(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 569 241**

(51) Int. CI.:

***A61K 39/00*** (2006.01)
***C07H 3/06*** (2006.01)
***A61P 11/06*** (2006.01)
***A61P 11/00*** (2006.01)
***A61P 37/08*** (2006.01)
***A61P 17/00*** (2006.01)
***A61K 35/74*** (2015.01)
***A61K 31/702*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2011 E 11701334 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2525811**

(54) Título: **Una composición que comprende Lactobacillus rhamnosus HN001 y prebióticos para su uso en el tratamiento de la enfermedad pulmonar alérgica**

(30) Prioridad:

**19.01.2010 US 296217 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**09.05.2016**

(73) Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)**
**100 Abbott Park Road**
**Abbott Park, IL 60064-3500, US**

(72) Inventor/es:

**THOMAS, DEBRA L y**
**BUCK, RACHAEL H**

(74) Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

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

Una composición que comprende Lactobacillus rhamnosus HN001 y prebióticos para su uso en el tratamiento de la enfermedad pulmonar alérgica

### Campo técnico

La presente divulgación se refiere a una composición simbiótica que comprende el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y prebióticos basados en hidratos de carbono tales como fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, oligosacáridos de leche humana, o sus combinaciones y el uso de la composición para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad alérgica.

### Antecedentes de la divulgación

Las enfermedades alérgicas tales como la dermatitis atópica, rinitis alérgica, y asma representan un segmento significativo de enfermedades crónicas en el mundo. Por ejemplo, se estima que 150 millones de personas de todo el mundo padecen asma, mientras que la mortalidad ha alcanzado más de 180.000 personas anualmente. Solo en los Estados Unidos se realizó una estimación de 20,3 millones de asmáticos en 2001, y el número de asmáticos ha superado el 60 % desde el principio de la década de los 80 del siglo pasado y las muertes se han duplicado hasta 5000 al año. *Véase* Li, et al., "Allergic Asthma: Symptoms and Treatment," sitio web de la Organización Mundial de Alergias, visitado el 11 de agosto de 2009.

La incidencia de enfermedades alérgicas puede ser especialmente problemática en bebés y durante la primera infancia. Los bebés carecen de flora intestinal al nacer. Como resultado del contacto con la madre durante el nacimiento y la posterior alimentación con leche humana o leche de fórmula, la flora intestinal se desarrolla rápidamente. Generalmente, la flora intestinal de los bebés que se alimentan con leche humana está principalmente compuesta por bifidobacterias y lactobacilos. Se considera que las bifidobacterias y los lactobacilos son importantes en el mantenimiento de una microbiota intestinal bien equilibrada, y se ha postulado que las bifidobacterias y los lactobacilos tienen algunos efectos promotores de la salud jugando posiblemente un papel en la estimulación temprana del sistema inmunitario del hospedador.

Se ha sometido a ensayo la administración de probióticos, incluyendo diversas cepas de *Lactobacillus*, para determinar su eficacia en el tratamiento y prevención de la alergia en bebés. El papel de los probióticos de *Lactobacillus* en la prevención de la alergia es, sin embargo, controvertido. Por ejemplo, algunos estudios han descubierto que la administración de probióticos de *Lactobacillus* no reduce la incidencia de dermatitis atópica cuando se administra durante el embarazo y la primera infancia, y de hecho se ha asociado con tasas crecientes de episodios recurrentes de bronquitis sibilantes *(véase* Kopp, et al., Pediatrics, 2008, Vol. 121, p. e850-e856, donde se administró un probiótico de *Lactobacillus rhamnosus GC*). Véase también Taylor, et al., J. Allergy Clin. Immunol., 2007, Vol. 119 No. 1, p. 184-191 que describen un estudio que descubre que el suministro temprano de probióticos con *Lactobacillus acidophilous* no reduce el riesgo de dermatitis atópica, y se ha asociado con una probabilidad significativamente mayor de desarrollar sibilancias en niños en los segundos 6 meses de vida; y Kalliomaki, et al., J. Allergy Clin. Immunol., 2007, Vol. 119, No. 4, p. 1019-1021, que describen un estudio que descubre que la rinitis alérgica y el asma tendieron a ser más comunes durante los primeros 7 años de vida del niño cuyas madres recibieron *Lactobacillus rhamnosus GC* durante cuatro semanas antes de la fecha prevista del parto y después del nacimiento durante 6 meses.

Se ha descubierto ahora que un probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* HN001, cuando se administra a un individuo junto con determinados prebióticos basados en hidratos de carbono, se puede usar para tratar y/o prevenir no solo las enfermedades alérgicas de la piel, sino que inesperadamente y en contraste con los estudios anteriormente notificados con otras especies de *Lactobacillus,* se puede usar también para tratar y/o prevenir las enfermedades alérgicas del pulmón. Este efecto se puede conseguir también sin la administración prenatal del probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y el prebiótico.

### Sumario de la divulgación

La presente divulgación se dirige a composiciones para tratar o prevenir enfermedades alérgicas. En una realización, la composición comprende un probiótico que comprende *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y un prebiótico seleccionado entre el grupo que consiste en fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, oligosacáridos de leche humana y sus combinaciones. En una realización ilustrativa, la composición puede ser una fórmula nutritiva o una fórmula infantil.

La presente divulgación se dirige además a métodos para tratar o prevenir enfermedades alérgicas en un individuo que necesita dicho tratamiento o prevención. En un método de la presente divulgación, se administra completamente al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende un probiótico que comprende *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y un prebiótico seleccionado entre el grupo que consiste en fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, oligosacáridos de leche humana y sus combinaciones.

Se ha descubierto de forma inesperada que *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y un prebiótico basado en hidratos de carbono seleccionado entre el grupo que consiste en fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, oligosacáridos de leche humana y sus combinaciones, se puede administrar a un individuo antes del inicio de una enfermedad alérgica para prevenir la incidencia de la enfermedad alérgica y/o para reducir la gravedad de una respuesta alérgica.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un diagrama que muestra el cambio promedio en los niveles de $pO_2$ desde el valor inicial en diversos momentos tras el estímulo respiratorio en cerdos a los que se administró por vía oral un pienso control, un pienso que comprende un probiótico de *L. rhamnosus* HN001, un pienso que comprende un prebiótico basado en un fructooligosacárido, o un pienso que comprende un probiótico de *L. rhamnosus* HN001 y un prebiótico basado en un fructooligosacárido (composición simbiótica), como se describe en los experimentos descritos en los Ejemplos.

La Figura 2 es un diagrama que muestra el cambio promedio en la presión de la pleura desde un valor inicial en diversos momentos tras el estímulo respiratorio en cerdos a los que se administró por vía oral un pienso control, un pienso que comprende un probiótico de *L. rhamnosus* HN001, un pienso que comprende un prebiótico basado en un fructooligosacárido, o un pienso que comprende un probiótico de *L. rhamnosus* HN001 y un prebiótico basado en un fructooligosacárido (composición simbiótica), como se describe en los Ejemplos.

La Figura 3 es un diagrama que muestra el nivel promedio de diversas citoquinas en el fluido de lavado broncoalveolar tomado a las 24 horas del estímulo respiratorio de cerdos a los que se administró por vía oral un pienso control, un pienso que comprende un probiótico de *L. rhamnosus* HN001, un pienso que comprende un prebiótico basado en un fructooligosacárido o un pienso que comprende un probiótico de *L. rhamnosus* HN001 y un prebiótico basado en un fructooligosacárido (composición simbiótica), como se describe en los Ejemplos.

La Figura 4 es un diagrama que muestra el promedio de reacciones alérgicas eruptivas de la piel 20 minutos después del estímulo con diversas dosis de antígeno en el día 45 en cerdos a los que se administró un pienso control (✧) en comparación con los cerdos a los que se administró un pienso que comprende un probiótico de *L. rhamnosus* HN001 (■), un pienso que comprende un prebiótico basado en galactooligosacárido (▲), o un pienso que comprende un probiótico de *L.* rhamnosus HN001 y un prebiótico basado en galactooligosacárido (●) (composición simbiótica) como se describe en los Ejemplos.

**Descripción detallada de la divulgación**

La presente divulgación se dirige a composiciones simbióticas que comprenden el probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y un prebiótico basado en hidratos de carbono seleccionado entre el grupo que consiste en fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, oligosacáridos de leche humana y sus combinaciones. Las composiciones simbióticas se pueden formular como fórmulas nutritivas o fórmulas infantiles, barritas, o como un suplemente para la administración a bebés, niños, o adultos. La presente divulgación proporciona además métodos para tratar y/o prevenir enfermedades alérgicas en un individuo que necesita dicho tratamiento o prevención, administrando al individuo una composición simbiótica de la presente divulgación. Estos y otros elementos o limitaciones esenciales u opcionales de las composiciones y métodos simbióticos de la presente divulgación se describen en detalle a partir de ahora en el presente documento.

El término "bebé" como se usa en el presente documento, a no ser que se especifique otra cosa, se refiere a niños de no más de un año de edad, e incluye bebés de 0 a aproximadamente 4 meses de edad, bebés de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 meses de edad, bebés de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 meses de edad, bebés de peso bajo en el nacimiento en menos de 2,500 gramos en el nacimiento, y bebés pretérmino nacidos con menos de 37 semanas de edad de gestación, normalmente de aproximadamente 26 semanas a aproximadamente 34 semanas de edad de gestación. El término "niño" o "niños", como se usa en el presente documento se refiere a niños de no más de 12 años de edad, e incluye niños de aproximadamente 12 meses a aproximadamente 12 años de edad. El término "adulto", como se usa en el presente documento, se refiere a adultos y niños de aproximadamente 12 años de edad y mayores.

El término "fórmula infantil", como se usa en el presente documento, a no ser que se especifique otra cosa, se refiere a una composición nutritiva diseñada para bebés que contiene nutrientes suficientes tales como proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas, y minerales para servir potencialmente con una fuente de nutrición suplementaria, primaria, o una única fuente de nutrición.

El término "fórmula nutritiva", como se usa en el presente documento, a no ser que se especifique otra cosa, se refiere a una composición nutritiva diseñada para bebes, niños pequeños, niños mayores, adultos o sus combinaciones, que contiene nutrientes suficientes tales como proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas, minerales y electrolitos para servir potencialmente como fuente de nutrición suplementaria, primaria, o una única fuente de nutrición.

El término "listo para la alimentación" como se usa en el presente documento, a no ser que se especifique otra cosa, se refiere a fórmulas nutritivas en forma líquida adecuada para su administración, incluyendo polvos reconstituidos, concentrados diluidos, y líquidos preparados.

El término "prebiótico", como se usa en el presente documento, a no ser que se especifique otra cosa, se refiere a un ingrediente alimenticio sustancialmente no digerible que estimula selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o más especies bacterianas en el sistema digestivo que son beneficiosas para la salud del hospedador.

El término "probiótico", como se usa en el presente documento, a no ser que se especifique otra cosa, se refiere a un microorganismo vivo o muerto que, cuando se administra en cantidades adecuadas, confiere un beneficio a la salud del hospedador. Un ejemplo de un probiótico utilizado en el presente documento es *Lactobacillus rhamnosus* HN001.

El término "oligosacáridos indigeribles" como se usa en el presente documento, a no ser que se especifique otra cosa, se refiere a sacáridos que no se digieren o se digieren solo parcialmente en el intestino mediante la acción de ácidos o enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo superior humano (intestino delgado y estómago) pero que son fermentados por la flora intestinal humana.

Todos los porcentajes, partes y relaciones que se usan en el presente documento son en peso de la composición total, a no ser que se especifique otra cosa. Todos los pesos mencionados, que pertenecen a los ingredientes relacionados, se basan en el nivel activo y, por tanto, no incluyen disolventes o subproductos que se pueden incluir en materiales comercialmente disponibles, a no ser que se especifique otra cosa.

Se pretende que los intervalos numéricos que se usan en el presente documento incluyan todos los números y subconjuntos de números incluidos en dicho intervalo, tanto si se describe específicamente como si no. Además, estos intervalos numéricos deben considerarse como una base para una reivindicación dirigida a cualquier número o subconjunto de números en ese intervalo. Por ejemplo, una divulgación de 1 a 10 debe considerarse como base de un intervalo de 2 a 8, de 3 a 7, de 5 a 6, de 1 a 9, de 3,6 a 4,6, de 3,5 a 9,9 y así sucesivamente.

