujeres embarazadas se usa para evitar el inicio de enfermedades atópicas en el bebé. En una forma de realización la composición se administra a mujeres embarazadas para prevenir la frecuencia y/o reducir la gravedad de alergia (es decir. alergia alimenticia), eczema (es decir. dermatitis atópica), asma, rinitis, fiebre de heno, rinoconjuntivitis, y/o sibilancia en el bebé, de la forma más preferible alergénico y/o dermatitis atópica. EL eczema, es decir, dermatitis atópica, se caracteriza por una piel seca y/o roja y/o pruriginosa.

[0040] En una forma de realización la administración del sacárido hidrosoluble no digerible a las mujeres embarazadas, se utiliza para mejorar la flora intestinal del bebé. La administración de la presente composición es en una forma de realización usada para el aumento del porcentaje de bifidobacteriana y/o lactobacilos en el colon y/o heces basada en bacterias totales presentes en la flora y/o heces del bebé después del nacimiento. Una flora rica en bifidobacterias y/o lactobacilos fortalece el sistema inmunológico del bebé y mejora la salud gastrointestinal. Una salud gastrointestinal mejorada se refiere a una frecuencia reducida de infecciones gastrointestinales, un duración más corta de infecciones intestinales, una frecuencia y gravedad reducidas de inflamación gastrointestinal, una frecuencia y/o gravedad reducida de diarrea, estreñimiento reducido, o calambres reducidos en comparación con la salud gastrointestinal de un bebé cuya madre durante el embarazo no ingiere la presente composición que comprende un sacárido hidrosoluble digerible. Fortalecer o fortalecido y mejorar o mejorado en el contexto de esta invención es con respecto a un bebé cuya madre durante el embarazo no ha ingerido la presente composición que comprende un sacárido hidrosoluble, no digerible o con respecto a una embarazada que no ha ingerido la presente composición que comprende un sacárido hidrosoluble, no digerible. Un sistema inmunológico reforzado tendrá un efecto preventivo en enfermedades atópicas y/o infecciones respiratorias. En una forma de realización la administración de la presente composición a una mujer embarazada se utiliza para prevenir y/o reducir la gravedad de trastornos seleccionados del grupo que consiste en alergia (es decir. alergia alimentaria), eczema (es decir dermatitis atópica), asma, rinitis, fiebre de heno, rinoconjuntivitis, sibilancia, infecciones intestinales, infecciones vaginales, infecciones respiratorias, diarrea, estreñimiento, calambres e inflamación intestinal en el bebé después del nacimiento. En una forma de realización la administración de la presente composición a una mujer embarazada se utiliza para prevenir trastornos seleccionados del grupo que consiste en infecciones intestinales, infecciones respiratorias, diarrea, estreñimiento, calambres y/o inflamación intestinal del bebé después del nacimiento.

[0041] Los paquetes que comprenden la presente composición según la invención con un texto declarando que después del consumo de la composición una embarazada le dará a su bebé el mejor comienzo después de nacer, por ejemplo con relación a la colonización intestinal, la flora intestinal, la composición de la flora y/o el sistema inmunológico, por ejemplo, defensa inmunológica o el refuerzo o la inmunidad fortalecida, mejorada o reforzada, también se encuentran comprendidos.

EjemplosEjemplo 1 prueba clínica

[0042] Un estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo fue realizado con un diseño de grupo paralelo que fue realizado con un total de 33 voluntarias embarazadas sanas. Ellas recibieron o bien el suplemento experimental o un placebo desde la semana 25 de gestación hasta el parto. El suplemento experimental estaba basado en oligosacáridos no digeribles, y comprendía 3 g de GOS (de Vivinal GOS, Borculo Domo, Países Bajos) más inulina

(RaftilinHP, Orafti, Bélgica), en una proporción 9:1 peso/peso y 3 g de maltodextrina digerible. Este suplemento fue tomado 3 veces al día. El suplemento de control estaba compuesto de 6 g de maltodextrina digerible.

[0043] Una muestra de deposición fue tomada antes de la primera suplementación, a la semana 25 de gestación. Una segunda muestra de deposición fue tomada durante la última visita de hospital de rutina estandarizada antes del parto. En el parto, se obtuvo una muestra de sangre de cordón de la vena umbilical placentaria. El día 5, día 20 y el mes 6 después del parto fueron obtenidas muestras de deposición de los neonatos.

