

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 089**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/00** (2006.01)

**A23L 33/10** (2006.01)

**A61K 31/01** (2006.01)

**A61K 31/702** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

**A61K 31/733** (2006.01)

**A23L 29/244** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2005 E 05749683 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 1679980**

54 Título: **Sinergismo de GOS y polifruetosa**

30 Prioridad:

**17.05.2004 EP 04076479**

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

**19.09.2016**

73 Titular/es:

**N.V. NUTRICIA (100.0%)  
EERSTE STATIONSSTRAAT 186  
2712 HM ZOETERMEER, NL**

72 Inventor/es:

**SPEELMANS, GELSKE;  
GOVERS, MARIA, JOHANNA, ADRIANA,  
PETRONELLA;  
KNOL, JAN y  
VAN TOL, ERIC, ALEXANDER, FRANSISCUS**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 583 089 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Sinergismo de GOS y polifruetosa.

## 5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la salud y nutrición humana.

Proporciona mezclas sinérgicas nuevas de carbohidratos prebióticos, especialmente mezclas de galactooligosacáridos (GOS, por ejemplo TOS) y polifruetosa (por ejemplo inulina), al igual que composiciones nutricionales que comprenden las mismas.

Las composiciones nutricionales tienen efectos beneficiosos cuando se usan para alimentar a bebés con biberón total o parcialmente y también tienen efectos de mejora de salud cuando son ingeridas por adultos con problemas intestinales, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) o el síndrome del intestino irritable (IBS).

## 15 Antecedentes de la invención

[0002] La microflora del intestino grueso humano (típicamente dividida en el intestino ciego, colon y recto) juega un papel crucial en tanto nutrición humana como salud.

La composición bacteriana se ve influenciada y se pueden modular por toma dietética.

20 Carbohidratos que han pasado a través del estómago e intestino delgado son metabolizados por las bacterias y son formados como un gran producto final de ácidos grasos de cadena corta de metabolismo (SCFA), tal como acetato, propionato, butirato y valerato, que son posteriormente liberados en la sangre.

Otros productos finales de fermentación bacteriana incluyen por ejemplo lactato y succinato.

25 Las cantidades totales y composiciones (cantidades relativas) de estos productos finales tienen a su vez un efecto profundo en el crecimiento bacteriano, pH, exclusión de especies patógenas, etc. Un método para influenciar beneficiosamente la flora microbiana y la salud humana es la administración de prebióticos. "Prebióticos" se definió como "ingredientes alimentarios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, y por lo tanto mejoran la salud del huésped" (Gibson and Roberfroid 1995, J. Nutr. 125, 1401-1412). Los criterios que un compuesto debe

30 cumplir para ser clasificado como un prebiótico son: 1) no debe ser hidrolizado o absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal (estómago, intestino delgado), 2) debe ser selectivamente fermentado por una o varias bacterias potencialmente beneficiosas en el colon, 3) debe alterar la microbiota colónica hacia una composición más saludable y 4) debe preferiblemente inducir efectos que sean beneficiosos a la salud del sujeto. Prebióticos comúnmente usado son los denominados carbohidratos no digeribles (o "fibras dietéticas solubles"), que pasan sin

35 digerir por la parte superior del tracto gastrointestinal en el intestino grueso. Estos incluyen por ejemplo fructooligosacáridos (FOS), oligofruetosa, inulina y transgalactooligosacáridos (TOS). Debe observarse que en la bibliografía hay frecuentemente inconsistencia entre el uso de varios términos, tales como fructooligosacárido, inulina, oligofruetosa e inulo-oligosacáridos, y el mismo término se puede utilizar para compuestos o composiciones diferentes.

40 [0003] Bacterias beneficiosas bien conocidas, que se estimulan por la comprensión de prebióticos, son bacterias del ácido láctico, tales como *Lactobacilli* y *Bifidobacteria*, y se ha considerado que los beneficios de salud se deben a este efecto estimulador.

45 Por ejemplo, los efectos beneficiosos de inulina y fructanos tipo inulina, tales como oligofruetosa, en la función intestinal se han descrito (Jenkins et al. 1999, J.Nutrición 129,14318-14338) y se piensa que este efecto se debe a un efecto bifidogénico, que se refiere a un efecto de estimulación de crecimiento selectivo en la bifidobacteria total, medido bien in vivo a través de cuentas bifidobacterianas de las heces o *in vitro* (ver por ejemplo Roberfroid, Am J Clin Nutr 2001, 73(suppl), 4068-4098).

50 [0004] La leche humana parece también tener un efecto bifidogénico, ya que las bacterias dominantes que se establecen en bebés amamantados son bifidobacteria.

En cambio, la colonización bacteriana de bebés alimentados con fórmula de leche no se domina por bifidobacteria y es más diversa en especies bacterianas (Harmsen et al. 2000, J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 30,61-67).

55 Se piensa que oligosacáridos encontrados en la leche humana son responsables del efecto bifidogénico o prebiótico y se han hecho esfuerzos para modificar la fórmula infantil de manera que se parezca a la leche humana tanto como sea posible y especialmente que tenga un efecto prebiótico igual o muy similar al de la leche humana. Esto se ha hecho añadiendo prebióticos a la fórmula de leche infantil (Boehm et al.

Acta Paediatr. 8uppl. 2003, 441, 64-67 and Moro et al. 2002, J Pediatr Gastroenterol Nutr 34, 291-295).

60 Por ejemplo, se ha descrito que suplementación de fórmula de leche de bovino con una mezcla de oligosacárido que comprenden trans-galactooligosacáridos (TOS) e inulinaHP aumenta la cuenta fecal de bifidobacteria en bebés alimentados por biberón (Boehm et al. 2002, Arch Dis Child 86, F178-F181).

En una publicación de internet de H-M. Böckler titulada "Prebiotics in infant nutrition" se describe un efecto bifidogénico de una mezcla de galactooligosacáridos y fructooligosacáridos.

