

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 636**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A23L 1/29 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23C 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2007 E 07711829 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 1993576**

54 Título: **Mezcla simbiótica**

30 Prioridad:

07.03.2006 EP 06110805

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

10.12.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SPRENGER, NORBERT;
MORGAN, FRANÇOIS;
BERROCAL, RAFAEL;
BRAUN, MARCEL;
CHERBUT, CHRISTINE y
DUNCAN, PETER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 553 636 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mezcla simbiótica

5 Campo de la invención

La invención se refiere a preparaciones que comprenden un probiótico y una mezcla prebiótica que se han diseñado específicamente para mejorar la eficiencia y la eficacia del probiótico, y a productos alimentarios que comprenden dicha preparación.

10

Antecedentes de la invención

El colon humano está colonizado con una amplia variedad de bacterias que tienen efectos tanto positivos como negativos sobre la fisiología del intestino así como otras influencias sistémicas. Los grupos predominantes de bacterias que se encuentran en el colon incluyen bacteroides, bifidobacterias, eubacterias, clostridia y lactobacilos. Las bacterias presentes presentan actividades fluctuantes en respuesta a la disponibilidad del sustrato, al potencial redox, al pH, a la tensión de O₂ y a la distribución en el colon. En general, las bacterias intestinales se pueden dividir en especies que pueden potencialmente ejercer efectos dañinos o beneficiosos en el huésped. Los efectos patógenos (que pueden ser causados por las clostridia o los bacteroides, por ejemplo) incluyen diarrea, infecciones, daño hepático, carcinogénesis y putrefacción intestinal. Los efectos promotores de la salud pueden ser causados por la inhibición del crecimiento de las bacterias dañinas y de la colonización por las mismas, por la estimulación de las funciones inmunológicas, por la mejora de la digestión y la absorción de nutrientes esenciales y la síntesis de vitaminas. Es deseable un aumento de las cantidades y/o las actividades de especies bacterianas tales como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* que pueden tener propiedades promotoras de la salud.

25

En el pasado reciente, determinadas cepas bacterianas han atraído una atención considerable ya que se ha descubierto que exhiben propiedades valiosas para el hombre si son ingeridas. En particular, se ha descubierto que cepas específicas de los géneros *Lactobacilli* y *Bifidobacteria* son capaces de colonizar, al menos transitoriamente, la mucosa intestinal, para reducir la capacidad de las bacterias patógenas de adherirse al epitelio intestinal, tener efectos inmunomoduladores y contribuir al mantenimiento del bienestar. Tales bacterias se denominan comúnmente probióticos.

30

Se han llevado a cabo estudios exhaustivos para identificar nuevas cepas de probióticos. Por ejemplo, los documentos EP 0 199 535, EP 0 768 375, WO 97/00078, EP 0 577 903 y WO 00/53200 divulgan cepas específicas de lactobacilos y bifidobacterias y sus efectos beneficiosos.

35

Un probiótico se puede definir como un complemento alimenticio microbiano vivo que influye de modo beneficioso en el animal huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal. Determinadas cepas de *Lactobacilli* y *Bifidobacteria* tales como, por ejemplo, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Bifidobacterium lactis* BB12®, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Bifidobacterium breve* M-16V®, han demostrado tener estas propiedades. Dichos lactobacilos y bifidobacterias se añaden normalmente a alimentos humanos tales como productos lácteos fermentados. Se sabe que los probióticos tienen por lo general un efecto profiláctico y terapéutico sobre las infecciones por patógenos del tracto gastrointestinal tales como las causadas por las especies *Clostridia* y *Salmonella*, por ejemplo. En el documento EP 904 784 se propone el uso de una combinación de tres tipos diferentes de probióticos para el tratamiento de trastornos gastrointestinales. Más recientemente, se ha sugerido que algunas cepas de probióticos también pueden ser eficaces en la prevención y el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio superior (*British Medical Journal* 2001, 322:1-5).

40

45

Por lo que afecta específicamente a los lactantes se cree que, inmediatamente antes del nacimiento, el tracto gastrointestinal de un bebé es estéril. Durante el proceso del nacimiento, se encuentra con las bacterias del tracto digestivo y de la piel de la madre y comienza a ser colonizado. Existen grandes diferencias con respecto a la composición de la microbiota intestinal en respuesta a la alimentación infantil. La flora fecal de los lactantes amamantados por la madre incluye poblaciones apreciables de bifidobacterias con algunos lactobacilos, mientras que los lactantes alimentados con fórmulas para lactantes tienen una microbiota más compleja, con bifidobacterias, bacteroides, clostridia y estreptococos, todos normalmente presentes. Tras el destete, se establece un patrón de microbiota intestinal que se parece a la del patrón adulto.

55

La leche materna se recomienda para todos los lactantes. Sin embargo, en algunos casos, la lactancia materna no es adecuada o no tiene éxito por razones médicas o las madres deciden no amamantar. Para estas situaciones se han desarrollado las fórmulas para lactantes.

60

Se ha propuesto añadir probióticos a las fórmulas para lactantes para fomentar que se produzca la colonización intestinal y para promover la colonización con bacterias "buenas" - bifidobacterias y lactobacilos - en lugar de con bacterias dañinas - patógenos tal como las clostridia, etc. Normalmente, se añade un mínimo de 10⁷ ufc/g de fórmula si bien se prefieren cantidades mayores, por ejemplo, de hasta 10¹² ufc/g de fórmula.

65

Otro planteamiento para promover las cantidades y/o las actividades de las bacterias beneficiosas en el colon es la adición de prebióticos a productos alimentarios. Un prebiótico es un ingrediente alimentario no digerible que afecta de manera beneficiosa al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de un número limitado de bacterias en el colon y que, por tanto, mejora la salud del huésped. Tales ingredientes son no digeribles en el sentido de que no se degradan ni se absorben en el estómago o en el intestino delgado y, por tanto, pasan intactos al colon donde son fermentados selectivamente por las bacterias beneficiosas. Los ejemplos de prebióticos incluyen determinados oligosacáridos, tales como los fructooligosacáridos (FOS) y los galactooligosacáridos (GOS).

