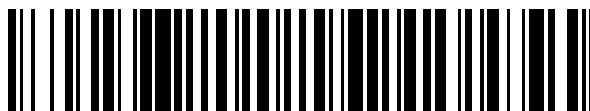


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 223**

51 Int. Cl.:

A23L 1/29 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)
A23L 1/308 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2007 E 07766165 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014 EP 2164349**

54 Título: **Fórmula sin proteínas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2014

73 Titular/es:
SHS INTERNATIONAL LTD. (100.0%)
100 WAVERTREE BOULEVARD
LIVERPOOL L7 9PT, GB

72 Inventor/es:
LANGFORD, JANE, ELIZABETH;
SULLIVAN, IAN;
DEERING, CATHERINE, TERESA y
GIFFEN, SANDRA, HELEN

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 525 223 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

Fórmula sin proteínas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la estimulación de la salud en niños que reciben una fórmula basada en aminoácidos.

10 Antecedentes de la invención

En una situación preferida, los niños se alimentan mediante lactancia materna. Sin embargo, a menudo en niños, tras un periodo inicial de lactancia materna, esta se interrumpe y la dieta del bebé comprende principalmente preparado lácteo para niños.

15 Sin embargo, en un grupo pequeño de niños, la lactancia materna o la alimentación con preparado infantil da como resultado reacciones adversas, tales como dolor y reacción alérgica. La gente que padece una alergia puede tener dificultades para digerir o metabolizar algunos constituyentes de los alimentos, que pueden dar lugar a reacciones alérgicas gastrointestinales y sistémicas. Las reacciones alérgicas se dirigen principalmente a la fracción proteica en el alimento. A menudo es necesario un cambio significativo en la dieta para reducir los sucesos adversos.

Para prevenir reacciones alérgicas a proteínas, el alimento para niños consiste en proteínas hidrolizadas de la leche, aminoácidos o proteínas no procedentes de la leche, por ejemplo, proteínas de soja y otros componentes nutricionales que no causan reacciones alérgicas.

25 Un alimento para niños conocido que comprende aminoácidos como fuente de nitrógeno es Neocate™, para su uso en pacientes que padecen alergia, molestias gastrointestinales, eccema, mala absorción o mala digestión.

30 En la técnica anterior, el número de distintas fuentes de nutrientes se mantiene a menudo bajo para evitar introducir alérgenos en la fórmula mediante la adición de estos ingredientes. Sin embargo, esto tiene la desventaja de que el bebé tampoco se beneficia de los efectos beneficiosos de dichos ingredientes adicionales.

35 El documento WO2005039319 divulga el uso de simbióticos en el preparado infantil que incluye proteínas en forma hidrolizada, reduciendo de este modo el riesgo de alergia (página 11, líneas 35-37). El documento WO2007/054989 describe cultivos bacterianos probióticos antialérgicos. El documento WO2006091103 divulga una composición nutricional que comprende simbióticos para el tratamiento y prevención de trastornos inmunes, incluyendo alergia. Se divulga el uso de hidrolizados de proteínas y/o aminoácidos libres para reducir el riesgo de alergia.

40 El objetivo de la presente invención es mejorar las formulaciones dietéticas para este grupo de pacientes vulnerables proporcionando beneficios nutricionales adicionales sin introducir alérgenos en la composición.

Sumario de la invención

45 Los presentes inventores han reconocido que en una fórmula elemental que contiene varios aminoácidos libres sin proteína intacta, es elevadamente impredecible cómo se desarrolla la flora intestinal. En lugar de las bifidobacterias y lactobacilos dominantes en la flora de los niños normales que reciben lactancia materna, muchas otras especies bacterianas, incluyendo especies potencialmente patógenas, pueden prevalecer en el intestino de los niños que reciben alimentos basados en aminoácidos.

50 La presente invención se define por las reivindicaciones y se describirá en la parte "descripción detallada de la invención".

55 El desarrollo de una flora intestinal saludable es particularmente importante en todos los niños, ya que estos niños a menudo ya padecen una función inmunológica deteriorada, que da como resultado cólicos, congestión, goteo nasal, sibilancias, vómitos, diarrea, heces sanguinolentas, moco en las heces, erupciones o eccemas.

60 Los presentes inventores han reconocido que el desarrollo de una flora saludable es de elevada importancia en niños que reciben una dieta que comprende principalmente aminoácidos libres como fuente de proteínas. Sin estar ligados a teoría alguna, los inventores reconocieron que una buena flora, es decir, una flora rica en Bifidobacterias y Lactobacilos, es especialmente beneficiosa para la maduración del sistema inmune (mucosal). Una buena flora previene el desarrollo de alergias o al menos reduce la gravedad de las alergias en dichos niños. Por lo tanto, los presentes inventores reconocieron la importancia crucial de un desarrollo beneficioso de la flora en estos niños.

65 A pesar de las limitaciones en la formulación de la fórmula dietética para dichos niños vulnerables, los presentes inventores descubrieron que una selección específica de oligosacáridos dietéticos, preferentemente fructanos y/o productos de la degradación de la pectina pueden añadirse beneficiosamente a la fórmula elemental para estimular

el desarrollo de la flora sin causar ningún efecto alérgico secundario.