[0044] La flora microbiana de las muestras de deposición neonatal y materna fueron analizadas por FISH y PCR en tiempo real. La sangre de cordón (CB) fue caracterizada fenotípicamente utilizando análisis FACS y ensayos de estimulación in vitro con mitógenos y alérgenos.

[0045] Los siguientes parámetros fueron medidos utilizando métodos conocidos en la técnica:

a) respuesta inmune innata

Las células NKT, la frecuencia de los receptores de células T monoclonales (es decir región N homogénea de Va24JaQ TCR, la cuantificación de los receptores como una herramienta que expresa las células (TLR2, TLR4); recuento de granulocitos. Actividad de las células NK

b) respuesta inmune adaptativa

Subconjuntos de linfocitos eran por citometría de cuatro colores. La caracterización de la citocina mRNA relacionada con TH1/TH2 y los modelos de receptores de quimiocina (TNF- α , INF- γ , IL-4, IL-8; IL10; IL-12; IL-13, TGF β , CD25, CD45RA, CD45RO, CTLA-4, CCR3, CCR4, CCR5; CXCR3) en células no estimuladas fueron determinados en RT PCR en tiempo real y después de la estimulación de sangre completa con ConA / PHA y LPS ex vivo. Se determinaron análisis de la proporción de producción de citocina-TH1/TH2 dentro de subconjuntos de células T CD4⁺ y CD8⁺.

[0046] Muestras de sangre corticales de la placenta fueron obtenidas de 28 partos y se estimularon con Concanavalina (ConA) / (PHA), lipopolisacárida (LPS), enterotoxina estafilocócica B (SEB), β -lactoglobulina (BLG), principal alérgeno de ácaro en polvo doméstico de *Dermatophagoides pteronissinus* (Der p1), ovalbúmina (ovarios), durante 24 h.

[0047] Linfocitos T de CB (50 μ L muestras de sangre entera) fueron manchados con FITC-, PE-, PC5-, o anticuerpos monoclonales apropiadamente diluidos marcados de APC contra CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CD25; CD69, CCR4, CCR5; CD14, CCR1, CCR2, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CRT2 humanos y controles isotipos apropiados. Después de la coloración, se lisaron los eritrocitos contaminantes. Los porcentajes de los receptores de quimiocina (CKR⁺) y de CKR⁺CD45RA⁺ que expresan linfocitos dentro de la población del CD4⁺ T auxiliar (Th), y los porcentajes de CKR⁺ que expresan las células que se expresan las células dentro de la población CD4⁺ CD45RA⁺ fueron analizados. El mismo procedimiento de análisis fue realizado en el CD8⁺ T citotóxico (Tc) y CD8⁺ CD45RA⁺ y poblaciones de linfocitos CD8⁺CD45RA⁺. Para CXCR4 se determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI). Se determinó la expresión de CD4⁺ CD25^{alta} en las células reguladoras T.

Ensayo entero de estimulación de CB

[0048] CB heparinizada fue diluida de 1 a 5 en RPMI-1640.

Partes alícuotas de 1 mL de CB diluida fueron estimuladas con concavalina A (con A 50 μ g/mL), beta-lactoglobulina (100 μ g/mL BLG), ovalbúmina (100 μ g/mL ovarios), lipopolisacárido (0.1 μ g/mL LPS), enterotoxina estafilocócica B (0.1 μ g/mL SEB), *Dermatophagoides pteronissinus* (10 μ g/mL Der p1) o solo medio en una placa de cultivo de 24 pocillos. Las células fueron incubadas a 37 °C en un 5% en una atmósfera de CO₂ durante 24 h o 48 h y sobrenadantes fueron almacenados a - 80 °C para un análisis de citocina.

Colección Multiplex

[0049] Las citocinas fueron cuantificadas en los sobrenadantes de cultivo con un ensayo de flujo multiplex humano, basado en partículas, citométrico. Concentraciones de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4; IL-10, GM-CSF, G-CSF en los sobrenadantes fueron directamente medidas sin otra dilución. Para determinar IL-6, IL-8, MCP-1 y MIP-1 β los sobrenadantes fueron diluidos 1:10 en RPMI. Las diferencias en la expresión de citocina, en comparación con el control negativo, fueron determinados y concentraciones fueron normalizadas al número de linfocitos (para IL-2) y leucocitos totales (para todas las demás citocinas) obtenido del recuento de sangre completo (pg/ml/células 10E3).

