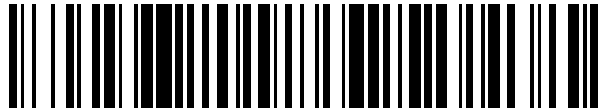


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 344**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/29** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**A61K 35/74** (2006.01)

**A61P 1/12** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2006 E 11162630 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2351492**

54 Título: **Composición nutritiva con probióticos**

30 Prioridad:

**28.02.2005 EP 05075486**

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

**05.12.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SPEELMANS, GELSKE;  
KNOL, JAN;  
HAARMAN, MONIQUE;  
GARSSEN, JOHAN;  
VRIESEMA, ADRIANUS JOHANNES MARIA y  
ALLES, MARTINE SANDRA**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 524 344 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición nutritiva con probióticos

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

5 [0001] La presente invención se refiere a composiciones nutritivas que comprenden al menos dos sacáridos prebióticos diferentes no digeribles y al menos una bacteria probiótica. La composición nutritiva es especialmente adecuada para alimentar lactantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 [0002] Los lactantes están desprovistos de flora intestinal en el nacimiento. Como resultado del contacto con la madre durante el nacimiento y la posterior alimentación con leche humana o leche de fórmula, la flora intestinal se desarrolla rápidamente. Durante el desarrollo, la flora intestinal sigue siendo inmadura y su equilibrio es frágil. Los lactantes alimentados con leche humana son menos afectados por infecciones o enfermedades que los lactantes alimentados con fórmula. Por lo tanto, los lactantes alimentados con leche humana tienen menos infecciones gastrointestinales en cuanto a incidencia y duración, menos enfermedades atópicas tales como alergia, eczema, menos cólicos y calambres, y menos estreñimiento que los lactantes alimentados con fórmula. También aflicciones que ocurren más tarde en la vida, tales como obesidad infantil, diabetes, y asma están relacionadas con el tipo de alimentación durante los estadios de vida más tempranos, estando en ventaja los lactantes alimentados con leche humana.

20 [0003] Generalmente, la flora intestinal de lactantes alimentados con leche humana está principalmente compuesta de Bifidobacterias y lactobacilos. La leche humana contiene oligosacáridos de leche humana, que son un factor de crecimiento para las Bifidobacterias en el intestino de los lactantes. La flora de los lactantes alimentados con fórmula es más diversa y contiene en general más especies de *Bacteroides*, *Clostridium* y *Enterobacteriaceae*. Los lactantes alimentados con fórmula tienen sobre una décima parte a aproximadamente dos tercios del número de Bifidobacterias de lactantes alimentados con leche humana. Bifidobacteria y lactobacilos se consideran importante en el mantenimiento de una microbiota intestinal bien equilibrada y se ha postulado que bifidobacterias y lactobacilos tienen diferentes efectos saludables, incluyendo la prevención y/o tratamiento de diarrea e infecciones intestinales. Además, bifidobacterias y lactobacilos han demostrado jugar un papel en el sistema inmunológico del huésped.

30 [0004] El método hasta la fecha fue promover Bifidobacterias en general, es decir, a nivel de género. El género bifidobacteria consiste en muchas especies diferentes, que difieren en el metabolismo, actividad enzimática, utilización de oligo y polisacáridos, composición de la pared celular, e interacción con el sistema inmunológico del huésped. Por lo tanto, no toda especie de bifidobacteria tiene el mismo efecto funcional en el lactante. *B. adolescentis* es más predominante en la flora de adultos y lactantes alérgicos, y es menos común en heces de lactantes saludables. *B. animalis* / *B. lactis* no es de origen natural en seres humanos. En lactantes saludables, la flora de bifidobacterias está principalmente compuesta por *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum*. Es el objetivo de la presente invención conseguir una flora en lactantes alimentados con fórmula que recuerda a la flora de lactantes alimentados con leche humana a nivel de especies de bifidobacterias.

35 [0005] EP1105002 describe el uso de dos carbohidratos no digeribles diferentes para mejorar la flora intestinal. Los carbohidratos pueden especialmente comprender galacto-oligosacáridos y fructo-polisacáridos.

[0006] Composiciones nutritivas que comprenden probióticos son conocidas de por ejemplo, WO 03/071883 y EP 1 481 682.

40 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0007] La presente invención se define por las reivindicaciones.

45 [0008] Los presentes inventores han descubierto que la alimentación de un lactante humano con una combinación de diferentes sacáridos no digeribles aumenta el nivel de bifidobacterias en las heces y regula la población de bifidobacterias en el tracto intestinal a nivel de una especie a un nivel que es similar a los niveles observados en los lactantes alimentados con leche humana, es decir bajo en *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, y *B. adolescentis*. No obstante, la concentración de *Bifidobacterium breve* (*B. Breve*) resultó ser baja con respecto a los lactantes alimentados con leche humana.

50 [0009] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende sacáridos A no digeribles y sacárido B no digerible y *B. breve*. Esta composición puede ser ventajosamente usada para igualar la distribución de especies de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal de un lactante alimentado con fórmula.

[0010] En otro aspecto también se descubrió que la alimentación de lactantes con fórmula conteniendo una combinación de diferentes sacáridos no digeribles aumenta el nivel de lactobacilos en heces y regula la población de lactobacilos en el tracto intestinal a nivel de una especie a un nivel que es similar a los niveles observados en los lactantes alimentados con leche humana. No obstante, la concentración de *Lactobacillus paracasei* (*L. Paracasei*)

resultó ser relativamente baja en los lactantes alimentados con leche humana. Por lo tanto la presente invención proporciona una composición que comprende *B. breve* y *L. paracasei*, preferiblemente combinada con sacárido A no digerible y sacárido B no digerible. Se ha observado que las poblaciones de estas bacterias se subdesarrollan en el tracto gastrointestinal de lactantes que reciben fórmula infantil. Por lo tanto, esta combinación de bacterias probióticas puede ser ventajosamente usada para la alimentación de lactantes y simulan la flora intestinal de un lactante alimentado con leche humana.

#### LEYENDA DE LA FIGURA

[0011]

Figura 1: Gráfico de hipersensibilidad de vías respiratorias como PenH relativo (pauza mejorada) frente a la concentración de metacolina en ratones que recibieron una combinación de *B. breve*, transgalacto-oligosacáridos y fructopolisacáridos; y un grupo de control de ratones que reciben solución salina.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0012] La presente invención proporciona una composición que comprende 5 a 16 % en. de proteína, 30 a 60 % en. de grasa, y 25 a 75 % en. de carbohidratos que comprende  $10^2$  a  $10^{13}$  unidades formadoras de colonias (cfu) de *Bifidobacterium breve* y  $10^2$  a  $10^{13}$  cfu de *Lactobacillus paracasei*.