No pueden usarse productos derivados de la leche en esta fórmula elemental, ya que esto puede dar lugar a la adición de alérgenos de la leche al producto. Por lo tanto, las fibras prebióticas de acuerdo con esta invención se seleccionan cuidadosamente a partir de fibras prebióticas conocidas para prevenir la adición de leche u otras proteínas intactas y potencialmente alergénicas que están presentes en las fibras a la composición no alergénica.

Los inventores descubrieron de manera sorprendente en un modelo reconocido internacionalmente para alergia, que cuando se combinan fibras prebióticas con bacterias probióticas, llamadas Bifidobacterias, hay presente un efecto sinérgico en la prevención de reacciones alérgicas. El efecto sinérgico es potencialmente muy beneficioso para los niños, pero también puede ser beneficioso para adultos.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la respuesta alérgica para varias composiciones ensayadas de acuerdo con el modelo de vacuna de ratón reconocido internacionalmente.

La Fig. 2 demuestra el efecto sinérgico de TD1 (*Bifidobacterium breve*) y fibras dietéticas (OS) en un modelo de ratón de alergia a caseína.

Descripción detallada de la invención

Una realización preferida de acuerdo con la invención comprende el uso de una composición que comprende aminoácidos libres como única fuente de proteínas, una fuente de ácidos grasos que comprende ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, una fuente de hidratos de carbono que comprende hidratos de carbono digeribles y no digeribles, y Bifidobacterias libres de proteína de leche para la fabricación de una composición para tratar a una persona que padece

- a. cólico, congestión, goteo nasal, sibilancias, vómitos, diarrea, heces sanguinolentas, moco en las heces, erupción, eccema, reflujo gastroesofágico, esofagitis eosinofílica o asma;
- b. alergia a la leche de vaca y/o intolerancia a proteínas de los alimentos; y/o
- c. infecciones,

en la que el hidrato de carbono no digerible se selecciona de una fuente libre de proteínas de la leche y la composición total está esencialmente libre de proteínas intactas.

La expresión "única fuente de proteínas" como se usa en el presente documento significa que la presente composición (preferentemente) contiene al menos un 99 % en peso de aminoácidos basándose en las proteínas totales, preferentemente al menos un 99,5 %, más preferentemente, al menos un 99,9 % en peso.

La invención proporciona adicionalmente una composición que comprende un componente proteico, un componente graso, un componente de hidrato de carbono digerible, un hidrato de carbono no digerible y bifidobacterias libres de proteína de leche en la que:

- a) el componente proteico contiene más del 99 % en peso de aminoácidos libres basándose en las proteínas totales, y que comprende al menos los siguientes aminoácidos libres: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina y glutamina;
- b) el componente de hidrato de carbono digerible contiene menos del 2 % en peso de lactosa, basándose en el total de hidratos de carbono digeribles;
- c) el hidrato de carbono no digerible comprende fructano soluble con un GP medio de entre 2 a 200 y un ácido galactourónico soluble con un GP medio entre 2 y 200; y
- d) el componente graso comprende entre un 0,1 y un 5 % en peso de LCPUFA basándose en el contenido total de ácidos grasos.

Como se muestra en la figura 1, la combinación de fructanos solubles de cadena larga (LFOS) con un oligosacárido ácido (AOS), que en este caso era hidrolizado de pectina, funciona al igual que las bifidobacterias cuando se ensayan en el modelo de ratón. Está claro, sin embargo, que si se combinan los oligosacáridos con las Bifidobacterias, los efectos se mejoran fuertemente.

La composición nutricional comprende tanto las fibras no digeribles y las Bifidobacterias, ya que esta composición proporciona los mejores resultados en el modelo de ratón alérgico. (Véase la figura 1). Preferentemente, se usa *Bifidobacteria breve*.

Hidrato de carbono no digerible

Los fructanos son oligosacáridos neutros basados en fructosa (>50 % de las unidades de monosacárido son fructosa), preferentemente, inulina, fructano y/o fructooligosacárido, más preferentemente, una mezcla de fructooligosacárido de cadena larga (FOScl) con un GP medio de entre 10 - 60 y fructooligosacárido de cadena corta (FOScc) con un GP medio de entre 3 y 10. Una realización preferida comprende una mezcla de FOScl y FOScc en una proporción de 1:9, ya que esta proporción se aproxima más a la composición de oligosacáridos en la leche materna y se ha demostrado que estimula de manera efectiva el crecimiento de bifidobacterias en los niños.

El presente método comprende preferentemente la administración de una ración que comprende entre 0,05 y 25 gramos de sacárido no digerible, preferentemente entre 0,1 y 5 gramos. El presente método comprende preferentemente la administración de una ración que comprende entre 0,05 y 25 gramos de FOScc, preferentemente entre 0,1 y 5 gramos de FOScc. El presente método comprende preferentemente la administración de 0,05 a 25 gramos de sacárido no digerible por día, preferentemente entre 0,1 y 5 gramos por día.