[0050] A pesar de las grandes variaciones intraindividuales en la microflora materna, la carga bacteriana total y los números medianos de células/ml de bifidobacterias y lactobacilos no diferían entre ambos grupos antes del inicio de suplementación. Sin embargo, fue observado tras la suplementación con el suplemento que comprende GOS e inulina un porcentaje aumentado de bifidobacterias totales y lactobacilos en la flora fecal de la embarazada. Ver tabla 1. En las muestras de deposición materna, *B. catenulatum*, *B. infantis* y *L. acidophilus* fueron las especies más frecuentes en ambos grupos antes y después de la suplementación.

[0051] Las heces de los bebés de madres del grupo experimental contenían el día 5 después del parto, 7,4 % lactobacilos (n=17, e.t. 3,0), mientras que las heces de bebés de madres del grupo de control, al día 5 después del parto solo contenían 2,4 % lactobacilos (n=16, e.t. 0,9).

[0052] Comparaciones dentro del grupo de bebés mostraban un aumento significativo en los números de lactobacilos en el grupo de placebo [p=0,038; pt] desde el día 20 hasta el día 182. Este efecto fue confirmado por un análisis de FISH [p=0.018; pt]. El porcentaje de neonatos positivos para *L. acidophilus* aumentó en el grupo de placebo desde el día 20 hasta el día 182 [p=0.016]. Esta diferencia fue confirmada por un análisis qPCR (p=0.012).

[0053] Los análisis FACS de sangre del cordón revelaron niveles significativamente más bajos de intensidad de fluorescencia TLR2⁺ en monocitos CD14⁺ en el grupo experimental (p<0,05). Los niveles de expresión alterados de CD14⁺ y TLR2⁺ indican que el sistema inmunológico neonatal antes del parto se dirige hacia una respuesta de Th1 más rápida después del parto.

Tabla 1 Porcentaje de bifidobacterias y lactobacilos en heces de mujeres embarazadas que consumen una mezcla de GOS e inulina (experimental) o (control) de maltodextrina.

	Medio Experimental (s.e.) % bifidobacterias ^a	Medio Experimental (s.e.) % lactobacilos ^a	Control medio (s.e.) % bifidobacteria ^a	Control medio (s.e.) % lactobacilos ^a
T=1 ^b	13.0 (1.7) ^c	8.6 (2.0)	18.5 (4.1)	5.4 (1.9)
T=2 ^b	24.1 (2.6) ^{cd}	9.9 (1.7)	14.7 (3.5) ^d	7.8 (1.9)

a Las bifidobacterias fueron cuantificadas con FISH, lactobacilos fueron cuantificados por PCR en tiempo real.

b t=1 en la semana 25 de la gestación, antes del comienzo de la suplementación, t=2 es en la última visita del hospital antes del parto.

c Diferencia estadísticamente significativa, p < 0.05, entre t=1 y t=2

d Diferencia estadísticamente significativa, p < 0.05, entre un grupo de control y experimental.

[0054] Para probar si la suplementación prebiótica materna afectaba a la inmunidad fetal, fue realizado un análisis exhaustivo fenotípico de un subconjunto de linfocitos. Las células auxiliares (Th) CD4⁺ y células CD8⁺ citotóxicas (Tc) expresaron predominantemente el fenotipo naïve (CD45RA⁺) (> 84%) mientras que menos del 13% expresaron CD45RO⁺. La proporción de CD4⁺/CD8⁺ al igual que los porcentajes de CD4⁺CD45RA⁺, CD8⁺CD45RA⁺, CD4⁺CD45RO⁺ y CD4⁺ CD45RO⁺ no diferían significativamente entre los grupos de prebiótico y de placebo. A diferencia de la frecuencia alta de células CCR7⁺ (>87.3%), todos los otros CKR fueron expresados en una frecuencia muy baja en ambas células CD4⁺ y CD8⁺. El MFI de CXCR4 fue alto en ambos subgrupos CD4⁺ y CD8⁺, mientras que CXCR3 fue sólo expresado en una frecuencia alta en células CD8⁺. Los análisis de la frecuencia de linfocitos CKR⁺ dentro de subgrupos de células T CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD45RA⁺ y CD8⁺CD45RA⁺ CB, al igual que la proporción Th1/Th2 (CXCR3/CCR4 y CCR5/CCR4) en los subgrupo diferentes CD4⁺ y CD8⁺, no diferían significativamente entre los dos grupos. El marcador de activación temprana CD69 al igual que el marcador de activación tardía CD25 fueron expresados a niveles similares en los subgrupos CD4⁺ diferentes en ambos grupos (datos no mostrados). Ninguna diferencia fue observada en la frecuencia de subgrupos de células CD4⁺ T que expresan CD25^{alta} (mediana: 1.5 contra 1.4; p=0.683).