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

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

#### *Bifidobacterium breve*

[0015] *Bifidobacterium breve* es una bacteria gram-positiva, anaeróbica, ramificada en forma de barra. La presente *B. breve* preferiblemente tiene al menos 95 % de identidad de la secuencia de ARNr 16 S cuando se compara con la cepa de tipo de *B. breve* ATCC 15700, de forma más preferible al menos 97% de identidad (Stackebrandt & Goebel, 1994, Int. J. Syst. Bacteriol. 44:846-849 ). La bifidobacteria usada en la presente invención se hibrida preferiblemente con la sonda de *B. breve* y da una señal con el método de ensayo de nucleasa 5' como se describe adicionalmente en este documento.

[0016] Cepas preferidas de *B. breve* son aquellas aisladas de las heces de lactantes alimentados con leche humana saludables. Típicamente, estas están disponibles comercialmente de productores de bacterias del ácido láctico, pero también pueden ser directamente aisladas de heces, identificadas, caracterizadas y producidas. Según una forma de realización preferida, la presente composición contiene al menos una *B. breve* seleccionada del grupo consistente en *B. breve* Bb-03 (Rhodia), *B. breve* M-16V (Morinaga), *B. breve* R0070 (institute Rosell, Lallemand), DSM 20091, y LMG 11613.

De la forma más preferible, *B. breve* es *B. breve* M-16V (Morinaga).

[0017] La presente composición contiene  $10^2$  a  $10^{13}$  unidades formadoras de colonias (cfu) de *B. breve* por gramo de peso en seco de la presente composición, preferiblemente  $10^4$  a  $10^{12}$ , de forma más preferible  $10^5$  a  $10^{10}$ , de la forma más preferible de  $10^5$  a  $1 \times 10^9$  cfu de *B. breve* por gramo de peso en seco de la presente composición.

[0018] Preferiblemente, la presente composición contiene  $10^4$  a  $10^{12}$ , de forma más preferible de  $10^5$  a  $10^{11}$ , de la forma más preferible de  $10^7$  a  $5 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (cfu) de *B. breve* por g del total de sacárido A y B.

[0019] La dosis de *B. breve* según la presente invención es preferiblemente administrada a una dosis diaria de  $10^2$  a  $10^{13}$ , de forma más preferible de  $10^5$  a  $10^{11}$ , de la forma más preferible de  $10^8$  a  $5 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (cfu).

#### Sacáridos no digeribles

[0020] La presente invención proporciona una composición que comprende sacárido A no digerible y sacárido B no digerible, de ahora en adelante sacárido A y sacárido B, respectivamente. Sacárido A y sacárido B son sacáridos diferentes y tienen diferentes enlaces glicosídicos y/o grado de polimerización y/o composición monosacárida.

[0021] Además de los monosacáridos de galactosa, fructosa y glucosa, los sacáridos A y B pueden contener otras unidades monosacáridas como arabinosa, xilosa y manosa, hasta un total de 40%. Se prefiere, no obstante, que al menos 75%, de forma más preferible al menos 90%, o incluso al menos 98 % mol de las unidades monosacáridas

totales de sacárido A y/o B sean monosacáridos seleccionados de monosacáridos de galactosa, fructosa y glucosa. Se prefiere que la cantidad relativa de glucosa  $\alpha$ -enlazada esté por debajo del 30%, especialmente por debajo del 15%.

5 [0022] El término sacárido A como se usa en la presente invención preferiblemente se refiere a una mezcla de sacáridos no digeribles. El término sacárido B como se usa en la presente invención preferiblemente se refiere a una mezcla de sacáridos no digeribles. Esto es una práctica común, debido a que el uso de sacáridos con por ejemplo una longitud de cadena es muy caro. Preferiblemente y comúnmente, las partes de tal mezcla difieren del uno al otro solo en el número del monosacárido predominante. Cuando el sacárido A y/o B son mezclas de sacáridos, los promedios de los parámetros respectivos se usan para la definición de la presente invención. Por ejemplo si el  
10 sacárido A es una mezcla de sacáridos individuales 25 % en peso de Glu-Gal-Gal-Gal, 25 % en peso de Glu-Gal-Gal y 50 % en peso de Gal-Gal, la composición media de monosacáridos es 85,4% de Gal y 14,6 % de Glu. El grado medio de polimerización (DP) es 2,75.

15 [0023] El término sacárido no digerible se refiere a sacáridos que se mantienen sin digerir en el tracto gastrointestinal y alcanzan el intestino grueso sin absorber, es decir sacáridos que no se digieren en el tracto intestinal superior de un humano, preferiblemente un lactante humano por ejemplo sin digerir por los ácidos o enzimas presentes en el tracto intestinal humano. Cabe destacar que los sacáridos digeribles no son parte de los sacáridos A y B. Así, por ejemplo glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa, lactosa, maltosa y las maltodextrinas se consideran digeribles.

20 [0024] Preferiblemente sacárido A y B son hidrosolubles. Sacáridos hidrosolubles son al menos 50% hidrosolubles, según un método descrito por L. Prosky et al, J. Assoc. Anal. Chem 71: 1017-1023, 1988.

25 [0025] En una forma de realización preferida al menos 80% en peso de sacárido no digerible A y B es fermentable. El término "fermentable" como se utiliza en este caso se refiere a la capacidad para sufrir descomposición por microorganismos en la parte inferior del tracto gastrointestinal (por ejemplo colon) a moléculas menores, en particular ácidos grasos de cadena corta y lactato. La fermentabilidad de sacárido no digerible A y B es preferiblemente determinada por el método descrito en Am. J. Clin. Nutr. 53,1418-1424 (1991). En una forma de realización más preferida al menos 80 % peso. de sacárido no digerible A y B son prebióticos. "Prebióticos" se definen como ingredientes de alimentos no digeribles que selectivamente estimulan el crecimiento y/o actividad de una o varias especies bacterianas en el colon y así afectan beneficiosamente al huésped (Gibson y Roberfroid, J. Nutr. 125:1401-1412(1995)).

### 30 Composición monosacárida

[0026] Al menos 60 % mol, preferiblemente al menos 75 % mol, de forma más preferible al menos 90 mol, de la forma más preferible al menos 98 % mol de las unidades monosacáridas totales de sacárido A y B son monosacáridos seleccionados de los monosacáridos galactosa (gal), fructosa (fru) y glucosa (Glu). Según una forma de realización preferida de la presente invención, el porcentaje de al menos un monosacárido seleccionado del  
35 grupo consistente en glucosa, fructosa y galactosa en el sacárido A es al menos 40 % mol superior al porcentaje del mismo monosacárido en el sacárido B, preferiblemente al menos 50 % mol, de forma más preferible al menos 75 % mol, incluso de forma más preferible al menos 90 % mol. Una diversidad aumentada de monosacáridos estimula una población más amplia de bacterias intestinales beneficiosas.

40 [0027] Preferiblemente al menos 50 % en peso, preferiblemente al menos 75 % en peso del peso acumulativo de sacárido A y B son sacáridos no digeribles con un DP de 2-8. Usando una mezcla con un alto porcentaje en peso de pequeños sacáridos la fermentabilidad y el efecto de estimulación en el crecimiento de las bacterias del ácido láctico y bifidobacterias aumentarán.