65 [0005] También, se ha descrito que la suplementación de fórmula de leche infantil con TOS e inulina tiene un efecto bifidogénico, y reduce pH fecal (Boehm et al. 2003 supra; Moro et al. 2003, Acta Paediatr. Suppl. 441:77-79; Marini

et al. 2003, Acta Paediatr. Suppl. 441:80-81; Boehm et al. 2002, Arch. Dis. Child Fetal. Neonata. Ed. 86:F178-F181; Moro et al. 2002, J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 34:291-295; Schmelzle et al. 2003, J Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 36:343-51).

5 [0006] Con la fermentación de prebióticos por bacterias de ácidos orgánicos se producen ácidos lácticos y el pH se baja.  
 Los *Lactobacilli* producen bien lactato o lactato y acetato (un ácido graso de cadena corta; SCFA).  
 El lactato puede estar en forma L o D.  
*Bifidobacteria*, por otro lado, produce L-lactato y acetato, pero no D-lactato.  
 10 *Bifidobacteria* (y otras bacterias del ácido láctico) normalmente no llevan a la producción de gases, tales como H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>.  
 Tampoco producen otro SCFA, tal como propionato, butirato, isobutirato, valerato e isovalerato.  
 La presencia de SCFA, tal como isobutirato e isovalerato, es indicativa de la fermentación de carbohidratos por otras especies bacterianas, tales como *Clostridia* y *Bacteroides* o *Enterobacteriaceae*, o es indicativa para la fermentación  
 15 de proteínas (para lo que la bifidobacteria tienen una capacidad pobre).  
 También, otras bacterias intestinales son capaces de producir acetato o lactato, tales como *Propionibacteria*, *Enterococci* y *Pediococci*.

[0007] Previamente se ha registrado que la toma de determinados carbohidratos prebióticos aumentan las  
 20 cantidades (relativas) de *Bifidobacteria* y/o *Lactobacilli*.  
 Concomitantemente una formación aumentada de SCFA y reducción de pH ha sido observada.  
 Pero también se ha notado la formación de gases, que produce síntomas no deseados tales como flatulencia y dolor abdominal, al introducir prebióticos, tales como inulina o GOS, en la dieta.  
 Además, no solo se han notado aumentos en acetato sino también, por ejemplo, en butirato, lo que es indeseable.  
 25 Una gama de efectos indeseables han sido por lo tanto descritos, resultante del consumo de nutrición suplementada con ciertos prebióticos.

[0008] En el colon y heces de bebés amamantados el SCFA encontrado predominante es acetato.  
 Concentraciones además altas de lactato son descubiertas.  
 30 Estos cantidades (relativas) son superior esa aquellas observadas en adultos (donde concentraciones de lactato son generalmente insignificantes) o en bebés alimentados por la fórmula de leche estándar.  
 Posteriormente, concentraciones de propionato y especialmente butirato son muy inferiores en el colon y heces de bebés amamantados que en adultos e incluso inferior que en bebés alimentados por la fórmula de leche infantil estándar.  
 35 El pH de las heces es mínimo en niños amamantados.  
 Como se ha mencionado anteriormente, es deseable proporcionar composiciones nutrientes, especialmente composiciones de fórmula de leche, que, cuando se consumen, resultan en una microflora intestinal altamente parecida a la de bebés amamantados.

[0009] Se han descrito muchos efectos sobre la salud de SCFA y lactato y un pH bajo en el colon.  
 Se ha descrito que el pH bajo y la presencia de ácidos orgánicos tienen un efecto antipatogénico, y proporcionan una ventaja para bacterias tolerantes ácidas tales como las bacterias del ácido láctico (incluyendo *Bifidobacteria*).  
 También se han descrito efectos de SCFA en la pared intestinal.  
 SCFA son una fuente de energía de colonocitos y así ayudan a la integridad de la barrera intestinal.  
 45 SCFA están también implicados en efectos en la peristalsis, el metabolismo de ácido biliar, la absorción de agua y la diferenciación celular (ver por ejemplo EP1105002).  
 SCFA se conocen por estimular la producción de mucosidad y se implican en la absorción mineral y producción de mucosa.

50 [0010] Salminen et al. en Br J Nutr (1998) 80, suppl. 1. S 147-S 171 proporcionan una visión de conjunto de ciencia de alimento funcional y fisiología y función gastrointestinal.

[0011] WO 2004/052121, no pre-publicada, concierne a una mezcla de FOS y GOS en relación con trastornos del tracto gastrointestinal tales como IBD, diarrea y estreñimiento.

55 Descripción detallada de la invención

[0012] Los presentes inventores sorprendentemente descubrieron que GOS (especialmente TOS) y polifruktosa (especialmente inulina), cuando administrados juntos, proporcionan un número de efectos beneficiosos que no se pueden explicar por un aumento en el número de bifidobacteria intestinal y que, por lo tanto, no son debidos al efecto bifidogénico descrito por TOS o inulinaHP en el estado de la técnica (por ejemplo en Boehm et al. 2002, supra).  
 En particular, se ha descubierto inesperadamente que, tras la administración de GOS y mezclas de polifruktosa, hubo un aumento en las cantidades totales de SCFA formado, un aumento en las cantidades relativas de acetato y  
 60 lactato y una reducción en el pH fecal de bebés, por lo cual estos efectos no estaban correlacionados con una cantidad (relativa) aumentada de *Bifidobacteria*.

Además de una cantidad y perfil de SCFA beneficioso y una cantidad aumentada de lactato, una reducción en la formación de gas fue observada.

Además, se descubrió que el lactato mismo tenía un efecto beneficioso hasta ahora desconocido en el colon, ya que se observó que aumentaba la secreción de prostaglandina E1 y prostaglandina E2.

5 Este efecto era previamente proporcionado solo para SCFA, especialmente acetato (Willemsen et al. 2003, Gut 52,1442-1447).

Composiciones que comprenden lactato, y composiciones que comprenden prebióticos que estimulan la producción de lactato, pueden por lo tanto ser usadas para estimular la producción de mucina y sostener la integridad de la barrera mucosa (mucoprotección).