Producto de degradación de pectina

La pectina se divide en dos categorías principales: pectina elevadamente metoxilada, que se caracteriza por un grado de metoxilación por encima del 50 % y pectina poco metoxilada que tiene un grado de metoxilación por debajo del 50 %. Como se usa en el presente documento, "grado de metoxilación" (también citado como GE o "grado de esterificación") pretende indicar el alcance hasta el cual los grupos de ácidos carboxílicos libres contenidos en el ácido poligalactourónico se han esterificado (por ejemplo, mediante metilación). La presente pectina se prepara preferentemente a partir de pectina elevadamente metoxilada.

La pectina se caracteriza preferentemente por un grado de metoxilación por encima del 20 %, preferentemente por encima del 30 %, aún más preferentemente por encima del 50 %.

La pectina, tal como se usa en el presente método, tiene un grado medio de polimerización (GP) entre 2 y 500, preferentemente entre 10 y 250 y lo más preferentemente entre 20 y 50. Cuando se usa una mezcla de pectinas con diferentes grados de polimerización, el GP medio de la mezcla de oligosacárido ácido es preferentemente entre 3 y 1000, más preferentemente entre 3 y 250, aún más preferentemente entre 3 y 50. Se ha descubierto que un GP menor de los oligosacáridos mejora la palatabilidad y da como resultado un producto de viscosidad reducida si el oligosacárido ácido se administra en forma líquida.

La pectina se administra preferentemente en una cantidad de entre 0,1 y 100 gramos por día, preferentemente entre 0,4 y 50 gramos por día, aún más preferentemente entre 1 y 20 gramos por día.

Una realización preferida comprende fructanos y productos de degradación de pectina en una proporción de 50:50 - 95: 5. Preferentemente, la proporción es 85:15, ya que esta es la proporción de oligosacáridos neutros y oligosacáridos ácidos presentes en la leche materna.

Bacterias probióticas

Las bacterias probióticas que son adecuadas para su uso en la invención deben tener preferentemente al menos un efecto positivo en el modelo de alergia de ratón descrito en los ejemplos más adelante. Los probióticos además deben recogerse en ausencia sustancial de alérgenos alimentarios. Esto necesita procedimientos especiales o medios de cultivo sin proteínas intactas para la preparación de las bacterias probióticas.

La presente invención requiere bacterias probióticas en ausencia sustancial de proteínas de la leche.

Las bacterias probióticas son bifidobacterias. Aún más preferentemente, la bacteria probiótica es *Bifidobacterium breve*. Las bifidobacterias tienen el efecto inductor de tolerancia más fuerte en los modelos de ratón y por lo tanto se prefieren. En concreto, *Bifidobacterium breve* es elevadamente efectiva.

En otra realización preferida, las Bifidobacterias son no viables. Esto tiene la ventaja de que la vida útil del producto se hace más larga y que la actividad moduladora inmunológica de la bacteria se hace independiente del número de bifidobacterias vivas. Los experimentos han demostrado que los efectos estimuladores inmunológicos de las bacterias no viables es similar y en ocasiones incluso mejor que la actividad de bifidobacterias vivas.

La presente composición comprende preferentemente de 10^2 a 10^{13} unidades formadoras de colonias (ufc) de bifidobacterias por gramo de peso seco de la presente composición, preferentemente de 10^2 a 10^{12} ufc, más preferentemente de 10^5 a 10^{10} ufc, los más preferentemente, de 10^4 a 5×10^9 ufc.

Aminoácidos

Pueden usarse aminoácidos en la fórmula para lactantes y niños. Sin embargo, la composición de los aminoácidos en la fórmula comprende preferentemente todos los aminoácidos esenciales excepto para los pacientes con fenilcetonuria (FCU) y errores no de FCU innatos del metabolismo, y es preferentemente óptima para alimentos para niños o nutrición para lactantes. Los inventores han descubierto que la composición óptima de aminoácidos debe ser lo más cercana posible a la composición de aminoácidos de la fracción proteica de la leche materna. Esto da como resultado una composición de aminoácidos como la ilustrada en la tabla 1 (ver más adelante).

En una realización preferida, la composición comprende menos del 1 % en peso de péptidos basándose en las proteínas totales y más del 99 % en peso de aminoácidos libres basándose en las proteínas totales, que comprende al menos los siguientes aminoácidos libres: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina y glutamina;

Fórmula

La fórmula de acuerdo con la invención comprende aminoácidos libres como fuente de nitrógeno, grasas incluyendo una mezcla de grasas que comprende LCPUFA e hidratos de carbono. Las vitaminas y minerales se añaden de acuerdo con los requerimientos legales.

La presente composición proporciona preferentemente nutrición al bebé, y comprende un componente lipídico, un componente proteico y un componente de hidratos de carbono. El componente lipídico proporciona preferentemente del 5 al 50 % de las calorías totales, el componente proteico proporciona preferentemente del 5 al 50 % de las calorías totales, y el componente de hidrato de carbono proporciona preferentemente del 15 al 90 % de las calorías totales. La presente composición se usa preferentemente como preparado infantil, en el que el componente lipídico proporciona del 35 al 50 % de las calorías totales, el componente proteico proporciona del 7,5 al 12,5 % de las calorías totales, y el componente de hidrato de carbono proporciona del 40 al 55 % de las calorías totales. Para el cálculo del % de calorías totales para el componente proteico, se necesita tomar la energía total proporcionada por los aminoácidos.