Se sabe que la leche humana contiene una cantidad de oligosacáridos mayor que la mayoría de leches de otros animales. De hecho, los oligosacáridos indigeribles representan el tercer mayor componente sólido (tras la lactosa y los lípidos) de la leche materna, encontrándose a una concentración de 12-15 g/l en el calostro y de 5-78 g/l en la leche madura. Los oligosacáridos de la leche humana son muy resistentes a la hidrólisis enzimática, indicando que estos oligosacáridos pueden mostrar funciones esenciales no directamente relacionadas con su valor calorífico.

A medida que se va comprendiendo mejor la composición de la leche humana, se está proponiendo también la adición de prebióticos a las fórmulas para lactantes. En el mercado están disponibles diversas fórmulas para lactantes complementadas con prebióticos tales como mezclas de fructooligosacáridos y galactooligosacáridos, por ejemplo. Sin embargo, dichas mezclas sólo se acercan de forma aproximada a la mezcla de oligosacáridos de la leche humana. Se han detectado más de 100 componentes oligosacáridos diferentes en la leche humana, algunos de los cuales no se habían detectado en absoluto, o sólo en pequeñas cantidades, hasta ahora en leches de animales tal como la leche de vaca. Los ejemplos de clases de oligosacáridos de la leche humana que están presentes en la leche y el calostro de vaca, sólo en pequeñas cantidades o en absoluto, son los oligosacáridos sialilados y fucosilados.

Se han propuesto también fórmulas para lactantes que contienen tanto probióticos como prebióticos en una investigación continua para producir fórmulas para lactantes que reproduzcan lo máximo posible la composición y la eficacia de la leche humana. Por ejemplo, en el documento WO 2005/039319 se propone complementar una fórmula para lactantes con una mezcla de una cepa de *Bifidobacterium breve*, galactooligosacáridos y fructooligosacáridos (inulina). Se reivindica que esta mezcla, que se describe como simbiótica, regula la población de *Bifidobacterium* en el colon de los lactantes que consumen la fórmula complementada hasta una población "más parecida a la lactante", esto es, con menores cantidades de las especies *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium adolescentis*, y con mayores cantidades de las especies *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum*. Se indica también que la mezcla es útil para la prevención o el tratamiento de una afección inmunológica.

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de preparaciones que comprendan un probiótico y una mezcla prebiótica diseñadas específicamente para mejorar la eficiencia y la eficacia del probiótico.

Sumario de la invención

Se ha descubierto ahora de modo sorprendente que una mezcla prebiótica que comprende un 5-70 % en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo que consiste en GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, un 20-90 % en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo que consiste en Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, y un 5-50 % en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo que consiste en NeuAca2,3Gal β 1,4Glc y NeuAca2,6Gal β 1,4Glc, es altamente eficaz en cuanto a mejorar los efectos beneficiosos y la eficiencia de las bacterias probióticas co-administradas con la mezcla prebiótica.

De acuerdo con esto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un producto alimentario que es una fórmula para lactantes que comprende una cepa bacteriana probiótica y una mezcla prebiótica que comprende un 5-70 % en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo que consiste en GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, un 20-95 % en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo que consiste en Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, y un 2-50 % en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo que consiste en NeuAca2,3Gal β 1,4Glc y NeuAca2,6Gal β 1,4Glc, y en el que la cepa bacteriana probiótica es una cepa de *Lactobacillus* o una cepa de *Bifidobacterium*.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una preparación que comprende una cepa bacteriana probiótica y una mezcla prebiótica que comprende un 5-20 % en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo que consiste en GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc un 60-95 % en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo que consiste en Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, y un 2-30 % en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo que consiste en NeuAca2,3Gal β 1,4Glc y

NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, y en la que la cepa bacteriana probiótica es una cepa de *Lactobacillus* o una cepa de *Bifidobacterium*.

5 En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una cepa bacteriana probiótica y una mezcla prebiótica que comprende un 5-70 % en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo que consiste en GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, un 20-95 % en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo que consiste en Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, y un 2-50 % en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo que consiste en NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, en la fabricación de una composición nutricional terapéutica o un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de infecciones patógenas del tracto gastrointestinal.

15 En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una cepa bacteriana probiótica y una mezcla prebiótica que comprende un 5-70 % en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo que consiste en GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, un 20-95 % en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo que consiste en Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, y un 2-50 % en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo que consiste en NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, en la fabricación de una composición nutricional terapéutica o un medicamento para la prevención o el tratamiento de una afección inmunológica.

25 En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una cepa bacteriana probiótica y una mezcla prebiótica que comprende un 5-70 % en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo que consiste en GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, un 20-95 % en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo que consiste en Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, y un 2-50 % en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo que consiste en NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, en la fabricación de una composición nutricional terapéutica o un medicamento para la prevención o el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio superior.

35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el efecto protector de la preparación de la invención frente a la toxina A de *Clostridium difficile* comparado con el efecto protector proporcionado por los componentes de la preparación por separado;

40 La Figura 2 muestra el efecto protector frente a la toxina A de *Clostridium difficile* conferido por las cepas bacterianas probióticas usadas en la Figura 1 en combinación con diferentes prebióticos de la técnica conocidos;

45 La Figura 3 compara los recuentos de *Bifidobacterium breve* en el intestino delgado de ratones gnotobióticos a los que se les administró microbiota de lactante humana mediante una sonda gástrica, y se alimentó con la preparación de la invención, con los recuentos de *Bifidobacterium breve* en ratones alimentados con los componentes de la preparación por separado;

50 La Figura 4 compara los recuentos de *Staphylococci* en las heces de ratones gnotobióticos a los que se les administró microbiota de lactante humana mediante una sonda gástrica, y se alimentó con la preparación de la invención, con los recuentos de *Staphylococci* en ratones alimentados con los componentes de la preparación por separado;

55 La Figura 5 compara los recuentos de *Clostridium perfringens* en el intestino delgado de ratones gnotobióticos a los que se les administró microbiota de lactante humana mediante una sonda gástrica, y se alimentó con la preparación de la invención, con los recuentos de *Clostridium perfringens* en tales ratones alimentados con los componentes de la preparación por separado; y

60 La Figura 6 compara la actividad metabólica relativa de *Bifidobacterium longum* residentes durante un periodo de dos semanas en ratones libres de gérmenes a los que se administró microbiota de lactante humana mediante una sonda gástrica y se alimentó con la preparación de la invención, con la actividad metabólica relativa de *Bifidobacterium longum* residentes en tales ratones alimentados con los componentes de la preparación por separado.

