(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 559 381**

(51) Int. CI.:

A23D 9/00 (2006.01)
A23L 1/052 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2012 E 12770507 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2768312**

(54) Título: **Composición para su uso en la promoción del crecimiento de hueso sano y/o en la prevención y/o tratamiento de osteopatía**

(30) Prioridad:

18.10.2011 EP 11185608

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2016

(73) Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)
CT-IAM, Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH

(72) Inventor/es:

BERGONZELLI DEGONDA, GABRIELA;
CASTANEDA GUTIERREZ, EURIDICE;
GARCIA-RODENAS, CLARA;
OFFORD CAVIN, ELIZABETH y
VIGUET-CARRIN, STÉPHANIE

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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 para su uso en la promoción del crecimiento de hueso sano y/o en la prevención y/o tratamiento de osteopatía

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición para su uso en la prevención y/o tratamiento de osteopatía, tal como la promoción del crecimiento de hueso sano, y la prevención o el tratamiento de osteopenia, osteomalacia o raquitismo, u osteoporosis. Esta composición es para su uso en mamíferos, preferentemente en seres humanos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La osteopenia es una afección caracterizada por una matriz ósea orgánica deficiente que provoca cantidades de tejido óseo más bajas de lo normal.

La osteomalacia es una afección en la que la densidad mineral ósea (DMO) y el contenido mineral óseo (CMO) son más bajos de lo normal.

Ambas afecciones son frecuentes en prematuros y/o lactantes de bajo peso al nacer y/o lactantes que experimentan nutrición intrauterina subóptima y provocan un riesgo incrementado de fracturas óseas en estas poblaciones (Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2002 86: F82-F85). Los lactantes, niños y adolescentes que experimentan retraso del crecimiento debido a desnutrición y/o enfermedad con frecuencia también se ven afectados por estas afecciones.

La osteomalacia en niños generalmente se asocia al raquitismo, mientras que, a menudo, la osteopenia se restringe a la forma de la enfermedad en adultos más severa. A menudo, la osteomalacia se considera por muchos médicos un precursor de la osteoporosis.

La osteoporosis ("huesos porosos", del griego) es una enfermedad del hueso que provoca un riesgo incrementado de fractura. Esta enfermedad se caracteriza por muy poca osteogénesis, pérdida ósea excesiva, o una combinación de ambas. En la osteoporosis la densidad mineral ósea (DMO) se reduce, se deteriora la microarquitectura ósea, y la cantidad y variedad de proteínas en el hueso se altera.

La osteoporosis está definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una densidad mineral ósea (DMO) que está 2,5 desviaciones estándar o más por debajo de la masa ósea máxima media (promedio de adultos sanos jóvenes) como se mide mediante DEXA (radioabsorciometría de doble energía). Como comparación, se define la osteopenia como una densidad mineral ósea entre la que se encuentra entre 1,0 y 2,5 desviaciones estándar por debajo de dicha masa ósea máxima media. Las pruebas de DMO proporcionan a las personas una medida llamada puntuación T, un valor numérico que resulta de comparar la densidad ósea de las personas con respecto a la densidad ósea óptima.

La osteomalacia es una afección ósea generalizada en la que existe una mineralización insuficiente del hueso. La osteomalacia o raquitismo también puede mostrar signos, como dolores corporales difusos, debilidad muscular, y fragilidad de los huesos. La causa más común de la enfermedad es una deficiencia de vitamina D, que normalmente se obtiene a partir de la dieta y una exposición a la luz solar.

Sin embargo, todavía existe la necesidad de una composición nutricional para la prevención y/o tratamiento de osteopatía, entre osteopenia, osteomalacia, raquitismo y osteoporosis, en particular, en lactantes y niños pequeños que nacieron prematuros o con bajo peso al nacer (BPN) o sufrieron retraso del crecimiento intrauterino (RCIU) o que experimentaron retraso estatural típicamente a causa de desnutrición (normalmente al sufrir nutrición intrauterina subóptima) o sufrieron una enfermedad, tal como la enfermedad de Crohn y/o enfermedad celíaca y/o cáncer o que fueron tratados con fármacos que provocan hipoabsorción, anorexia y/u osteopatía metabólica, tales como fármacos quimioterápicos y/o corticoesteroides.

Existe la necesidad de una mejora de la osteopatía, tal como osteopenia, osteomalacia, raquitismo u osteoporosis, mediante una intervención no basada en fármacos que sea compatible con personas delicadas, como lactantes o niños.

Existe la necesidad de un efecto a largo plazo en la reducción de la frecuencia, aparición, gravedad y/o duración de la osteopatía. Además, existe la necesidad de un efecto que se haga medible "más adelante en la vida", en especial algunos años después de la intervención.

Existe la necesidad de una intervención nutricional en mamíferos jóvenes, en particular, lactantes y niños, pero también animales de compañía jóvenes, que nacieron prematuros o con BPN o sufrieron RCIU o que experimentaron retraso estatural a causa de desnutrición o sufrieron una enfermedad, tal como la enfermedad de

Crohn y/o enfermedad celíaca y/o cáncer o que fueron tratados con fármacos que provocan hipoabsorción, anorexia y/o usteopatía metabólica, tales como fármacos quimioterápicos y/o corticoesteroides.

Existe la necesidad de tal intervención que induzca el mantenimiento o la mejora de la salud ósea en seres humanos y en animales, en especial, en mamíferos jóvenes.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que la administración de una mezcla de oligosacáridos específicos en combinación con al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga (AGPI-CL) y al menos un probiótico, es particularmente eficaz en la promoción del crecimiento de hueso sano y en la prevención y/o tratamiento de osteopatía, en particular, osteomalacia, raquitismo, osteopenia y osteoporosis.

En consecuencia, la presente invención proporciona una composición que comprende al menos un AGPI-CL, al menos un probiótico y una mezcla de oligosacáridos, conteniendo dicha mezcla al menos un oligosacárido N-acetilado, al menos uno de oligosacárido sialilado y al menos un oligosacárido neutro, para su uso en la prevención y/o tratamiento de osteopatía, preferentemente osteomalacia, raquitismo, osteopenia u osteoporosis.

La composición de acuerdo con la invención es preferentemente una composición nutricional.

El AGPI-CL se escoge preferentemente entre ácido araquidónico (ARA) y ácido docosahexanoico (DHA), más preferentemente, el AGPI-CL es una mezcla de ARA y DHA.

El probiótico se escoge preferentemente entre cepas bacterianas probióticas, más preferentemente el probiótico es un lactobacillus o una bifidobacterium. En un modo de realización preferente, el probiótico es *Lactobacillus rhamnosus,* término que abarca *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 y *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 (sobrenombre NCC4007 y LPR), *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium lactis.*

El oligosacárido neutro se escoge preferentemente entre fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS), preferentemente GOS.

En un modo de realización, la mezcla de oligosacáridos puede derivar de leche animal, tal como una o más de leche de vaca, cabra, oveja o búfalo. Por ejemplo, se obtuvo mediante fraccionamiento de leche de vaca y tratamiento enzimático adicional.

En un segundo modo de realización, la mezcla de oligosacáridos se puede preparar usando medios enzimáticos, quimioenzimáticos y/o químicos.

En un tercer modo de realización, la mezcla de oligosacáridos se puede preparar usando levadura y/o tecnologías de fermentación bacteriana. Por ejemplo, se pueden usar con este fin levadura y/o células bacterianas que expresan enzimas adecuadas, tales como glucosidasas y/o glucosiltransferasas tras modificación genética o no.