LCPUFA

El contenido de LC-PUFA con 20 y 22 átomos de carbono en la presente composición, no se excede preferentemente el 15 % en peso del contenido total de grasas, preferentemente, no se excede del 10 % en peso, aún más preferentemente, no se excede del 5 % en peso del contenido total de grasas. La presente composición comprende preferentemente al menos un 0,1 % en peso, preferentemente al menos un 0,25 % en peso, más preferentemente al menos un 0,5 % en peso, aún más preferentemente al menos un 0,75 % en peso de LC-PUFA con 20 y 22 átomos de carbono del contenido total de grasas. El contenido en ácido docosahexaenoico (DHA) preferentemente no se excede del 5 % en peso, más preferentemente, no se excede del 1 % en peso pero es al menos un 0,15 % en peso de las grasas totales. Ya que se descubrió que el ácido araquidónico (AA) es particularmente efectivo en la reducción de la permeabilidad de las uniones estrechas, la presente composición comprende cantidades relativamente elevadas, preferentemente al menos un 0,1 % en peso, aún más preferentemente al menos un 0,25 % en peso, lo más preferentemente al menos un 0,5 % en peso de las grasas totales. El contenido en AA preferentemente no se excede del 5 % en peso, más preferentemente, no se excede del 1 % en peso de grasas totales. Un exceso de metabolitos de AA puede causar inflamación. Por lo tanto, la presente composición comprende preferentemente AA y DHA, en la que la proporción en peso de AA/DHA está preferentemente por encima de 0,25, preferentemente, por encima de 0,5, aún más preferentemente por encima de 1. La proporción está preferentemente por debajo de 25.

Los LC-PUFA son preferentemente aceites de células individuales no derivados de pescados, por ejemplo, disponibles a través de Martek.

Las características preferidas para composiciones de acuerdo con la invención se exponen en las Tablas 1-3.

Tabla 1. Contenido de aminoácidos de composición de acuerdo con la invención

Aminoácido	Unidades	Contenido de AA como porcentaje de AA total			
		Intervalo (g/100 g)		Bebé 0-1 años	
				Niño 1-10 años	
Ala	gramo	3,95	4,01	3,12	3,03
Arg	gramo	6,99	7,02	14,24	13,91
Asp	gramo	6,54	6,57	5,73	5,59
Cys	gramo	2,59	2,58	1,85	2,91
Ácido Glu	gramo		0,00	0,00	0,00
Gly	gramo	6,15	6,12	5,11	5,01
His	gramo	4,02	3,99	3,71	3,61
Iso	gramo	6,15	6,12	5,11	5,01

Leu	gramo	10,56	10,51	8,54	8,32
Lys	gramo	7,19	7,19	6,25	6,11
Meth	gramo	1,68	1,69	4,02	3,90
Phe	gramo	7,51	7,47	7,10	6,93
Pro	gramo	4,73	4,72	5,97	5,82
Ser	gramo	4,60	4,61	3,71	3,61
thr	gramo	5,18	5,17	4,29	4,19
Try	gramo	2,07	2,08	1,72	1,69
tyr	gramo	4,73	4,72	1,44	1,40
Val	gramo	6,74	6,74	5,42	5,30
Car	gramo	0,06	0,06	0,10	0,12
tau	gramo	0,19	0,20	0,17	0,17
Glu	gramo	8,42	8,43	12,35	13,39
total	gramo	100	100	99,97	100

Tabla 2. Formula nutricional infantil para niños alérgicos

Perfil nutricional de preparado infantil de acuerdo con la invención (polvo)			
	Unidades	Nivel/100 g	Nivel/100 kcal
Equivalente en proteína	gramo	13	2,9
Energía	kcal	455	100
Nitrógeno	gramo	2,1	
Hidratos de carbono	gramo	49	10,8
Grasa (total)	gramo	23	5,1
(TCM)	%	33	
(TCL)	%	67	

Tabla 3. Intervalos en la composición de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCP)

	% de ácidos grasos		
	Preferido	Intervalo +/- 25 %	
Ácido araquidónico	0,35	0,26	0,44
Ácido docosahexanoico	0,20	0,15	0,25
LCP total	0,55	0,41	0,69

5 Los intervalos preferidos en la composición de oligosacáridos son de 0,4-1,2 g/100 ml en la que el 85 % en peso es FOScc y FOScl y el 15 % es hidrolizado de pectina. Preferentemente, la proporción de FOScc a FOScl es entre 2 y 20, aún más preferentemente, la proporción es 9.

10 Una realización de formulación completa en polvo libre de proteínas de la leche y alérgenos de acuerdo con la invención que es adecuada para su dilución con agua para formar una alimentación enteral comprende:

Componente	Por 100 g de polvo
Equivalente de proteína (g)	13
<i>Aminoácidos totales (g)</i>	15,5
Grasas totales (g)	23
<i>Aceite de girasol (g)</i>	4
<i>Aceite de coco fraccionado (g)</i>	7
<i>Aceite de canola (g)</i>	4
<i>Aceite de girasol alto oleico (g)</i>	6,6
<i>Aceite de ARASCO™ (g)</i>	0,21
<i>Aceite de DHASCO™ (g)</i>	0,11
Hidrato de carbono: Maltodextrina (g)	49
Prebiótico (g)	5,33
<i>FOScc (g)</i>	4,1
<i>FOScl(g)</i>	0,43
<i>AOS (g)</i>	0,8
Probiótico: <i>B. breve</i> (unidades formadoras de colonias; UFC)	1 x 10 ¹⁰
Otras vitaminas/minerales/oligoelementos	Equilibrio

La formulación anterior proporciona aproximadamente 455 kcal de energía por 100 gramos de polvo.