Descripción detallada de la invención

65 En la presente memoria descriptiva, se da una definición de las palabras siguientes que se ha de tener en cuenta cuando se lee y se interpreta la descripción, los ejemplos y las reivindicaciones:

"microbiota intestinal bifidógena" significa para los lactantes la microbiota intestinal que está dominada por bifidobacterias tales como *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, y *Bifidobacterium longum*; con la exclusión de poblaciones apreciables de especies tales como bacteroides, clostridia y estreptococos, y que es comparable generalmente con la encontrada en lactantes amamantados por la madre.

"lactante" significa un niño con una edad inferior a 12 meses;

"fórmula para lactantes" significa un producto alimentario previsto para la nutrición completa de los lactantes durante los primeros cuatro a seis meses de vida y como complemento para otros productos alimentarios hasta una edad de 12 meses;

"oligosacárido N-acetilado" significa un oligosacárido que tiene un residuo N-acetilo;

NNC designa la Colección de Cultivos de Nestlé; "oligosacárido neutro" significa un oligosacárido que no tiene carga ni un residuo N-acetilo;

"bacterias probióticas" significa preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto benéfico sobre la salud o el bienestar del huésped. (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. et al. "Probiotics: how should they be defined" *Trend Food Sci. Technol.* 1999:10 107-10);

"prebiótico" significa un ingrediente alimentario no digerible que afecta de manera beneficiosa al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de un número limitado de bacterias en el colon y que, por tanto, mejora la salud del huésped. (Gibson y Roberfroid "Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics" *J. Nutr* 125:1401 -1412);

"oligosacárido" significa un carbohidrato que tiene un grado de polimerización (GP) que varía de 2 a 20 inclusive, pero que no incluye la lactosa; y

"oligosacárido sialilado" significa un oligosacárido que tiene un residuo de ácido siálico con carga asociada.

Preferentemente, la mezcla prebiótica comprende un 10-70 % en peso de oligosacáridos N-acetilados, un 20-80 % en peso de oligosacáridos neutros y un 10-50 % en peso de oligosacáridos sialilados. Más preferentemente, la mezcla prebiótica comprende un 15-40 % en peso de oligosacáridos N-acetilados, un 40-60 % en peso de oligosacáridos neutros y un 15-30 % en peso de oligosacáridos sialilados. Una mezcla prebiótica particularmente preferente comprende un 30 % en peso de oligosacáridos N-acetilados, un 50 % en peso de oligosacáridos neutros y un 20 % en peso de oligosacáridos sialilados.

De modo alternativo, la mezcla puede comprender convenientemente un 5-20 % en peso del oligosacárido u oligosacáridos N-acetilados especificados, un 60-95 % en peso del oligosacárido u oligosacáridos neutros especificados y un 2-30 % en peso del oligosacárido u oligosacáridos N-sialilados especificados.

La mezcla prebiótica, tal y como está comprendida o se usa en los aspectos de la invención, se puede preparar a partir de una o más leches de animales. La leche se puede obtener a partir de cualquier mamífero, en particular, de vacas, cabras, búfalos, caballos, elefantes, camellos u ovejas.

De modo alternativo, la mezcla prebiótica se puede preparar comprando y mezclando los componentes individuales. Por ejemplo, se encuentran disponibles en el mercado galacto-oligosacáridos sintetizados tales como Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,6Gal1,4Glc y mezclas de los mismos con los nombres comerciales Vivinal® y Elix'or®. Otros proveedores de oligosacáridos son Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH y Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. De modo alternativo, se pueden usar glucosiltransferasas específicas, tales como las galactosiltransferasas, para producir oligosacáridos neutros.

Los oligosacáridos N-acetilados se pueden preparar mediante la acción de la glucosaminidasa y/o la galactosaminidasa sobre la N-acetilglucosa y/o la N-acetilgalactosa. Análogamente, se pueden usar N-acetilgalactosil transferasas y/o N-acetil-glucosil transferasas para este fin. Los oligosacáridos N-acetilados se pueden producir también mediante tecnología de la fermentación usando las enzimas respectivas (recombinantes o naturales) y/o mediante fermentación microbiana. En este último caso, los microbios pueden expresar sus sustratos y enzimas naturales o se pueden modificar mediante bioingeniería para producir los respectivos sustratos y enzimas. Se pueden usar cultivos microbianos únicos o mezclas de cultivos. La formación del oligosacárido N-acetilado se puede iniciar mediante sustratos aceptores partiendo de cualquier grado de polimerización (GP) desde GP = 1 en adelante. Otra opción es la conversión química de cetohexosas (por ejemplo, la fructosa), bien libres o bien unidas a un oligosacárido (por ejemplo, la lactulosa) en N-acetilhexosamina o un oligosacárido que contiene N-acetilhexosamina, tal y como se describe en Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* 38:827-828.

Los oligosacáridos sialilados 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa se pueden aislar mediante tecnología cromatográfica o de filtración a partir de una fuente natural tal como la leche de animales. De modo alternativo, se pueden producir también mediante biotecnología usando sialiltransferasas específicas, o bien mediante tecnología de la fermentación basada en enzimas (enzimas naturales o recombinantes) o mediante tecnología de la fermentación microbiana. En este último caso, los microbios pueden expresar sus sustratos y enzimas naturales o se pueden modificar mediante bioingeniería para producir los respectivos sustratos y enzimas. Se pueden usar cultivos microbianos únicos o mezclas de cultivos. La formación del sialil-oligosacárido se puede iniciar mediante sustratos aceptores partiendo de cualquier grado de polimerización (GP) desde GP = 1 en adelante.

La cepa bacteriana se puede seleccionar de entre las cepas que satisfagan la definición de probiótico y tengan una vida útil aceptable para el producto en el que se va a incorporar la preparación de la invención. Por ejemplo, se requiere que las fórmulas para lactantes sean estables y eficaces durante un periodo de hasta 36 meses. Por supuesto, la preparación de la invención no necesita ser incorporada en otro producto tal como un producto alimentario, sino que puede ser ingerida como tal o se puede mezclar con un excipiente adecuado en forma de un polvo o una cápsula o se puede comprimir en comprimidos, por ejemplo.