Todas las referencias a características o limitaciones singulares de la presente divulgación deben incluir las correspondientes características o limitaciones plurales, y viceversa, a no ser que se especifique otra cosa o se implique claramente lo contrario en el contexto donde se hace la referencia.

Todas las combinaciones del método o las etapas de proceso que se usan en el presente documento se pueden llevar a cabo en cualquier orden, a no ser que se especifique otra cosa o se implique claramente lo contrario en el contexto donde se hace la conminación a la que se hace referencia.

Las composiciones de la presente invención, incluyendo las fórmulas nutritivas e infantiles, pueden estar también sustancialmente exentas de cualquier ingrediente o característica esencial opcional o seleccionada descrita en el presente documento, con la condición de que la composición restante siga conteniendo todos los ingredientes o características requeridas como se describe en el presente documento. En este contexto, y a no ser que se especifique otra cosa, el término "sustancialmente exento" significa que la composición seleccionada contiene menos de una cantidad opcional del ingrediente opcional, normalmente menos de un 0,1 % en peso, e incluyendo también un cero por ciento en peso de dicho ingrediente esencial opcional o seleccionado.

Las composiciones, fórmulas nutritivas, fórmulas infantiles, y los métodos correspondientes de la presente divulgación pueden comprender, consistir en, o consistir esencialmente en elementos y limitaciones esenciales de la divulgación que se describe en el presente documento, así como cualquier ingrediente, componente, o limitación adicional u opcional, descrito en el presente documento o útiles de otra manera en aplicaciones de fórmulas nutritivas.

**Probióticos**

Las composiciones simbióticas de la presente divulgación incluyen un probiótico, específicamente el probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* cepa HN001 (*L. rhamnosus* HN001), denominado también *Lactobacillus rhamnosus* DR20. Se ha descubierto de forma sorprendente que el probiótico de *L. rhamnosus* HN001 es eficaz en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades alérgicas en un individuo cuando se administra por vía entérica al individuo junto con determinados prebióticos basados en hidratos de carbono como se describe en el presente documento.

*L. rhamnosus* HN001 son bacterias heterofermentativas que son bacilos anaerobios facultativos Gram positivos no móviles, no formadores de esporas, catalasa negativos, que presentan una temperatura de crecimiento óptima de 37,1 ºC y un pH óptimo de 6,0-6,5. *Véase* el documento WO 2004/031389. *L. rhamnosus* HN001 se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos N.º 6.379.663, *L. rhamnosus* HN001 se ha depositado previamente en el Australian Government Analytical Laboratories (AGAL), número de depósito NM97/09514, el 18 de agosto de 1997 mediante el New Zealand Dairy Board, conocido ahora como Fonterra (Auckland, Nueva Zelanda).

El probiótico *L. rhamnosus* HN001 se puede proporcionar como células viables o no viables, aunque es generalmente preferible que se proporcione como células viables; es decir, células vivas que alcanzan el intestino de un individuo que ingiere el probiótico. El probiótico puede estar en varias formas incluyendo, por ejemplo, células criodesecadas, células húmedas, un fluido de cultivo, yogures, o sus combinaciones. En una realización, se prefieren células criodesecadas.

Las composiciones simbióticas de la presente divulgación pueden estar en forma de polvo, líquido o barritas, y se pueden incluir en una fórmula nutritiva, como se describe a partir de ahora en el presente documento. Las composiciones pueden comprender cualquier cantidad de probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 eficaz para tratar y/o prevenir enfermedades alérgicas cuando se administra por vía entérica a un individuo junto con el prebiótico de la presente divulgación. Normalmente, las composiciones comprenderán probióticos en cantidades suficientes para proporcionar una dosis diaria de aproximadamente $10^6$ unidades formadores de colonias (ufc) a aproximadamente $10^{12}$ ufc, o de aproximadamente $10^6$ ufc a aproximadamente $10^{10}$ ufc, o de aproximadamente $10^8$ ufc a aproximadamente $10^{12}$ ufc, o de aproximadamente $10^8$ ufc a aproximadamente $10^{10}$ ufc de un probiótico a un individuo tras la ingestión de la composición. En algunas realizaciones, las composiciones comprenderán probiótico suficiente para proporcionar una dosis diaria de aproximadamente $10^6$ ufc, o aproximadamente $10^7$ ufc, o aproximadamente $10^8$ ufc, o aproximadamente $10^9$ ufc, o aproximadamente $10^{10}$ ufc, o aproximadamente $10^{11}$ ufc o aproximadamente $10^{12}$ ufc a un individuo tras la ingestión de la composición.

Cuando la composición simbiótica se formula como fórmula nutritiva, la fórmula nutritiva puede comprender de aproximadamente $10^4$ ufc a aproximadamente $10^{10}$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva, o de aproximadamente $10^4$ ufc a aproximadamente $10^9$ ufc por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva, o de aproximadamente $10^4$ ufc a aproximadamente $10^8$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva, o de aproximadamente $10^4$ ufc a aproximadamente $10^7$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva, o de aproximadamente $10^4$ ufc a aproximadamente $10^6$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva, o de aproximadamente $10^4$ ufc a aproximadamente $10^5$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva. En otra realización, la fórmula nutritiva puede comprender de aproximadamente $10^6$ ufc a aproximadamente $10^8$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva, o de aproximadamente $10^6$ ufc a aproximadamente $10^7$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva. En otra realización, la fórmula nutritiva puede comprender aproximadamente $10^4$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva, o aproximadamente $10^5$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva, o aproximadamente $10^6$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva, o aproximadamente $10^7$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva, o aproximadamente $10^8$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva, o aproximadamente $10^9$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva, o aproximadamente $10^{10}$ ufc de probiótico por gramo de peso seco de la fórmula nutritiva.

**Prebiótico**

Las composiciones simbióticas de la presente divulgación incluyen al menos un prebiótico basado en hidratos de carbono. Los prebióticos de la presente divulgación son oligosacáridos indigeribles que estimulan selectivamente el crecimiento y/o la actividad de las bacterias en el sistema digestivo, y en particular *L. rhamnosus* HN001. Se ha descubierto sorprendentemente que los prebióticos de la presente divulgación actúan junto con el probiótico de *L. rhamnosus* HN001 para reducir la incidencia o la gravedad de las enfermedades alérgicas y previenen el inicio de las enfermedades alérgicas.

El prebiótico basado en hidratos de carbono de la presente divulgación se selecciona entre el grupo que consiste de fructooligosacáridos de cadena larga, fructooligosacáridos de cadena corta (denominados generalmente fructooligosacáridos), oligosacáridos que contienen galactosa (denominados generalmente galactooligosacáridos), oligosacáridos de leche humana, y sus combinaciones.

Los fructooligosacáridos (FOS), que se denominan también en el presente documento prebióticos basados en fructooligosacáridos, son sacáridos que comprenden unidades de fructosa unidas con enlace β, que se unen preferentemente mediante enlaces glucosídicos β(2.1) y/o β(2.6). Los ejemplos de fructooligosacáridos adecuados incluyen inulina, levano, y graminano. En general, inulina, levano, y graminano difieren en la cantidad de ramificaciones que están presentes en sus cadenas de fructosa y en los tipos de enlaces que conectan las unidades de fructosa individuales. Por ejemplo, los levanos consisten generalmente en cadenas de unidades de fructosa que se conectas normalmente por un enlace β(2-6). Aunque los levanos pueden aparecer como hidratos de carbono de cadena lineal, están compuestos normalmente por cadenas de fructosa ramificadas. Por el contrario, las inulinas consisten generalmente en cadenas lineales de unidades de fructosa que están conectadas normalmente por enlaces β(2-1). Los graminanos, o fructanos de tipo mixto, pueden comprender unidades de fructosa entre enlaces que tienen uniones β(2-1) y β(2-6). Los fructooligosacáridos de la presente divulgación contienen preferentemente contienen una glucosa unida por un enlace glucosídico β(2.1) en el extremo reductor.

Los fructooligosacáridos pueden encontrarse ampliamente distribuidos en la naturaleza. Por ejemplo, se puede encontrar inulina como un hidrato de carbono de almacenamiento en plantas, y es común en plantas de la familia de las compuestas. Se puede derivar la inulina a partir de diferentes plantas, tales como la alcachofa de Jerusalén y el

tubérculo de la dalia, y es un constituyente principal de algunas hierbas, tales como raíz de bardana, raíz de diente de león, raíz de helenio, raíz de achicoria, y raíz de codonopsis, entre otros. Están también comercialmente disponibles fructooligosacáridos como, por ejemplo, (Orafti), Actilight (Beghin-Meiji), o Synergy 1® (Orafti) entre otros.

Los fructooligosacáridos de la presente divulgación tendrán normalmente un grado de polimerización de 2 a aproximadamente 20. Preferentemente, el fructooligosacárido tiene un grado de polimerización de 2 a aproximadamente 10 o incluso de 2 a 7. Debe entenderse que no todos los fructooligosacáridos presentes en una composición de la presente divulgación deben tener el mismo grado de polimerización. Por ejemplo, el término "fructooligosacárido" o "FOS" puede referirse también a una mezcla de fructooligosacáridos que tiene longitudes de cadena variables; esto es, longitudes de cadenas largas y/o longitudes de cadenas cortas.

Otro ejemplo de un prebiótico adecuado es un oligosacárido que contiene galactosa, denominado comúnmente como un galactooligosacárido (GOS). Los GOS son oligosacáridos indigeribles que contienen una o más moléculas de galactosa y una o más moléculas de glucosa conectadas a través de enlaces glucosídicos β(1,4) y/o β(1,6). Los GOS usados en las composiciones de la presente divulgación se pueden seleccionar entre β-galactooligosacáridos, α-galactooligosacáridos, y (arabino-) galactanos. En alguna realización, el GOS puede ser un trans-galactooligosacárido (TOS). El GOS puede estar representado por la fórmula: $[galactosa]_n$-glucosa, donde n es un número entero entre 1 y 20, y se selecciona preferentemente entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. El término "galactooligosacárido" o "GOS" puede referirse también a una mezcla de galactooligosacáridos que tiene diferentes longitudes de cadena; esto es, longitudes de cadenas largas y/o longitudes de cadenas cortas. Los galactooligosacáridos están también comercialmente disponibles como, por ejemplo, Vivinal® GOS (Friesland) y GOS (Clasado).

Otro ejemplo de un prebiótico adecuado es un oligosacárido de leche humana. El término "oligosacárido de leche humana" o "HMO" se refiere generalmente a numerosos hidratos de carbono complejos que se encuentran en la leche humana. Los monómeros que se encuentran en los oligosacáridos de la leche incluyen normalmente D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAC), L-fucosa (Fuc), y ácido siálico [ácido N-acetilneuramínico (NeuAc)]. Puede conseguirse el alargamiento de estos monómeros mediante la unión de restos de GlcNAc unidos en el enlace β1-3 o en el enlace β1-4 a un resto Gal seguido por la adición adicional de Gal en un enlace β1-3 o β1-4. La mayoría de los HMO transporta lactosa en su extremo reductor. Se pueden formar un gran número de estructuras nucleares a partir de estos monómeros. Se pueden producir variaciones adicionales debido a la unión de la lactosamina, Fuc, y/o NeuAc.

Los ejemplos de HMO adecuados que se pueden incluir en las composiciones de la presente divulgación incluyen lacto-N-tetrosa, lacto-N-neotetrosa, lacto-N-fucopentosa I, lacto-N-fucopentosa II, lacto-N-fucopentosa III, lacto-N-fucopentosa V, lacto-N-hexosa, para-lacto-N-hexosa, lacto-N-neohexosa, para-lacto-N-neohexosa, monofucosillacto-N-hexosa II, lacto-N-hexosa fucosilada isomérica (1), monofucosillacto-N-hexosa, lacto-N-hexosa fucosilada isomérica (3), lacto-N-hexosa fucosilada isomérica (2), difucosil-para-lacto-N-neohexosa, difucosil-para-lacto-N-hexosa, difucosillacto-N-hexosa, lacto-N-neooctosa, para-lacto-N-octosa, iso-lacto-N-octosa, lacto-N-octosa, monofucosillactoneooctosa, monofucosillacto-N-octosa, difucosillacto-N-octosa I, difucosillacto-N-octosa II, difucosillacto-N-neooctosa II, difucosillacto-N-neooctosa I, lacto-N-decosa, trifucosillacto-N-neooctosa, trifucosillacto-N-octosa, trifucosil-iso-lacto-N-octosa, y sus combinaciones. Estos HMO se describen más completamente en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2009/0098240. Otros ejemplos adecuados de HMO que se pueden incluir en las composiciones de la presente divulgación incluyen lacto-N-difuco-hexosa II, sialilα(2-3) lactosa, sialilα(2-6) lactosa, sialillacto-N-tetrosa a, sialillacto-N-tetrosa b, sialil-lacto-N-tetrosa c, sialil-fucosil-lacto-N-tetrosa I, sialilfucosil-lactoN-tetrosa II, y disialil-lacto-N-tetrosa.