La invención comprende tres tipos diferentes de usos de la composición de acuerdo con la invención. En el primer caso, las personas y, en particular, niños, están sanas, sin ningún riesgo de osteopatía, a causa de no antecedentes de osteopatía en su familia. En el segundo caso, las personas y, en particular, niños, están sanas, pero con riesgo de osteopatía, a causa de antecedentes de osteopatía en su familia o a causa de que nacieron prematuros o con BPN o sufrieron RCIU o que experimentaron períodos de retraso estatural o sufrieron una enfermedad, tal como la enfermedad de Crohn y/o enfermedad celíaca y/o cáncer o que fueron tratados con fármacos que provocan hipoabsorción, anorexia y/u osteopatía metabólica, tales como fármacos quimioterápicos y/o corticoesteroides. En el tercer caso, las personas y, en particular, niños, presentan una osteopatía, y, por tanto, están enfermos. El uso preferente de acuerdo con la invención es el segundo caso, para lactantes prematuros/BPN/RCIU y también para lactantes/niños que experimentan retardos del crecimiento a causa de una enfermedad o desnutrición o uso de fármacos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados.

El término "niño" significa un ser humano entre las etapas de nacimiento y pubertad. Un adulto es un ser humano mayor que un niño.

El término "lactante" quiere decir un niño por debajo de la edad de 12 meses.

El término "lactante prematuro" significa un lactante nacido al menos con 37 semanas de edad gestacional.

El término "lactante de bajo peso al nacer" significa un lactante que presenta un peso al nacer vivo de menos de 2.500 g. El término "niño pequeño" significa un niño con edad comprendida entre uno y tres años.

El término "preparado para lactantes" significa un producto alimenticio destinado a uso nutricional particular por lactantes durante los primeros cuatro a seis meses de vida y que satisface por sí mismo los requisitos nutricionales de esta categoría de persona (artículo 1.2 de la Directiva 91/321/CEE de la Comisión Europea, de 14 de mayo, 1991, relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación).

El término "preparado para lactantes prematuros" significa un preparado para lactantes destinado a un lactante prematuro.

El término "enriquecedor de leche humana" significa un complemento usado para incrementar las calorías, proteínas, minerales y vitaminas en la leche materna para alimentar a lactantes prematuros o lactantes con un bajo peso al nacer. El término "preparado de continuación" significa un producto alimenticio destinado a uso nutricional particular por lactantes con edad superior a los cuatro meses y que constituye el elemento líquido principal en la dieta progresivamente diversificada de esta categoría de persona.

El término "preparado de inicio para lactantes" significa un producto alimenticio destinado a uso nutricional particular por lactantes durante los primeros cuatro meses de vida.

El término "alimentos infantiles" significa un producto alimenticio destinado a uso nutricional particular por lactantes durante los primeros años de vida.

El término "composición a base de cereales para lactantes" significa un producto alimenticio destinado a uso nutricional particular por lactantes durante los primeros años de vida.

El término "leche de crecimiento" significa una bebida adaptada para las necesidades nutricionales específicas de niños pequeños.

El término "periodo de destete" significa el periodo durante el que la leche de la madre o el preparado para lactantes se sustituye parcial o totalmente por otro alimento en la dieta de un lactante.

El término "osteopatía" se refiere a las afecciones médicas que afectan al hueso, en particular, relacionadas con la reducción de la matriz orgánica ósea, tales como osteopenia u osteoporosis y/o con una reducción en la mineralización ósea, tales como osteomalacia y raquitismo.

El término "prevención y/o tratamiento de osteopatía" significa la prevención y la reducción de la frecuencia y/o aparición y/o gravedad y/o duración de la osteopatía. La aparición está relacionada con el número de cualquier osteopatía. La frecuencia está relacionada con el número de la misma osteopatía. Esta prevención engloba la reducción de la frecuencia y/o de la gravedad de dicha osteopatía más adelante en la vida. El término "más adelante en la vida" engloba el efecto después de la finalización de la intervención. El efecto "más adelante en la vida" puede ser preferentemente de 2 a 4 semanas, 2 a 12 meses o años (por ejemplo, 2, 5, 10 años) después de la finalización de dicha intervención. Un fractura puede ser una consecuencia de una osteopatía, tal como las anteriores.

El término "promoción del crecimiento de hueso sano" significa el refuerzo del crecimiento óseo, de modo que se logre de la manera más equilibrada.

El término "composición nutricional" significa una composición que nutre a un sujeto. Esta composición nutricional normalmente se ha de tomar por vía oral, por vía intragástrica, o por vía intravenosa, y normalmente incluye una fuente de lípido o grasa y una fuente de proteína.

El término "mezcla sintética" significa una mezcla obtenida por medios químicos y/o biológicos, que puede ser químicamente idéntica a la mezcla que se produce de forma natural en leches de mamíferos.

El término "composición hipoalergénica" significa una composición que es improbable que cause reacciones alérgicas.

El término "probiótico" significa preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o bienestar del huésped. (Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. et al. "Probiotics: how should they be defined" Trends Food Sci. Technol. 1999:10 107-10).

El término "oligosacárido" significa un hidrato de carbono que presenta un grado de polimerización (GP) que oscila desde 2 a 20 inclusive pero sin incluir lactosa.

El término "oligosacáridos neutro" significa un oligosacárido que no presenta carga y ningún residuo de N-acetilo.

El término "oligosacárido sialilado" significa un oligosacárido que presenta un residuo de ácido siálico (tal como ácido N-acetilneuramínico y/o ácido N-glicolilneuramínico).

El término oligosacárido "N-acetilado" significa un oligosacárido que presenta al menos una hexosa que tiene un residuo de N-acetilo.
NCC designa la colección de cultivos de Nestlé.

Todos los porcentajes son en peso, a menos que se indique lo contrario.

En un aspecto, la invención proporciona una composición, que comprende

- al menos un AGPI-CL,
- al menos un probiótico, y
- una mezcla de oligosacáridos, conteniendo dicha mezcla al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado del grupo que comprende GalNAcα1,3Galβ1,4Glc (=3'GalNAc-lac = N-acetil-galactosaminillactosa), Galβ1,6GalNAcα1,3Galβ1,4Glc (= 6'Gal-3GalNAc-lac = galactosil-N-acetil-galactosaminillactosa), Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc (lacto-N-neotetraosa o LNnT) y Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc (lacto-N-tetraosa o LNT), al menos un oligosacárido sialilado seleccionado del grupo que comprende NeuAcα2,3Galβ1,4Glc (= 3'-sialillactosa) y NeuAcα2,6Galβ1,4Glc (= 6'-sialillactosa), y al menos un oligosacárido neutro seleccionado del grupo que consiste en Galβ1,6Gal (=β1,6-digalactósido); Galβ1,6Galβ1,4Glc (= 6'Gal-lac); Galβ1,6Galβ1,6Glc; Galβ1,3Galβ 1,3Glc; Galβ1,3Galβ1,4Glc (= 3'Gal-lac); Galβ1,6Galβ1,6Galβ1,4Glc (=6',6-diGal-lac); Galβ1,6Galβ1,3Galβ1,4Glc (=6',3-diGal-lac); Galβ1,3Galβ1,6Galβ1,4Glc (=3',6-diGal-lac); Galβ1,3Galβ1,3Galβ1,4Glc (=3',3-diGal-lac); Galβ1,4Galβ1,4Glc (= 4' Gal-lac) y Galβ1,4Galβ1,4Galβ1,4Glc (=4',4-diGal-lac); y Fucα1,2Galβ1,4Glc (= 2' fucosillactosa o FL),

para su uso en la promoción del crecimiento de hueso sano y en la prevención y/o tratamiento de osteopatía, preferentemente osteomalacia, raquitismo, osteopenia u osteoporosis.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga, al menos un probiótico, y una mezcla de oligosacáridos que comprende:

- un 0,25-20 % en peso, preferentemente un 0,3-10 % en peso, más preferentemente un 0,3-5 % en peso e incluso más preferentemente alrededor de un 0,5 % en peso, con respecto al peso total de la mezcla de oligosacáridos, de al menos un oligosacárido N-acetilado,
- un 0,5-30 % en peso, preferentemente un 0,75-15 % en peso, más preferentemente un 0,75-10 % en peso e incluso más preferentemente alrededor de un 1 % en peso, con respecto al peso total de la mezcla de oligosacáridos, de al menos un oligosacárido sialilado, y
- un 50-99,3 % en peso, preferentemente un 20-80 % en peso, más preferentemente un 10-50 % en peso e incluso más preferentemente alrededor de un 50 % en peso, con respecto al peso total de la mezcla de oligosacáridos, de al menos un oligosacárido neutro,

para su uso en la promoción del crecimiento de hueso sano y en la prevención y/o tratamiento de osteopatía, preferentemente osteomalacia, raquitismo, osteopenia u osteoporosis.