La cepa bacteriana probiótica es un lactobacilo o una bifidobacteria. Preferentemente, se usan las cepas que producen solamente ácido láctico L (+). Los ejemplos de las especies preferentes de *Lactobacillus* son *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus reuteri*. Las cepas particularmente preferentes son *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116. Los ejemplos de las especies preferentes de *Bifidobacterium* son *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum*. Las cepas particularmente preferentes son la cepa de *B. lactis* comercializada por la empresa Christian Hansen de Dinamarca con la marca comercial Bb12 y la de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 comercializada por Morinaga Milk Industry Co. Ltd de Japón con la marca comercial BB536.

La preparación de la invención puede proporcionar entre 10^2 y 10^{10} ufc de bacterias probióticas por cada gramo de mezcla prebiótica.

En un aspecto preferente de la invención, la preparación descrita anteriormente se incorpora a un producto alimentario. En el contexto de la invención, la expresión "producto alimentario" se pretende que englobe cualquier materia consumible. Por tanto, puede ser un producto para consumo humano, en particular una fórmula para lactantes, una leche de crecimiento y similares. Sin embargo, el consumo de la preparación no está restringido a lactantes y niños. En particular, la preparación de la invención se puede incorporar en leche deshidratada o en mezclas de cereales.

Si la preparación de la invención se incorpora a una fórmula para lactantes u otra composición nutricional basada en leche, la composición se puede preparar de cualquier manera adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, se puede preparar una fórmula para lactantes mezclando conjuntamente la fuente de proteína, cualquier carbohidrato distinto a la lactosa y la fuente de grasa en las proporciones apropiadas. Se pueden añadir emulsionantes, si se desea. En este punto se pueden añadir vitaminas y minerales, aunque normalmente se añaden más tarde para evitar la degradación térmica. Se pueden disolver cualquier vitamina lipófila, emulsionantes y similares en la fuente de grasa antes del mezclado. Después se pueden mezclar en agua, preferentemente agua que ha sido sometida a ósmosis inversa, para formar una mezcla líquida.

La mezcla líquida después se puede tratar térmicamente para reducir la carga bacteriana. Por ejemplo, la mezcla líquida se puede calentar rápidamente a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 80°C a aproximadamente 110°C durante un periodo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 5 minutos. Esto se puede llevar a cabo mediante inyección de vapor o mediante un intercambiador de calor, por ejemplo, un intercambiador de calor de placas.

Seguidamente, la mezcla líquida se puede enfriar hasta una temperatura de aproximadamente 60°C hasta aproximadamente 85°C , por ejemplo, mediante enfriamiento instantáneo. La mezcla líquida después se puede homogeneizar, por ejemplo, en dos etapas a una presión de aproximadamente 7 MPa a aproximadamente 40 MPa en la primera etapa, y de 2 MPa a aproximadamente 14 MPa en la segunda etapa. La mezcla homogeneizada se puede enfriar adicionalmente para añadir cualquier componente sensible al calor tal como vitaminas y minerales. El pH y el contenido de sólidos de la mezcla homogeneizada se estandarizan de modo conveniente en este punto.

La mezcla homogeneizada se transfiere a un aparato de secado adecuado, tal como un secador por pulverización o un liofilizador, y se convierte en polvo. El polvo debe tener un contenido de humedad inferior a aproximadamente un 5 % en peso.

La preparación de la invención se puede preparar por adelantado y se puede añadir directamente a la composición nutricional mediante mezclado en seco. Preferentemente, sin embargo, los componentes individuales de la preparación se añaden por separado a la composición nutricional, en cuyo caso la mezcla prebiótica se añade

preferentemente a la fase líquida inmediatamente antes del secado y la cepa bacteriana probiótica se añade preferentemente a la composición secada mediante mezclado en seco.

5 La cepa bacteriana probiótica seleccionada se puede cultivar de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica, y se puede preparar para su adición a la fórmula para lactantes mediante liofilización o secado por pulverización, por ejemplo. De modo alternativo, las cepas bacterianas pueden adquirirse a proveedores especializados tales como Christian Hansen y Morinaga ya preparadas en una forma adecuada para su adición a productos alimentarios tales como una fórmula para lactantes.

10 Si la mezcla prebiótica se ha preparado a partir de una leche animal, por ejemplo, tal y como se describe a continuación, y se pretende añadirla a una fórmula para lactantes, puede ser conveniente añadirla sin eliminar previamente toda la lactosa. Puesto que la fórmula para lactantes contiene un componente de carbohidratos que con frecuencia está constituido total o parcialmente por lactosa, será evidente para el experto en la materia la necesidad de ajustar la cantidad de carbohidratos en la fórmula para lactantes a fin de tener en cuenta los carbohidratos adicionales que se han de añadir a la mezcla prebiótica. La concentración final de la preparación de la invención en la fórmula o en el producto alimentario para lactantes o bebés es preferentemente de un 0,3 a un 6,0 %, preferentemente de un 0,75 a un 4,0 % en peso de materia seca. Esto se corresponde con una concentración de 0,2 a 8 gramos por litro, preferentemente de 1 a 5 g/l de fórmula reconstituida. Sin embargo, estas cantidades no deben considerarse limitantes y se deben adaptar a la población a la que van destinadas, por ejemplo, se deben basar en el peso y la edad o el estado de salud del lactante o el bebé. Preferentemente, la fórmula o alimento que contiene la mezcla de oligosacáridos de la invención se le da al bebé en cada toma.

Además de la preparación de la invención, un producto alimentario tal como una fórmula para lactantes puede comprender uno o más oligosacáridos adicionales que se añaden por separado hasta un contenido de oligosacáridos de 10 g/l de fórmula líquida o reconstituida.

Si bien es preferente complementar productos alimentarios destinados específicamente a la nutrición de lactantes o bebés, también puede ser beneficioso complementar productos alimentarios no destinados específicamente o destinados a la población adulta. Por ejemplo, las mezclas de oligosacáridos de la invención se pueden incorporar a productos nutricionales para el cuidado de la salud y a productos nutricionales para personas de edad avanzada. Tales productos alimentarios pueden incluir mezclas para bebidas a base de leche, yogures, productos fermentados a base de leche, y helados, así como productos a base de cereales, entre otros.