45 [0028] El porcentaje de un monosacárido en el sacárido puede ser simplemente calculado dividiendo la cantidad de la unidad monosacárida respectiva (por ejemplo glucosa) en el sacárido por la cantidad total de las unidades monosacáridas en este sacárido y multiplicarlo por 100. Cuando el sacárido es una mezcla de sacáridos, la aportación de cada sacárido individual en la mezcla de sacáridos debe ser tomada en cuenta. El porcentaje de una mezcla de sacáridos puede ser simplemente determinado hidrolizando completamente la mezcla y determinando el porcentaje molar para cada monosacárido.

50 [0029] Preferiblemente el sacárido A contiene al menos el 40 % mol de galactosa, de forma más preferible al menos 67 % mol de galactosa, de forma más preferible al menos 75 % mol de galactosa. Preferiblemente el sacárido B contiene al menos 30 % mol de fructosa, de forma más preferible al menos 67 % mol de fructosa, incluso de forma más preferible al menos 75 % en peso de fructosa.

55 [0030] Por ejemplo, en el caso en el que el sacárido A es una mezcla de glu-(gal)<sub>n=2-7</sub> con una composición monosacárida media de 20 % mol de glucosa y 80 % mol de galactosa y sacárido B es una mezcla de glu-(fru)<sub>n=2-7</sub> y (fru)<sub>n=2-7</sub> con una composición monosacárida media de 10 % mol de glucosa y 90 % mol de fructosa, la diferencia en a) glucosa es 10 % mol; b) fructosa es 90 % mol; y c) 80 % mol de galactosa. En este ejemplo la galactosa cumple el criterio de que el porcentaje de al menos un monosacárido seleccionado del grupo consistente en glucosa, fructosa y galactosa en el sacárido A es al menos 40 % mol mayor que el porcentaje del mismo monosacárido en el

sacárido B.

#### Grado de polimerización

5 [0031] Sacárido A y B tienen un grado de polimerización (DP) entre 2 y 200. Preferiblemente al menos 80 % peso, de forma más preferible al menos 95 % peso, de la forma más preferible al menos 98 % peso del peso acumulativo de sacárido A y B tiene un grado de polimerización (DP) por debajo de 100, de forma más preferible por debajo de 60, de la forma más preferible por debajo de 40. El DP inferior reduce ventajosamente la viscosidad y aumenta la fermentabilidad de los sacáridos no digeribles. Preferiblemente al menos 50 % en peso, preferiblemente al menos 75 % en peso de sacárido A son sacáridos no digeribles con un DP de 2-8. Usando una mezcla con un alto porcentaje en peso de sacáridos pequeños, la fermentabilidad y efecto de estimulación en el crecimiento de las bacterias del ácido láctico y bifidobacterias será aumentado.

15 [0032] Según una forma de realización preferida de la presente invención, el DP de sacárido A es al menos 5 unidades monosacáridas inferior al grado de polimerización de sacárido B, preferiblemente al menos 10, incluso de forma más preferible al menos 15. Incorporación de un sacárido con un grado aumentado de polimerización reduce la carga osmótica, lo que es ventajoso para una nutrición infantil y mejora la estimulación prebiótica de la flora intestinal también en las partes más distales del colon.

20 [0033] Preferiblemente, el sacárido A tiene un DP de 2-15, de forma más preferible 2-8. Preferiblemente el sacárido B tiene DP de 8-100. Los sacáridos A y B con un DP diferente pueden tener la misma composición monosacárida o ligeramente diferente. Cuando los sacáridos A y B tienen un DP diferente y composición monosacárida similar, entonces la diferencia en el DP medio entre sacárido A y sacárido B es preferiblemente al menos 5, de forma más preferible al menos 10, incluso de forma más preferible al menos 15. Preferiblemente, sacárido A y B tienen una composición monosacárida diferente (ver arriba) y un DP diferente.

25 [0034] Por ejemplo, si el sacárido A es una mezcla de glu-fru<sub>m=2-7</sub> y fru<sub>m=2-6</sub> con un DP medio de 4,5 unidades monosacáridas y el sacárido B es glu-fru<sub>n=12-100</sub> con un DP medio de 25 unidades monosacáridas; entonces la diferencia en el DP medio es (25-4,5 =) 20,5.

#### Enlace glicosídico

30 [0035] En una forma de realización preferida de la presente invención, el porcentaje de al menos un enlace glicosídico de sacárido A basado en enlaces glicosídicos totales de sacárido A es al menos un 40% mayor que el porcentaje del mismo enlace glicosídico en el sacárido B, preferiblemente al menos 50%, incluso de forma más preferible al menos 75%. El término "enlace glicosídico" como se usa en la presente invención se refiere a un enlace C-O-C formado entre los anillos de dos monosacáridos cíclicos por eliminación de agua. Una diversidad aumentada en enlaces glicosídicos estimula una gama más amplia de bacterias beneficiosas.

35 [0036] Enlaces glicosídicos difieren en que enlazan de manera covalente átomos de carbono en las unidades monosacáridas en posiciones numeradas diferentemente, y/o que forman enlaces  $\alpha$  o  $\beta$ . Ejemplos de diferentes enlaces glicosídicos que ocurren en sacáridos no digeribles son enlaces  $\beta(1,3)$ ,  $\alpha(1,4)$ ,  $\beta(2,1)$ ,  $\alpha(1,2)$ , y  $\beta(1,4)$ .

[0037] Preferiblemente los enlaces glicosídicos en el sacárido A comprende al menos 40% de enlaces glicosídicos  $\beta(1,4)$  y / o  $\beta(1,6)$ , de forma más preferible al menos 75%. Los enlaces glicosídicos en el sacárido B preferiblemente comprenden al menos 40% de enlaces glicosídicos  $\beta(2,1)$ , de forma más preferible al menos 75%.

#### Combinación

40 [0038] En una forma de realización particularmente preferida, el presente sacárido A y B difieren en al menos dos aspectos seleccionados del grupo de enlace glicosídico, grado de polimerización y composición monosacárida. Preferiblemente, los presentes sacáridos A y B difieren en el grado de polimerización y en al menos un aspecto seleccionado del grupo de enlace glicosídico y composición monosacárida. De forma más preferible, el presente sacárido A y B difiere en el grado de polimerización y composición monosacárida. De la forma más preferible los tres aspectos son diferentes. La administración de mezclas de sacáridos de diferentes tamaños, "clases" y/o "estructuras" diferentes estimulan sinérgicamente la flora intestinal, que ventajosamente influencia la salud.

#### Concentración de Sacárido A y B

50 [0039] La presente composición preferiblemente comprende al menos 5 mg de sacárido A por 100 ml, preferiblemente al menos 50 mg de sacárido A por 100 ml, incluso de forma más preferible al menos 0,1 g de sacárido A por 100 ml, de la forma más preferible al menos 0,5 g de sacárido A por 100 ml. Preferiblemente la presente composición no contiene más de 10 g de sacárido A por 100 ml, preferiblemente no más de 2.0 g por 100 ml. La presente composición preferiblemente comprende al menos 5 mg de sacárido B por 100 ml, preferiblemente al menos 10 mg de sacárido B por 100 ml, incluso de forma más preferible al menos 25 mg de sacárido B por 100 ml, de la forma más preferible al menos 50 mg de sacárido B por 100 ml. Preferiblemente la presente composición no contiene más de 10 g de sacárido B por 100 ml, preferiblemente no más de 1 g por 100 ml.