10 Se descubrió además que el lactato reducía las contracciones espontáneas y la tensión en músculos colónicos, dando como resultado alivio de calambre y dolor.

[0013] Las composiciones prebióticas son por lo tanto nuevas en que ellos no aumentan, o no lo hacen significativamente, el número de *Bifidobacteria*, mientras que resultan un aumento en las cantidades totales de SCFA, cambios beneficiosos en el perfil SCFA (aumentos en el acetato, reducciones en el butirato y propionato), aumento en el ácido láctico (y contracción beneficiosa resultante y efectos reductores de tensión y efecto mucostimuladorio), una reducción en el pH fecal, una reducción en la formación de gases, y formación más gradual de SCFA (incluyendo formación en la parte distal del colon), es decir globalmente un modelo óptimo de productos de fermentación (más L-lactato, menos butirato etc.). Todos estos cambios hacen que el ambiente colónico se parezca más al de bebés amamantados.

En una forma de realización de la invención, se proporciona por lo tanto aquí el uso de mezclas de GOS y polifruetosa en cantidades eficaces para la preparación de composiciones que conducen a un ambiente colónico esencialmente similar al de bebés amamantados.

25 [0014] Los efectos beneficiosos encontrados fueron significativamente más pronunciada al coadministrar que cuando solo fueron administrados o GOS o polifruetosa (por ejemplo TOS o inulina), lo que indica que GOS y polifruetosa actúan sinérgicamente.

En el estado de la técnica ninguno de los estudios fueron efectuados donde los efectos individuales de la administración de TOS e inulina fueran comparados directamente con la coadministración de estos dos tipos de compuestos y claramente tales estudios individuales independientes no se pueden comparar uno a otro y no son adecuados para identificar efectos sinérgicos.

35 [0015] Esta interacción sinérgica nueva de GOS y polifruetosa (por ejemplo TOS e inulina) y los efectos *in vivo* de coadministración de los mismos llevan a nuevos usos de composiciones que comprenden tanto GOS como polifruetosa en cantidades (sinérgicas) adecuadas, tales como tratamiento o prevención del dolor abdominal debido a contracciones espontáneas y tensión en músculos colónicos, además, una composición que comprende además lactato (D-lactato y/o L-lactato, preferiblemente L-lactato) se puede utilizar para tratar o prevenir uno o varios de estos síntomas o trastornos.

40 [0016] Así, de forma imprevista, la fermentación de las mezclas específicas de prebióticos (GOS y polifruetosa) por la flora intestinal produce una formación mejorada y cinéticamente ventajosa de SCFA y lactato y un modelo mejorado de productos finales metabólicos.

A consecuencia resultan muchos efectos beneficiosos, tales como efectos en la percepción de dolor y en calambres/cólicos abdominales (tanto vía relajación del colon como reducción de contracciones espontáneas).

45 Definiciones

[0017] "Polisacáridos" se refiere a cadenas de carbohidrato de unidades monosacáridas con una longitud de cadena de al menos 10 unidades.

50 En cambio, "oligosacáridos" tienen una longitud de cadena inferior a 10 unidades.

[0018] "Grado de polimerización" o "DP" se refiere al número total de unidades de sacáridos en una cadena de oligo o polisacárido.

55 El "DP medio" se refiere, al DP medio de cadenas oligosacáridas o polisacáridas en una composición, sin tener en cuenta posible mono- o disacáridos (que son preferiblemente quitado si están presente).

El DP medio de una composición se utiliza para distinguir entre composiciones.

Además las unidades de sacáridos %, tales como las unidades % glucosa y % fructosa, son distintivas en una composición.

60 [0019] "Polifruetosa" o "polifruetano" o "fructopolisacárido" se refieren a un carbohidrato polisacárido que comprende una cadena de unidades de fructosa enlazadas  $\beta$  con un grado de polimerización de 10 o más y comprende, por ejemplo, inulina (por ejemplo inulina HP), levano y/o un "tipo mixto de polifruetano" (ver por debajo).

65 [0020] "Inulina" o "inulina no hidrolizada" o "inulina HP" se utiliza en este caso para referirse a cadenas de fructosa terminada en glucosa con la mayoría de cadenas (al menos 90%, preferiblemente al menos 95%) con un grado de polimerización (DP) de 10 o más.

Inulina puede así ser descrita como GF<sub>n</sub>, donde G representa una unidad glucosil, F representa una unidad fructosil y n es el número de unidades fructosil enlazadas a una a la otra, n siendo 9 o más.

La proporción G/F es aproximadamente de 0,1 a 0.

Una pequeña parte de las moléculas de inulina, sin embargo, pueden no tener ninguna unidad de glucosa terminal.

5 El DP medio es aquí preferiblemente al menos 15, más preferiblemente 20 o más, tal como 20, 21, 22, 23, 25, 30, 40, 60, 70, 100, 150 o más.

En la inulina, las unidades de fructosa se enlazan con una conexión  $\beta(2\rightarrow1)$ .

Una inulina adecuada es por ejemplo la disponible comercialmente como Raftiline®HP (Orafti) con un DP medio > 23.

10 [0021] "Inulina hidrolizada" o "oligofructosa" se refiere a mezclas de cadenas de fructosa de glucosa y terminadas en fructosa, con un DP por debajo de 10.

Así, la inulina hidrolizada puede ser descrita como una mezcla de cadenas GF<sub>n</sub> y cadenas F<sub>n</sub> (donde G es una unidad glucosil, F es una unidad fructosil y n = 1-8).

15 Inulina hidrolizada es un producto (enzimático o ácido) de hidrólisis o producto de hidrólisis parcial de inulina, resultante de escisión de enlaces de fructosil-fructosa  $\beta(1-2)$ .

El término inulina hidrolizada también abarca inulina sintéticamente hecho o recombinantemente hecha que tiene la misma estructura estructural.

20 [0022] "Levano" o "levulan" o "levulina" o "levulosan" se refieren a un polisacárido consistente en polifructosa donde las unidades de fructosa se enlazan con enlaces  $\beta(2\rightarrow6)$ .