De modo sorprendente, se ha descubierto que la mezcla prebiótica en las preparaciones de la invención potencia de manera sinérgica las propiedades inmunomoduladoras y antipatógenas del probiótico para producir un efecto terapéutico que es marcadamente superior al de la mezcla de, por ejemplo, el mismo probiótico con un único prebiótico. Las preparaciones de la invención y los productos alimentarios que las contienen son, por tanto, adecuados para la prevención y el tratamiento de infecciones gastrointestinales causadas por patógenos, particularmente patógenos bacterianos, así como infecciones del tracto respiratorio superior tales como la otitis media. Los productos alimentarios que contienen las preparaciones de acuerdo con la invención son, por tanto, especialmente adecuados para poblaciones vulnerables tales como los bebés y las personas de edad avanzada.

Asimismo, las preparaciones de la invención son adecuadas para reforzar las defensas inmunológicas, por ejemplo, para reforzar la respuesta a las vacunas y reducir la duración y gravedad de las infecciones, así como para la prevención y el tratamiento de dolencias relacionadas con el mal funcionamiento del sistema inmunológico en lactantes y niños pequeños tales como la hipersensibilidad alimentaria, el eczema, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica y otras enfermedades atópicas.

Otra ventaja de las preparaciones de la invención es que promueven el establecimiento de una microbiota intestinal bifidógena en lactantes aumentando la actividad metabólica relativa de las especies de bifidobacterias que dominan tal microbiota intestinal en los lactantes.

La invención se ilustrará ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

55 Ejemplo 1

Se pre-concentran 200.000 litros de un permeado de ultrafiltración de suero de leche hasta un 22 % (p/p) de sólidos totales (ST), se pasteurizan a aproximadamente 75° C durante aproximadamente 30 segundos y después se concentran mediante evaporación a 60° C para alcanzar unos ST del 59 % (p/p). El líquido se enfría en un cristalizador a una velocidad de 2 °C por hora durante un periodo de 24 horas para cristalizar la lactosa. La lactosa cristalizada se lava y después se elimina mediante un escurridor. El líquido remanente se clarifica a través de un decantador. Los 77.000 litros con un 17,7 % de ST obtenidos del clarificador se concentran de nuevo mediante evaporación 60° C hasta alcanzar unos ST del 55 % (p/p) y se someten a una segunda etapa de cristalización de la lactosa en las mismas condiciones que antes. Los 29.000 litros con un 20,5 % de ST del licor así obtenido se desmineralizan mediante una combinación de electrodiálisis e intercambio iónico de un modo conocido *per se* proporcionando 28.500 litros de un licor desmineralizado al 90 % con un 17,3 % de ST. El licor que contiene

aproximadamente 1,5 gramos por litro de una mezcla de aproximadamente un 30 % en peso de GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, un 50 % en peso de Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,4Glc y un 20 % en peso de NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc; dependiendo del material de partida, se puede añadir directamente a un producto alimentario tal como una fórmula para lactantes, o se puede concentrar adicionalmente de un modo conocido *per se* por el experto en la materia.

Por ejemplo, la lactosa remanente en el licor se puede hidrolizar a glucosa y galactosa y estos monosacáridos se pueden eliminar mediante nanofiltración, o bien si se desea, la galactosa se puede polimerizar al menos parcialmente, por ejemplo, mediante la acción de la β -galactosidasa para producir galactooligosacáridos que también serán retenidos por la membrana de nanofiltración.

Ejemplo 2

Se calientan 100 kg de la mezcla prebiótica producida de acuerdo con el Ejemplo 1 con un 50 % de ST hasta 60° C en un tanque convencional y el pH se ajusta a un valor de 6 a 6,5. Se añaden 4,5 mg de lactasa F (Amano, Japón) por gramo de ST y la mezcla se mantiene a 60° C durante tres horas. A continuación la temperatura se eleva hasta 110° C durante 11 segundos mediante inyección directa de vapor para inactivar la enzima. El líquido resultante contiene aproximadamente 100 gramos por litro de una mezcla de aproximadamente un 10 % en peso de GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, un 87 % en peso de Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, y un 3 % en peso de NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc. Esto se puede añadir directamente a un producto alimentario tal como una fórmula para lactantes o se puede concentrar adicionalmente tal y como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 3

Se da a continuación un ejemplo de la composición de una fórmula para lactantes que contiene una preparación de acuerdo con la presente invención.

Nutriente	por 100 Kcal	por litro
Energía (kcal)	100	670
Proteína (g)	1,83	12,3
Grasa (g)	5,3	35,7
Ácido linoleico (g)	0,79	5,3
Ácido α -linolénico (mg)	101	675
Lactosa (g)	11,2	74,7
Mezcla de OS del Ejemplo 1 (g)	1,0	6,5
Minerales (g)	0,37	2,5
Na (mg)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Mn (μ g)	8	50
Se (μ g)	2	13
Vitamina A (μ g ER)	105	700
Vitamina D (μ g)	1,5	10
Vitamina E (mg ET)	0,8	5,4
Vitamina K1 (μ g)	8	54
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B (mg)	0,07	0,47

Nutriente	por 100 Kcal	por litro
Vitamina B2 (mg)	0,15	1,0
Niacina (mg)	1	6,7
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,50
Ácido fólico (µg)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 (µg)	0,3	2
Biotina (µg)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (µg)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
<i>L. rhamnosus</i> CGMCC 1.3724	2,3 x 10 ⁹ ufc/g polvo	

Ejemplo 4

5 Se efectuaron experimentos *in vitro* para comparar la eficacia de las preparaciones de acuerdo con la invención usando dos cepas diferentes de bacterias probióticas con la eficacia de mezclas de las mismas bacterias probióticas y otros prebióticos en la prevención de una infección patógena. Se seleccionó la toxina A de *Clostridium difficile* como una toxina representativa de las bacterias patógenas.

10 Se incubaron monocapas de células epiteliales intestinales T84 crecidas sobre placas Transwell con (i) un probiótico por separado, (ii) un prebiótico por separado, o (iii) una combinación de probiótico y prebiótico. Después de una preincubación durante 2 horas a 37 °C, 5 % de CO₂, se estimularon las células T84 con toxina A de *Clostridium difficile* a una concentración de 100 ng/ml. Se controló la resistencia eléctrica transepitelial (RET), que servía como marcador para evaluar la protección frente a la acción de la toxina A, a intervalos regulares durante un periodo de hasta 24 h. Se calculó una puntuación de protección normalizada.