Los HMO pueden tener un grado de polimerización de 2 a aproximadamente 20. Preferentemente, los HMO tienen un grado de polimerización de 2 a aproximadamente 10. El término "oligosacárido de leche humana" o "HMO" puede referirse también a una mezcla de oligosacáridos de leche humana que tienen diferentes longitudes de cadena.

Los HMO se pueden derivar usando cualquier número de fuentes y métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden purificar los HMO a partir de leche humana usando los métodos conocidos en la materia. Uno de dichos métodos para la extracción de oligosacáridos a partir de leches maternas combinadas conlleva la centrifugación de una leche a 5.000 g durante 30 minutos a 4 ºC y la desnatación. A continuación, se puede añadir etanol a las proteínas precipitadas. Tras la centrifugación para sedimentar la proteína precipitada, el disolvente resultante se recoge y se seca mediante evaporación rotatoria. El material resultante se puede ajustar al pH adecuado de 6,8 con tampón fosfato y se añade β-galactosidasa. Tras la incubación, la solución se extrae con cloroformo-metanol, y se recoge la capa acuosa. Los monosacáridos y los disacáridos se eliminan mediante adsorción selectiva de los HMO usando extracción en fase sólida con cartuchos de carbono no poroso grafitizados. Los oligosacáridos retenidos se pueden eluir con agua-acetonitrilo (60:40) con ácido trifluoroacético al 0,01 %. Los HMO individuales pueden separarse adicionalmente usando métodos conocidos en la técnica tales como electroforesis capilar, HPLC (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada; HPAEC-PAD), y cromatografía en capa fina. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2009/0098240.

De forma alternativa, se pueden usar métodos enzimáticos para sintetizar los HMO. En general, cualquier enzima biosintética de oligosacáridos o enzima catabólica (con el ciclo de reacción en inverso) que convierte un sustrato en cualquiera de las estructuras de HMO (o sus intermedios) se puede usar para preparar los HMO. Otra solución a la síntesis de los HMO conlleva la síntesis química o enzimática, o el aislamiento, de estructuras de oligosacáridos que contienen lacto-N-biosa, o lacto-N-tetrosa procedente de fuentes de leche de mamíferos no humanos (por ejemplo, vacas, ovejas, búfalos, cabras, etc) y añadir enzimáticamente unidades de lacto-N-biosa, fucosa y ácido siálico según sea necesario para llegar a estructuras de HMO. Los ejemplos de dichas enzimas modificadoras de oligosacáridos incluyen sialidasas, silato O-acetilesterasas, N-acetilneuraminato liasas, N-acetil-beta-hexosaminidasa, beta-galactosidasas, N-acetilmannosamina-6-fosfato 2-epimerasas, alfa-L-fucosidasas, y las proteínas de la ruta de desasimilación de la fucosa, entre otros, que se pueden usar para catalizar una reacción biosintética en las condiciones adecuadas. De forma alternativa, se pueden usar métodos químicos convencionales para la síntesis orgánica de *novo* o la conversión de oligosacárido preexistentes en estructuras de HMO. Estas técnicas para sintetizar HMO se describen más completamente en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2009/0098240.

En una realización ilustrativa, el prebiótico usado junto con el *L. rhamnosus* HN001 es una combinación de dos o más galactooligosacáridos, fructooligosacáridos, y/u oligosacáridos de leche humana.

Las composiciones simbióticas de la presente divulgación pueden estar en forma de polvo, líquido y/o barritas, y/o se pueden incluir en una fórmula nutritiva o infantil, como se describe a partir de ahora en el presente documento. Las composiciones pueden comprender cualquier cantidad de prebiótico eficaz para tratar y/o prevenir enfermedades alérgicas cuando se administran por vía entérica a un individuo junto con el probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* HN001. Normalmente, las composiciones comprenderán prebiótico en cantidades suficientes para proporcionar de aproximadamente 0,4 gramos por día de prebiótico hasta aproximadamente 9,2 gramos por día de prebiótico, o de aproximadamente 1,5 gramos por día de prebiótico hasta aproximadamente 8,5 gramos por día de prebiótico, o aproximadamente 1,5 gramos por día de prebiótico hasta aproximadamente 7,0 gramos por día de prebiótico, o aproximadamente 1,5 gramos por día de prebiótico hasta aproximadamente 6,0 gramos por día de prebiótico, o aproximadamente 1,5 gramos por día de prebiótico hasta aproximadamente 4,0 gramos por día de prebiótico, o aproximadamente 1,5 gramos por día de prebiótico hasta aproximadamente 2,0 gramos por día de prebiótico a un individuo tras la ingestión de la composición. En otra realización, las composiciones comprenderán prebióticos en cantidades suficientes para proporcionar de aproximadamente 3,0 gramos por día de prebiótico hasta aproximadamente 6,0 gramos por día de prebiótico, o de aproximadamente 3,0 gramos por día de prebiótico hasta aproximadamente 5,0 gramos por día de prebiótico, o de aproximadamente 3,0 gramos por día de prebiótico hasta aproximadamente 4,0 gramos por día de prebiótico a un individuo tras la ingestión de la composición. En otra realización, las composiciones comprenderán prebióticos en cantidades suficientes para proporcionar aproximadamente 1,5 gramos por día de prebiótico, o 2,0 gramos por día de prebiótico, o 2,5 gramos por día de prebiótico, o 3,0 gramos por día de prebiótico, o 3,5 gramos por día de prebiótico, o 4,0 gramos por día de prebiótico, o 4,5 gramos por día de prebiótico, o 5,0 gramos por día de prebiótico, o 5,5 gramos por día de prebiótico, o 6,0 gramos por día de prebiótico, o 6,5 gramos por día de prebiótico, o 7,0 gramos por día de prebiótico, o 7,5 gramos por día de prebiótico, o 8,0 gramos por día de prebiótico, o 8,5 gramos por día de prebiótico, o 9,0 gramos por día de prebiótico, o 9,2 gramos por día de prebiótico a un individuo tras la ingestión de la composición.

Cuando la composición simbiótica se formula como una fórmula nutritiva o infantil, la fórmula nutritiva o infantil puede comprender de aproximadamente 0,35 gramos de prebiótico por 100 gramos de fórmula nutritiva a aproximadamente 9,2 gramos de prebiótico por 100 gramos de fórmula nutritiva, o de aproximadamente 1,5 gramos de prebiótico por 100 gramos de fórmula nutritiva a 7,0 gramos de prebiótico por 100 gramo de fórmula nutritiva, o de aproximadamente 1,5 gramo de prebiótico por 100 gramo de fórmula nutritiva a aproximadamente 6,0 gramos de prebiótico por 100 gramos de fórmula nutritiva, y preferentemente de aproximadamente 30 gramos de prebiótico por 100 gramos de fórmula nutritiva a aproximadamente 6,0 gramos de prebiótico a aproximadamente 100 gramos de fórmula nutritiva.

**Nutrientes**

Las composiciones simbióticas de la presente divulgación se pueden incorporar a cualquier alimento o bebida que se pueda consumir por bebés o adultos humanos o animales. De esta manera, en un aspecto, la composición de la presente divulgación se formula como una fórmula nutritiva o infantil. Las fórmulas nutritivas o infantiles de la presente divulgación pueden comprender suficientes tipos y cantidades de nutrientes para cumplir las necesidades dietéticas determinadas del usuario previsto. Estas fórmulas nutritivas o infantiles pueden por tanto comprender proteínas, hidratos de carbono, y un componente lípido (tanto orgánico como no orgánico) además del probiótico y prebiótico descritos anteriormente. Las fórmulas nutritivas o infantiles pueden incluir también vitaminas, minerales, u otros ingredientes adecuados para su uso en las fórmulas nutritivas.

Por ejemplo, cuando la fórmula nutritiva es una fórmula para adulto, el componente de proteína puede comprender de aproximadamente 10 % a aproximadamente 80 % del contenido calórico total de dicha fórmula nutritiva; el componente de hidratos de carbono puede comprender de aproximadamente 10 % a aproximadamente 70 % de

dicha fórmula nutritiva; y el componente lípido puede comprender entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 % del contenido calórico total de dicha fórmula nutritiva. La fórmula nutritiva puede estar en forma líquida o de polvo. Estos intervalos se proporcionan solo como ejemplos y no se pretende que sean limitantes.

Cuando la fórmula nutritiva es una fórmula no destinada a adultos, tal como una fórmula infantil, la fórmula no destinada a adultos incluye aquellas realizaciones donde el componente de proteína puede comprender de aproximadamente 7,5 % a aproximadamente 25 % del contenido calórico de la fórmula nutritiva; el componente de hidratos de carbono puede comprender de aproximadamente 35 % a aproximadamente 50 % del contenido calórico total de la fórmula nutritiva; y el componente lípido puede comprender de aproximadamente 30 % a aproximadamente 60 % del contenido calórico total de la fórmula nutritiva. Estos intervalos se proporcionan solo como ejemplos y no se pretende que sean limitantes. En la siguiente Tabla se señalan los intervalos adecuados adicionales.

| **Nutriente*** | **1ª Realización** | **2ª Realización** | **3ª Realización** |
|---|---|---|---|
| Hidratos de carbono: % de calorías totales | 20-85 | 30-60 | 35-55 |
| Lípidos: % de calorías totales | 5-70 | 20-60 | 25-50 |
| Proteína: % de calorías totales | 2-75 | 5-50 | 7-40 |
| *todos los valores numéricos precedidos por el término "aproximadamente" | | | |

Se conocen muchas fuentes y tipos diferentes de hidratos de carbono, lípidos, proteínas, minerales y vitaminas y se pueden usar en las fórmulas nutritivas de la presente divulgación, con la condición de que dichos nutrientes sean compatibles con los ingredientes añadidos en la fórmula seleccionada, sean seguros para su uso previsto y que por otra parte no deterioren indebidamente el comportamiento del producto.

Los hidratos de carbono adecuados para su uso en las fórmulas nutritivas de la presente divulgación pueden ser simples, complejos o sus variaciones o combinaciones. Los ejemplos no limitantes de hidratos de carbono adecuados incluyen almidón de maíz hidrolizado, intacto modificado natural y/o químicamente, maltodextrina, polímeros de glucosa, sacarosa, jarabe de maíz, sólidos de jarabe de maíz, hidratos de carbono derivados de arroz o patata, glucosa, fructosa, lactosa, jarabe de maíz con una concentración alta de fructosa y oligosacáridos indigeribles tales como fructooligosacáridos (FOS) y sus combinaciones.

Los ejemplos no limitantes de proteínas adecuadas para su uso en las fórmulas nutritivas incluyen proteínas o fuentes de proteínas ampliamente hidrolizadas, parcialmente hidrolizadas o no hidrolizadas, Y se pueden derivar de cualquier fuente conocida o adecuada de otra manera tal como leche (por ejemplo, caseína, suero lácteo), animal (por ejemplo, carne, pescado), cereal (por ejemplo, arroz, maíz), vegetal (por ejemplo, soja), o sus combinaciones. Las proteínas para su uso en el presente documento pueden incluir también, o estar completa o parcialmente sustituidas por aminoácidos libres conocidos para el uso en fórmulas nutritivas, cuyos ejemplos no limitantes incluyen triptófano, glutamina, tirosina, metionina, cisteína, arginina, y sus combinaciones. Otros aminoácidos (no de proteínas) que se añaden normalmente a las fórmulas nutritivas incluyen carnitina y taurina. En algunos casos, las formas D de los aminoácidos se consideran como nutritivamente equivalentes a las formas L, y se usan mezclas isoméricas para disminuir el coste (por ejemplo, D,L-metionina).