De acuerdo con un modo de realización preferente, la mezcla de oligosacáridos está presente en una cantidad de un 0,5-70 %, más preferentemente un 1-20 %, incluso más preferentemente un 2-5 %, con respecto al peso total de la composición.

Los compuestos oligosacáridos están definidos por sus estructuras, donde GalNAc es N-acetilgalactosamina, GlcNAc es N-acetilglucosamina, Gal es galactosa, NeuAc es ácido N-acetilneuramínico, Glc es glucosa y Fuc es fucosa.

La mezcla de oligosacáridos de la composición de acuerdo con la invención es preferentemente la única fuente de oligosacáridos en dicha composición.

En un primer modo de realización, el oligosacárido neutro se escoge preferentemente entre FOS y GOS, preferentemente GOS, tales como los citados anteriormente.

En un segundo modo de realización, independiente o no del primer modo de realización, el oligosacárido neutro es preferentemente 2'-fucosillactosa (FL). En este caso, la FL está incluida preferentemente en el grupo de oligosacáridos neutros en la mezcla de oligosacáridos durante su fabricación. El oligosacárido neutro se puede preparar como una mezcla al comprar y mezclar los componentes individuales. Por ejemplo, los galactooligosacáridos sintéticos, tales como Galβ1,6Gal,Galβ1,6Galβ1,4Glc,Galβ1,6Galβ1,6Glc,Galβ1,3Galβ1,3Glc,Galβ1,3Galβ1,4Glc,Galβ1,6Galβ1,6Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,3Galβ1,4Glc Galβ1,3Galβ1,6Galβ1,4Glc,Galβ1,3Galβ1,3Galβ1,4Glc,Galβ1,4Galβ1,4Glc y

Galβ1,4Galβ1,4Galβ1,4Glc y mezclas de los mismos, están disponibles comercialmente bajo las marcas comerciales Vivinal® de Friesland Campina, Países Bajos, y Elix'or®. Otros proveedores de oligosacáridos son Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH y Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. De forma alternativa, se pueden usar glucosidasas y/o glucosiltransferasas específicas, tales como galactosiltransferasas y/o fucosiltransferasas y/o galactosidasas y/o fucosidasas para producir galactooligosacáridos y/u oligosacáridos fucosilados.

La fucosillactosa es un oligosacárido fucosilado (es decir, un oligosacárido que presenta un residuo de fucosa). Este oligosacárido fucosilado se puede aislar mediante cromatografía o tecnología de filtración a partir de una fuente natural, tal como leches animales. De forma alternativa, se puede producir mediante medios biotecnológicos usando fucosidasa y/o fucosiltransferasas específicas, bien a través del uso de tecnología de fermentación basada en enzimas (enzimas naturales o recombinantes) o tecnología de fermentación microbiana. En este caso, los microbios bien pueden expresar sus enzimas naturales y sustratos o pueden estar genomanipulados para producir los sustratos y enzimas respectivos. Se pueden usar cultivos microbianos individuales y/o cultivos mixtos. La formación de oligosacáridos fucosilados se puede iniciar por sustratos aceptores partiendo de cualquier grado de polimerización (GP), desde GP=1 en adelante. De forma alternativa, los oligosacáridos fucosilados se pueden producir mediante síntesis química a partir de lactosa y fucosa libre. Los oligosacáridos fucosilados también están disponibles, por ejemplo, a partir de Kyowa, Hakko, Kogyo de Japón.

De acuerdo con la invención, el oligosacárido sialilado se puede seleccionar del grupo que comprende 3'-sialillactosa y 6'-sialillactosa. Preferentemente, el oligosacárido sialilado comprende tanto 3'-sialillactosa como 6'-sialillactosa. En esta forma de realización, la proporción entre 3'-sialillactosa y 6'-sialillactosa se encuentra preferentemente en el intervalo entre 5:1 y 1:2.

Las formas 3'- y 6'- de sialillactosa se pueden obtener mediante la adición a la composición de una fuente natural, tal como leche animal, o se pueden aislar mediante tecnología cromatográfica o de filtración a partir de dicha fuente natural. De forma alternativa, se pueden producir mediante medios biotecnológicos usando sialidasas o sialiltransferasas específicas, neuraminidasas, mediante un tecnología de fermentación basada en enzimas (enzimas naturales o recombinantes), mediante síntesis química o mediante una tecnología de fermentación microbiana. En este caso, los microbios bien pueden expresar sus enzimas naturales y sustratos o pueden estar genomanipulados para producir los sustratos y enzimas respectivos. Se pueden usar cultivos microbianos individuales o cultivos mixtos. La formación de sialiloligosacáridos se puede iniciar por sustratos aceptores partiendo de cualquier grado de polimerización (GP), desde GP=1 en adelante. De forma alternativa, las sialillactosas se pueden producir mediante síntesis química a partir de lactosa y ácido N'-acetilneuramínico libre (ácido siálico). Las sialillactosas también están disponibles comercialmente, por ejemplo, a partir de Kyowa Hakko Kogyo de Japón.

Los oligosacáridos N-acetilados se puede obtener mediante la adición a la composición de una fuente natural, tal como leche animal. De forma alternativa, se pueden preparar mediante la acción de glucosaminidasa y/o galactosaminidasa sobre N-acetilglucosa y/o N-acetilgalactosa. Igualmente, para este propósito se pueden usar las N-acetilgalactosiltransferasas y/o N-acetilglucosiltransferasas. Los oligosacáridos N-acetilados también se pueden producir a través del uso de tecnología de fermentación usando enzimas respectivas (naturales o recombinantes) y/o fermentación microbiana. En este caso, los microbios bien pueden expresar sus enzimas naturales y sustratos o pueden estar genomanipulados para producir los sustratos y enzimas respectivos. Se pueden usar cultivos microbianos individuales o cultivos mixtos. La formación del oligosacárido N-acetilado se puede iniciar por sustratos aceptores partiendo de cualquier grado de polimerización (GP), desde GP=1 en adelante. Otra opción es la conversión química de cetohexosas (por ejemplo, fructosa) bien libres o unidas a un oligosacárido (por ejemplo, lactulosa) en N-acetilhexosamina o una N-acetilhexosamina que contenga oligosacáridos, como se describe en Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) Angew. Chem. Int. Ed. 38:827-828.

Las LNnT y LNT se pueden sintetizar mediante transferencia enzimática de unidades de sacárido a partir de restos donantes a restos aceptores usando glucosilhidrolasas y/o glucosiltransferasas, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.288.637 y en el documento WO 96/10086. De forma alternativa, la LNnT se puede preparar mediante conversión química de cetohexosas (por ejemplo, fructosa) bien libres o unidas a un oligosacárido (por ejemplo, lactulosa) en N-acetilhexosamina o una N-acetilhexosamina que contenga oligosacáridos, como se describe en Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) Angew. Chem. Int. Ed. 38:827-828. A continuación, se puede transferir la N-acetillactosamina producida de esta manera a la lactosa como el resto aceptor.

Preferentemente, el oligosacárido N-acetilado se selecciona del grupo que comprende lacto-N-neotetraosa (o LNnT) y lacto-N-tetraosa (o LNT). Preferentemente las LNnT y/o LNT están incluidas en el grupo de oligosacáridos sialilados en la mezcla de oligosacáridos durante su fabricación.