15 Las cepas bacterianas probióticas eran *L. paracasei* (CNCM I-2116) y *L. rhamnosus* (ATCC 53103). Se usaron ambas cepas a una concentración final de 10⁸ ufc/l.

20 Los prebióticos usados eran la mezcla prebiótica descrita en el presente documento a 1 g/l; fructooligosacáridos (Raftilosa P95, Orafiti, Bélgica); galactooligosacáridos (Vivinal GOS, DOMO, Países Bajos) y sialil-lactosa (Kyowa Hakko Kogyo, Japón) a 10 g/l.

25 Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2. La Figura 1 compara los resultados obtenidos con el probiótico por separado, la mezcla prebiótica por separado y la preparación de la invención para dos cepas de probióticos. La Figura 2 compara los resultados obtenidos con las mismas cepas de probióticos que las usadas en la Figura 1 y fructooligosacáridos a 20 g/l; galactooligosacáridos a 20 g/l y sialil-lactosa a 10 g/l. Se usó lactosa (Sigma) a 20 g/l como control.

30 A partir de la Figura 1 se puede observar que las preparaciones de la invención tenían un efecto sinérgico significativo contra la toxina A de *C. difficile* comparado con el conferido por los componentes individuales (es decir, la mezcla prebiótica y la cepa de probiótico) por separado. A partir de la Figura 2 se puede observar que no se consiguió un efecto comparable cuando se ensayaron las mismas cepas bacterianas probióticas en combinación con fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, o sialil-lactosa de manera individual. Se puede observar que se consiguió una protección moderada usando *L. rhamnosus* en combinación con sialil-lactosa, pero solamente a 10 g/l y no a 1 g/l como con la preparación de la invención.

Ejemplo 5

40 Se llevaron a cabo experimentos *in vivo* para comparar los efectos sobre la microbiota intestinal de la complementación con la mezcla prebiótica por separado, con un probiótico *Bifidobacterium lactis* por separado y con una preparación de acuerdo con la invención en un modelo animal gnotobiótico de microbiota de lactante humana.

5 A ratones libres de gérmenes se les administró un modelo de microbiota de lactante humana mediante una sonda gástrica, y se dejó que la microbiota se estableciera por sí misma durante dos semanas. Los ratones se dividieron después en cuatro grupos: -un primer grupo que recibió un 3 % en peso de una mezcla prebiótica por separado en la comida; un segundo grupo que recibió *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 (NCC 2818) en el agua de bebida, un tercer grupo que recibió tanto la comida complementada con el prebiótico como el agua complementada con el probiótico, y un cuarto grupo de control. La microbiota fecal se controló durante el curso del estudio (dos semanas), periodo al final del cual los animales se sacrificaron y se investigó la microbiota del intestino delgado también.

10 Los resultados se muestran en las Figuras 3, 4 y 5. A partir de estas Figuras se puede observar que se potencia de modo sinérgico una microbiota intestinal bifidógena, tal y como se evidencia mediante los recuentos de *Bifidobacterium breve* en el intestino delgado (Figura 3) y la disminución de los recuentos de *Staphylococci* y *Clostridium perfringens* en las heces (Figuras 4 y 5), mediante la preparación de acuerdo con la invención en comparación con los componentes individuales.

15 Ejemplo 6

20 Se llevaron a cabo experimentos *in vivo* para comparar los efectos sobre el establecimiento y la actividad metabólica de *Bifidobacterium longus* en el tracto gastrointestinal de ratones libres de gérmenes, de la complementación con la mezcla prebiótica por separado, con una cepa probiótica de *Bifidobacterium rhamnosus* por separado y con una preparación de acuerdo con la invención. A ratones libres de gérmenes se les administró un modelo de microbiota de lactante humana mediante una sonda gástrica, y se controló el establecimiento de la microbiota a lo largo del tiempo mediante recuento en placa y mediante evaluación de los niveles de ARNr 16S que indicaban la actividad metabólica. El ARNr 16S se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa, los productos se separaron sobre un gel con gradiente de desnaturalización y se cuantificaron con respecto a los niveles de ARNr 16S constantes de *E. Coli* que sirvieron como estándar interno. Se compararon los siguientes tratamientos: - dieta de control y bebida de control (agua); dieta de control complementada con un 3 % de mezcla prebiótica y agua; dieta de control y *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 (NCC 4007) en el agua de bebida; dieta de control complementada con un 3 % de mezcla prebiótica y *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 en el agua de bebida;

30 Los resultados se muestran en la Figura 6. La preparación de acuerdo con la invención estimulaba de manera sinérgica la actividad metabólica general de la *Bifidobacterium longum* residente durante el establecimiento de una microbiota de lactante humana en ratones libres de gérmenes. Los recuentos de *B. longum* residente de microbiota de bebé humana eran similares al cabo de 14 días en el grupo de control y en los grupos que recibieron el probiótico y la mezcla prebiótica por separado, mientras que la actividad metabólica relativa aumentaba de manera sinérgica y significativa en el grupo que recibió la preparación de acuerdo con la invención (Figura 6D en comparación con las Figuras 6A, 6B y 6C).