Los ejemplos no limitantes de los lípidos adecuados para su uso en las fórmulas nutritivas incluyen aceite de coco, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de cártamo alto oleico, aceite MCT (triglicéridos de cadena media), aceite de girasol, aceite de girasol alto oleico, aceites de palma y de nuez de palma, oleína de palma, aceite de canola, aceites de animales marinos, aceites de semilla de algodón, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga tales como ácido araquidónico (ARA), ácido docosahexanoico (DHA) y ácido eicosapentanoico (EPA), y sus combinaciones.

Además de estos aceites de calidad alimenticia, se pueden incorporar si se desea lípidos estructurados a las fórmulas nutritivas. Se conocen en la técnica los lípidos estructurados, cuyas descripciones se pueden encontrar en INFORM, Vol. 8, n.º 10, página 1004, Structured lipids allow fat tailoring (octubre de 1997); y la patente de Estados Unidos n.º 4.871.768. Los lípidos estructurados son predominantemente triacilgliceroles que contienen mezclas de ácidos grasos de cadena media y de cadena larga en el mismo núcleo de glicerol. Los lípidos estructurados se describen también en la patente de Estados Unidos n.º 6.160.007.

Las fórmulas nutritivas de la presente divulgación pueden comprender además cualquiera de una variedad de vitaminas, además de los componentes descritos anteriormente. Los ejemplos no limitantes de vitaminas incluyen vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K, tiamina, riboflavina, piridoxina, vitamina B 12, niacina, ácido fólico, ácido pantoténico, biotina, vitamina C, colina, cromo, carnitina, inositol, sales y sus derivados, y sus combinaciones.

Las fórmulas nutritivas pueden comprender además cualquiera de una variedad de minerales, los ejemplos no limitantes de los cuales incluyen calcio, fósforo, magnesio, hierro, cinc, manganeso, cobre, yodo, sodio, potasio, cloro, y sus combinaciones.

Las realizaciones de fórmulas infantiles de la presente divulgación comprenden preferentemente nutrientes de acuerdo con las directrices relevantes de las fórmulas infantiles para el consumidor objetivo o la población de usuarios, como ejemplo de las cuales estaría la Formula infantil comprendida en el Título 21 del USC. Sección 350(a).

Las fórmulas nutritivas de la presente divulgación incluyen también aquellas realizaciones que contienen las concentraciones de hidratos de carbono, lípidos y proteínas descritas en la Tabla 1 (Macronutrientes de fórmulas nutritivas).

**Tabla 1***

| Nutriente | Realización | g/100 kcal | g/100 g de sólidos totales | g/l (como alimento) |
|---|---|---|---|---|
| Hidratos de carbono | 1ªRealización | 8-16 | 30-90 | 54-108 |
| | 2ªRealización | 9-13 | 45-60 | 57-79 |
| | 3ªRealización | 15-19 | 63-81 | 157-203 |
| Lípidos | 1ªRealización | 3-8 | 15-42 | 20-54 |
| | 2ªRealización | 4-6,6 | 20-30 | 27-45 |
| | 3ªRealización | 2-5 | 8-21 | 20-53 |
| Proteína | 1ªRealización | 1-3,9 | 8-20,5 | 7-24 |
| | 2ªRealización | 1,5-3,4 | 10-17 | 10-23 |
| | 3ªRealización | 3,5-6,0 | 14,8-25,3 | 37-63 |
| *todos los valores numéricos precedidos por el término "aproximadamente" | | | | |

Las fórmulas nutritivas de la presente divulgación incluyen aquellas realizaciones que comprenden, por 100 kcal de fórmula reconstituida, una o más de las siguientes: vitamina A (de aproximadamente 250 a aproximadamente 1250 UI), vitamina D (de aproximadamente 40 a aproximadamente 150 UI), vitamina K (más de aproximadamente 4 mcg), vitamina E (al menos aproximadamente 0,3 UI), vitamina C (al menos aproximadamente 8 mg), tiamina (al menos aproximadamente 8 mcg), vitamina B 12 (al menos aproximadamente 0,15 mcg), niacina (al menos aproximadamente 250 mcg), ácido fólico (al menos aproximadamente 4 mcg), ácido pantoténico (al menos aproximadamente 300 mcg), biotina (al menos aproximadamente 1,5 mcg), colina (al menos aproximadamente 7 mg), e inositol (al menos aproximadamente 4 mg).

Las fórmulas nutritivas de la presente divulgación incluyen aquellas realizaciones que comprenden, por 100 kcal de fórmula reconstituida, uno o más de los siguientes calcio (al menos aproximadamente 50 mg), fósforo (al menos aproximadamente 25 mg), magnesio (al menos aproximadamente 6 mg), hierro (al menos aproximadamente 0,15 mg), yodo (al menos aproximadamente 5 mcg), cinc (al menos aproximadamente 0,5 mg), cobre (al menos aproximadamente 60 mcg), manganeso (al menos aproximadamente 5 mcg), sodio (de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 mg), potasio (de aproximadamente 80 a aproximadamente 200 mg), y cloruro (de aproximadamente 55 a aproximadamente 150 mg).

**INGREDIENTES OPCIONALES**

Las fórmulas nutritivas de la presente divulgación pueden comprender además otros componentes opcionales que pueden modificar las características físicas, químicas, estéticas o de procesamiento de las fórmulas o servir como componentes farmacéuticos o componentes nutritivos adicionales cuando se usan en una población objetivo. Se conocen muchos de dichos ingredientes opcionales, u otros adecuados para su uso en productos alimenticios y nutritivos, incluyendo fórmulas infantiles, y se pueden usar también en las fórmulas nutritivas de la presente divulgación, con la condición de que dichos materiales opcionales sean compatibles con los materiales esenciales descritos en el presente documento, sean seguros para su uso previsto, ni deterioren indebidamente el comportamiento del producto.

Los ejemplos no limitantes de dichos ingredientes opcionales incluyen conservantes, antioxidantes, agentes emulsionantes, tampones, colorantes, aromas, nucleótidos, y nucleósidos, probióticos adicionales, prebióticos adicionales, lactoferrina y derivados relacionados, agentes espesantes y estabilizantes, y así sucesivamente.

**FORMA DEL PRODUCTO**

Las fórmulas nutritivas de la presente divulgación pueden prepararse como cualquier forma de producto adecuada para su uso en seres humanos, incluyendo suplementos nutritivos completos, líquidos o en polvo, suplementos líquidos o en polvo (tales como un suplemento que se puede mezclar con una bebida), polvos reconstituibles, líquidos listos para utilizar, barritas, y concentrados líquidos diluibles, cuyas formas de producto son bien conocidas en las técnicas de las fórmulas nutritivas.

Las fórmulas nutritivas de la presente divulgación pueden tener cualquier densidad calórica adecuada para la población de pacientes objetivo o prevista, o proporcionar dicha densidad tras la reconstitución de una realización en polvo o tras la dilución de una realización de un concentrado líquido. Las densidades calóricas más comunes para las realizaciones de la fórmula infantil de la presente divulgación son generalmente al menos aproximadamente 19 kcal/fl oz (660 kcal/litro), más normalmente de aproximadamente 20 kcal/fl oz (675-680 kcal/litro) a aproximadamente 25 kcal/fl oz (820 kcal/litro), incluso más normalmente de aproximadamente 20 kcal/fl oz (675-680 kcal/litro) a aproximadamente 24 kcal/fl oz (800-810 kcal/litro). Generalmente, se usan más comúnmente fórmulas de 22-24 kcal/fl oz en los bebés pretérmino o de bajo peso al nacer, y se usan más a menudo fórmulas de 20-21 kcal/fl oz (675-680 a 700 kcal/litro) en bebés pretérmino. Las fórmulas no para bebés y de adultos pueden tener cualquier densidad calórica adecuada para la población objetivo o prevista.

Para las realizaciones de polvos nutritivos de la presente divulgación, dichos polvos están normalmente en forma de composiciones particuladas fluidas o sustancialmente fluidas, o al menos composiciones particuladas que se pueden retirar fácilmente y medirse con una cuchara u otro dispositivo similar, donde las composiciones pueden reconstituirse fácilmente por el usuario previsto con un fluido acuoso adecuado, normalmente agua, para formar una fórmula nutritiva líquida para uso oral o entérico inmediato. En este contexto, uso "inmediato" significa generalmente en un lapso de tiempo de 48 horas lo más normal en aproximadamente 24 horas, preferentemente justo después de la reconstitución. Estas realizaciones en polvo incluyen una forma particulada criodesecada, aglomerada, mezclada en seco u otra forma particulada conocida u eficaz. La cantidad de polvo nutritivo requerida para producir un volumen adecuado para una ración puede variar.

Las fórmulas nutritivas de la presente divulgación pueden envasarse y precintarse en recipientes individuales o multiuso, y a continuación almacenarse en condiciones ambientales durante hasta aproximadamente 36 meses o más tiempo, más normalmente de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 meses. Para los recipientes multiuso, estos envases se pueden abrir y a continuación cubrirse para un uso repetido por el usuario final, con la condición de que el envase cubierto se almacene a continuación en condiciones ambientales (por ejemplo, evitando temperaturas extremas) y el contenido se usa en un lapso de tiempo de aproximadamente un mes y así sucesivamente.

**MÉTODOS DE USO**

Las composiciones simbióticas de la presente divulgación se pueden usar para tratar y/o prevenir enfermedades alérgicas, particularmente en individuos que necesitan dicho tratamiento o prevención, dichos individuos padecen o están en riesgo de otra forma de desarrollar enfermedades alérgicas. Estas composiciones se pueden administrar también a cualquier individuo como fuente de nutrición, por ejemplo, en la forma de una fórmula nutritiva, especialmente para los que sea deseable la protección contra una enfermedad alérgica.

Las composiciones y métodos de la presente divulgación pueden dirigirse a cualquier individuo, incluyendo seres humanos y otros mamíferos tales como perros, gatos, roedores, vacas, ovejas, suínidos, cabras, caballos, y otros animales ungulados, y así sucesivamente. Se pueden también administrar a individuos sanos, incluyendo aquellos en riesgo de desarrollar una enfermedad alérgica, las composiciones.

Las composiciones de la presente divulgación se pueden usar para prevenir enfermedades alérgicas administrando las composiciones a un individuo antes del inicio de la enfermedad alérgica o sus síntomas. Por ejemplo, se pueden administrar las composiciones a un individuo antes, durante o después de la exposición a un alérgeno que puede estimular una enfermedad alérgica o una respuesta alérgica para proteger contra el desarrollo de la enfermedad alérgica y/o para reducir la gravedad de la respuesta alérgica.

De esta manera, en un aspecto, la presente divulgación se dirige a un método para prevenir enfermedades alérgicas en un individuo. El método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición simbiótica de la presente divulgación. Una "cantidad eficaz" de la composición simbiótica es cualquier cantidad eficaz para conseguir el tratamiento deseado y/o la prevención de una enfermedad alérgica, incluyendo una reducción (o eliminación) de la gravedad de los síntomas de la enfermedad alérgica. Como se describe en el presente documento, la composición se puede administrar antes del comienzo de la enfermedad alérgica para proteger contra el desarrollo de la enfermedad alérgica y/o reducir la gravedad de una respuesta alérgica. Preferentemente, la composición se administra por vía entérica.

El individuo al que se administra la composición puede ser, por ejemplo, uno que sea susceptible al desarrollo de la enfermedad alérgica. De esta manera, en un aspecto, el método puede comprender además, identificar un individuo susceptible de desarrollar una enfermedad alérgica. Los individuos susceptibles de desarrollar una enfermedad alérgica pueden incluir, por ejemplo, individuos que tienen antecedentes familiares de una o más enfermedades alérgicas, individuos que han presentado anteriormente síntomas de una enfermedad alérgica, y/o individuos que son sensibles a alérgenos, incluyendo alérgenos estacionales. Dichos individuos pueden identificarse mediante cualquier medio conocido en la materia, incluyendo, pero sin limitarse al examen de los antecedentes médicos y/o familiares de un individuo, y un examen de un individuo para determinar los signos de las respuestas alérgicas a los alérgenos.

Las composiciones de la presente divulgación pueden usarse también para tratar enfermedades alérgicas administrando las composiciones a un individuo durante o posteriormente al inicio de la enfermedad alérgica o sus síntomas. Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar a un individuo posteriormente al inicio de la enfermedad alérgica o sus síntomas para reducir la gravedad de la respuesta alérgica y/o reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad alérgica.