La formulación puede diluirse con agua hervida enfriada para proporcionar una concentración recomendada del 15 % p/v.

Usos

La composición se usa preferentemente para tratar a un niño (en particular con una constitución atópica) que padece

- a. cólico, congestión, goteo nasal, sibilancias, vómitos, diarrea, heces sanguinolentas, moco en las heces, erupción, eccema, reflujo gastroesofágico, esofagitis eosinofílica o asma;
- b. alergia a la leche de vaca y/o intolerancia a proteínas de los alimentos; y/o
- c. infecciones

La composición también puede usarse preferentemente para mejorar las características de las deposiciones de niños que padecen los síntomas anteriormente mencionados. La composición está específicamente diseñada para niños de entre 0 y 3 años. Con algunas adaptaciones en el perfil de aminoácidos (ver tabla 1) la composición también es adecuada para niños de entre 3 y 10 años de edad. Los niños alérgicos a menudo padecen diarrea, pero también tienen estreñimiento. Una composición preferida que puede usarse para prevenir y tratar estos síntomas comprende fibras de acuerdo con la composición de la leche materna, en la que la proporción FOScc/FOScl es 9:1 y adicionalmente, está presente hidrolizado de pectina.

Ejemplos

Para determinar los efectos estimuladores inmunológicos de los oligosacáridos y el probiótico *Bifidobacterium breve* (TD1) se efectuaron pruebas en un modelo de vacuna de ratón reconocido internacionalmente (fig. 1) y en un modelo alérgico (fig. 2).

Materiales y método del modelo de vacuna

Ratones

Se obtuvieron ratones C57Bl/6J01aHsd hembra de 6 y 8 semanas de edad a través de Harlan (Horst, Países Bajos) y se mantuvieron en condiciones normales con un ciclo de oscuridad y luz de 12 horas y acceso libre a comida y agua. Todos los experimentos se aprobaron por un comité independiente de experimentación animal (DEC Consult, Bilthoven, Países Bajos).

Dietas y preparaciones de oligosacáridos

Todos los animales recibieron dietas basadas en AIN-93-G semipurificado (Research Diet Services, Wijk bij Duurstede, Países Bajos). Todos los productos de oligosacáridos suplementados se intercambiaron por la misma cantidad de hidratos de carbono totales, para mantener igual este parámetro. Además, este enfoque dio como resultado una composición general de hidratos de carbono comprable en diferentes dietas, para asegurar que la flora intestinal estuviese mínimamente influenciada por diferencias entre dietas control y de ensayo en parámetros tales como tiempo de paso por el intestino y retención de fluidos. Los oligosacáridos se mezclaron en la dieta AIN-93G y se comprimieron en bolitas.

Protocolo de vacunación y respuesta a DTH

Los experimentos de vacunación se llevaron a cabo usando Influvac (Solvay Pharmaceuticals, Weesp, Países Bajos) desde la temporada 2002/2003. Es una vacuna de virus de la gripe inactivado basada en antígenos aislados de hemaglutinina (HA) y neuramidasa de tres cepas de mixovirus de la gripe, en una dosis equivalente a 30 µg/ml de HA por cepa (90 µg/ml de HA en total). Se usó un adyuvante oleoso en todas las vacunaciones (Stimune, anteriormente conocido como Specol; Cedi-diagnostics, Lelystad, Países Bajos). Los ratones recibieron una vacunación primaria y una vacunación de refuerzo, que consiste en una inyección subcutánea (sc) de una mezcla 1:1 de vacuna y adyuvante en un volumen total de 100 µl. La vacunación de refuerzo se administró 21 días después de la vacunación primaria. Los experimentos terminaron 10 días después de la vacunación de refuerzo. Se tomaron muestras de sangre (tomadas mediante punción retroorbital) antes de la vacunación primaria y secundaria y al final del experimento. Los grupos de control negativo que se incluyeron en todos los experimentos (indicados como "grupo simulado") recibieron inyecciones con una mezcla 1:1 de PBS y adyuvante en un volumen total de 100 µl. Los grupos simulados no se usaron para comparaciones estadísticas con grupos suplementados, sino que sirvieron únicamente para demostrar la especificidad de las respuestas inducidas por la vacuna. Las reacciones a DTH se indujeron 9 días después de la vacunación de refuerzo, mediante inyección sc de 25 µl de Influvac en el pabellón auricular de ambas orejas. Se midió el grosor de la oreja por duplicado antes de la exposición a la vacuna y 24 horas después, usando un micrómetro digital (Mitutoyo Digimatic 293561, Veenendaal, Países Bajos). La respuesta a DTH se calculó restando el grosor inicial de la oreja del valor a las 24 h después de la exposición.