[0040] La proporción en peso entre sacárido A y sacárido B es preferiblemente entre 0,01 y 100, de forma más preferible entre 0,5 y 100, incluso de forma más preferible entre 4 y 100, de la forma más preferible entre 24 y 99. Una alta proporción en peso es particularmente ventajosa cuando el sacárido A tiene un bajo DP y el sacárido B tiene un DP relativamente alto.

5 Asegura un equilibrio óptimo entre osmolalidad y fermentabilidad.

[0041] Sacárido A y sacárido B preferiblemente comprenden entre 5 y 100 % en peso basado en el peso total de los sacáridos no digeribles en la presente composición, de forma más preferible 50 a 100 % en peso.

10 [0042] Sacáridos no digeribles A y B según la presente invención son preferiblemente administrado a una dosis diaria de 0,1 a 30 g (peso sacárido A + peso sacárido B), de forma más preferible 0,5 a 15 g, de forma más preferible 3 a 10 g.

#### Sacáridos preferidos

15 [0043] Sacárido A no digerible es preferiblemente un sacárido seleccionado de  $\beta$ -galactooligosacáridos,  $\alpha$ -galactooligosacáridos, y (arabino-)galactanos. Según una forma de realización más preferida, el sacárido A es  $\beta$ -galactooligosacárido, de forma más preferible trans-galactooligosacárido (TOS). Preferiblemente, el sacárido A comprende  $\beta$ -galactooligosacáridos con enlaces glicosídicos  $\beta(1,4)$  y/o  $\beta(1,6)$  y una glucosa terminal. TOS está por ejemplo disponible comercialmente bajo el nombre comercial Vivinal®GOS (Borculo Domo ingredientes, Zwolle, Países Bajos).

20 [0044] Sacárido no digerible B es preferiblemente un sacárido seleccionado de fructopolisacáridos y fructooligosacáridos. Los términos fructopolisacáridos, polifrufructosa, polifrufructano y fructano son usados aquí de forma intercambiable y se refieren a polisacáridos que comprenden unidades de fructosa  $\beta$ -enlazadas, que son preferiblemente enlazadas por enlaces glicosídicos  $\beta(2,1)$  y/o  $\beta(2,6)$ . Preferiblemente, el fructopolisacárido contiene una glucosa terminal enlazada glicosídicamente (2,1). Preferiblemente, el fructopolisacárido contiene al menos 7 unidades de fructosa  $\beta$ -enlazadas. En otra forma de realización preferida se usa inulina como sacárido B. La inulina es un tipo de fructopolisacárido donde al menos 75% de los enlaces glicosídicos son enlaces  $\beta(2,1)$ . Normalmente, la inulina tiene una longitud media de cadena entre 8 y 60 unidades monosacáridas. Fructopolisacárido adecuado para usar en las composiciones está comercialmente disponible bajo el nombre comercial, por ejemplo Raftiline®HP (Orafti).

25 [0045] En otra forma de realización preferida, el sacárido B es un fructooligosacárido. Un fructooligosacárido es un sacárido que comprende unidades de fructosa  $\beta$ -enlazadas, que son preferiblemente enlazadas por enlaces glicosídicos  $\beta(2,1)$  y/o  $\beta(2,6)$ . El fructooligosacárido contiene preferiblemente una glucosa enlazada glicosídica  $\beta(2,1)$  en el extremo reductor. Preferiblemente, el fructooligosacárido contiene 2 a 6 unidades de fructosa  $\beta$ -enlazadas. Una fuente adecuada de fructooligosacárido es Raftilose® (Orafti), o Actilight (Beghin-Meiji).

#### *Lactobacillus paracasei*

35 [0046] La presente composición comprende *Lactobacillus paracasei*. Se ha encontrado que esta bacteria está presente en cantidades limitadas en lactantes alimentados con leche no humana. Por consiguiente, la administración de una composición que comprende sacárido A no digerible, sacárido B no digerible, *B. breve*, y *L. paracasei* permiten la normalización de bifidobacterias a nivel de especie, pero también permite la normalización de la población de especies de *Lactobacillus* a un nivel equivalente al presente en el tracto gastrointestinal de lactantes alimentados con leche humana. Esto es importante, puesto que diferentes especies de *Lactobacillus* ejercen efectos diferentes en el huésped. Por ejemplo *L. delbrueckii* forma D-lactato que puede resultar en la acidosis en lactantes prematuros, mientras que *L. paracasei* forma L-lactato.

40 [0047] Preferiblemente la presente cepa de *Lactobacillus* tiene al menos 95, de forma más preferible al menos 97 % de identidad de la secuencia de ARNr 16S cuando se compara con la cepa de tipo de *L. paracasei* ATCC 25032 (Stackebrandt & Goebel, 1994, Int. J. Syst. Bacteriol. 44:846-849)). El *Lactobacillus* usado en la presente invención se hibrida preferiblemente con la sonda de *L. paracasei* y da una señal con el método de ensayo de nucleasa 5' como se describe adicionalmente en en este documento.

45 [0048] Cepas de *L. paracasei* preferidas son aquellas aisladas de las heces de lactantes alimentados con leche humana saludables. Diferentes cepas de *L. paracasei* están disponibles comercialmente de productores de bacterias del ácido láctico, pero también pueden ser directamente aisladas de heces, identificadas, caracterizadas y producidas. Según una forma de realización preferida, la presente composición contiene al menos *L. paracasei* seleccionada del grupo consistente en *L. paracasei* F19 (Arla; Suecia), *L. paracasei* LAFTI L26 (DSM Food Specialties, Países Bajos) y *L. paracasei* CRL 431 (Chr. Hansen, Dinamarca), LMG 12165 y LMG 11407.

50 [0049] La presente composición contiene  $10^2$  a  $10^{13}$  unidades formadoras de colonias (cfu) de *L. paracasei* por gramo de peso en seco de la presente composición, preferiblemente  $10^4$  a  $10^{12}$ , de forma más preferible  $10^5$  a  $10^{10}$ , de la forma más preferible de  $10^5$  a  $1 \times 10^9$  cfu de *L. paracasei* por gramo de peso en seco de la composición.

[0050] Preferiblemente, la presente composición contiene  $10^4$  a  $10^{12}$ , de forma más preferible de  $10^5$  a  $10^{11}$ , de la forma más preferible de  $10^7$  a  $5 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (cfu) de *L. paracasei* por g del total de sacárido A y B.

5 [0051] La dosis de *L. paracasei* según la presente invención es preferiblemente administrado a una dosis diaria de  $10^2$  a  $10^{13}$ , de forma más preferible de  $10^5$  a  $10^{11}$ , de la forma más preferible de  $10^8$  a  $5 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (cfu).