De esta manera, en otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método para prevenir enfermedades alérgicas o sus síntomas en un individuo. El método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición simbiótica de la presente divulgación. Como se describe en el presente documento, la composición se puede administrar posteriormente al comienzo de la enfermedad alérgica o de sus síntomas para reducir la gravedad de una respuesta alérgica y/o para reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad alérgica. Preferentemente, la composición se administra por vía entérica. El individuo al cual se administra la composición puede ser, por ejemplo, uno que sea susceptible al desarrollo de la enfermedad alérgica, como se ha descrito anteriormente, y/o un individuo que presenta uno o más síntomas de una enfermedad alérgica.

Se pueden usar las composiciones de la presente divulgación para tratar y/o prevenir las enfermedades alérgicas, incluyendo las enfermedades alérgicas del pulmón, enfermedades alérgicas de la piel, rinitis alérgica, y alergias alimentarias. Las enfermedades alérgicas pueden ser el resultado de la exposición o reexposición a un alérgeno, tal como pólenes, ácaros del polvo, caspa de animales, esporas de mohos, polvo, insectos, alérgenos alimentarios, y similares.

Las enfermedades alérgicas del pulmón incluyen asma, tal como asma atópica, así como pneumonitis hipersensible, y otras enfermedades respiratorias que pueden estar producidas por alérgenos. El asma implica normalmente episodios intermitentes reversibles de obstrucción de las vías aéreas caracterizada por tos, sibilancias, opresión en el pecho, y/o disnea. Los síntomas de asma grave incluyen opresión en el pecho grave, tos, sensación de falta de aire, incapacidad para estar tumbado, insomnio y fatiga grave. Los signos de asma grave incluyen también uso de músculos accesorios de la respiración, hiperinflado del pecho, taquipnea, taquicardia, sudoración, diaforesis, obnubilación, aspecto aprensivo, sibilancias, incapacidad de completar frases y dificultades para agacharse. La fiebre del heno es normalmente una dolencia estacional resultante de alergia a hierbas y pólenes, y se caracteriza algunas veces por estornudos, o en los casos más graves, inflamación y desarrollo de pólipos en los pasajes nasales. La pneumonitis hipersensibilizante puede caracterizarse por inflamación de los bronquiolos más pequeños en los pulmones, edema de la pared alveolar, y en algunos casos obstrucción del flujo de las vías aéreas debido a la contracción del músculo liso.

Las enfermedades alérgicas incluyen rinitis alérgica, dermatitis de contacto, eczema, y alergias alimentarias. Se pueden producir también reacciones alérgicas de la piel en algunos individuos como resultado de una exposición al látex. Los síntomas del eczema, que se denominan también dermatitis atópica, incluyen lesiones de la piel y/o piel seca normalmente en la cara y los lados extensores de los brazos y/o las piernas que pueden mostrar una extensa exudación y formación de costras, picores, eritema y pápulas. Los síntomas de la dermatitis de contacto, tales como la dermatitis de contacto alérgica, incluyen inflamación de la piel caracterizada por una erupción que incluye enrojecimiento, picores, ampollas, y en algunos casos, escamas en la piel. Los síntomas de la rinitis alérgica y de la fiebre del heno incluyen rinorrea, picor nasal, obstrucción nasal, estornudos, sibilancias, y picores en la garganta y los ojos. La fiebre del heno es normalmente una dolencia estacional resultante de alergia a hierbas y pólenes, y se caracteriza algunas veces por estornudos, o en los casos más graves, inflamación y desarrollo de pólipos en los pasajes nasales. Los síntomas de alergias alimentarias pueden manifestarse en la piel y/o en el tracto respiratorio. Por ejemplo, los síntomas de las alergias alimentarias pueden incluir urticaria (urticaria aguda), hinchazón de los ojos, labios, y/o lengua (es decir, angioderma), eczema, rinoconjuntivitis alérgica, y anafilaxis. Los síntomas asociados con las alergias al látex incluyen dermatitis de contacto alérgica, urticaria de contacto, rinosinusitis, conjuntivitis, y asma, entre otros.

En un aspecto de la divulgación, la administración de las composiciones de la presente divulgación a un individuo que las necesita da como resultado una disminución en las enfermedades respiratorias cuando el individuo se expone a un alérgeno, en comparación con los individuos a los que no se administra la composición. Se puede determinar el grado de insuficiencia respiratoria midiendo la tensión de oxígeno arterial ($pO_2$) del individuo, como se describe en los ejemplos, y/o midiendo la función pulmonar del individuo, utilizando cualquier técnica adecuada conocida en la materia. De esta manera, en un aspecto, la administración de las composiciones de la presente

divulgación a un individuo que lo necesita da como resultado una disminución menos grave de los niveles de $pO_2$ cuando el individuo se expone a un alérgeno, en comparación con los individuos expuestos al alérgeno pero que no han recibido la composición. En otro aspecto, la administración de las composiciones de la presente divulgación a un individuo que lo necesita disminuye los cambios en la función pulmonar (la presión pleural es una medida de la función pulmonar) del individuo cuando el individuo se expone a un alérgeno, en comparación a los individuos expuestos a un alérgeno, pero que no han recibido la composición.

**MÉTODOS DE FABRICACIÓN**

Las fórmulas base nutritivas de la presente divulgación (donde se introducen el prebiótico y el probiótico) pueden prepararse mediante cualquier técnica conocida o por otra parte eficaz para preparar y formular una fórmula nutritiva u otra fórmula similar, cuyas variaciones cuales pueden depender de variables tales como la forma del producto seleccionada, combinación de ingredientes, selección de envase y recipiente, y así sucesivamente, para la fórmula nutritiva deseada. Una persona normalmente experta en formulaciones nutritivas y técnicas de fabricación determina y aplica fácilmente dichas técnicas y variaciones para cualquier fórmula dada.

Las fórmulas nutritivas base de la presente divulgación, incluyendo las fórmulas ilustrativas descritas a partir de ahora en el presente documento, pueden por tanto prepararse mediante cualquiera de una variedad de métodos eficaces de formulación o fabricación que sean conocidos o eficaces. Estos métodos suelen implicar la formación inicial de una suspensión acuosa que contiene hidratos de carbono, proteínas, lípidos, estabilizantes u otros adyuvantes de la formulación, vitaminas, minerales, o sus combinaciones. La suspensión se emulsiona, pasteuriza, homogeneiza, y enfría. Se pueden añadir otras soluciones, mezclas, u otros materiales diversos a la emulsión resultante antes, durante, o después de un procesamiento adicional. A continuación, esta emulsión se puede diluir más, tratarse térmicamente, y envasarse para formar un líquido listo para la alimentación o como líquido concentrado, o se puede tratar térmicamente y posteriormente procesarse y envasarse como un polvo reconstituible, por ejemplo, secado mediante pulverización, mezcla en seco, aglomerado.

Se describen otros métodos adecuados para preparar fórmulas nutritivas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6.365.218 (Borschel, et al.), patente de Estados Unidos n.º 6.589.576 (Borschel, et al.), patente de Estados Unidos n.º 6.306.908 (Carlson, et al.), solicitud de patente de Estados Unidos 20030118703 A1 (Nguyen, et al.).

Una vez que se ha producido la fórmula nutritiva base, el probiótico que se ha descrito anteriormente se puede mezclar en seco con la fórmula nutritiva base para producir las fórmulas nutritivas de la presente divulgación. El probiótico se introduce en la fórmula nutritiva base y se mezcla vigorosamente con la fórmula nutritiva base usando un equipo de mezcla convencional adecuado para producir una fórmula nutritiva sustancialmente homogénea.

**Ejemplos**

Los siguientes ejemplos describen y demuestran adicionalmente realizaciones específicas comprendidas en el alcance de la presente invención. Todas las cantidades ilustradas son porcentajes en peso basados en el peso total de la composición, a no ser que se especifique otra cosa.

Cada una de las fórmulas ilustradas se alimenta a seres humanos para proporcionarse una fuente de alimentación única, primaria o suplementaria. Cada fórmula contiene una composición simbiótica de la presente divulgación, donde cada composición se puede usar para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades alérgicas.

**Ejemplos 1-13**

Los siguientes ejemplos ilustran las fórmulas infantiles nutritivas de la presente divulgación, incluyendo los métodos de preparar y utilizar las fórmulas infantiles. En las Tablas 2 y 3 se relacionan los ingredientes de las fórmulas para cada lote.

**Tabla 2: Fórmulas infantiles nutritivas que comprenden FOS o GOS**

| Ingredientes | Ejemplo 1 | Ejemplo 2 | Ejemplo 3 | Ejemplo 4 | Ejemplo 5 | Ejemplo 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb |
| Leche desnatada en polvo | 204,43 | 204,43 | 204,43 | 204,43 | 204,43 | 204,43 |
| Lactosa | 381,80 | 366,42 | 351,03 | 381,80 | 366,42 | 351,03 |
| Aceite de cártamo alto oleico | 116,62 | 116,62 | 116,62 | 116,62 | 116,62 | 116.b2 |
| Aceite de soja | 88,59 | 88,59 | 88,59 | 88,59 | 88,59 | 88,59 |

| **Ingredientes** | **Ejemplo 1** | **Ejemplo 2** | **Ejemplo 3** | **Ejemplo 4** | **Ejemplo 5** | **Ejemplo 6** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb |
| Aceite de coco | 81,60 | 81,60 | 81,60 | 81,60 | 81,60 | 81,60 |
| Galactooligosacáridos (GOS) | --- | --- | --- | 15,38 | 46,15 | 76,92 |
| Fructooligosacáridos (FOS) | 15,38 | 46,15 | 76,92 | --- | --- | --- |
| Concentrado de proteína de leche | 50,31 | 50,31 | 50,31 | 50,31 | 50,31 | 50,31 |
| Citrato de potasio (1) | 5,76 | 5,76 | 5,76 | 5,76 | 5,76 | 5,76 |
| Carbonato de calcio | 4,06 | 4,06 | 4,06 | 4,06 | 4,06 | 4,06 |
| Ácido araquidónico | 2,95 | 2,95 | 2,95 | 2,95 | 2,95 | 2,95 |
| Cloruro de potasio | 1,26 | 1,26 | 1,26 | 1,26 | 1,26 | 1,26 |
| Lecitina Ultralec | 1,15 | 1,15 | 1,15 | 1,15 | 1,15 | 1,15 |
| Ácido docosahexanoico | 1,11 | 1,11 | 1,11 | 1,11 | 1,11 | 1,11 |
| Cloruro de magnesio | 1,04 | 1,04 | 1,04 | 1,04 | 1,04 | 1,04 |
| Cloruro sódico | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,59 |
| Cloruro de colina | 0,43 | 0,43 | 0,43 | 0,43 | 0,43 | 0,43 |
| Vitamina ADEK | 0,39 | 0,39 | 0,39 | 0,39 | 0,39 | 0,39 |
| Palmitato de ascorbilo | 0,37 | 037 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 |
| Premezcla de mezcla de carotenoides | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 |
| Mezcla de tocoferoles | 0,16 | 0,16 | 0,16 | 0,16 | 0,16 | 0,16 |
| Ácido ascórbico | 1,28 | 1,28 | 1,28 | 1,28 | 1,28 | 1,28 |
| Citrato de potasio (3) | 3,43 | 3,43 | 3,43 | 3,43 | 3,43 | 3,43 |
| Riboflavina | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,003 |
| L-carnitina | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 |
| Premezcla de vitaminas/minerales | 1,12 | 1,12 | 1,12 | 1,12 | 1,12 | 1,12 |
| Sulfato ferroso | 0,45 | 0,45 | 0,45 | 0,45 | 0,45 | 0,45 |
| Citrato de potasio (2) | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 |
| Premezcla de nucleósidos/colina | 2,35 | 2,35 | 2,35 | 2,35 | 2,35 | 2,35 |
| L. rhamnosus HN001 (DR20)* | $5x10^{12}$ UFC | $5x10^{13}$ UFC | $5x10^{11}$ UFC | $5x10^{12}$ UFC | $5x10^{13}$ UFC | $5x10^{14}$ UFC |
| *Las unidades están en UFC por 1000 lb | | | | | | |