*Material y métodos para el modelo de alergia a la leche de vaca***Productos químicos**

- 5 Se obtienen caseína y suero lácteo a través DMV international, Vehel, Países Bajos. La toxina del cólera se compra a través de Quadratech Diagnostics, Epsom, Reino Unido. El PBS se compra a través de Cambrex Bio Science, Verviers, Bélgica. El tampón de recubrimiento de Elisa se obtiene a través de Sigma, Alphen aan den Rijn, Países Bajos. La IgE de rata anti ratón marcada con biotina se compra a través de BD Biosciences, Alphen aan den Rijn, Países Bajos. Todos los demás agentes químicos se obtienen a través de Sigma-Aldrich-Chemie, Zwijndrecht, Países Bajos.

Sensibilización oral y provocación de ratones

- 15 Se compraron ratones C3H/HeOuj hembra de tres a 5 semanas de edad libres de patógenos específicos (n = 4-6 por grupo) a través de Charles River Laboratories (Maastricht, Países Bajos), mantenidos con alimento para ratones libre de proteína de leche de vaca (Special Diets Services, Witham, Essex, Reino Unido) y se alojaron en el animalario en la Universidad de Utrecht. El cuidado y uso de los animales se llevó a cabo de acuerdo con las orientaciones del Comité Holandés de Experimentación con Animales. Los animales se sensibilizaron por vía intragástrica (i.g) con 0,5 ml de caseína homogeneizada (40 mg/ml de PBS) con toxina del cólera (TC, 20 µl/ml de PBS) como adyuvante usando una aguja roma. Los ratones de control recibieron TC solo o PBS. Los ratones se reforzaron semanalmente durante un periodo de 6 semanas, una semana después de la última sensibilización, se expuso por vía i.g. a los ratones con 100 mg de caseína.

- 25 Se recogieron muestras de sangre y se centrifugaron a continuación (15 min. a 13500 rpm.). Se almacenaron los sueros a -70 °C. Los ratones se eutanasiaron mediante dislocación cervical media hora después de la exposición i.g.

Respuesta cutánea específica de alérgenos

- 30 La respuesta cutánea específica de alérgenos se midió después de la inyección de la proteína específica en el pabellón auditivo. Antes de la exposición i.g. (t = 0), se inyectó por vía intradérmica (i.d) 20 µl de caseína homogeneizada (0,5 mg/ml en PBS) en la oreja izquierda a los ratones de control sensibilizados con caseína, respectivamente. Se inyectaron 20 µl de PBS en la oreja derecha como control de vehículo. Los ratones de TC y PBS recibieron también una exposición a caseína en la oreja usando inyecciones de PBS como control. Se midió el grosor de la oreja en duplicado usando un micrómetro digital (Mitutoyo, Veenendaal, Países Bajos), a las 0, 1, 4 y 24 horas después de la exposición. La inflamación de la oreja específica del alérgeno se calculó restando el espesor inicial (0 h) y el de control (oreja derecha) del valor medido en los tres distintos momentos (1, 4 y 24 h).

Medida de niveles de inmunoglobulina en suero y de proteasa 1 de mastocitos

- 40 Las concentraciones de IgE totales y los niveles de caseína o IgE, IgG 1 e IgG2a específicos de suero lácteo se determinaron en el suero de ratones eutanasiados mediante ELISA. Se recubrieron placas Microton (Greiner, Alphen aan den Rijn, Países Bajos) con caseína en tampón de recubrimiento o IgE de rata anti ratón (1 µg/ml) en PBS durante 18 horas a 4 °C. Las placas se lavaron y bloquearon durante 1 hora con BSA al 5 %. Se aplicaron las muestras de suero a varias diluciones y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 5 veces y se incubaron con 1 µg de IgE de rata anti ratón marcada con biotina durante una hora y media a temperatura ambiente. Después de lavar las placas se incubaron con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante una hora, se lavaron y se revelaron con o-fenilendiamina (OPD). La reacción se detuvo con H₂SO₄ 4 M y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas Benchmark (Biorad, California, EE.UU.). Las concentraciones en suero de proteasa 1 de mastocitos de ratón (mMCP-1) se determinaron como se describe anteriormente usando un kit ELISA comercialmente disponible (Moredun Scientific Ltd., Midlothian, Reino Unido).

- 55 Los resultados del modelo de vacuna de ratón se muestran en la Fig. 1, en la que queda claro que la combinación de TD1 (= *Bifidobacterium breve*) proporciona el efecto más fuerte en la respuesta a DTH y es significativamente mejor que TD1 solo o cualquier otra combinación ensayada.