La cepa bacteriana probiótica presente en la composición de la invención se puede seleccionar de cualquier cepa que satisfaga la definición de un probiótico y presente un tiempo de conservación aceptable para la composición en la que se va a incorporar. Por ejemplo, si la composición se incorpora en preparados para lactantes, se requiere que dichos preparados para lactantes permanezcan estables y eficaces durante un máximo de 12 meses.

La cepa bacteriana probiótica es preferentemente un *lactobacillus* o una *bifidobacterium.* Los ejemplos de especies de *Lactobacillus* preferentes son *Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus reuteri.* Son particularmente preferentes las cepas *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, y *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116. Incluso más preferentemente, el probiótico es *Lactobacillus Rhamnosus,* término que abarca *Lactobacillus Rhamnosus* ATCC 53103 y *Lactobacillus Rhamnosus* CGMCC 1.3724.

El *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 está disponible a partir de Valio Oy de Finlandia bajo la marca comercial LGG.

Los ejemplos de especies de bifidobacteria preferentes incluyen *Bifidobacterium lactis, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis*. Son particularmente preferentes las cepas *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 comercializada, entre otros, por la compañía Christian Hansen de Dinamarca bajo la marca comercial Bb12, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 comercializada por Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón bajo la marca comercial BB536, la cepa de *Bifidobacterium breve* comercializada por Danisco bajo la marca comercial Bb-03, la cepa de *Bifidobacterium breve* comercializada por Morinaga bajo la marca comercial M-16V, la cepa de *Bifidobacterium infantis* comercializada por Procter & Gamble Co. bajo la marca comercial Bifantis y la cepa de *Bifidobacterium breve* comercializada por Institut Rosell (Lallemand) bajo la marca comercial R0070.

De acuerdo con un modo de realización de la invención, el probiótico se escoge entre cepas bacterianas probióticas, preferentemente el probiótico es un *lactobacillus* o una *bifidobacterium,* más preferentemente el probiótico es *Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium lactis.*

El probiótico puede estar presente en la composición en un amplio intervalo de porcentajes siempre que el probiótico brinde el efecto descrito. Sin embargo, preferentemente, el probiótico está presente en la composición en una cantidad equivalente a desde 10e2 a 10e12 ufc (=unidad de formación de colonias) de una cepa bacteriana probiótica, más preferentemente entre 10e6 y 10e9 ufc, para cada gramo de la composición. Esta expresión incluye las posibilidades de que las bacterias estén vivas, inactivadas o muertas o incluso estén presentes como fragmentos, tales como ADN, materiales de la pared celular, materiales intracelulares o metabolitos de bacterias. En otras palabras, la cantidad de bacterias que contiene la composición se expresa en términos de la capacidad de formación de colonias de esa cantidad de bacterias si todas las bacterias estuvieran vivas con independencia de si, de hecho, están vivas, inactivadas o muertas, fragmentadas o una mezcla de alguno o todos de estos estados.

La composición contiene al menos un AGPI-CL, que normalmente es un AGPI-CL n-3 o uno n6 . El AGPI-CL n-3 puede ser un ácido graso n-3 C20 o uno C22. El AGPI-CL n-3 C20 o C22 está presente preferentemente en una cantidad de al menos un 0,1 % en peso de todos los ácidos grasos en la composición. Preferentemente, el AGPI-CL n-3 es ácido docosahexanoico (DHA, C22:6, n-3). El AGPI-CL n-6 puede ser un ácido graso n-6 C20 o uno C22. El AGPI-CL n-6 C20 o C22 está presente preferentemente en una cantidad de al menos un 0,1 % en peso de todos los ácidos grasos en la composición. Preferentemente, el AGPI-CL n-6 es ácido araquidónico (ARA, C20:4, n- 6). La fuente de AGPI-CL puede ser, por ejemplo, lípidos de huevo, aceite fúngico, aceite de algas o aceite de pescado bajo en EPA. El AGPI-CL de la composición de la invención se puede proporcionar en pequeñas cantidades de aceites que contienen altas cantidades de ácido docosahexanoico y ácido araquidónico preformado, tales como aceites de pescado o aceites microbianos.

La composición de acuerdo con la invención es preferentemente una composición nutricional, más preferentemente, una composición nutricional sintética. En este caso, puede ser un preparado para lactantes prematuros, un enriquecedor de leche humana, un preparado de inicio para lactantes, un preparado de continuación, un preparado de alimentos infantiles, un preparado a base de cereales para lactantes, una leche de crecimiento, un producto de alimento para usos médicos para nutrición clínica, o un complemento, típicamente que se va a usar durante la estancia hospitalaria y/o que se va a usar después de alta hospitalaria. Un complemento puede ser para un lactante prematuro o un niño o un adulto. Dicha composición es preferentemente un producto para alimentar prematuros, tal como un preparado para lactantes prematuros, un enriquecedor de leche humana, o un complemento para lactantes prematuros. De acuerdo con un modo de realización, la composición es preferentemente un preparado para lactantes prematuros, un enriquecedor de leche humana, o complemento. La composición de acuerdo con la invención también puede ser productos para niños o adultos, tal como yogur o alimentos para usos médicos, así como alimentos para animales de compañía.

De acuerdo con un modo de realización particularmente preferente, la composición de acuerdo con la invención es para su uso en lactantes y niños pequeños que nacieron prematuros o con BPN o sufrieron RCIU, preferentemente en lactantes que sufrieron RCIU, o que experimentaron retraso estatural típicamente a causa de desnutrición o sufrieron una enfermedad, tal como la enfermedad de Crohn y/o enfermedad celíaca y/o cáncer o que fueron tratados con fármacos que provocan hipoabsorción, anorexia y/u osteopatía metabólica, tales como fármacos quimioterápicos y/o corticoesteroides.

La composición de acuerdo con la invención puede ser para su uso antes y/o durante y/o después de un periodo de destete.

Preferentemente la composición de acuerdo con la invención es para su uso en la promoción del crecimiento de hueso sano y/o en la prevención y la reducción de la frecuencia y/o aparición y/o gravedad y/o duración de la osteopatía.

Particularmente la composición de acuerdo con la invención es para su uso en la prevención y la reducción de la frecuencia y/o aparición y/o gravedad y/o duración de las fracturas.

Preferentemente, la composición de acuerdo con la invención es para su uso en la promoción del crecimiento de hueso sano. Más preferentemente, la composición de acuerdo con la invención es para su uso en la prevención de la reducción de la DMO y/o para su uso en la potenciación del contenido mineral óseo (CMO).

La invención también incluye el uso de una composición de acuerdo con la invención, como un agente nutricional sintético, para la promoción del crecimiento de hueso sano y/o para la prevención y/o tratamiento de osteopatía, en particular, osteomalacia, raquitismo, osteopenia u osteoporosis.

La invención también incluye el uso de una composición de acuerdo con la invención, como un agente nutricional sintético, para la prevención de la reducción de la DMO y/o la potenciación del CMO.

Estos usos engloban el caso en el que la composición sea un complemento, provisto preferentemente en forma de dosis unitarias.

Todos los usos indicados anteriormente están particularmente destinados a lactantes y niños pequeños. Las composiciones y usos según la presente invención son particularmente adecuados para lactantes y niños pequeños con riesgo de osteopatía, que presentan antecedentes familiares de osteopatía, o que ya han sufrido al menos un, preferentemente varios, episodio(s) de fractura. Las composiciones y usos según la presente invención son particularmente adecuados para lactantes y niños pequeños que nacieron prematuros o con BPN o sufrieron RCIU o que experimentaron retraso estatural a causa de desnutrición o sufrieron una enfermedad, tal como la enfermedad de Crohn y/o enfermedad celíaca y/o cáncer o que fueron tratados con fármacos que provocan hipoabsorción, anorexia y/u osteopatía metabólica, tales como fármacos quimioterápicos y/o corticoesteroides. La composición de la invención también se puede aplicar a adolescentes o adultos con riesgo de osteopatía o que hayan sufrido al menos un, preferentemente varios, episodio(s) de fracturas, o que nacieron prematuros o con BPN o sufrieron RCIU o que experimentaron retraso estatural a causa de desnutrición o sufrieron una enfermedad, tal como la enfermedad de Crohn y/o enfermedad celíaca y/o cáncer o que fueron tratados con fármacos que provocan hipoabsorción, anorexia y/u osteopatía metabólica, tales como fármacos quimioterápicos y/o corticoesteroides o que experimentaron retardos del crecimiento a causa de una enfermedad o desnutrición o uso de fármacos durante la lactancia y/o infancia (incluyendo la adolescencia).