**Tabla 3: Fórmulas infantiles nutritivas que comprenden HMO, GOS y/o FOS**

| Ingredientes | Ejemplo 7 | Ejemplo 8 | Ejemplo 9 | Ejemplo 10 | Ejemplo 11 | Ejemplo 12 | Ejemplo 13 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb |
| Leche desnatada en polvo | 204,43 | 204,43 | 204,43 | 204,43 | 204,43 | 204,43 | 204,43 |
| Lactosa | 389,30 | 387,57 | 370,26 | 389,49 | 366,42 | 366,42 | 389,49 |
| Aceite de cártamo alto oleico | 116,62 | 116,62 | 116,62 | 116,62 | 116,62 | 116,62 | 116,62 |
| Aceite de soja | 88,59 | 88,59 | 88,59 | 88,59 | 88,59 | 88,59 | 88,59 |
| Aceite de coco | 81,60 | 81,60 | 81,60 | 81,60 | 81,60 | 81,60 | 81,60 |
| Galactooligosacáridos (GOS) | --- | --- | --- | | 46,15 | --- | |
| Fructooligosacáridos (FOS) | --- | --- | --- | | --- | 46,15 | |
| Oligosacáridos de leche humana (HMO) | 0,38 | 3,84 | 38,46 | --- | 3,84 | 3,84 | |
| Concentrado de proteína de leche | 50,31 | 50,31 | 50,31 | 50,31 | 50,31 | 50,31 | 50,31 |
| Citrato de potasio (1) | 5,76 | 5,76 | 5,76 | 5,76 | 5,76 | 5,76 | 5,76 |
| Carbonato de calcio | 4,06 | 4,06 | 4,06 | 4,06 | 4,06 | 4,06 | 4,06 |
| Ácido araquidónico | 2,95 | 2,95 | 2,95 | 2,95 | 2,95 | 2,95 | 2,95 |
| Cloruro de potasio | 1,26 | 1,26 | 1,26 | 1,26 | 1,26 | 1,26 | 1,26 |
| Lecitina Ultralec | 1-15 | 1,15 | 1,15 | 1,15 | 1,15 | 1,15 | 1,15 |
| Ácido docosahexanoico | 1,11 | 1,11 | 1,11 | 1,11 | 1,11 | 1,11 | 1,11 |
| Cloruro de magnesio | 1,04 | 1,04 | 1,04 | 1,04 | 1,04 | 1,04 | 1,04 |
| Cloruro sódico | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,59 |
| Cloruro de colina | 0,43 | 0,43 | 0,43 | 0,43 | 0,43 | 0,43 | 0,43 |
| Vitamina ADEK | 0,39 | 0,39 | 0,39 | 0,39 | 0,39 | 0,39 | 0,39 |
| Palmitato de ascorbilo | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 |



ES 2 569 241 T3

| **Ingredientes** | **Ejemplo 7** | **Ejemplo 8** | **Ejemplo 9** | **Ejemplo 10** | **Ejemplo 11** | **Ejemplo 12** | **Ejemplo 13** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb | Cantidad (lb) por 1000 lb |
| Premezcla de mezcla de carotenoides | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 |
| Mezcla de tocoferoles | 0,16 | 0,16 | 0,16 | 0,16 | 0,16 | 0,16 | 0,16 |
| Ácido ascórbico | 1,28 | 1,28 | 1,28 | 1,28 | 1,28 | 1,28 | 1,28 |
| Citrato de potasio (3) | 3,43 | 3,43 | 3,43 | 3,43 | 3,43 | 3,43 | 3,43 |
| Riboflavina | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,003 |
| L-carnitina | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 |
| Premezcla de vitaminas/minerales | 1,12 | 1,12 | 1,12 | 1,12 | 1,12 | 1,12 | 1,12 |
| Sulfato ferroso | 0,45 | 0,45 | 0,45 | 0,45 | 0,45 | 0,45 | 0,45 |
| Citrato de potasio (2) | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 |
| Premezcla del nucleótido/colina | 2,35 | 2,35 | 2,35 | 2,35 | 2,35 | 2,35 | 2,35 |
| *L. rhamnosus* HN001 (DR20)* | $5x10^{12}$ UFC | $5x10^{13}$ UFC | $5x10^{14}$ UFC | | $5x10^{13}$ UFC | $5x10^{13}$ UFC | |
| Las unidades están en UFC por 1000 lb | | | | | | | |

Las fórmulas ilustradas se preparan como fórmulas infantiles nutritivas en polvo preparando al menos dos suspensiones separadas que se mezclan posteriormente entre sí, se tratan térmicamente, se estandarizan, se tratan térmicamente una segunda vez, se secan mediante pulverización, se aglomeran, se mezclan en seco, y se envasan, o se pueden preparar como una fórmula nutritiva infantil lista para su utilización haciendo al menos dos suspensiones separadas que se mezclan posteriormente entre sí, se tratan térmicamente, se estandarizan, se diluyen con una cantidad adecuada de agua, se envasan, y se esterilizan. Inicialmente, se prepara una suspensión de hidratos de carbono-minerales disolviendo los hidratos de carbono y prebióticos en agua a 60-71°C, seguido por la adición de cloruro de magnesio, cloruro de colina, y cloruro de sodio, cloruro de potasio, y carbonato de calcio. La suspensión resultante se mantiene con agitación moderada a 49-60 ºC hasta que se mezcla posteriormente con las otras suspensiones preparadas.

Una suspensión oleosa se prepara combinando aceite de cártamo alto oleico, aceite de soja, ácido araquidónico, y ácido docosahexanoico a 49-60°C seguido por la adición de palmitato de ascorbilo, tocoferoles mezclados, premezcla de carotenoides mezclados, premezcla de vitamina ADEK, y lecitina. La suspensión oleosa resultante se mantiene con agitación moderada a 38-49 ºC hasta que esta última se mezcla con las otras suspensiones preparadas.

Se preparó una suspensión de proteínas disolviendo leche desnatada en polvo y un concentrado de proteína de suero lácteo en agua a aproximadamente 5-30 ºC. La suspensión de proteínas resultante se mantuvo a baja agitación a 2-7 ºC hasta que se mezcló posteriormente con las otras suspensiones preparadas.

Se combinaron agua, la suspensión de hidratos de carbono-minerales, y la suspensión de proteínas con agitación adecuada. A continuación se añadió la suspensión oleosa. El pH de la mezcla resultante se ajustó con hidróxido de potasio. Esta mezcla se mantuvo con agitación moderada a 49-60°C.

La mezcla resultante se calentó a 71-77°C, se emulsionó a un máximo de 2068 kPa (300 psig), y a continuación se homogeneizó a 16547-17926/2758-4137 kPa (2400-2600/400-600 psig). A continuación la mezcla se calentó a 144-146 ºC durante aproximadamente 5 segundos. La mezcla calentada se enfrió a continuación a una temperatura de aproximadamente 4 ºC. Se tomaron muestras para ensayo microbiológico y analítico. La mezcla se mantuvo con agitación.

Se preparan por separado una solución de premezcla de vitaminas/minerales y una solución de ácido ascórbico y se añadieron a la suspensión de la mezcla procesada. La solución de premezcla de vitaminas/minerales se preparó añadiendo los siguientes ingredientes al agua con agitación; citrato potásico, sulfato ferroso, premezcla de vitaminas/minerales, L-carnitina, riboflavina y la premezcla de nucleótidos-colina. La solución de ácido ascórbico se preparó añadiendo hidróxido de potasio y ácido ascórbico a una cantidad suficiente de agua para disolver los ingredientes. El pH de la mezcla resultante se ajustó a continuación a 5-9 con hidróxido de potasio.

Para preparar una fórmula infantil nutritiva en polvo, se puede ajustar el pH de la mezcla con hidróxido de potasio para conseguir una óptima estabilidad del producto. La mezcla recibe a continuación un segundo tratamiento térmico. La mezcla inicialmente se calentó a 71-77 ºC y a continuación se calentó adicionalmente a 144-146 ºC durante aproximadamente 5 segundos. La mezcla calentada se hizo pasar a continuación a través de un enfriador ultrarrápido para reducir la temperatura a 71-82 ºC. Tras el tratamiento térmico, la mezcla se evaporó.

La mezcla evaporada se hizo pasar a través de un secador mediante pulverización. El polvo acabado experimenta a continuación aglomeración con agua como la solución aglutinante. El probiótico se mezcla en seco con el producto. El producto completado se envasa a continuación en recipientes adecuados.

Para preparar una fórmula infantil nutritiva lista para su utilización, basándose en los resultados analíticos de los ensayos de control de calidad, se añadió una cantidad adecuada de agua al lote con agitación para conseguir los sólidos totales deseados. El pH del producto puede ajustarse para conseguir la estabilidad óptima del producto. El producto completado se coloca a continuación en los recipientes adecuados y se somete a esterilización terminal.

La fórmula resultante se usó a continuación para proporcionar una fuente de nutrición suplementaria, priamria, o única para bebés u otros individuos adecuados.

**EXPERIMENTO 1**

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la capacidad de una composición simbiótica que comprende el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20™) y un prebiótico basado en fructooligosacáridos para tratar y/o prevenir enfermedades alérgicas, en comparación con composiciones que comprenden solo *Lactobacillus rhamnosus* HN001, composiciones que comprenden solo un prebiótico basado en un fructooligosacárido, y composiciones control que no comprenden ni *Lactobacillus rhamnosus* HN001 ni un prebiótico basado en un fructooligosacárido.

El estudio evaluó los efectos de las composiciones en un modelo de enfermedad pulmonar alérgica en cerdo. Un modelo de cerdo es un modelo animal más relevante que los modelos de ratón, debido a las similitudes inmunitarias

entre seres humanos y cerdos. Específicamente, las respuestas de las citoquinas de tipo 1 de los lechones se desarrollan en el tiempo al igual que las de los bebés humanos (Diaz, et al., "Use of ELISPOT and ELISA to evaluate IFN-y, IL-10 and IL-4 responses in conventional pigs," Vet. Immunol. Immunopathol., 2005, Vol. 106, p. 107-112; Buck, et al., "Longitudinal study of intracellular T cell cytokine production in infants compared to adults," Clin. Exp. Immunol., 2002, Vol. 128, p. 490-497). Además, las respuestas de las citoquinas de los cerdos a los patógenos infecciosos son también comparables a la de los seres humanos. Por ejemplo, se ha mostrado que *Toxoplasma gondii* estimula una respuesta de tipo 1 y *Ascaris suum* estimula una respuesta de tipo 2 en cerdos (Dawson, et al., "Localized multigene expression patterns support an evolving TH1/TH2-like paradigm in response to infections with Toxoplasma gondii and Ascaris suum," Infect. Immun., 2005, Vol. 73, p. 1116-1128). Se han señalado también las similitudes entre seres humanos y cerdos en un subconjunto de células dendríticas presentadoras de antígenos conocidos como células dendríticas plasmacitoides, mientras que ratones y seres humanos difieren (Hochrein, et al., "Of men, mice and pigs: looking at their plasmacytoid dendritic cells," Immunology, 2004, Vol. 112, p. 26-27). Como estas funciones inmunitarias pueden jugar un papel en la patogénesis de la enfermedad alérgica del pulmón, un modelo de cerdo es un modelo animal relevante.

Se evaluaron los cerdos en un periodo de 70 días. Específicamente, cerdos de la University of Illinois Research Farm (Urbana, Illinois) fueron criados por una cerda hasta los 21 días de edad, en cuyo momento se destetaron. Cuando se destetaron, los cerdos se alimentaron con pienso normal (University of Illinois Feed Mill), pienso normal suplementado con *Lactobacillus rhamnosus* HN001 ($10^{10}$ UFC diariamente), pienso normal suplementado con un prebiótico basado en fructooligosacárido (4 % p/p, Synergy 1, Orafti), o pienso normal suplementado con una composición simbiótica que comprende *Lactobacillus rhamnosus* HN001 ($10^{10}$ CFU diariamente) y un prebiótico basado en un fructooligosacárido (4 % p/p, Synergy 1, Orafti), durante el resto de los 70 días del estudio. Durante este periodo de tiempo, los cerdos se expusieron a un alérgeno, el antígeno de *Ascaris suum* (ASA) por vía subcutánea (3x en el día del estudio 21,35, y 49) y 1 mg de ASA intranasalmente (2x en el día del estudio 49 y 63). Se estimuló a los cerdos por vía intradérmica en el día 45 y en el día 70 con una serie de concentraciones de ASA que variaban desde 0,35 µg/ml a 400 µg/ml para determinar los efectos de la suplementación oral con el probiótico en reacciones inmediatas de hipersensibilidad de la piel (reacciones mediadas por IgE). En el día 70, se estimuló a los cerdos también por vía intranasal con ASA para determinar los efectos de la suplementación oral con el probiótico, prebiótico, y simbiótico sobre la enfermedad alérgica del pulmón.