Los resultados del modelo de alergia a caseína en ratón se muestran en la Fig. 2 y demuestran que la combinación de fibra dietética y TD1 inhibe de manera sinérgica la respuesta "alérgica" de DTH a caseína.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende más del 99 % en peso de aminoácidos libres basado en las proteínas totales, una fuente de ácidos grasos que comprende ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, una fuente de hidratos de carbono que comprende hidratos de carbono digeribles y no digeribles, y *Bifidobacterias* libres de proteínas de la leche para la fabricación de una composición para tratar a una persona que padezca
 - a. cólico, congestión, goteo nasal, sibilancias, vómitos, diarrea, heces sanguinolentas, moco en las heces, erupción, eccema, reflujo gastroesofágico, esofagitis eosinofílica o asma;
 - b. alergia a la leche de vaca y/o intolerancia a proteínas de los alimentos; y/o
 - c. infecciones,en donde el hidrato de carbono no digerible se selecciona de una fuente libre de proteínas de la leche y la composición total está esencialmente libre de proteínas intactas.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la persona es un bebé de entre 0 y 36 meses de edad.
3. Uso de una composición que comprende aminoácidos libres como única fuente de aminoácidos, una fuente de ácidos grasos que comprende ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, una fuente de hidratos de carbono que comprende hidratos de carbono digeribles y no digeribles, y *Bifidobacterias* libres de proteína de la leche para la fabricación de una composición para estimular la maduración del sistema inmunológico en un bebé con una constitución atópica, en donde el hidrato de carbono no digerible se selecciona de una fuente libre de proteína de la leche y la composición total está esencialmente libre de proteínas intactas.
4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los aminoácidos libres basados en la proteína total comprenden al menos los siguientes aminoácidos libres: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina y glutamina.
5. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que los aminoácidos libres comprenden entre un 5-16 % de la energía de la composición total, entre un 30-60 % de la energía de grasas, de las que entre un 0,1-5 % de la energía es de LCPUFA y entre el 25-75 % de la energía de hidratos de carbono digeribles.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el LCPUFA comprende entre un 0,2-1 % de la energía de la composición total.
7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que el hidrato de carbono no digerible comprende (i) fructano soluble con un grado medio de polimerización de entre 3 a 200 y (ii) un ácido galactourónico soluble con un grado medio de polimerización de entre 3 y 200.
8. Composición que comprende un componente proteico, un componente graso, un componente de hidrato de carbono digerible, un hidrato de carbono no digerible y *bifidobacterias* libres de proteína de la leche en donde:
 - (a) el componente proteico comprende más del 99 % en peso de aminoácidos libres basado en la proteína total y comprende al menos los siguientes aminoácidos libres: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina y glutamina;
 - (b) el componente de hidrato de carbono digerible contiene menos del 2 % en peso de lactosa, basado en el total de hidratos de carbono digeribles;
 - (c) el hidrato de carbono no digerible comprende fructano soluble con un GP medio de entre 2 a 200 y un ácido galactourónico soluble con un GP medio entre 2 y 200; y
 - (d) el componente graso comprende entre un 0,1 y un 5 % en peso de LCPUFA basado en el contenido total de ácidos grasos.
9. Composición de acuerdo con la Reivindicación 8 en la que:
 - el componente graso comprende entre un 0,2 y un 1 % en peso de LCPUFA basado en el contenido total de ácidos grasos.
10. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, que comprende fructano soluble no digerible con un GP medio entre 2 y 200 y un ácido galactourónico soluble no digerible con un GP medio entre 2 y 200.
11. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende *Bifidobacterium breve*.
12. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que comprende ácido araquidónico y/o ácido docosahexanoico.

13. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en la que el hidrato de carbono no digerible consiste en FOS de cadena larga y FOS de cadena corta.

5 14. Composición de acuerdo con la Reivindicación 13, en la que el FOS de cadena larga tiene un GP medio entre 10-60 y el FOS de cadena corta tiene un GP medio entre 3 y 10.

15. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-14, en la que el producto es un polvo o un líquido.

10 16. Una composición que comprende aminoácidos libres como única fuente de proteína, una fuente de ácidos grasos que comprende ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, una fuente de hidratos de carbono que comprende hidratos de carbono digeribles y no digeribles y Bifidobacterias libres de proteína de la leche en donde el hidrato de carbono no digerible se selecciona de una fuente libre de proteína de la leche y la composición total está esencialmente libre de proteínas intactas, para su uso en una persona que padezca

15 (a) cólico, congestión, goteo nasal, sibilancias, vómitos, diarrea, heces sanguinolentas, moco en las heces, erupción, eccema, reflujo gastroesofágico, esofagitis eosinofílica o asma;
(b) alergia a la leche de vaca y/o intolerancia a proteínas de los alimentos;
20 (c) y/o infecciones.