Una fracción de glucosa de inicio puede estar presente, pero no es necesario.

El grado de polimerización está por encima de 10.

25 [0023] En "tipo de polifructosa mixta" las unidades de fructosa se enlazan con enlaces  $\beta(2\rightarrow1)$  y  $\beta(2\rightarrow6)$ . Polifructanos de tipo mezclado se ramifican y tienen un DP > 10.

[0024] "GOS" o "galactooligosacáridos", o "trans-galactooligosacáridos" o "TOS" se refieren a oligosacáridos compuestos por unidades de galactosa, con un DP de 10 o menos y un DP medio de 2, 3, 4, 5 o 6.

30 Una unidad de glucosa puede estar presente en el extremo reductor de la cadena.

Preferiblemente el GOS contiene al menos 2/3 unidades de galactosa.

Se prefieren más los trans-galactooligosacáridos (TOS) con enlaces glicosídicos  $\beta(1-4)$ .

Tal GOS es por ejemplo el encontrado en Vivinal®GOS (disponible comercialmente de Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Países Bajos), que comprende trans-galactooligosacáridos con enlaces glicosídicos  $\beta(1-4)$  y enlaces glicosídicos  $\beta(1\rightarrow6)$ .

35 [0025] "SCFA" o "ácidos grasos de cadena corta" se refieren ácidos grasos, con unas longitudes de cadena de carbono de hasta C6, producidos como un producto final de fermentación intestinal bacteriana, tal como acetato (C2), propionato (C3), butirato e isobutirato (C4), valerato e isovalerato (C5) y otros. La expresión "iC4-5" se refiere a la suma de isobutirato, valerato e isovalerato.

40 [0026] Una "cantidad sinérgicamente eficaz" se refiere a una cantidad de GOS y polifructosa (por ejemplo TOS e inulina) que, cuando coadministrada, confiere uno (o más) efectos fisiológicos específicos (como descritos en otra parte en el presente documento), por lo cual el efecto total de coadministración es significativamente mayor que la suma del efecto de administración individual de GOS o polifructosa.

45 Por ejemplo, si el efecto de administración de GOS solo es X y el efecto de administración de polifructosa solo es Y, entonces el efecto de coadministración de GOS y polifructosa es mayor que X+Y y por ejemplo el efecto de coadministración de ½ la concentración de GOS más ½ la concentración de polifructosa tiene un efecto mayor que ½ X + ½ Y, etc.

50 [0027] "Co-administración" de dos o más sustancias se refiere a la administración de estas sustancias a un individuo, bien en una composición o en composiciones separadas (kit de partes; como una composición combinada) que se administran al mismo tiempo (simultáneamente) o dentro de un periodo de tiempo corto (uso separado o secuencial, por ejemplo en minutos u horas).

55 [0028] "Enteral" se refiere aquí a la entrega directamente en el tracto gastrointestinal de un sujeto (por ejemplo por vía oral o por un tubo, catéter o estoma).

60 [0029] El término "que comprende" debe ser interpretado como que especifica la presencia de las partes, pasos o componentes declarados, pero no excluye la presencia de una o varias partes, pasos o componentes adicionales.

[0030] "Bebé" se refiere aquí a seres humanos de 0-36 meses de edad, preferiblemente 0-18 meses, o más preferiblemente 0-12 meses.

[0031] "Bebés amamantados" se refiere a bebés alimentados exclusivamente con leche materna. "Bebés no alimentados con leche materna o sólo parcialmente" son bebés no exclusivamente alimentados con la leche materna.

Esto incluye bebés alimentados con al menos un biberón (aproximadamente 80ml) de leche de fórmula al día.

[0032] "Porcentaje" o "promedio" generalmente se refiere a porcentajes de promedios en peso, a menos que se especifique lo contrario o a menos que esté claro que se refiere a otra base.

Usos y métodos según la invención

[0033] En los varios usos descritos aquí, un sujeto es aquí preferiblemente un sujeto humano, más preferiblemente un bebé, tal como un bebé recién nacido de hasta 12 meses de edad.

Especialmente se refiere a bebés alimentados por completo o parcialmente con biberón.

Alternativamente, un sujeto también puede ser un niño, adolescente o adulto.

En particular problemas intestinales se refieren a dolor abdominal debido a contracciones espontáneas y tensión en músculos colónicos, que puede también suponer fatiga, depresión o irritabilidad, que se puede evitar y/o tratar usando composiciones según la invención.

[0034] Composiciones que comprenden tanto GOS como polifruktosa, tales como composiciones que comprenden TOS e inulina, puede ser usadas en una forma de realización para inducir la producción de SCFA en el intestino grueso de un sujeto y para aumentar significativamente la cantidad total (intestinal y/o fecal) producida tras la administración de SCFA y/o para modificar significativamente las cantidades relativas de SCFA (intestinal y/o fecal) producido, en particular para aumentar la cantidad (intestinal y/o fecal) relativa de acetato del SCFA total, y/o para aumentar significativamente la cantidad (absoluta y relativa) de lactato intestinal producido, y/o para reducir o prevenir significativamente la formación de gas intestinal, y/o para extender la producción de SCFA a la parte distal del colon, y/o para reducir significativamente el pH en el intestino grueso y pH fecal.

También se puede disminuir la suma de butirato intestinal y/o fecal, isobutirato, valerato y/o isovalerato relativamente al total SCFA.

Estos efectos son conseguidos tras la administración, sin tener un efecto significativo en el número total y/o relativo de bifidobacteria intestinal.

Composiciones para el tratamiento o profilaxis de cualquier enfermedad o trastornos o incomodidad asociada o provocada por uno o varios de estos efectos intestinales se proporcionan aquí.

[0035] La presente invención proporciona el uso de galactooligosacáridos y polifruktosa para la producción de una composición para el tratamiento o prevención de músculos colónicos

[0036] A menos que se especifique lo contrario, un "aumento significativo" (de por ejemplo SCFA, acetato o lactato) se refiere aquí a un aumento de al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 20%, o más, en comparación con la cantidad producida cuando se administran sólo GOS o polifruktosa (por ejemplo inulina).