La Tabla 4 siguiente resume el número de cerdos en cada grupo que experimentan insuficiencia respiratoria de cualquier magnitud y la Tabla 5 resume la gravedad de la insuficiencia respiratoria de los cerdos en cada grupo.

**Tabla 4: Incidencia de la insuficiencia respiratoria**

| | **Control (n=5)** | **Probiótico (n=6)** | **Prebiótico (n=6)** | **Simbiótico (n=6)** |
|---|---|---|---|---|
| Número de cerdos que experimentan insuficiencia respiratoria | 4 | 2 | 4 | 1 |
| Número de cerdos que no experimentan enfermedad respiratoria | 1 | 4 | 2 | 5 |

**Tabla 5: Gravedad de la enfermedad respiratoria**

| | **Control (n=5)** | **Probiótico (n=6)** | **Prebiótico (n=6)** | **Simbiótico (n=6)** |
|---|---|---|---|---|
| Número de cerdos que experimentan insuficiencia respiratoria grave/extrema | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Número de cerdos que experimentan insuficiencia respiratoria moderada/leve | 3 | 1 | 3 | 0 |
| Número de cerdos que no experimentan enfermedad respiratoria | 1 | 4 | 2 | 5 |

Se clasificó la gravedad de la insuficiencia respiratoria de los cerdos basándose en las presiones parciales de oxígeno ($pO_2$, véase a continuación). Específicamente, se analizaron los niveles de $pO_2$ a los 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, y 30 minutos después del estímulo respiratorio. Si la $pO_2$ no disminuye por debajo de 70 en ningún punto tras el estímulo, la gravedad se clasifica como sin insuficiencia respiratoria. Si la $pO_2$ no disminuye por debajo de 60 en ningún punto, seguido por una rápida recuperación, se clasifica como insuficiencia respiratoria leve, una disminución de la pO2 por debajo de 60 y una anoxia sostenida se clasifica como una insuficiencia respiratoria moderada, una disminución de la pO2 por debajo de 60 y una anoxia sostenida que requiere tratamiento de recuperación (mascarilla de válvula Amubu bag™) se clasifica como insuficiencia respiratoria grave, y una reacción que no era sensible a un tratamiento de recuperación se determinó que era una insuficiencia respiratoria extrema.

La Figura 1 muestra el cambio promedio en los niveles de $pO_2$ (promedio + SEM) del valor inicial tras el estímulo respiratorio. Los niveles de la $pO_2$ son una indicación sobre lo que funcionan los pulmones para oxigenar la sangre. Como se puede observar a partir de la Figura 1, se produjo una disminución inmediata más grande en los niveles de la $pO_2$ en el grupo del control tras el estímulo, en comparación con los grupos probióticos, prebióticos, y simbióticos. A los 5 minutos desde el estímulo respiratorio, el grupo simbiótico presentó la menor disminución en los niveles de $pO_2$, en comparación con los otros grupos sometidos a ensayo.

Se analizó también la presión pleural de los cerdos a los 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, y 30 minutos tras el estímulo respiratorio. Un aumento en la presión pleural indica que se necesita más fuerza para expandir y contraer los pulmones y, por tanto, es indicativa de una función pulmonar deteriorada. La Figura 2 representa gráficamente el cambio en la presión pleural (promedio + SEM) del valor inicial entre los diversos grupos tras el estímulo respiratorio. Como se puede observar en la Figura 2, se produjo un aumento más pequeño en la presión pleural para los grupos probióticos y simbióticos en comparación con el grupo del control.

Se ensayó el fluido de lavado brocoalveolar tomado de los cerdos de cada grupo 24 horas después del estímulo respiratorio para determinar los niveles de citoquina. Los resultados se muestran en la Figura 3. Como se puede observar en la Figura 3, las citoquinas inflamatorias (IL-1β, IL8, y TNF-α) fueron mayores en los grupos control, probióticos, y prebióticos en comparación con el grupo simbiótico. IL-2 es también mayor en el grupo del control y el prebiótico en comparación con el grupo simbiótico. Se ha demostrado previamente que los linfocitos T productores de IL2 se encuentran en las biopsias bronquiales de asmáticos a los que se ha estimulado con alérgenos (Bousquet, J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM, Asthma From Bronchoconstriction To Airways Inflammation and Remodeling. AM J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1720-1745).

**EXPERIMENTO 2**

Se llevó a cabo un experimento similar al Experimento 1. En el Experimento 2, cerdos de la University of Illinois Research Farm (Urbana, Illinois) fueron criados por una cerda hasta los 21 días de edad, en cuyo momento se destetaron. Cuando se destetaron, los cerdos se alimentaron con pienso normal (University of Illinois Feed Mill), pienso normal suplementado con *Lactobacillus rhamnosus* HN001 ($10^{10}$ UFC diariamente), pienso normal suplementado con un prebiótico basado en un galactooligosacárido (4 % p/p, Vivinal GOS, Domo), o pienso normal suplementado con una composición simbiótica que comprende *Lactobacillus rhamnosus* HN001 ($10^{10}$ CFU diariamente) y un prebiótico basado en un galactooligosacárido (4 % p/p, Vivinal GOS, Friesland). En la Figura 4 se representan gráficamente los efectos de las composiciones del control, probióticas, prebióticas y simbióticas sobre las reacciones alérgicas de erupciones en la piel. Específicamente, la Figura 4 representa gráficamente las reacciones alérgicas de erupciones en la piel 20 minutos después del estímulo con dosis diferentes del antígeno del estímulo en el día 45 para los cerdos a los que se administró la composición del control en comparación con los cerdos a los que se administró las composiciones probióticas, prebióticas, y las simbióticas. Como se puede observar a partir de estos resultados, los cerdos a los que se administró el pienso del control desarrollaron reacciones alérgicas de erupciones en la piel cuando se les estimuló en el día 45 con 12 µg/ml y dosis mayores de ASA. Por el contrario, los cerdos a los que se administró la composición probiótica y la prebiótica tuvieron reacciones alérgicas de erupciones en la piel más pequeñas comparados con los cerdos del control mientras que los cerdos a los que se administró la composición simbiótica tuvieron las reacciones más pequeñas de erupciones en la piel 20 minutos después del estímulo del día 45.

**CONCLUSIÓN**

Los datos que se muestran en el presente documento muestran que una composición simbiótica que comprende el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y un prebiótico basado en un fructooligosacárido redujeron las incidencias y la gravedad de la insuficiencia respiratoria cuando se administran a los cerdos, en comparación con los cerdos del control a los que se administró pienso normal y a los cerdos a los que se administró el probiótico solo o el prebiótico solo. Los cerdos a los que se administró la composición simbiótica presentaron la disminución menor en los niveles de la $pO_2$ a los 5 minutos después del estímulo respiratorio, presentaron un aumento menor en la presión pleural a los 10 minutos después del estímulo respiratorio, y tuvieron niveles menores de las citoquinas inflamatorias IL-1β, IL-8, IL-2, y TNF-α en su fluido de lavado broncoalveolar a las 24 horas después del estímulo respiratorio, en comparación con otros grupos ensayados. Además, los datos muestran que los cerdos a los que se administró la composición simbiótica que contenía *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y una composición de un galactooligosacárido tuvieron reacciones de erupción en la piel más pequeñas 20 minutos después del estímulo en el día 45 para todas las dosis de ASA ensayadas, en comparación con los cerdos a los que se administró pienso del control solo, indicando que el probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 en combinación con un prebiótico es eficaz en la prevención o la reducción de la incidencia de erupciones alérgicas en la piel.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para tratar o prevenir enfermedades alérgicas del pulmón, que comprende:

un probiótico que comprende *Lactobacillus rhamnosus* HN001, y
un prebiótico que comprende fructooligosacáridos.

2. La composición de la reivindicación 1 donde el prebiótico comprende además un oligosacárido de leche humana.

3. La composición de la reivindicación 1 que comprende el prebiótico en una cantidad de 15 gramos de prebiótico por 100 gramos de composición a 9,2 gramos de prebiótico por 100 gramos de composición.

4. La composición de la reivindicación 1 que comprende probiótico en una cantidad de $10^4$ ufc de probiótico por gramo de composición a $10^{10}$ ufc de probiótico por gramo de composición.

5. La composición de la reivindicación 1 que comprende además al menos uno de vitaminas, minerales, hidratos de carbono, grasa y proteína.

6. La composición de la reivindicación 5 que comprende, como porcentaje de calorías totales, de 10 % a 70 % de hidratos de carbono, de 5 % a 50 % de componente lípido, y de 10 % a 80 % de proteína.

7. La composición de la reivindicación 1, donde la composición es una fórmula infantil en polvo.

8. La composición de la reivindicación 1, donde la composición es una fórmula infantil lista para la alimentación.

9. Una fórmula infantil que comprende un probiótico que comprende *Lactobacillus rhamnosus* HN001, y un prebiótico seleccionado del grupo que consiste en fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, y sus combinaciones, para su uso en un método para tratar o prevenir enfermedades alérgicas del pulmón en un individuo que necesita dicho tratamiento o prevención, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de dicha fórmula infantil.

10. La fórmula infantil para el uso de acuerdo con la reivindicación 9 donde la enfermedad alérgica del pulmón se selecciona entre el grupo que consiste de asma, fiebre del heno, y pneumonitis hipersensible.

11. La fórmula infantil para el uso de acuerdo con la reivindicación 10 donde la enfermedad alérgica del pulmón es asma.

12. La fórmula infantil para el uso de acuerdo con la reivindicación 9 donde la fórmula infantil se administra antes de exponer el individuo a un alérgeno.

FIG. 1

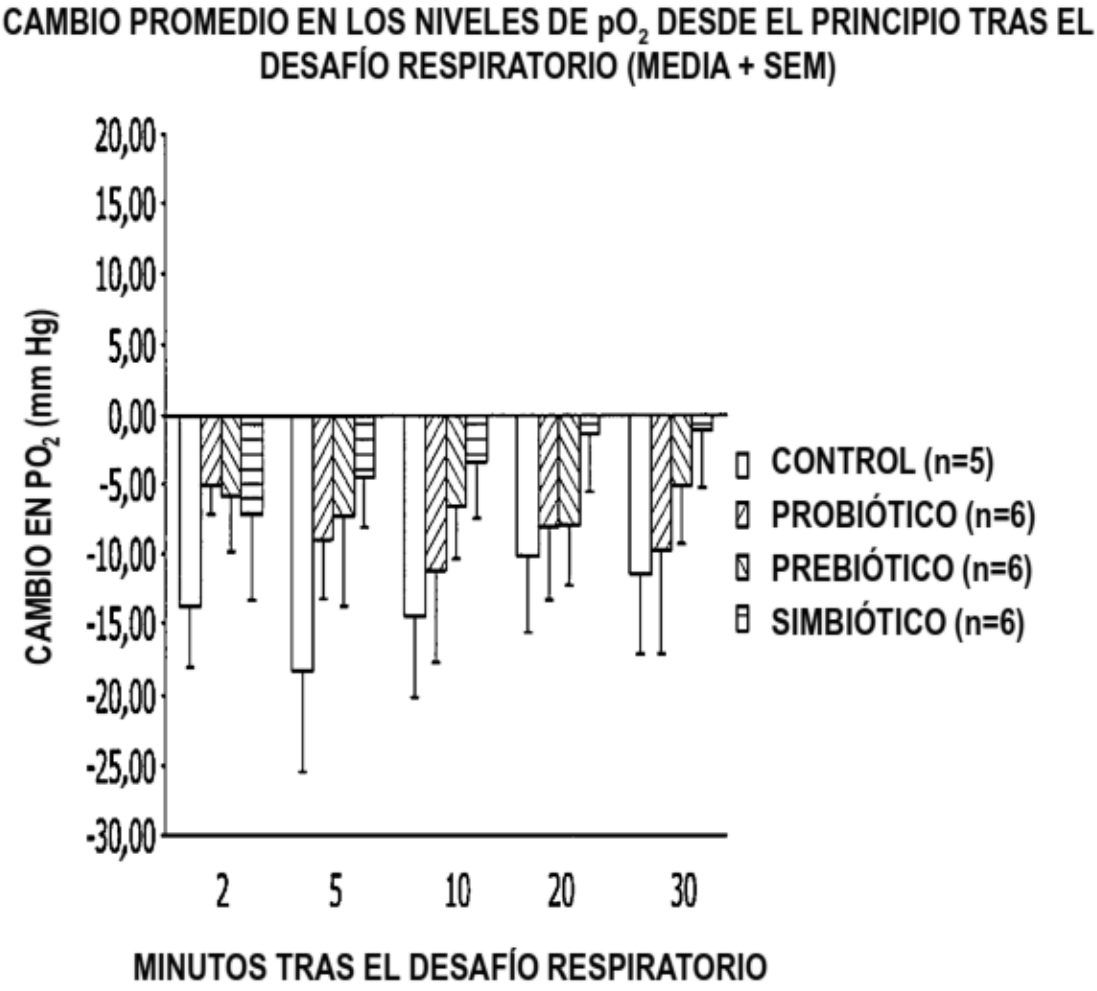

CAMBIO PROMEDIO EN LOS NIVELES DE pO2 DESDE EL PRINCIPIO TRAS EL DESAFÍO RESPIRATORIO (MEDIA + SEM)
CAMBIO EN PO2 (mm Hg)
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
-5,00
-10,00
-15,00
-20,00
-25,00
-30,00
2
5
10
20
30
MINUTOS TRAS EL DESAFÍO RESPIRATORIO
CONTROL (n=5)
PROBIÓTICO (n=6)
PREBIÓTICO (n=6)
SIMBIÓTICO (n=6)