La composición de acuerdo con la invención es particularmente preferente para su uso en lactantes y niños que nacieron prematuros o con bajo peso al nacer o sufrieron retraso del crecimiento intrauterino, o con desnutrición intrauterina o que experimentaron retardo del crecimiento.

Sin querer vincularse a la teoría, los inventores creen que la eficacia de la combinación de la mezcla de oligosacáridos en la composición descrita anteriormente en la promoción del crecimiento de hueso sano y/o en la prevención y/o tratamiento de osteopatía, puede ser el resultado de la combinación sinérgica de los efectos inmunomoduladores generados por la cepa bacteriana probiótica y el AGPI-CL a través de su estimulación con la mezcla de oligosacáridos específicos.

Los oligosacáridos, el AGPI-CL y la cepa bacteriana probiótica se pueden administrar en la misma composición o se pueden administrar de forma secuencial.

Si se va a estudiar el grupo de prematuros y lactantes con BPN, la composición es preferentemente una composición nutricional, por ejemplo, consumida en forma líquida. Puede ser un preparado nutricionalmente completo, tal como un preparado para lactantes (prematuros), un complemento, un enriquecedor de leche humana, un preparado de continuación o una leche de crecimiento. De forma alternativa, para el grupo de niños pequeños, la composición puede ser una bebida de zumo o cualquier bebida enfriada o de larga duración o una sopa, por ejemplo, o un alimento infantil, o una composición a base de cereales para lactantes. De forma alternativa, para el grupo de mamíferos jóvenes, la composición puede ser un alimento para animales de compañía.

La composición de acuerdo con la invención también puede contener una fuente de proteína. No se cree que el tipo de proteína sea crucial para la presente invención siempre que se cumplan los requisitos mínimos para el contenido en aminoácidos esenciales y se garantice un crecimiento satisfactorio. De esta manera, se pueden usar fuentes de proteína basadas en lactosuero, caseína y mezclas de los mismos, así como fuentes de proteína basadas en soja.

En lo que respecta a las proteínas de lactosuero, la fuente de proteína puede estar basada en lactosuero ácido o lactosuero dulce o mezclas de los mismos y puede incluir alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina en cualquier proporción deseada. Las proteínas pueden estar al menos parcialmente hidrolizadas a fin de potenciar la tolerancia oral a alérgenos, especialmente alérgenos alimentarios. En ese caso, la composición es una composición hipoalergénica.

La composición de acuerdo con la presente invención también puede contener una fuente de hidratos de carbono además de la mezcla de oligosacáridos. Esto es particularmente preferente en el caso en el que la composición de la invención sea un preparado para lactantes. En este caso, se puede usar cualquier fuente de hidratos de carbono encontrada de forma convencional en preparados para lactantes, tal como lactosa, sacarosa, maltodextrina, almidón y mezclas de los mismos, aunque la fuente preferente de hidratos de carbono es lactosa. En cualquier caso, la mezcla de oligosacáridos es preferentemente la única fuente de prebiótico en la composición de acuerdo con la invención.

La composición de acuerdo con la presente invención también puede contener una fuente de lípidos además del AGPI-CL. Esto es particularmente pertinente si la composición nutricional de la invención es un preparado para lactantes. En este caso, la fuente de lípidos puede ser cualquier lípido o grasa que sea adecuado para su uso en preparados para lactantes. Las fuentes de grasa preferentes incluyen palma oleico, aceite de girasol alto oleico y aceite de cártamo alto oleico. También se pueden añadir los ácidos grasos esenciales ácido linoleico y α-linolénico. En la composición, la fuente de grasa (incluyendo el AGPI-CL, tal como ARA y/o DHA) tiene preferentemente una proporción de ácidos grasos n-6 a n-3 de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 10:1, preferentemente aproximadamente 3:1 a aproximadamente 8:1.

La composición de la invención también puede contener todas las vitaminas y minerales entendidos como esenciales en la dieta diaria y en cantidades nutricionalmente significativas. Se han establecido los requisitos mínimos para determinadas vitaminas y minerales. Los ejemplos de minerales, vitaminas y otros nutrientes opcionalmente presentes en la composición de la invención incluyen vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina E, vitamina K, vitamina C, vitamina D, ácido fólico, inositol, niacina, biotina, ácido pantoténico, colina, calcio, fósforo, yodo, hierro, magnesio, cobre, cinc, manganeso, cloro, potasio, sodio, selenio, cromo, molibdeno, taurina, y L-carnitina. Normalmente los minerales se añaden en forma de sal. La presencia y cantidades de minerales específicos y otras vitaminas varía dependiendo de la población destinada.

Si fuera necesario, la composición de la invención puede contener emulsionantes y estabilizantes, tales como soja, lecitina, ésteres de ácido cítrico de mono y diglicéridos, y similares.

La composición de la invención también puede contener otras sustancias que pueden presentar un efecto beneficioso, tales como lactoferrina, nucleótidos, nucleósidos, gangliósidos, poliaminas, y similares.

La preparación de la composición de acuerdo con la invención se describirá a continuación a modo de ejemplo.

El preparado se puede preparar de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, se puede preparar combinando conjuntamente una fuente de proteína, una fuente de hidrato de carbono (diferente de la mezcla de oligosacáridos), y una fuente de grasa incluyendo el AGPI-CL en proporciones apropiadas. Si se usan, los emulsionantes se pueden incluir en este punto. Las vitaminas y minerales se pueden añadir en este punto, pero normalmente se añaden más tarde para evitar la degradación térmica. Cualquier vitamina lipófila, emulsionante y similares se pueden disolver en la fuente de grasa antes de la combinación. A continuación, se puede mezclar agua, preferentemente agua que se ha sometido a ósmosis inversa, para formar una mezcla líquida. La temperatura del agua se encuentra convenientemente en el intervalo entre aproximadamente 50 °C y aproximadamente 80 ºC para favorecer la dispersión de los ingredientes. Se pueden usar fluidificantes disponibles comercialmente para formar la mezcla líquida. La mezcla de oligosacáridos se añade en esta etapa si el producto final ha de presentar una forma líquida. Si el producto final ha de ser un polvo, asimismo los oligosacáridos se pueden añadir en esta etapa si se desea. A continuación, la mezcla líquida se homogeneiza, por ejemplo, en dos etapas.

A continuación, la mezcla líquida se puede tratar térmicamente para reducir las cargas bacterianas, por ejemplo, calentando rápidamente la mezcla líquida a una temperatura en el intervalo entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 150 ºC durante una duración entre aproximadamente 5 segundos y aproximadamente 5 minutos. Esto se puede llevar a cabo por medio de inyección de vapor, una autoclave o un intercambiador de calor, por ejemplo, un intercambiador de calor de placas.