#### Combióticos

10 [0052] La presente invención proporciona una composición que comprende 5 a 16 % ene. de proteína, 30 a 60 % ene. de grasa, y 25 a 75 % ene. de carbohidratos que comprenden *Bifidobacterium breve* y *Lactobacillus paracasei*. Se cree que la administración de la combinación de estas bacterias estimula la salud gastrointestinal del lactante. Las características composicionales preferidas, tipos de bacterias e indicaciones médicas como se describe en este documento para la composición que contiene el sacárido A y B y *B. breve* igualmente se aplican a la composición que contiene *B. breve* y *L. paracasei*. Sacárido A y/o sacárido B como se describe en este caso pueden ser ventajosamente combinados con *B. breve* y *L. paracasei*. Cuando *L. paracasei* está presente en la composición de la invención, un único tipo de sacárido no digerible puede bastar para obtener el efecto deseado. Por otro lado, cuando *L. paracasei* no está presente, la invención particularmente está relacionada con composiciones que contienen sacáridos A y B en una proporción en peso entre 95:5 y 99:1.

20 [0053] Otros microorganismos además de *B. breve* y/o *L. paracasei* también pueden estar presentes, aunque ninguna otra mejora sustancial será obtenida. Tales otros microorganismos pueden comprender otras especies de bifidobacteria u otras especies de *Lactobacillus* o incluso otras bacterias del ácido láctico. Bifidobacterias preferidas son *B. longum* y/o *B. infantis*. Lactobacilos preferidos son *L. casei* y/o *L. acidophilus*.

#### Macronutrientes

[0054] La presente composición contiene grasa, carbohidrato y proteína.

25 [0055] Preferiblemente la presente composición contiene un carbohidrato digerible seleccionado del grupo consistente en maltodextrina, almidón, lactosa, maltosa, glucosa, fructosa, y sacarosa. Preferiblemente la presente composición contiene lactosa. Preferiblemente al menos 35 % en peso, de forma más preferible al menos 50 % en peso, de la forma más preferible al menos 75 % en peso del carbohidrato digerible es lactosa. Cuando está en forma líquida, la presente composición preferiblemente comprende 6 a 19 g de carbohidratos digeribles por 100 ml, de forma más preferible 6 a 10 g por 100 ml.

30 [0056] Preferiblemente 10% a 80% del contenido energético total de la presente composición sirve por carbohidrato digerible. La presente composición contiene 25 a 75 % en. de carbohidrato. % en. es la forma abreviada de porcentaje de energía y representa la cantidad relativa cada constituyente contribuye al valor calórico total de la preparación. El valor calórico se proporciona por carbohidratos digeribles, proteína y grasa.

35 [0057] Ingredientes típicos para uso como una fuente lípida incluyen grasa animal, grasa vegetal, y aceite de fermentación microbiana. La grasa es una fuente de energía importante y de importancia máxima para un desarrollo apropiado de un lactante. La presente invención contiene preferiblemente ácido linolénico (LA; un ácido graso omega 6) y ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA; un ácido graso omega 3). La composición preferiblemente comprende 0.3 a 1.5 g de LA por 100 ml, y 0.05 a 5 g de ALA por 100 ml. La proporción en peso LA/ALA es preferiblemente entre 5 y 15. Preferiblemente la presente composición comprende ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC PUFA), de forma más preferible ácido eicosapentanoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA). En una forma de realización preferida la composición comprende ácido araquidónico (ARA). Preferiblemente la composición comprende 1 a 25 mg, de forma más preferible 4 a 15 mg de DHA por 100 ml. Preferiblemente la composición comprende 2 a 50 mg, de forma más preferible 6 a 30 mg de ARA por 100 ml. La presencia de LC-PUFA ventajosamente afecta a la colonización de lactobacilos y/o bifidobacterias, especialmente de *Lactobacillus paracasei*. La presente composición  
45 comprende 30 a 60 % en. De grasa, de forma más preferible 39 a 50 % en. De grasa. La composición preferiblemente comprende 2.1 a 6.5 g de grasa por 100 ml.

[0058] La presente composición comprende 5 a 16 % en., de forma más preferible 8 a 12 % en. de proteína. Preferiblemente la presente composición comprende una proteína seleccionada del grupo consistente en caseína, suero de leche, leche desnatada, proteína de soja, proteína de guisante, colágeno, proteína de arroz y/o proteína de maíz. Preferiblemente al menos 25 % en peso, de forma más preferible al menos 50 % en peso, de la forma más preferible al menos 90 % en peso de la proteína de la presente composición está provisto por la proteína hidrolizada y/o aminoácido libre. El uso de hidrolizado de proteínas y/o aminoácidos libres reduce el riesgo de alergia, particularmente alergia a la leche de vaca. Cuando la composición está en una forma líquida, preferiblemente  
50 comprende 1.0 a 6.0 g, de forma más preferible 1.0 a 2.5 g de proteína por 100 ml.

55 [0059] La presente composición es preferiblemente líquida. Irregularidades intestinales (por ejemplo heces duras, volumen de deposición insuficiente, diarrea) son un problema mayor en muchos lactantes y sujetos enfermos que reciben alimentos líquidos. Por lo tanto, la presente composición preferiblemente tiene una osmolalidad entre 50 y

500 mOsm/kg, de forma más preferible entre 100 y 400 mOsm/kg. Con esta osmolalidad, la presente composición es especialmente adecuada para el tratamiento y/o prevención de diarrea.

5 [0060] Es también importante que la presente composición no tenga una densidad demasiado calórica, no obstante, todavía proporciona calorías suficientes para alimentar al sujeto. Por lo tanto, el alimento líquido tiene preferiblemente una densidad calórica entre 10 y 250 kcal por 100 ml, incluso de forma más preferible, una densidad calórica de entre 50 y 90 kcal/ml, de la forma más preferible, entre 60 y 71 kcal por 100 ml. La densidad calórica óptima también contribuye a la incidencia reducida de diarrea.

10 [0061] Las presentes composiciones preferiblemente comprenden minerales, oligoelementos y vitaminas, colina, taurina, carnitina, mioinositol y/o mezclas derivadas. Preferiblemente la presente composición contiene taurina, que reduce los síntomas de asma (Adv. Exp. Med. Biol. 2003 526:403-10). La taurina actúa sinérgicamente con los componentes en la presente composición. Preferiblemente, la presente composición comprende nucleótidos. Preferiblemente, la composición comprende citidina 5'-monofosfato, uridina 5'-monofosfato, adenosina 5'-monofosfato, guanosina 5'-monofosfato, e inosina 5'-monofosfato. Preferiblemente, la composición comprende 0,75 a 10, de forma más preferible 1,5 a 5 mg nucleótidos por 100 ml. La presencia de nucleótidos sostiene ventajosamente la supervivencia y/o crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, especialmente *B. breve* y/o *L. paracasei*. Preferiblemente, la presente composición contiene ácidos orgánicos, aromas y/o colorantes.