FIG. 2

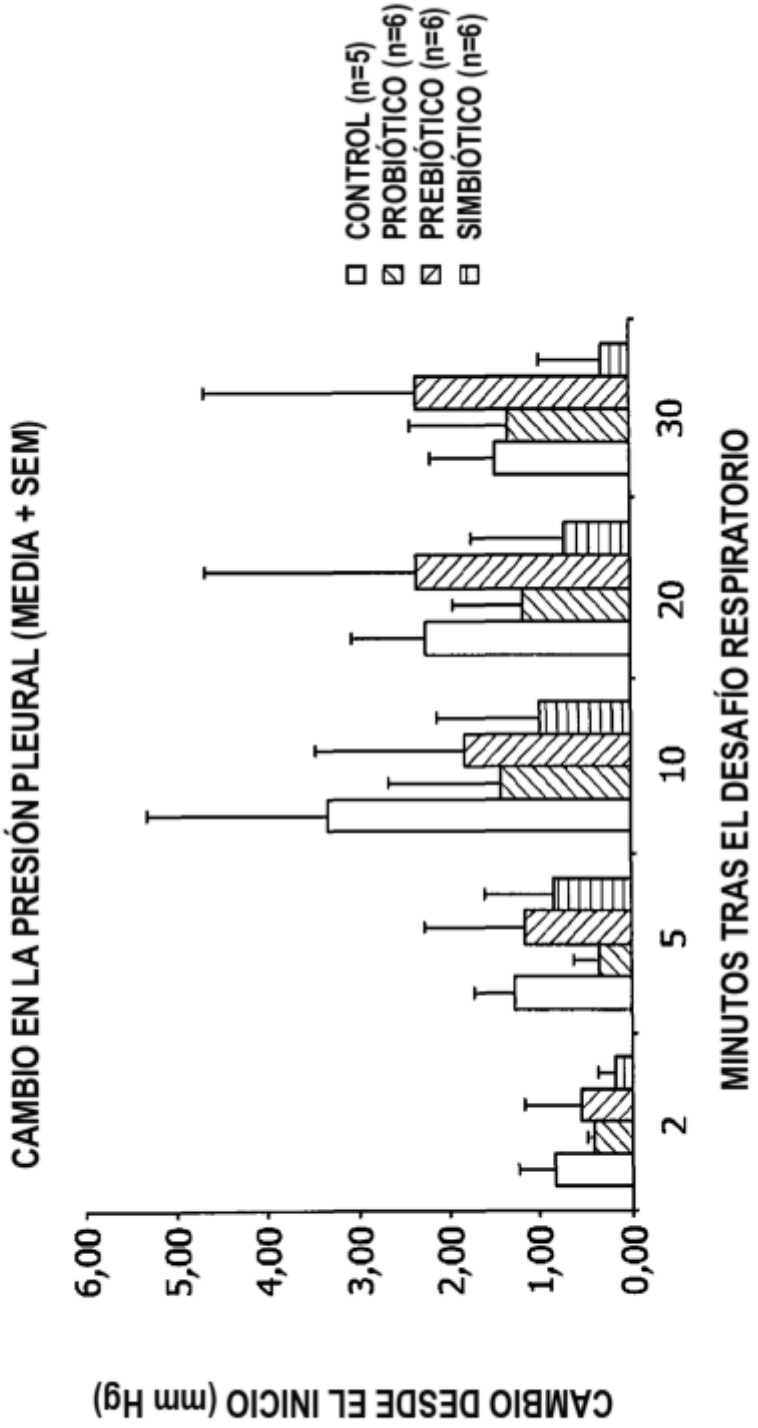
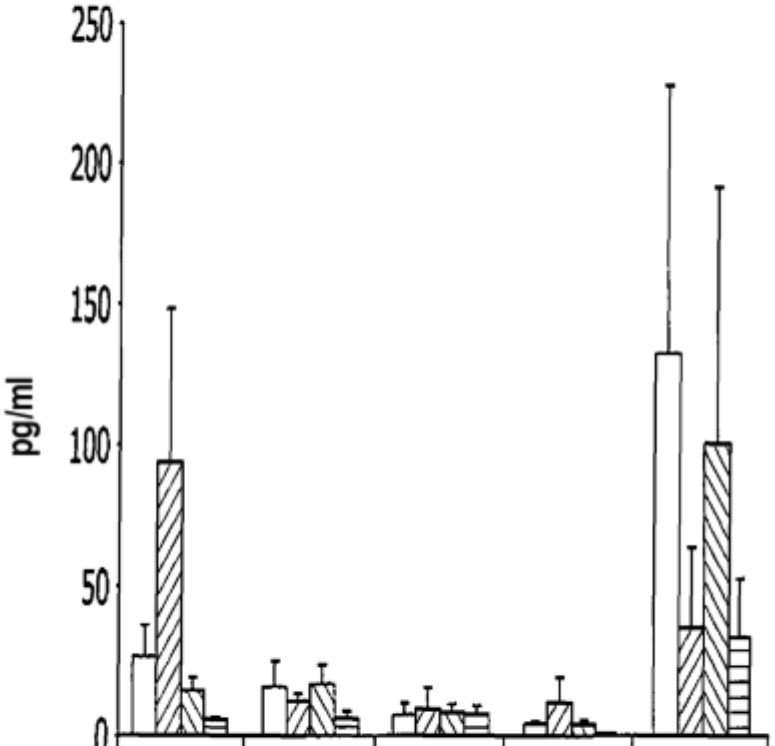

CAMBIO EN LA PRESIÓN PLEURAL (MEDIA + SEM)
CONTROL (n=5)
PROBIÓTICO (n=6)
PREBIÓTICO (n=6)
SIMBIÓTICO (n=6)
CAMBIO DESDE EL INICIO (mm Hg)
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
2
5
10
20
30
MINUTOS TRAS EL DESAFÍO RESPIRATORIO

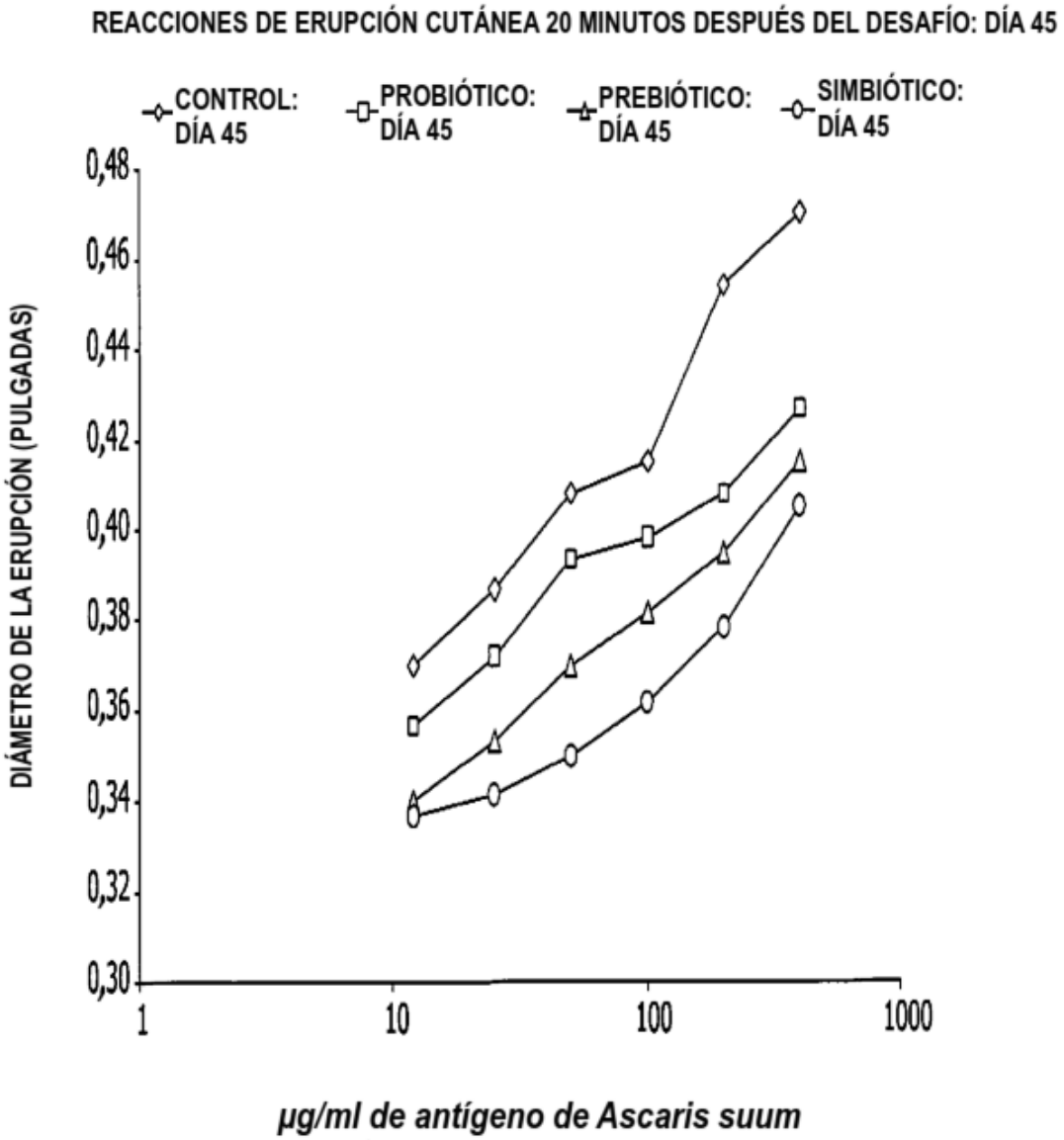
FIG. 3

FLUIDO BAL 24 HORAS DESPUÉS DEL DESAFÍO RESPIRATORIO




| | IL1β | IL8 | IL6 | TNFα | IL2 |
|---|---|---|---|---|---|
| CONTROL | 27,63 | 17,23 | 8,08 | 2,83 | 135,73 |
| PROBIÓTICO | 96,79 | 13,10 | 10,64 | 11,28 | 38,01 |
| PREBIÓTICO | 15,89 | 19,26 | 9,02 | 3,30 | 104,74 |
| SIMBIÓTICO | 6,11 | 6,76 | 8,26 | 0,78 | 34,80 |

FIG. 4


REACCIONES DE ERUPCIÓN CUTÁNEA 20 MINUTOS DESPUÉS DEL DESAFÍO: DÍA 45
CONTROL: DÍA 45
PROBIÓTICO: DÍA 45
PREBIÓTICO: DÍA 45
SIMBIÓTICO: DÍA 45
DIÁMETRO DE LA ERUPCIÓN (PULGADAS)
0,48
0,46
0,44
0,42
0,40
0,38
0,36
0,34
0,32
0,30
1
10
100
1000
µg/ml de antígeno de Ascaris suum