[0055] Los análisis comparativos de producción de perfil de citocina derivada de leucocito por cultivos enteros de CB estimulados con mitógeno y alérgenos durante 24 h revelaron modelos típicos de expresión de citocina. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de suplementación, al analizar las concentraciones de citocina producidas por estímulos diferentes (aparte de G-CSF (p<0.03 para Der p1, BLG y OVA).

[0056] Estos resultados indican que la suplementación con sacáridos no digeribles hidrosolubles dio como resultado un porcentaje aumentado de bifidobacterias y lactobacilos en la microflora intestinal de las mujeres embarazadas. Este produce una inoculación mejorada del intestino del bebé durante el nacimiento y la colonización después del nacimiento con lactobacilos y/o bifidobacterias. Especialmente la presencia de lactobacilos muy poco después del nacimiento es de importancia, ya que los lactobacilos tienen una capacidad alta de acidificación del colon, con lo que el ambiente intestinal posteriormente es más adecuado para las bifidobacterias y menos adecuado para patógenos entéricos. Además, estos resultados indican que esta suplementación mejora el sistema inmunológico del bebé no nacido y del bebé durante y después del nacimiento.

Ejemplo 2

[0057] 100 ml de una composición líquida a base de leche envasada en una botella de 100 ml comprende:

- 8.1 g transgalacto-oligosacárido, (originado de Vivinal GOS)
- 0.9 g fructopolisacárido (originado de RaftilineHP)
- 750 mg aceite de pescado y aceite de onagra, que comprende
c 300 mg DHA

c 42 mg EPA
c 8.4 mg AA
c 8.4 mg de ácido docosapentaenoico (DPA)
c 15 mg de ácido gamma linoleico (GLA)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un sacárido hidrosoluble no digerible para la producción de una composición, donde la composición se administra a una mujer embarazada de un bebé, para
 - i. mejorar el desarrollo de la flora intestinal de un bebé después del nacimiento;
 - 10 ii. reforzar el sistema inmunológico y/o prevención de trastornos relacionados con el sistema inmunológico del bebé después del nacimientocon la condición de que la composición no comprenda *Lactobacillus GG*.
- 15 2. Uso según la reivindicación 1, donde la composición se administra a una mujer embarazada de un bebé para la prevención de al menos un trastorno seleccionado del grupo que consiste en alergia, eczema, asma, rinitis, fiebre de heno, rinoconjuntivitis, sibilancia, infecciones intestinales, infecciones vaginales, infecciones respiratorias, diarrea, estreñimiento, calambres e inflamación intestinal en el bebé después del nacimiento.
- 20 3. Uso de un sacárido hidrosoluble, no digerible para la producción de una composición, donde la composición se administra a una mujer embarazada de un bebé, para
 - i. reforzar el sistema inmunológico de un bebé antes del nacimiento con la condición de que la composición no comprenda *Lactobacillus GG*.
- 25 4. Uso según la reivindicación 1-3, donde el sacárido se administra en una dosis de 0.5 a 50 g/día, durante al menos 2 semanas antes del parto.
- 30 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes
 - para estimular la colonización bacteriana del intestino del bebé después del nacimiento y/o
 - aumentar el porcentaje bifidobacteriano y/o lactobacilos basado en bacterias totales en el colon y/o heces del bebé después del nacimiento.
- 35 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el sacárido comprende al menos 50% de unidades de monosacárido de galactosa basadas en el número total de unidades de monosacárido presentes en el sacárido.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el sacárido es seleccionado del grupo que consiste en transgalactooligosacáridos, galactooligosacáridos, lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (neoLNT), fucosil-lactosa, LNT fucosilada y neo-LNT fucosilado, y alfa-galacto-oligosacárido, preferiblemente transgalactooligosacárido.
- 40 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la composición comprende, sacárido A hidrosoluble no digerible y un sacárido B hidrosoluble no digerible, donde sacárido A y sacárido B tienen i) enlaces glicosídicos diferentes, ii) grado diferente de polimerización, y/o iii) composición monosacárida diferente.
- 45 9. Uso según la reivindicación 8 donde el sacárido A comprende al menos 50% de unidades de galactosa basadas en un número total de unidades de monosacárido presentes en el sacárido de A y donde el sacárido B es seleccionado del grupo consistiendo en fructopolisacáridos y fructooligosacáridos, preferiblemente inulina.