De forma similar, a menos que se especifique lo contrario, una "reducción significativa" (de por ejemplo formación de gas) se refiere a una reducción de al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 20%, 25%, 50% o más (por ejemplo 70%, 80%, 90%, 100%) en comparación con la cantidad producida cuando solo se administra la polifruktosa (por ejemplo inulina).

[0037] Un aumento en la cantidad total de SCFA producido como producto de fermentación de GOS y composiciones de polifruktosa también puede ser medido como una reducción significativa en el pH de muestras fecales de sujetos, reflejando una reducción *in vivo* en el pH en el intestino grueso.

En bebés se ha observado que el pH fecal disminuyó hasta alrededor de pH 5,8 o menos, tal como pH 5,6, 5,5 o 5,4 o 5,2 tras la coadministración de TOS y polifruktosa (por ejemplo inulina), mientras el pH de bebés alimentados con fórmula de estándar estuvo alrededor o por encima de pH 6, tal como alrededor de pH 5,9, 6,8 o incluso 7,0. Una reducción significativa en el pH se refiere por lo tanto a una reducción en el pH de al menos 15% o 0,9 unidad en comparación con bebés alimentados con una fórmula estándar.

[0038] Otro efecto beneficioso de coadministración de GOS y polifruktosa en cantidades adecuadas es que la composición de SCFA es significativamente diferente a cuando se administra GOS o polifruktosa.

Especialmente la cantidad relativa de butirato es significativamente reducida, mientras la cantidad relativa de acetato es significativamente aumentada.

Las composiciones pueden, así, ser usadas para alterar no solo cantidades de SCFA total, sino también proporciones de SCFA relativo.

En bebés a los que se les ha coadministrado TOS y polifruktosa (por ejemplo inulina), los niveles de SCFA relativo se parecieron más a los niveles encontrados en bebés amamantados, con proporciones de acetato:propionato:butirato de generalmente aproximadamente 80-85%:10-15%:1-5%, mientras en bebés alimentados con fórmula de leche estándar las proporciones estuvieron generalmente alrededor de 69-74%:16-19%:5-6% (como mostrado en los ejemplos).

Así, las cantidades especialmente relativas de acetato aumentan y las cantidades relativas de propionato y butirato disminuyen con las composiciones según la invención.

La coadministración de GOS y polifruktosa produce proporciones de acetato:propionato:butirato mucho más parecidas a las de bebés amamantados que las de bebés alimentados con fórmula (que producen altos niveles de butirato y propionato y niveles relativamente bajos de acetato).

El efecto en las proporciones de SCFA relativo se pueden medir por métodos conocidos en la técnica, tales como cromatografía de gases de muestras fecales en varios puntos temporales tras la administración, bien utilizando estudios in vivo o sistemas de fermentación in vitro como por ejemplo descritos en los ejemplos.

Una "composición AGCC modificada significativamente" o una "cantidad significativamente aumentada de acetato" se refiere a que la cantidad de acetato (% de total SCFA) es al menos aproximadamente 4%, 5%, 10%, 15%, o más, más alta a cuando no se administra GOS o polifruktosa o cuando GOS o polifruktosa son administrados individualmente.

Preferiblemente las cantidades relativas de propionato y/o butirato son inferiores a cuando no se administra GOS o polifruktosa o cuando GOS o polifruktosa son administrados individualmente.

En una forma de realización, la composición según la invención es adecuado para aumentar acetato intestinal y/o fecal a aproximadamente por encima de 85%, tal como 86%, 87%, 88%, 90% o más, del SCFA total.

[0039] Otro efecto beneficioso más observado durante la coadministración de GOS y polifruktosa es una reducción significativa en el SCFA ramificado, en comparación con la proporción de SCFA ramificado descubierto cuando solo GOS o solo polifruktosa son administrados.

Una "reducción significativa en el SCFA ramificado", como se utiliza en este caso, se refiere a una reducción de al menos 70% en comparación con la concentración encontrada en bebés no alimentados con prebióticos o dando como resultado en una proporción fecal inferior a 1,5% de SCFA total.

La proporción de SCFA ramificado relativa al SCFA total se puede medir por la división de la suma de SCFAs ramificado, es decir isobutirato, más isovalerato más valerato, por la suma de SCFA total, es decir acetato, más propionato, más butirato, más isobutirato, más isovalerato, más valerato, etc. Reducir la proporción de SCFA ramificado es beneficioso para la salud del sujeto, ya que el SCFA ramificado es dañino.

Esto indica menos degradación de proteína, que no se desea porque la fermentación de proteína produce un aumento de pH y la formación de agentes dañinos tales como H<sub>2</sub>S.

[0040] Una reducción significativa de butirato se refiere a una reducción de al menos 50% en comparación con la concentración encontrada en bebés no alimentados con prebióticos o dando como resultado una proporción fecal inferior a 4% de SCFA total.

En una forma de realización la composición según la invención es adecuado para disminuir la suma de butirato, isobutirato, valerato e isovalerato intestinal (y/o fecal) por debajo de 7% de SCFA total, tal como 6,5%, 6%, 5%, 4% o menos de SCFA total.

[0041] En otra forma de realización, composiciones que comprenden GOS y polifruktosa se adecuan para aumentar la longitud de fermentación en el colon.

En particular, la fermentación bacteriana todavía estará activa en las partes más distales del colon tras la coadministración, como indicado por la producción SCFA en la parte distal del colon.

Se produce poco o ningún SCFA en la parte distal del colon tras la administración de composiciones que comprenden solo GOS o solo polifruktosa.

Además, la fermentación rápida a principios del colon es vista tras la coadministración, lo que es especialmente importante para efectos antipatogénicos y es también observado en bebés amamantados.

Globalmente, esto indica que las composiciones se adecuan al establecimiento y/o mantenimiento de un modelo de fermentación relativamente uniforme en todo el colon de un sujeto y para extender la fermentación y producción de SCFA en el extremo distal del colon.