A continuación, la mezcla líquida se puede refrigerar a entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 85 ºC, por ejemplo, mediante refrigeración ultrarrápida. A continuación, la mezcla líquida se puede homogeneizar de nuevo, por ejemplo, en dos etapas entre aproximadamente 10 MPa y aproximadamente 30 MPa en la primera etapa y entre aproximadamente 2 MPa y aproximadamente 10 MPa en la segunda etapa. A continuación, la mezcla homogeneizada se puede refrigerar adicionalmente para añadir cualquier componente sensible al calor, tal como

vitaminas y minerales. El pH y el contenido en sólidos de la mezcla homogeneizada se ajustan convenientemente 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 en humedad de menos de aproximadamente un 5 % en peso. La mezcla de oligosacáridos se puede añadir en esta etapa mediante mezclado en seco junto con la(s) cepa(s) bacteriana(s) probiótica(s) o mediante su combinación en forma de jarabe de cristales, junto con la(s) cepa(s) bacteriana(s) probiótica(s), y secado por pulverización (o liofilización).

Si es preferente una composición líquida, la mezcla homogeneizada se puede esterilizar, a continuación, llenar de forma aséptica en recipientes adecuados o primero se puede llenar en los recipientes y, a continuación, destilar en retortas.

En otro modo de realización, la composición de la invención puede ser un complemento en una cantidad suficiente para alcanzar el efecto deseado en una persona. Esta forma de administración es más adecuada para prematuros o lactantes con BPN o RCIU, niños mayores y adultos.

La cantidad de mezcla de oligosacáridos, AGPI-CL y cepa bacteriana probiótica que se va a incluir en el complemento se selecciona de acuerdo con la manera en la que complemento se va a administrar.

El complemento, por ejemplo, puede estar en forma de polvo, comprimidos, cápsulas, pastillas o un líquido. Adicionalmente, el complemento puede contener hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes de formación de películas, agentes/materiales de encapsulación, materiales de pared/envoltura, compuestos de la matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes tensioactivos, agentes de solubilización (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, vehículos, cargas, co-compuestos, agentes de dispersión, agentes humectantes, coadyuvantes de procesamiento (disolventes), agentes de flujo, agentes de enmascaramiento del sabor, agentes lastrantes, agentes gelificantes y agentes de formación de geles. El complemento también puede contener adyuvantes y aditivos farmacéuticos y convencionales, excipientes y diluyentes, incluyendo, pero sin limitarse a, agua, gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, sulfonato de lignina, talco, azúcares, almidón, goma arábiga, aceites vegetales, polialquilenglicoles de polialquileno, agentes saborizantes, conservantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, cargas, y similares.

El complemento se puede añadir en un producto aceptable para el consumidor (que es un ser humano o un animal), tal como un soporte o vehículo ingerible respectivamente. Los ejemplos de tales vehículos o soportes son un producto farmacéutico o un alimento o una composición alimenticia para animales de compañía. Los ejemplos no limitantes para tales composiciones son leche, yogur, requesón, queso, leches fermentadas, productos fermentados basados en leche, productos basados en cereales fermentados, polvos basados en leche, leche humana, preparado para prematuros, preparado para lactantes, complemento oral, y alimentación por sonda.

Adicionalmente, el complemento puede contener un material de vehículo orgánico o inorgánico adecuado para la administración enteral o parenteral, así como vitaminas, minerales, oligoelementos y otros micronutrientes de acuerdo con las recomendaciones de organismos gubernamentales, tales como las USRDA.

Las ventajas, naturaleza, y varias características adicionales de la invención aparecerán de forma más completa tras considerar el experimento ilustrativo que ahora se va a describir en detalle con respecto a los dibujos adjuntos. En los dibujos:

La FIG. 1 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos, en términos de la concentración mineral ósea (CMO, en g).

La FIG. 2 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos, en términos de la densidad mineral ósea (DMO, en g/cm^2).

La FIG. 3 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos, en términos de la longitud nariz-ano (o Lna en cm).

La FIG. 4 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos, en términos de la longitud del fémur (o Lf en mm).

EJEMPLO

Los experimentos se llevaron a cabo con respecto al efecto de la complementación de una mezcla de oligosacáridos que es una mezcla de oligosacáridos de leche de vaca (OSLV) enriquecida con galactooligosacáridos (filtrado de suero desmineralizado y delactosado o DDWP), AGPI-CL (ácido araquidónico –ARA– y ácido docosahexaenoico –

DHA–), y *Lactobacillus rhamnosus,* en ratas que sufrieron RCIU. Se indujo RCIU mediante un 50 % de restricción de alimentos maternos a partir del día 11 de gestación hasta el parto.

1. Metodología

Se adquirieron hembras no apareadas y hembras oportunamente apareadas Sprague-Dawley de Charles River, Francia. Las hembras apareadas se bloquearon en peso y se asignaron a voluntad o a régimen con restricción. Todos los animales recibieron una dieta de pienso (Kliba 3437). Las hembras con restricción recibieron un 50 % de aporte de las hembras no apareadas a partir del día 11 de gestación hasta el parto, después de lo que se permitió que todas las hembras se alimentaran de pienso a voluntad.

En el momento del nacimiento, las crías se pesaron en las primeras 24 h y se asignaron a uno de tres grupos (cada uno de 12 machos y 12 hembras):
a) Control: las crías de madres alimentadas a voluntad recibieron alimentación forzada de control y dieta de destete de control;
b) RCIU de control (RCIUc): las crías de madres con restricción recibieron alimentación forzada de control y dieta de destete de control;
c) RCIU de mezcla (RCIUtx): las crías de madres con restricción recibieron tratamiento de alimentación forzada y tratamiento de destete;

A fin de minimizar los efectos maternos, las crías en el estudio se seleccionaron aleatoriamente a partir de cada una de las madres y se asignaron a 4 madres lactantes por grupo, de esta manera, los hermanos de la misma camada se asignaron aleatoriamente en los dos grupos con RCIU. Las crías de control fueron amamantadas por madres alimentadas a voluntad durante la gestación y las crías en los grupos con RCIU por madres con restricción durante la gestación.

Las camadas se ajustaron a 8 crías cada una (4 machos y 4 hembras) de las cuales 6 de cada camada (3 machos y 3 hembras) se incluyeron en los grupos experimentales. Las crías permanecieron con sus madres asignadas y se permitió que mamaran a voluntad hasta los 21 días de edad.

2. Tratamiento y dietas

Se usaron los siguientes ingredientes funcionales para la alimentación forzada experimental y la composición de la dieta:

a) Ingrediente de DDWP en un 98,8 % de materia seca, cuya composición se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de mezcla de DDWP

	% de materia seca
Lactosa	33,4
Oligosacáridos totales	25,51
Glucosa	9,06
Galactosa	8,13
Proteína	4,03
Ceniza	11,43
Desconocida	8,44

El DDWP se obtiene típicamente de acuerdo con las divulgaciones de los documentos WO2007/101675 o WO 2007/090894 y normalmente contiene una mezcla de aproximadamente un 30 % en peso de GalNAcα1,3Galβ1,4Glc y Galβ1,6GalNAcα1,3Galβ1,4Glc; un 50 % en peso de Galβ1,6Galβ1,4Glc y Galβ1,3Galβ1,4Glc; un 20 % en peso de NeuAcα2,3Galβ1,4Glc y NeuAca2,6Galβ1,4Glc.

b) Cultivo liofilizado en polvo de NCC 4007 *(Lactobacillus rhamnosus)* con leche desnatada en polvo que contiene $2{,}14 \times 10^{11}$ ufc por gramo.

c) Aceite ARASCO® que contiene un 43,6 % de ácido araquidónico (ARA) y aceite DHASCO® que contiene un 43,6 % de ácido docosahexanoico (DHA) (Martek Biosciences Corporation).

2.1. Alimentación forzada

Las crías de 7 a 21 d bien recibieron control o tratamiento de alimentación forzada. El tratamiento de alimentación forzada pretendía proporcionar DDWP en un 0,08 % de peso corporal (PC), DHA y ARA en un 0,03 % de PC y 1 x 10^9 UFC de NCC 4007 por día. En la alimentación forzada placebo, el DDWP se sustituyó con maltodextrina (Glucidex 12, Roquette), DHA y ARA se sustituyeron con ácido α-linolénico (C18:3 n-3) y ácido linoleico (C18:2 n-6) respectivamente, y el NCC 4007 liofilizado se reemplazó por leche desnatada en polvo. También se proporcionaron otros hidratos de carbono presentes en la mezcla de DDWP (véase la tabla 1) en la alimentación forzada placebo.