#### Aplicaciones

20 [0062] La composición según la presente invención ha sido encontrada particularmente útil como una nutrición infantil. También la composición es especialmente adecuada para normalización de la población de bifidobacteria y/o de *Lactobacillus* según la distribución de las especies en lactantes alimentados con leche humana en el tracto gastrointestinal de lactantes que no fueron o fueron parcialmente alimentados con leche humana, en particular los lactantes nacidos prematuramente, los lactantes nacidos maduramente, al igual que lactantes que están en el periodo de adaptación a alimentos sólidos. Por lo tanto la presente invención, proporciona un método para proporcionar nutrición a un lactante humano, dicho método comprendiendo la administración de la presente composición al lactante.

[0063] Preferiblemente el lactante tiene una edad entre 0 y 36 meses, incluso de forma más preferible entre 0 y 18 meses, de la forma más preferida entre 0 y 12 meses.

30 [0064] La flora gastrointestinal tiene un efecto importante en trastornos tales como trastornos gastrointestinales, trastornos inmunológicos y/o trastornos endocrinos. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente composición puede ser ventajosamente usada en la producción de un medicamento para usar en un método para la prevención y/o tratamiento de trastornos gastrointestinales, trastornos inmunológicos y/o trastornos endocrinos. Particularmente alergia, rinitis alérgica, hipersensibilidad alimentaria, dermatitis atópica, eczema, asma, diarrea, inflamación intestinal, infección, estreñimiento, calambres intestinales, cólicos, obesidad infantil, y/o diabetes pueden ser adecuadamente tratados con la presente composición. En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o prevención de dermatitis atópica, eczema, alergia y/o infección. En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o prevención de alergia y/o infección. La presente composición puede ser ventajosamente usada en la producción de un medicamento para usar en un método para la prevención y/o tratamiento de trastornos gastrointestinales, trastornos inmunológicos y/o trastornos endocrinos en un lactante. La incidencia reducida de estas enfermedades se debe a la flora intestinal optimizada, particularmente la población optimizada de especies de bifidobacteria y/o la población optimizada de especies de *Lactobacillus*. La presente invención proporciona particularmente el uso de la presente composición para la producción de una composición para la prevención y/o tratamiento de la alergia a la leche de vaca y/o infección.

#### **EJEMPLOS**

##### 45 Ejemplo 1: Estudio clínico

[0065] En este estudio, el efecto de una nutrición infantil que contiene transgalactooligosacáridos, y fructopolisacáridos en bifidobacterias intestinales y lactobacilos fue evaluado. El estudio fue realizado y las muestras fecales fueron analizadas como se describe en WO2005/039319

50 [0066] Los lactantes fueron asignados de forma aleatoria a uno de dos grupos de tratamiento: un grupo (grupo SF) que recibió una fórmula infantil estándar (Aptamil 1 Milupa) y; un grupo (grupo GFSF) que recibió fórmula estándar suplementada con 0,72 g/100ml de transgalacto-oligosacáridos (GOS; Vivinal(tm) (Borculo Domo ingredients, Países Bajos) y 0,08 g/100ml de fructopolisacáridos (inulina, Raftilin HP, Orafiti, Bélgica). Un grupo de lactantes alimentados con leche humana fue incluido como un grupo de referencia (grupo HMF).

55 [0067] La cuantificación relativa de las diferentes especies de bifidobacterias y de *Lactobacillus* en muestras fecales fue determinada por ensayos de nucleasa 5' dúplex. Las sondas y cebadores fueron diseñadas y validadas para especies de bifidobacterias como se describe en WO2005/039319 y para *Lactobacillus*. Las sondas y cebadores para especies de *Lactobacillus* se muestran en la tabla 1. F es el cebador directo, R es el cebador inverso y P es la



sonda. La Tabla 2 muestra las concentraciones finales óptimas de cebador y de sonda usadas en los ensayos de nucleasa 5' dúplex para *Lactobacillus*. La cantidad total de bifidobacterias fue también determinada con ayuda de FISH, como se ha descrito anteriormente (Langendijk et al. 1995 Appl. Environ. Microbiol. 61:3069-75 .).

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

	Cebadores & sondas	Secuencia (5' → 3')
<i>L. acidophilus</i>	F	GAAAGAGCCCAAACCAAGTGATT
	R	CTTCCCAGATAATTCAACTATCGCTTA
	P	TACCACTTTGCA GTCCTACA
<i>L. casei</i>	F	CTATAAGTAAGCTTTGATCCGGAGATTT
	R	CTTCCTGCGGGTACTGAGATGT
	P	ACAAGCTATGAATTCACT TGC
<i>L. delbrueckii</i>	F	CACTTGTACGTTGAAAACCTGAATATCTTAA
	R	CGAACTCTCTCGGTCGCTTT
	P	CCGAGAATCATTGAGATC
<i>L. fermentum</i>	F	AACCGAGAACACCGCGTTAT
	R	ACTTAACCTTACTGATCGTAGATCAGTCA
	P	TAATCGCATACTCAACTAA
<i>L. paracasei</i>	F	ACATCAGTGTATTGCTTGTCAGTGAATAC
	R	CCTGCGGGTACTGAGATG TTTC
	P	TGCCGCCGGCCAG
<i>L. plantarum</i>	F	TGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAT
	R	TGTTCTCGGTTTCATTATGAAAATA
	P	ACATTCTTCGAAACTTTGT
<i>L. reuteri</i>	F	ACCGAGAACACCGCGTTATTT
	R	CATAACTTAACCTAAACAATCAAAGAT TGTCT
	P	ATCGCTAACTCAATTAAT
<i>L. rhamnosus</i>	F	CGGCTGGATCACCTCCTTT
	R	GCTTGAGGGTAATCCCCT CAA
	P	CCTGCACACACGAAA
Género <i>Lactobacillus</i>	F	TGGATCCCTTGGCACTAGGA
	R	AAATCTCCGGATCAAAGCTTACTTAT
	P	TATTAGTTCCGTCCTTCATC

## ES 2 524 344 T3

Todas las bacterias*	F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT
	R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
	P	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC
* Sondas y cebadores fueron derivados de Nadkami et al, 2002, <i>Microbiology</i> 148:257- 266 .		

Tabla 2: Concentraciones finales optimizadas de cebador y de sonda usadas en los diferentes ensayos de nucleasa 5' dúplex

Objetivo	Ensayo de nucleasa 5'	Cebador directo (nM)	Cebador inverso (nM)	Sonda (nM)
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	900	900	200
	Género <i>Lactobacillus</i>	900	900	200
<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>	900	900	200
	Género <i>Lactobacillus</i>	300	300	50
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. delbrueckii</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	900	900	200
<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	300	300	100
<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	300	300	100
<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	300	300	100
<i>L. reuteri</i>	<i>L. reuteri</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	900	900	200
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	900	450	200
	Género <i>Lactobacillus</i>	150	100	100
Género	Género <i>Lactobacillus</i>	600	600	100
<i>Lactobacillus</i>	Todas las bacterias	300	300	100

5

### Resultados:

[0068] El porcentaje del género bifidobacteria como un porcentaje de bacterias totales fue 75, 47, y 68% en el grupo HMF, SF, y GFSF, después de un periodo de alimentación de 6 semanas, respectivamente. La cantidad de lactobacilos fue de 3.9, 0.4, y 4.2%, respectivamente. Las diferencias entre el grupo GFSF y SF fueron significativas estadísticamente.