SCFA, y muy probablemente también otros productos de fermentación, especialmente lactato, son por lo tanto producidos en todo el colon, al principio, la mitad y al final del colon.

[0042] En otra forma de realización, la coadministración de GOS y polifruktosa en cantidades sinérgicas se puede utilizar para significativamente aumentar la producción de lactato, como se pueden determinar nuevamente por análisis de muestras fecales de sujetos de prueba y sujetos de control que recibieron composiciones que comprenden bien GOS solo o composiciones de polifruktosa sola o de base equivalente sin prebióticos.

Un "aumento significativo en el lactato" se refiere por lo menos a 5%, 10%, 20% o incluso 50% o más lactato siendo producido en sujetos a los que se coadministran composiciones que comprenden GOS y polifruktosa, en comparación con sujetos a los que no se ha administrado GOS o polifruktosa.

Por ejemplo, bebés alimentados con la fórmula de leche estándar suplementada con 6 g/l de mezclas TOS/inulina (90%:10%) produjeron en 16 semanas aproximadamente 16% lactato (como % de ácidos de total), mientras que bebés alimentados con fórmula estándar produjeron aproximadamente 0,6% y bebés amamantados produjeron aproximadamente 35% de lactato.

Aunque no coincide con la cantidad de lactato producida por bebés amamantados, la suplementación de la fórmula de leche estándar con TOS y mezclas de inulina llevó a un aumento significativo en la producción de lactato.

Como se muestra en los ejemplos, se descubrió que el lactato tiene efectos beneficiosos inesperado.

De forma similar a acetato, aumentó la producción de prostaglandina E1 y prostaglandina E2 y resultó en expresión mejorada de mucina epitelial.

La mucosa intestinal juega un papel importante en la salud humana, ya que sirve como una barrera contra patógenos infecciosos, alérgenos y carcinógenos.

5 Las composiciones que positivamente influyen en el desarrollo y/o integridad de la mucosa pueden por lo tanto usarse para ayudar a desarrollar una mucosa saludable en bebés recién nacidos y para ayudar al establecimiento de una mucosa saludable en bebés alimentados a biberón o parcialmente alimentados a biberón y en sujetos que padecen de síntomas o enfermedades resultantes o asociadas a una mucosa intestinal que no funciona debidamente.

10 Por ejemplo, problemas intestinales, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por ejemplo colitis o enfermedad de Crohn) o síndrome del intestino irritable (IBS) se puede tratar o evitar, o la fijación y/o introducción patógena a través de la mucosa se puede reducir u otros problemas inmunológicos, tales como el desarrollo de asma, se puede evitar o reducir.

15 También se puede evitar o reducir la pérdida de integridad de la barrera intestinal como resultado de desnutrición, cirugía, quimioterapia etc.

[0043] Además, contracciones espontáneas y tensión abdominal fueron significativamente reducidas de una manera dependiente de la dosis tras la administración de D- o L-lactato.

20 Las composiciones según la invención pueden usarse así para aumentar los niveles de lactato intestinal y así tratar o prevenir síntomas tales como dolor abdominal, cólico, contracciones abdominales, tensión abdominal y similares.

[0044] Como se descubrió que el lactato mismo tenía efectos previamente desconocidos, es también un objeto de la invención proporcionar composiciones que comprenden lactato en cantidades adecuadas, que se pueden usar para tratar o prevenir los síntomas y trastornos descritos anteriormente.

25 En una forma de realización, las composiciones comprenden solo lactato en cantidades adecuadas, mientras en otra forma de realización, las composiciones de GOS y polifruetosa descritas aquí comprenden además lactato para aumentar adicionalmente los niveles de lactato intestinal.

Una tal composición según la invención comprende TOS e inulina en cantidades sinérgicamente eficaces y comprende además lactato en cantidades adecuadas.

30 En una forma de realización, las composiciones se proporcionan de forma que se adecuan para aumentar lactato intestinal y/o fecal hasta aproximadamente encima de 10 mmol/kg heces.

[0045] Se entiende que cuando se hace referencia al análisis de muestras fecales ésta es una medida indirecta del efecto real *in vivo*.

35 Asimismo, ensayos *in vitro* pueden ser realizados, donde se cultivan poblaciones bacterianas *in vitro* y cantidades adecuado de composiciones se agregan a los cultivos.

En particular, el sistema de fermentación *in vitro* descrito en los ejemplos puede ser utilizado.

[0046] Coadministración de composiciones que comprende GOS y polifruetosa puede por lo tanto ser usada para conseguir uno o varios de los siguientes efectos fisiológicos:

- 40 – un aumento significativo en SCFA total
- una reducción significativa en el pH
- una composición significativamente modificada de SCFA
- 45 – una reducción significativa en el SCFA ramificado
- una reducción significativa en la producción de gas por mol SCFA producido
- una fermentación más larga y más uniforme, incluyendo fermentación incluso en las partes más distales del colon, y/o
- una formación inicial alta de SCFA y/o formación de ácido láctico en la parte más proximal del colon
- promover la producción de SCFA al principio, mitad y final del colon
- 50 – un aumento significativo en el ácido láctico (absoluto y/o relativo) y/o
- un aumento en la cantidad relativa de L-lactato como una proporción del ácido láctico total formado.

[0047] En una forma de realización preferida al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o todos estos efectos se ven significativamente modificados cuando se usan composiciones que comprenden tanto GOS como polifruetosa, en comparación con cuando se administran composiciones que comprende solo GOS o polifruetosa, o ni GOS ni polifruetosa.

55 En particular, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o todos estos efectos son significativamente mayores tras la coadministración de una cantidad (sinérgicamente eficaz) de GOS y polifruetosa que la suma del efecto(s) de administración de GOS y polifruetosa individualmente.

60 [0048] Las composiciones sinérgicas según la invención son, por lo tanto, particularmente adecuadas para desarrollar y/o mantener una microflora saludable dentro del intestino grueso del bebé tras la administración de una cantidad sinérgicamente eficaz.