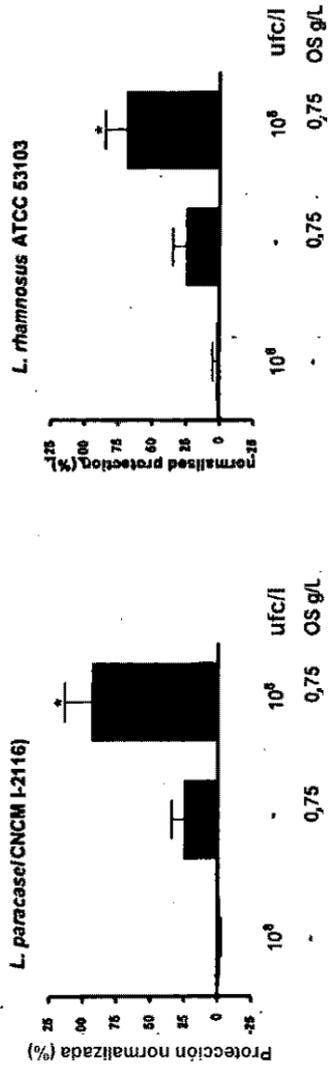
REIVINDICACIONES

1. Un producto alimentario que es una fórmula para lactantes que comprende una preparación que comprende una cepa bacteriana probiótica y una mezcla prebiótica que comprende un 5-70 % en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo que consiste en GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, un 20-95 % en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo que consiste en Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, y un 2-50 % en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo que consiste en NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, y en el que la cepa bacteriana probiótica es una cepa de *Lactobacillus* o una cepa de *Bifidobacterium*.
2. El producto alimentario de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mezcla prebiótica comprende un 15-40 % en peso de oligosacáridos N-acetilados, un 40-60 % en peso de oligosacáridos neutros y un 15-30 % en peso de oligosacáridos sialilados.
3. El producto alimentario de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la mezcla de oligosacáridos comprende un 30 % en peso de oligosacáridos N-acetilados, un 50 % en peso de oligosacáridos neutros y un 20 % en peso de oligosacáridos sialilados.
4. El producto alimentario de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mezcla de oligosacáridos comprende un 5-20 % en peso de oligosacáridos N-acetilados, un 60-95 % en peso de oligosacáridos neutros y un 2-30 % en peso de oligosacáridos sialilados.
5. Una preparación que comprende una cepa bacteriana probiótica y una mezcla prebiótica que comprende un 5-20 % en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo que consiste en GaNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, un 60-95 % en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo que consiste en Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, y un 2-30 % en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo que consiste en NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, en la que la cepa bacteriana probiótica es una cepa de *Lactobacillus* o una cepa de *Bifidobacterium*.
6. El producto alimentario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o la preparación de acuerdo con la reivindicación 5, en los que la cepa de *Lactobacillus* es una *Lactobacillus rhamnosus*, una *Lactobacillus paracasei* o una *Lactobacillus reuteri*.
7. El producto alimentario o la preparación de acuerdo con la reivindicación 6, en los que la cepa de *Lactobacillus* es *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 (ATCC 53103).
8. El producto alimentario o la preparación de acuerdo con la reivindicación 6, en los que la cepa de *Lactobacillus* es *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116.
9. El producto alimentario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o la preparación de acuerdo con la reivindicación 5, en los que la cepa de *Bifidobacterium* es una *Bifidobacterium lactis*, una *Bifidobacterium longum* o una *Bifidobacterium breve*.
10. El producto alimentario o la preparación de acuerdo con la reivindicación 9, en los que la cepa de *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.
11. El producto alimentario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y 6 a 10, que comprende de un 0,3 a un 4 % en peso basado en la materia seca de la preparación.
12. Uso de una cepa bacteriana probiótica y una mezcla prebiótica que comprende un 5-70 % en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo que consiste en GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, un 20-95 % en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo que consiste en Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, y un 2-50 % en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo que consiste en NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, en la fabricación de una composición nutricional terapéutica o un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de infecciones patógenas del tracto gastrointestinal.
13. Uso de una cepa bacteriana probiótica y una mezcla prebiótica que comprende un 5-70 % en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo que consiste en GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y

Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, un 20-95 % en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo que consiste en Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, y un 2-50 % en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo que consiste en NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, en la fabricación de una composición nutricional terapéutica o un medicamento para la prevención o el tratamiento de una afección inmunológica.

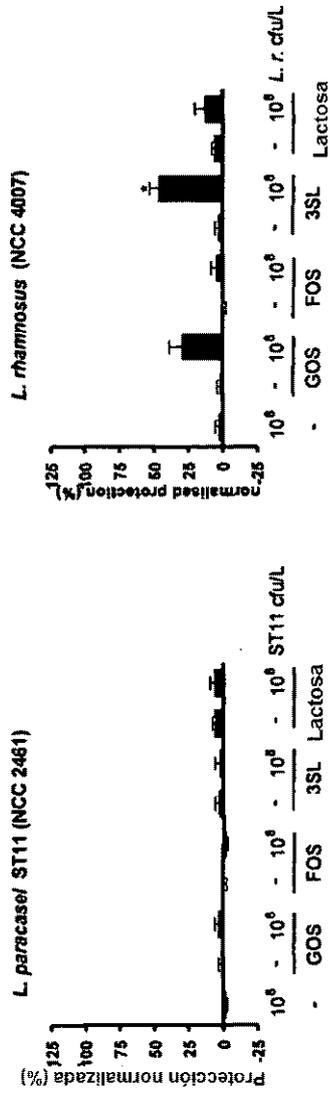
14. Uso de una cepa bacteriana probiótica y una mezcla prebiótica que comprende un un 5-70 % en peso de al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado de entre el grupo que consiste en GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc, un 20-95 % en peso de al menos un oligosacárido neutro seleccionado de entre el grupo que consiste en Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc y un 2-50 % en peso de al menos un oligosacárido sialilado seleccionado de entre el grupo que consiste en NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc, en la fabricación de una composición nutricional terapéutica o un medicamento para la prevención o el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio superior.

Figura 1



Los datos mostrados representan la media \pm ETM. * $p < 0,05$ (prueba t) versus protección acumulativa conferida por la cepa bacteriana probiótica y la mezcla prebiótica por separado.

Figura 2



Los datos mostrados representan la media \pm ETM. * $p < 0,05$ (prueba t) versus protección acumulativa conferida por la bacteria por separado + 3SL por separado.

Figura 3

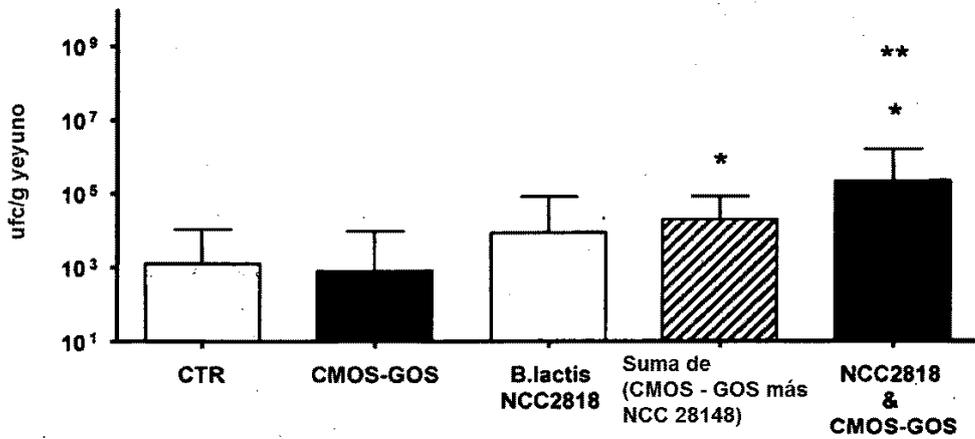


Figura 3. Recuentos de *B. breve* en el intestino delgado (yeyuno) después de un tratamiento de 2 semanas con mezcla prebiótica (CMOS - GOS) en la adieta y *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 (NCC 2818) en el agua. Significancia mediante la prueba t no pareada ($p < 0,05$): * diferencia significativa respecto al grupo de control (CTR), ** diferencia significativa respecto a la suma de la mezcla prebiótica más el probiótico.