10

[0069] En la tabla 3 se muestra el porcentaje de especies de bifidobacterias relativas a la cantidad total de bifidobacterias.

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

Especies	HMF % (SE)	GFSF % (SE)	SF % (SE)
<i>B. catenulatum</i>	1,9(0,6)	1,4(1,0) <sup>b</sup>	8,1 (4,1) <sup>b</sup>
<i>B. adolescentis</i>	0,3 (0,9) <sup>a</sup>	0,2(0,1) <sup>a</sup>	2. (1,9)
<i>B. breve</i>	11,7 (9,6)	5,4 (10,8)	4,9 (10,7) <sup>a</sup>
<i>B. longum</i>	7,3 (13,9)	5,4 (10,7)	6,2 (9,4)
<i>B. bifidum</i>	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)
<i>B. angulatum</i>	<0,0 (0,0)	<0,1 (0,2)	<0,1 (0,0)
<i>B. infantis</i>	32,0 (18,9)	32,1 (20,0)	37,8 (18,4)
<i>B. dentium</i>	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)

<sup>a</sup> : una disminución significativa durante el periodo del estudio  
<sup>b</sup> : una diferencia significante entre los grupos GFSF y SF.

5

[0070] Una gran variedad de especies de bifidobacterias está presente en los tres grupos diferentes. Además, una reducción significativa en *B. adolescentis* es visible en lactantes alimentados con leche humana y en lactantes que reciben GFSF a diferencia de los lactantes que reciben una fórmula estándar. Después de 6 semanas de alimentación, *B. adolescentis* es mucho más alto en los lactantes alimentados con SF que en los lactantes que fueron alimentados con GFSF o con leche humana. Análisis de las muestras fecales de lactantes con GFSF muestra una gran variedad en la flora de bifidobacterias similar a los lactantes alimentados con leche humana. Los perfiles de lactantes alimentados con leche humana y lactantes que reciben GFSF también mostraron menos *B. catenulatum* (+ *B. pseudocatenulatum*) que el perfil de lactantes que reciben una fórmula estándar. *B. infantis*, y *B. longum* parecen ser predominantes en lactantes alimentados con leche humana al igual que en lactantes que reciben una fórmula estándar (SF) o una fórmula estándar suplementada con prebióticos (GFSF). También *B. breve* fue dominante en los tres grupos, pero en el grupo que recibió leche humana *B. breve* como un % de bifidobacterias totales fue más alto (11,7 %) que en el grupo SF (4,9 %) y GFSF (5,4%).

[0071] En la tabla 4 se proporciona la distribución de especies de lactobacilos en las heces de los lactantes alimentados de manera diferente.

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

	HMF	GFSF	SF
Especies	% (SE)	% (SE)	% (SE)
<i>L. acidophilus</i>	23,5 (4,5) <sup>a</sup>	24,5 (3,9) <sup>a</sup>	19,2 (4,1)
<i>L. casei</i>	6,0 (1,8) <sup>a</sup>	10,7 (2,5) <sup>a</sup>	8,3 (2,0) <sup>a</sup>
<i>L. delbrueckii</i>	<0,001 (0,00)	0,01 (0,01) <sup>bc</sup>	6,9 (2,8) <sup>ac</sup>
<i>L. fermentum</i>	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)	0,05 (0,03)
<i>L. paracasei</i>	22,1 (6,1) <sup>a</sup>	16,8 (4,2) <sup>a</sup>	5,6 (3,3)
<i>L. plantarum</i>	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)
<i>L. reuteri</i>	1,4 (0,6)	1,3 (0,4)	6,4 (3,2)
<i>L. rhamnosus</i>	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)

<sup>a</sup>: un aumento significativo durante el periodo de estudio  
<sup>b</sup>: una reducción significativa durante el periodo de estudio  
<sup>c</sup>: una diferencia significativa entre el grupo GFSF y SF

[0072] Como se puede observar en la tabla 4, una gran variedad de especies de *Lactobacillus* está presente en los lactantes alimentados con leche humana y alimentados con fórmula estándar. No obstante, la distribución de especies no es similar en lactantes alimentados con leche humana y en los lactantes alimentados con fórmula estándar. Una reducción en *L. delbrueckii* es visible en lactantes alimentados con leche humana a diferencia de lactantes que recibían una fórmula estándar, donde se observa un aumento. Después de 6 semanas de alimentación, un aumento significativo de *L. acidophilus*, *L. casei*, y *L. paracasei* se observa en lactantes alimentados con leche humana, mientras que el aumento de *L. acidophilus* y *L. paracasei* no es significativo en lactantes alimentados con fórmula. En comparación con los lactantes alimentados con leche humana los lactantes alimentados con fórmula estándar tienden a tener concentraciones relativas más altas de *L. fermentum* y *L. reuteri*. Sorprendentemente, el análisis de las muestras fecales de lactantes GFSF muestra una gran variedad en la flora de *Lactobacillus* similar a los lactantes alimentados con leche humana. La distribución de especies en lactantes alimentados con GFSF es muy similar a la que se observa en lactantes alimentados con leche humana. Como se observa en lactantes alimentados con leche humana, los lactantes alimentados con GFSF tienen cantidades relativamente disminuidas de *L. delbrueckii*, *L. reuteri* y *L. fermentum* y cantidades aumentadas de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. paracasei*. Las cantidades relativas de *L. paracasei* en lactantes alimentados con GFSF tienden a ser inferiores a aquellas de lactantes alimentados con leche humana, sin embargo. Estos resultados son indicativos de que la alimentación de una mezcla de sacáridos A y B no digeribles, que comprenden al menos 60, especialmente al menos 98 mol % de una o varias unidades monosacáridas seleccionadas del grupo consistente en galactosa, fructosa y glucosa, y que A y B difieren en la estructura química resulta en una distribución de especies de bifidobacterias y lactobacilos similar a aquellas observadas en lactantes alimentados con leche humana (es decir *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, y/o *L. reuteri* relativamente disminuyeron y *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *L. casei*, *L. paracasei* y/o *L. acidophilus* aumentaron relativamente). También estos resultados son indicativos de que la administración de esta mezcla de sacáridos A y B no digeribles en combinación con *B. breve* o con *B. breve* más *L. paracasei* restaurará la flora intestinal en lactantes de manera que ésta imita la de lactantes alimentados con leche humana con respecto a la distribución de especies de bifidobacterias y *Lactobacillus*, haciendo que la flora intestinal más parecida a la de lactantes alimentados con leche humana tenga un efecto beneficioso en el tratamiento y/o prevención de trastornos gastrointestinales, trastornos inmunológicos y/o trastornos endocrinos en lactantes.