En una forma de realización preferida un bebé se alimenta solamente con una composición base, tal como fórmula de leche, suplementada con una cantidad sinérgicamente eficaz de GOS y polifruktosa en las primeras semanas tras el nacimiento.

Una composición preferida es, por lo tanto, una composición dietética para bebés.

5 En otra forma de realización un bebé es solo parcialmente alimentado con una composición según la invención.

En una forma de realización la composición se usa para tratar o prevenir dolor abdominal debido a contracciones espontáneas y tensión en músculos colónicos.

10 GOS y polifruktosa pueden usarse así para la preparación de una composición o una composición combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de dolor abdominal debido a contracciones espontáneas y tensión en músculos colónicos. El sujeto puede ser en este caso cualquier sujeto, desde un bebé, niño o adolescente a un adulto.

Claramente, las composiciones base a las que GOS y polifruktosa se agregan en cantidades sinérgicamente eficaces, variarán dependiendo de la edad del sujeto, el modo de administración y en los síntomas principales por tratar o evitar.

15 Para bebés por ejemplo la composición de base es preferiblemente una fórmula líquida o en polvo para bebés o de continuación, mientras que para adultos puede ser más adecuada una composición de suplemento nutriente (líquida, semi-líquida o sólida) o alimentación por sonda.

20 [0049] En una forma de realización preferida GOS y polifruktosa se coadministran en una cantidad sinérgicamente eficaz adecuada para aumentar significativamente la cantidad total de SCFA intestinal formado y/o para mejorar significativamente la composición intestinal de SCFA (especialmente para aumentar significativamente el porcentaje de relación de acetato a la cantidad total de SCFA) y / o para aumentar significativamente la producción de lactato y / o para y para bajar el pH intestinal y / o para reducir significativamente la formación de gas intestinal.

25 [0050] Uso de composiciones que comprenden una cantidad sinérgicamente eficaz de GOS y polifruktosa para el tratamiento y/o prevención de dolor abdominal debido a contracciones espontáneas y tensión en músculos colónicos, Se entiende que no se refiere necesariamente a una composición, sino que GOS y polifruktosa pueden estar presentes en composiciones separadas, que proporciona una cantidad sinérgicamente eficaz cuando se coadministran.

30 [0051] A través de estos cambios en niveles SCFA, perfil y pH intestinal, las composiciones son capaces de causar uno o varios de los siguientes efectos beneficiosos:

a) La permeabilidad intestinal en el sitio de producción de SCFA se ve disminuida.

35 Esto es importante para evitar enfermedad y mantener la salud, especialmente para prevenir el desarrollo de alergias.

El hallazgo de que la coadministración de GOS y polifruktosa causa fermentación más uniforme y extiende la fermentación a la parte distal del colon es importante a este respecto, ya que la permeabilidad del intestino, con las partes distales del colon, puede ser uniformemente reducida y el intestino puede así ser uniformemente mantenido en un estado saludable.

40 b) La motilidad o movimiento peristáltico del intestino se ve mejorado, lo que reduce o previene estreñimiento, un problema común observado en bebés alimentados con fórmula.

c) La disminución de la cantidad de contracciones espontáneas y la tensión de músculo colónico dando como resultado menos calambres y menos dolor abdominal.

45 d) La absorción de iones de calcio aumenta, lo que es importante para la mineralización del hueso y el desarrollo del hueso del sujeto, especialmente si el sujeto es un bebé.

e) Los síntomas secundarios de salud reducida tales como fatiga, depresión y fluctuación de humor pueden ser reducidos.

f) La producción mucosa de la mucosa intestinal se ve significativamente mejorada, lo que proporciona protección contra la fijación y colonización de patógenos.

50 En particular se ha observado que los niveles de lactato se correlacionaban positivamente con la producción mucosa.

Las composiciones según la invención pueden usarse así para estimular la producción de mucosa.

g) El metabolismo de bilis se puede modificar a niveles y/o modelos como se observó en bebés amamantados.

55 h) El crecimiento de microorganismos patógenos intestinales se inhibe a lo largo de todo el colon.

[0052] Una composición que comprende una cantidad sinérgicamente eficaz de GOS y polifruktosa puede por lo tanto ser usada para bien mantener o establecer (por ejemplo en un bebé recién nacido, prematuro o maduro o en un bebé parcialmente amamantado o no amamantado, u otros sujetos, tales como adultos) uno o varios de los efectos fisiológicos anteriores y mantener o mejorar la salud del sujeto por asegurar o establecer un ambiente intestinal grande saludable y una actividad óptima del intestino grueso.

[0053] En particular, la incidencia, duración y/o gravedad del dolor abdominal debido a contracciones espontáneas y tensión en músculos colónicos puede ser reducida, abolida o evitada por la administración de una composición según la invención.

Las composiciones según la invención también se pueden usar para relajar las contracciones del colon, preferiblemente las contracciones fásicas y/o tónicas.

Composiciones según la invención

5 [0054] Las composiciones adecuadas para los usos anteriormente descritos comprenden tanto polifruetosa como GOS en cantidades sinérgicamente eficaces.

Las composiciones comprenden GOS/polifruetosa en proporciones que varían de 3/97 a 97/3, preferiblemente de 5/95 a 95/5, más preferiblemente de 90/10 a 45/55.

10 Todas las proporciones individuales entre estos puntos finales están incluidas aquí, tales como 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 55/45, 60/40, 70/30, 80/20, 85/15, 90/10, etc.

[0055] Las dosificaciones requeridas y la proporción de GOS/polifruetosa para la realización del efecto sinérgico (óptimo) pueden variar dependiendo del tipo de composición y el método y la frecuencia de administración.

15 Sin embargo se dan unos pocos ejemplos por debajo.

Una persona experta puede fácilmente decidir qué dosificaciones de cada componente se requiere para conseguir el mejor efecto fisiológico y qué proporción de GOS/polifruetosa es la más adecuada.