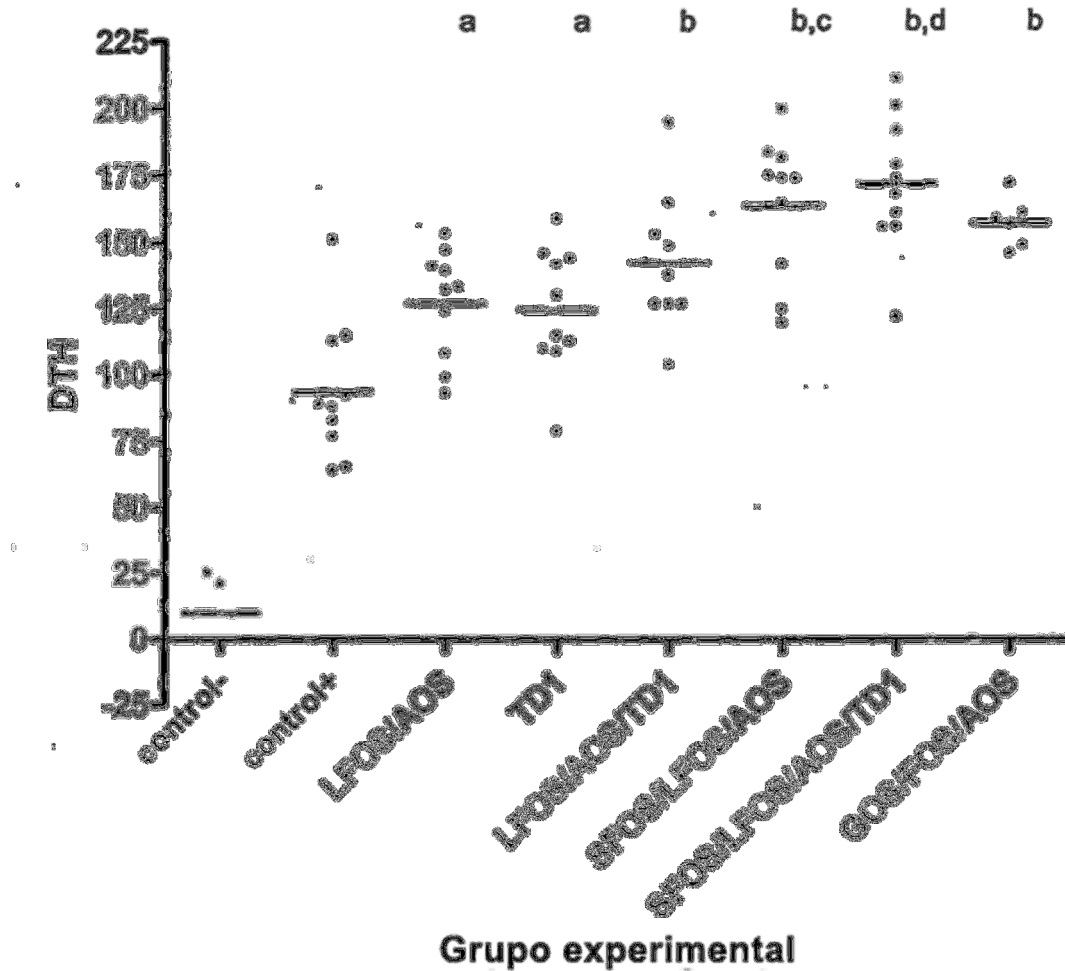


Figura 1 - Modelo de vacuna de ratón

a= $p < 0,05$ en comparación con control+, b= $p < 0,01$ en comparación con control+, c= $p < 0,05$ en comparación con LFOS/AOS, d= $p < 0,001$ en comparación con TD1 (= *Bifidobacterium breve*).

Porcentajes de inflamación de la oreja

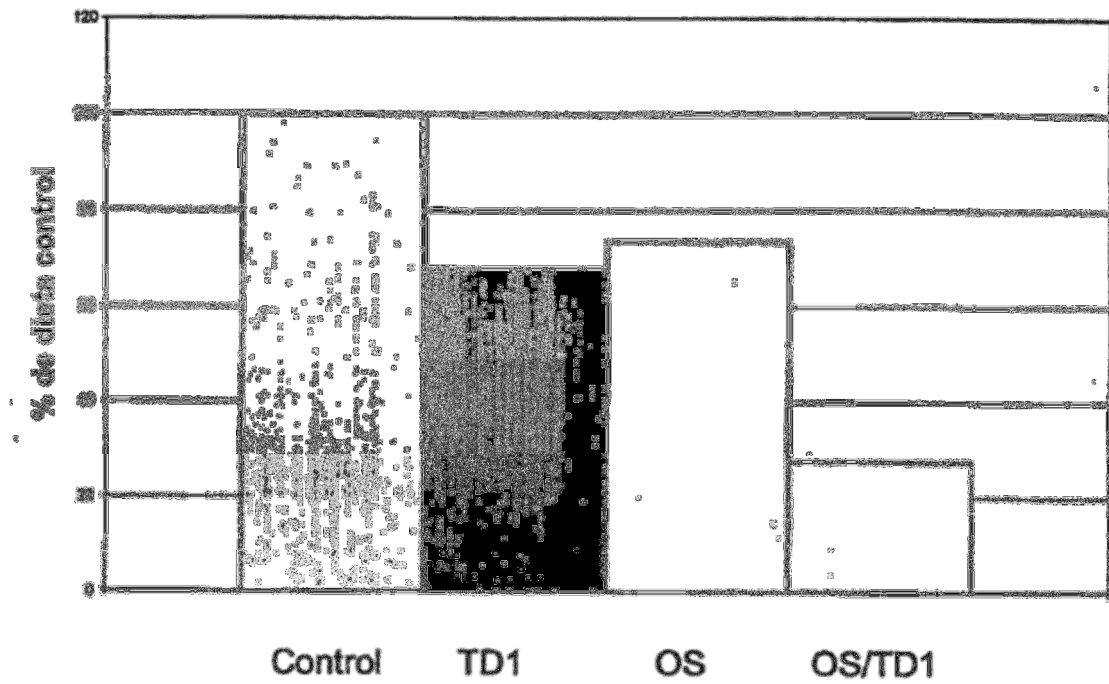


Fig. 2- Modelo de alergia a caseína de ratón