2.2. Dietas

En el día 21, las crías se alojaron individualmente y se destetaron bien con respecto a la dieta de control (Control y RCIUc) como experimental (RCIUtx) que recibieron hasta el día (= día posnatal) 58. La dietas de destete (tablas 2 y 3) se encontraban en forma de polvo y se almacenaron a 4 ºC en envases de aluminio sellados al vacío hasta su uso.

Tabla 2. Composición de dietas de destete (g/100 g de dieta)

	Control[1]	Tratamiento[2]
K-caseinato[3]	20	20
Almidón de maíz[4]	33,95	33,95
Maltodextrina[5]	16,79	9,58
Sacarosa[6]	10	10
Lactosa[7]	4,76	0
Glucosa[8]	1,29	0
Galactosa[7]	1,16	0
Mezcla de DDWP[9]	0	14,42
Grasa mixta (véase a continuación la tabla 3 para la composición)	7	7
Minerales (AIN-93-G[10]	3,50	3,50
Vitaminas (AIN-93-VX[10]	1	1
L-cisteína[7]	0,30	0,30
Bitartrato de colina[4]	0,25	0,25

Tabla 3: Grasa mixta (g/100 g de grasa)

Oleína de palma refinada[11]	50	54
Aceite de coco[11]	15	11
Aceite de colza de bajo erúcico [11]	15	12
Aceite de maíz[12]	14	10
ARASCO[13]	0	5
DHASCO[13]	0	5
Aceite de linaza[15]	6	3

[1]4,53 kcal/g, un 18,32 % de proteína [2]4,46 kcal/g, un 18,78 % de proteína [3]Smith trading Co. [4]Synopharm, Alemania, [5]Roquette, Francia. [6]Howeg, Suiza. [7]Fluka, [8]Merck, Alemania. [9]Nestlé, Suiza, [10]Socochim, Suiza. [11]Sofinol, Suiza. [12]Nutriswiss, Suiza. [13]Martek, EE. UU. [14]Sabo, Suiza.

En los experimentos, las proporciones son como sigue: alimentación forzada: DDWP:ARA:DHA 1:1:1 y dieta: DDWP:ARA:DHA 11:1:1

El contenido nutricional de ambas dietas (AIN 93 G modificado) se adaptó a los requisitos de la rata para el crecimiento. La dieta de control se complementó con lactosa, glucosa, galactosa para igualar los niveles de estos hidratos de carbono encontrados en el producto de DDWP.

El perfil de ácidos grasos de las dos dietas se equilibró para proporcionar una proporción similar de n-6/n-3 y una proporción similar de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.

La composición de ácidos grasos de ambas dietas era prácticamente la misma en términos del perfil de ácidos grasos, excepto para C18:2 n-6 (ácido linoleico) que es de un 16,8 % de masa de AG para el control y 14,6 para el tratamiento, C18:3 n-3 (ácido α-linolénico) que es de un 4,1 % de masa de AG para el control y 2,5 para el tratamiento, C20:4 n-9 (ARA) que es 0,0 para el control y un 2,1 % de masa de AG para el tratamiento y C22:6 n-3

(DHA) que es 0,0 para el control y 1,9 % de masa de AG para el tratamiento. El n-6 total para el control y para el tratamiento es de un 18,0 % de masa de AG. El n-3 total es de un 4,1 % de masa de AG para el control y un 4,4 % de masa de AG para el tratamiento, que es bastante similar, y la proporción n-6/n-3 es de un 4,4 % de masa de AG para el control y 4,1 para el tratamiento, que es similar.

Durante este periodo, los animales recibieron una bolita de gelatina con (RCIU-tratamiento) o sin (control y RCIU-control) NCC 4007 (1 x 10 UFC). Las bolitas se complementaron cada mañana, y su composición se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. Composición de bolitas de gelatina

	Control	Tratamiento
Gelatina (mg)	45	45
DDWP (mg)	0	15
Hidratos de carbono mixtos	15	0
NCC 4007 (mg)	0	4,6
Leche desnatada (mg)	4,6	0
PBS + peptona (microl)	300	300
Sacarina (mg)	0,2	0,2

Los animales se sacrificaron el día 58.

3. Parámetros óseos

Antes del sacrificio, se midió la longitud nariz-ano.

Después del sacrificio, se recogieron los fémures. Se retiró la carne de los huesos con cuidado a fin de dejar intacto el periostio. Después de medir su longitud, los fémures se almacenaron hidratados en gasa empapada con solución salina tamponada con fosfato a -80 °C. Cada fémur se llevó a temperatura ambiente antes de la medición.

Se determinaron el contenido mineral óseo (CMO) y mineral ósea (DMO) del fémur completo usando radioabsorciometría de doble energía (DEXA). El fémur se colocó en una placa ósea extraída de referencia (adquirida PIXImus) que imita el tejido blando y se escaneó usando DXA (PIXImus2; GE-Lunar, Madison, WI). El coeficiente de variación para las DMO y CMO totales fue un 0,5 %.

La FIG. 1 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos, en términos del contenido mineral óseo (CMO, en g), en el día (= día posnatal) 58.

La FIG. 2 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos, en términos de la densidad mineral ósea (DMO, en g/cm^2), en el día (= día posnatal) 58. Las columnas indican la mediana ± EE mediana del grupo. Los machos y las hembras se representan conjuntamente. Las letras "a" y "b" presentan los significados siguientes: las letras diferentes significan diferencias significativas ($p<0,005$).

La FIG. 3 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos, en términos de la longitud nariz-ano (o Lna en cm), en el día (= día posnatal) 58.

La FIG. 4 es un gráfico de barras que representa los resultados de los experimentos, en términos de la longitud del fémur (o Lf en mm), en el día (= día posnatal) 58. Las columnas indican la mediana ± EE mediana del grupo. Los machos y las hembras se representan conjuntamente. Las letras "a" y "b" presentan los significados siguientes: las letras diferentes significan diferencias significativas ($p<0,005$).

A partir de los resultados, parce que la longitud nariz-ano (Lna) disminuyó en el RCIUc en comparación con el control, mientras que no se observaron diferencias entre el control y el RCIUtx (figura 3, RCIUc frente al control, $P<0,01$ y RCIUtx frente al RCIUc, $P=0,059$). La longitud del fémur (Lf) disminuyó en RCIUc en comparación con el control y el RCIUtx; no se observaron diferencias entre el control y el RCIUtx. (Figura 4, RCIUc frente al RCIUtx de control, $P = 0,027$). De forma similar, el CMO disminuyó en RCIUc en comparación con el control y el RCIUtx (figura 1, $P<0,003$); no se observaron diferencias entre el RCIUtx y el control. Se incrementó la DMO por RCIUtx con respecto al control y RCIUc (figura 2, $P< 0,003$).

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga (AGPI-CL), al menos un probiótico y una mezcla de oligosacáridos, conteniendo dicha mezcla al menos un oligosacárido N-acetilado, al menos un oligosacárido sialilado y al menos un oligosacárido neutro, para su uso en la promoción del crecimiento de hueso sano y/o en la prevención y/o tratamiento de osteopatía, preferentemente osteomalacia, raquitismo, osteopenia u osteoporosis.

2. Una composición de acuerdo con la reivindicación precedente, en la que el oligosacárido neutro se escoge entre fructooligosacáridos (FOS) y/o galactooligosacáridos (GOS), preferentemente GOS.

3. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha mezcla de oligosacáridos contiene al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado del grupo que comprende GalNAcα1,3Galβ1,4Glc (=3'GalNAc-lac = N-acetil-galactosaminillactosa), Galβ1,6GalNAcα1,3Galβ1,4Glc (= 6'Gal-3GalNAc-lac = galactosil-N-acetil-galactosaminillactosa), Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc (lacto-N-neotetraosa o LNnT) y Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc (lacto-N-tetraosa o LNT), al menos un oligosacárido sialilado seleccionado del grupo que comprende NeuAcα2,3Galβ1,4Glc (= 3'-sialillactosa) y NeuAcα2,6Galβ1,4Glc (= 6'-sialillactosa), y al menos un oligosacárido neutro seleccionado del grupo que consiste en Galβ1,6Gal (=β1,6-digalactósido); Galβ1,6Galβ1,4Glc (= 6'Gal-lac); Galβ1,6Galβ1,6Glc; Galβ1,3Galβ1,3Glc; Galβ1,3Galβ1,4Glc (= 3'Gal-lac); Galβ1,6Galβ1,6Galβ1,4Glc (=6',6-diGal-lac); Galβ1,6Galβ1,3Galβ1,4Glc (=6',3-diGal-lac); Galβ1,3Galβ1,6Galβ1,4Glc (=3',6-diGal-lac); Galβ1,3Galβ1,3Galβ,4Glc (=3',3-diGal-lac); Galβ1,4Galβ1,4Glc (= 4' Gal-lac) y Galβ1,4Galβ1,4Galβ1,4Glc (=4',4-diGal-lac) y Fucα1,2Galβ1,4Glc (= 2' fucosillactosa).

4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la mezcla de oligosacáridos comprende:

- un 0,25-20 % en peso, preferentemente un 0,3-10 % en peso, más preferentemente un 0,3-5 % en peso e incluso más preferentemente alrededor de un 0,5 % en peso, con respecto al peso total de la mezcla de oligosacáridos, de al menos un oligosacárido N-acetilado,
- un 0,5-30 % en peso, preferentemente un 0,75-15 % en peso, más preferentemente un 0,75-10 % en peso e incluso más preferentemente alrededor de un 1 % en peso, con respecto al peso total de la mezcla de oligosacáridos, de al menos un oligosacárido sialilado, y
- un 50-99,3 % en peso, preferentemente un 20-80 % en peso, más preferentemente un 10-50 % en peso e incluso más preferentemente alrededor de un 50 % en peso, con respecto al peso total de la mezcla de oligosacáridos, de al menos un oligosacárido neutro.

5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la mezcla de oligosacáridos está presente en una cantidad de un 0,5-70 %, más preferentemente un 1-20 %, incluso más preferentemente un 2-5 %, con respecto al peso total de la composición.

6. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el AGPI-CL se escoge entre ácido araquidónico (ARA) y ácido docosahexanoico (DHA), preferentemente el AGPI-CL es una mezcla de ARA y DHA.

7. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el probiótico se escoge entre cepas bacterianas probióticas, preferentemente el probiótico es un *lactobacillus* o una *bifidobacterium,* más preferentemente el probiótico es *Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium lactis.*

8. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el oligosacárido N-acetilado se selecciona del grupo que comprende lacto-N-neotetraosa (o LNnT) y lacto-N-tetraosa (o LNT).

9. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el oligosacárido sialilado se selecciona del grupo que comprende 3'-sialillactosa y 6'-sialillactosa, y preferentemente el oligosacárido sialilado comprende tanto 3'-sialillactosa como 6'-sialillactosa, encontrándose preferentemente la proporción entre 3'-sialillactosa y 6'-sialillactosa en el intervalo entre 5:1 y 1:2.

10. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el oligosacárido neutro es 2'-fucosillactosa (o FL).

11. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición es un preparado para lactantes prematuros, un enriquecedor de leche humana, un preparado de inicio para lactantes, un preparado de continuación, un preparado de alimentos infantiles, un preparado a base de cereales para lactantes, una leche de crecimiento, un producto de alimento para usos médicos para nutrición clínica

o un complemento y preferentemente, dicha composición es un preparado para lactantes prematuros, un enriquecedor de leche humana, o un complemento.

12. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en lactantes y niños que nacieron prematuros o con bajo peso al nacer o sufrieron retraso del crecimiento intrauterino, o que experimentaron retraso estatural a causa de desnutrición o sufrieron una enfermedad, tal como anorexia, enfermedad de Crohn y/o enfermedad celíaca y/o cáncer o que fueron tratados con fármacos que provocan hipoabsorción, anorexia y/u osteopatía metabólica, tales como fármacos quimioterápicos y/o corticoesteroides.

13. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en la prevención de la reducción de la densidad mineral ósea (DMO) y/o para su uso en la potenciación del contenido mineral óseo (CMO).

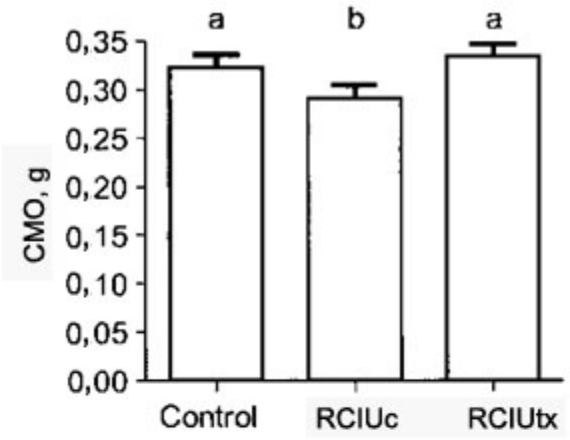

Fig.1

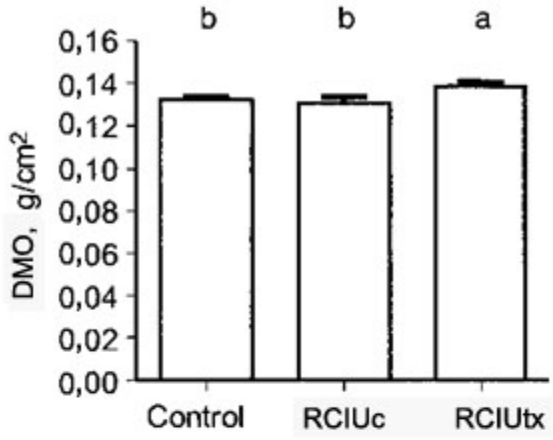

Fig.2

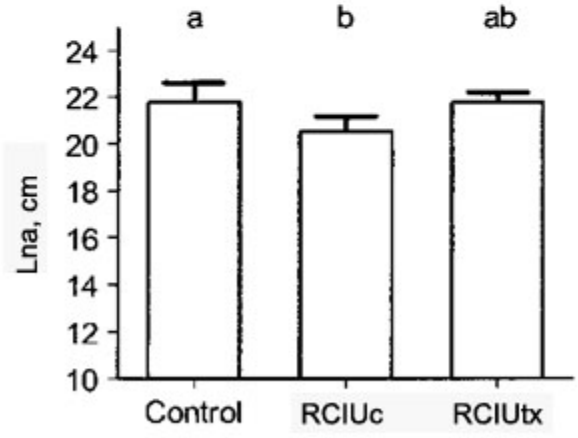

Fig.3

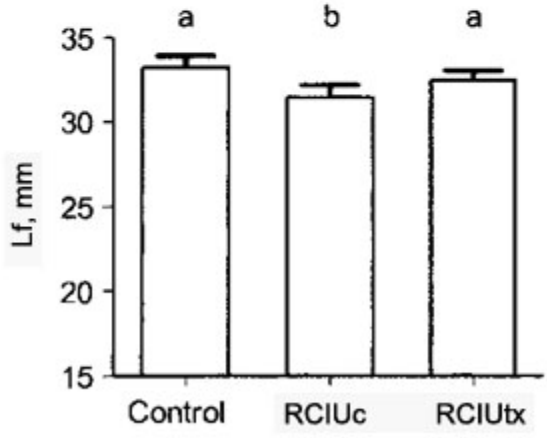

Fig.4