#### Ejemplo 2: Efecto en la reacción alérgica

[0073] Ratones Balb/c macho sin patógenos específicos fueron obtenidos de Charles River (Maastricht, Países Bajos). Alimento y agua se proporcionaron *ad libitum* y los ratones fueron usados con una edad de 6-9 semanas...

[0074] Los ratones fueron sensibilizados por dos inyecciones i.p. con 10 µg de ovalbúmina adsorbida en 2,25 mg de hidróxido de aluminio en 100 µl de solución salina o solución salina sola en días los 0 y 7. Los ratones fueron desafiados en los días 35, 38, y 41 por inhalación de aerosoles de ovalbúmina en una cámara de exposición a plexiglás durante 20 minutos. Los aerosoles fueron generados pulverizando una solución de ovalbúmina (10 mg/ml) en la solución salina utilizando un nebulizador Pari LC Star (Pari respiratory Equipment, Richmond, VA, EEUU).

- 5 [0075] Los ratones fueron tratados a diario con  $1 \times 10^9$  cfu de *Bifidobacterium breve* y 25 mg de una mezcla de transgalacto-oligosacáridos y fructopolisacáridos (9:1) (mezcla de TOS / fructopolisacáridos del ejemplo 2) por vía oral a través de alimentación forzada (0,2 ml, solución de sal fisiológica) empezando en el día 28 hasta el final del experimento (es decir día 42). Como control, 0.2 ml de solución de sal fisiológica se administró por alimentación forzada.
- [0076] La receptividad de las vías respiratorias a la metacolina pulverizada inhalada fue determinada 24 horas después del desafío con aerosol final, en ratones conscientes, incontrolados usando pletismografía de cuerpo entero (BUXCO, EMKA, París, Francia). La respuesta de las vías respiratorias fue expresada como pausa mejorada (penH).
- 10 [0077] Resultados: mediciones en la muestra de hiper-receptividad de las vías respiratorias que en comparación con el control los ratones que recibieron *B. breve*, TOS y fructopolisacárido muestran una hiper-receptividad de las vías respiratorias estadísticamente reducida, indicativo de una reacción asmática reducida. En la figura 1, la hiper-receptividad de las vías respiratorias se fija como PenH relativo (pausa mejorada) contra la concentración de metacolina para ratones que reciben una combinación de *B. breve* + una mezcla de TOS / fructopolisacárido y un
- 15 grupo de control de ratones que reciben solución salina en su lugar. Los valores fijados de PenH relativo se obtienen después de sustracción de los valores de forma preliminar obtenidos para ratones no sensibilizados a la ovoalbúmina y normalización al valor obtenido para el grupo de control a la máxima concentración de metacolina.

### Ejemplo 3

- 20 [0078] Una fórmula de leche infantil que contiene por 100 ml de producto final una viscosidad de  $2,0 \pm 0,2$  mPa.s y:
- |  |                       |
|--|-----------------------|
| 13 % energía de proteína (caseína y suero de leche)  | 2.2 g                 |
| 49 % energía de carbohidratos digeribles             | 8.6 g                 |
| 37 % energía de grasa                                | 3.0 g                 |
| TOS (presente en Vivinal GOS) (DP medio entre 2 y 4) | 0.72 g                |
| 25 FOS (Raftiline CV) (medio DP entre 23-25)         | 0.08 g                |
| <i>B. breve</i>                                      | $1.6 \times 10^8$ cfu |
| <i>L. paracasei</i>                                  | $1.6 \times 10^8$ cfu |

## REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende 5 a 16 % en. de proteína, 30 a 60 % en. de grasa, y 25 a 75 % en. de carbohidratos que comprende  $10^2$  a  $10^{13}$  unidades formadoras de colonias (cfu) de *Bifidobacterium breve* y  $10^2$  a  $10^{13}$  unidades formadoras de colonias (cfu) de *Lactobacillus paracasei* por gramo de peso en seco de la composición.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, que comprende *Bifidobacterium breve* que tiene al menos 95 % de identidad de la secuencia de ARNr 16 S cuando se compara con la cepa de tipo de *B. breve* ATCC 15700.
3. Composición según la reivindicación 1 o 2, que comprende *Bifidobacterium breve* que se selecciona del grupo consistente en *B. breve* Bb-03, *B. breve* M-16V, *B. breve* R0070, DSM 20091, y LMG 11613, preferiblemente *B. breve* M-16V.
- 10 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende *Lactobacillus paracasei* que tiene al menos 95 % de identidad de la secuencia de ARNr 16S cuando se compara con la cepa de tipo de *L. paracasei* ATCC 25032.
- 15 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende *Lactobacillus paracasei* seleccionado del grupo consistente en *L. paracasei* F19, *L. paracasei* LAFTI L26, *L. paracasei* CRL 431, LMG 12165 y LMG 11407.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además 0,75 a 10 mg de nucleótidos por 100 ml.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un sacárido no digerible que tiene un grado de polimerización entre 2 y 200 y al menos 60 % mol de las unidades monosacáridas totales del sacárido no digerible son monosacáridos seleccionados del grupo consistente en los monosacáridos galactosa, fructosa y glucosa.
- 20 8. Composición según la reivindicación 7, donde el sacárido no digerible comprende al menos 67 % mol de unidades de galactosa basado en la cantidad total de unidades monosacáridas.
- 25 9. Composición según la reivindicación 7, donde el sacárido no digerible comprende al menos 67 % mol de unidades de fructosa basado en la cantidad total de unidades monosacáridas.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además un sacárido no digerible A y un sacárido B no digerible, donde:
- a. el sacárido A no digerible tiene un grado de polimerización entre 2 y 200 y comprende al menos 67 % mol de unidades de galactosa basado en la cantidad total de unidades monosacáridas; y
- 30 b. el sacárido B no digerible tiene un grado de polimerización entre 2 y 200 y comprende al menos 67 % mol de unidades de fructosa basado en la cantidad total de unidades monosacáridas.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para usar en la provisión de nutrición para un lactante.
- 35 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para usar en la normalización de la población de especies de *Bifidobacterium* y/o de *Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal de lactantes alimentados con leche no humana o parcialmente humana a la población de especies de *Bifidobacterium* y/o de *Lactobacillus* de lactantes alimentados con leche humana.
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para usar en la prevención y/o tratamiento de un trastorno gastrointestinal, trastorno inmunológico y/o trastorno endocrino.
- 40 14. Composición para uso según la reivindicación 13, donde el trastorno es seleccionado del grupo consistente en alergia, infección, rinitis alérgica, hipersensibilidad alimentaria, dermatitis atópica, eczema, asma, diarrea, diarrea vírica, inflamación intestinal, estreñimiento, calambres intestinales, cólicos, obesidad infantil, y diabetes.
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para usar en la prevención y/o tratamiento de alergia, dermatitis atópica, eczema y/o infección.

*Fig 1*