Figura 4

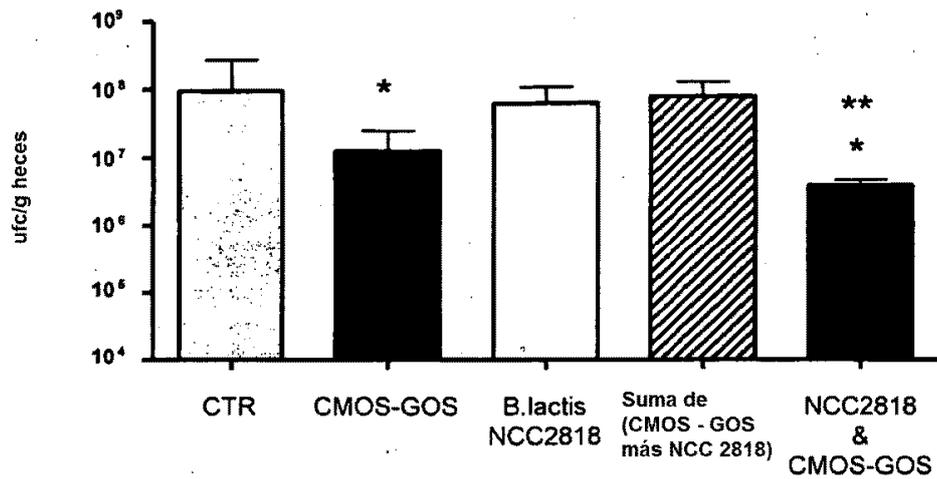


Figura 4. Recuentos de *Staphylococci* en heces después de un tratamiento de 2 semanas con mezcla prebiótica (CMOS - GOS) en la dieta de *Bifidobacterium lactis* CNCM I-2334 (NCC 2818) en el agua. Significancia mediante la prueba t no pareada ($p < 0,05$): * diferencia respecto al grupo de control (CTR), ** diferencia significativa respecto a la suma de la mezcla prebiótica más el probiótico.

Figura 5

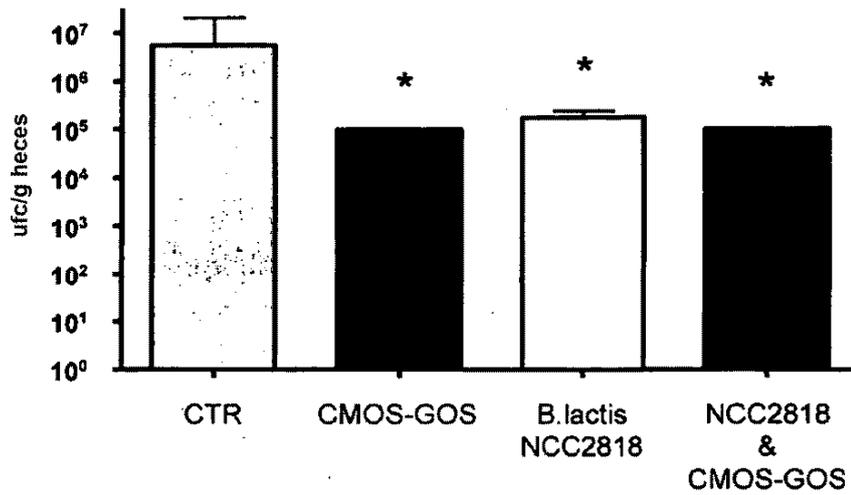


Figura 5. Recuentos de *Clostridium perfringens* en heces después de un tratamiento de 2 semanas con mezcla prebiótica (CMOS - GOS) en la dieta y *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 (NCC 2818) en el agua. Significancia mediante la prueba t no pareada ($p < 0,05$): * diferencia significativa respecto al grupo de control (CTR).

Figura 6

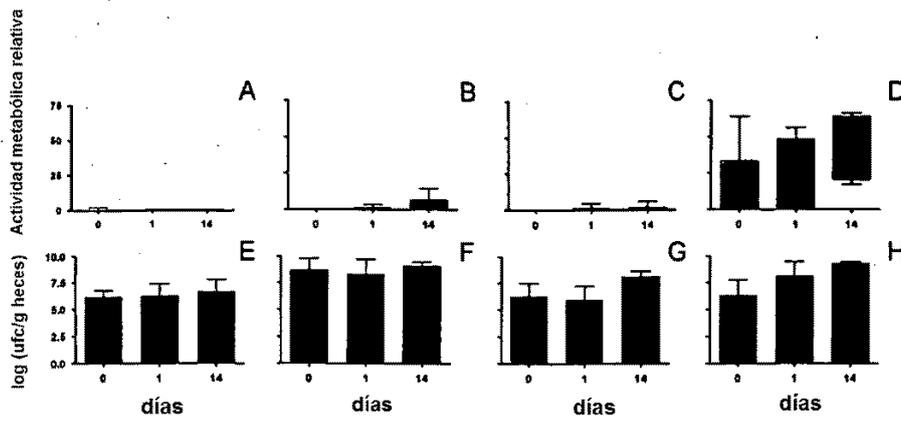


Figura 6. Actividad metabólica relativa con mediana y rango intercuartil (A, B, C, D) y media con desviación típica (E,F,G,H) de *B. longum* residente a lo largo del tiempo de establecimiento de la microbiota. Están representados el grupo de control (A,E), el grupo con mezcla prebiótica (B,F), el grupo con *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 (NCC 4007) (C,G) y el grupo con la preparación de acuerdo con la invención (D,H) (N=9 a 10).