20 Por ejemplo, si el objetivo principal es mejorar el nivel total de SCFA después de la administración oral de una composición que comprende GOS y polifruetosa, una persona experta hará varias composiciones (que comprenden GOS más polifruetosa, GOS solo, polifruetosa solo) y comparará su eficiencia en la inducción de altos niveles de SCFA usando pruebas bien *in vivo* o *in vitro* como se conoce en la técnica. Se entiende que cuando se hace referencia a "dosis diaria" o "dosificación por día", esto no implica que la dosificación deba ser administrada al sujeto de una vez.

25 [0056] Una fórmula infantil sinérgicamente eficaz puede, por ejemplo, consistir en una composición base (por ejemplo fórmula infantil estándar) que comprende aproximadamente 4 g/l, 5 g/l o más de una mezcla de GOS y polifruetosa, donde la proporción de GOS a polifruetosa puede variar como se describe en otra parte aquí (por ejemplo 90% GOS: 10% polifruetosa).

30 [0057] La polifruetosa puede ser, por ejemplo, levano y/o inulina.

Polifruetosa, tal como levano o inulina, para su uso en las composiciones puede ser bien extraído de fuentes naturales (plantas o bacterias) o puede ser realizada por *novosíntesis* o por tecnologías de ADN recombinante como conocido en la técnica. Métodos de extracción, separación de tamaño y purificación de inulina se han descrito, por ejemplo, en De Leenheer (1996), US6569488 y US5968365.

35 Métodos de producción recombinante han sido por ejemplo descritos en US6559356.

*Síntesis* implica generalmente el uso de moléculas de sacarosa y enzimas con actividad de fructosil transferasa.

Inulina adecuada para usar en las composiciones está también disponible ya comercialmente, por ejemplo Raftiline®HP, Orafiti.

40 [0058] Las inulinas de planta generalmente tienen un grado muy inferior de polimerización que las inulinas bacterianas (hasta 150, en comparación con hasta 100,000 en bacterias).

Las fuentes de planta incluyen especies dicotiledóneas, tales como *Compositae*.

45 Ejemplos de especies que producen cantidades relativamente grandes de inulina, principalmente en sus raíces, bulbos o tubérculos, son achicoria, espárragos, dalia, alcachofa de Jerusalén, el ajo y otros (ver Kaur y Gupta, J. Biosci. 2002, 27,703-714).

Como la inulina no debería preferiblemente comprender oligofruetosa, la hidrólisis debería ser evitada y la oligofruetosa y/o mono- o disacáridos presentes deberían ser quitados antes del uso.

50 [0059] Especialmente preferida es polifruetosa con un PD de al menos 10, 15, 20, 50, 70, 100, 120, 130, 150, 200, 300, 500 o más.

Las polifruetosas, tales como levanos, se pueden hidrolizar para evitar problemas de viscosidad asociados a cadenas demasiado largas, siempre y cuando un PD de 10 o más sea retenido.

55 [0060] Levanos también se pueden obtener de fuentes naturales tales como plantas (por ejemplo monocotiledones) levadura, hongos, bacterias, o hecho químicamente o usando tecnología del ADN recombinante.

[0061] GOS puede ser obtenido de fuentes naturales, tales como plantas (por ejemplo achicoria, soja) o bacterias, o puede ser hecho sintéticamente o por tecnología de ADN recombinante como conocida en la técnica. GOS puede ser  $\beta$ -galacto-oligosacárido o  $\beta$ -galacto-oligosacárido o una mezcla de ambos.

60 En particular, residuos de galactosa se enlazan por enlaces glicosídicos  $\beta(1-4)$  y  $\beta(1-6)$  (trans GOS o TOS).

GOS adecuado para usar en las composiciones está también disponible ya comercialmente, por ejemplo Vivinal®GOS, Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Países Bajos.

GOS también se puede derivar de lactosa, por tratamiento de lactosa enzimáticamente con  $\beta$ -galactosidasa o por hidrólisis de poliglucano.

65 En una forma de realización preferida se usa TOS.

En una forma de realización la polifruktosa preferida es inulina HP, de modo que la combinación de TOS e inulina HP es también una forma de realización preferida aquí.

5 [0062] Otras composiciones proporcionadas son composiciones que comprenden lactato en cantidades adecuadas, en particular para los usos anteriormente descritos.

Las cantidades adecuadas de lactato pueden variar, y pueden por ejemplo ir de 1 a 30 gramos al día.

[0063] Las composiciones según la invención pueden ser composiciones bien alimenticias, composiciones de suplemento alimenticio o composiciones farmacéuticas.

10 Además de polifruktosa y GOS (y/o lactato) pueden comprender ingredientes adicionales.

Para composiciones alimenticias o composiciones de suplemento alimenticio, estas deberían ser de calidad alimenticia y fisiológicamente aceptables. "Alimenticio" se refiere a composiciones dietéticas sólidas, semi-sólidas o líquidas, especialmente composiciones totales alimenticias (sustitución alimenticia), que no requieren toma de nutriente adicional o composiciones de suplemento alimenticio.

15 Las composiciones de suplemento alimenticio no reemplazan completamente la toma de nutrientes por otros medios. Alimentos y composiciones de suplemento alimenticio en una forma de realización preferida son un alimento de bebé o suplementos alimenticios, alimentos o suplementos alimenticios para bebés prematuramente nacidos, alimentos infantiles, alimentos de niños, etc., que son preferiblemente administrado enteralmente, preferiblemente por vía oral varias veces diarias.

20 El alimento o las composiciones de suplemento alimenticio son particularmente adecuadas para bebés no amamantados o parcialmente amamantados.

La composición puede ser también beneficiosamente administrada a bebés en su periodo de adaptación a alimento sólido o bebés cambiando de alimentación de pecho a alimentación de biberón.

La composición también puede ser parte de un suplemento fortificante de leche humana.

25 [0064] En una forma de realización la composición es una fórmula de bebé o de continuación como por ejemplo conocida en la técnica, especialmente como se describe en la directiva de Comisión Europea 91/321/EEC y sus enmiendas, pero se puede modificar para comprender una cantidad eficaz de polifruktosa y GOS.

30 La fórmula de bebé o de continuación se puede basar en la leche (leche de vaca, leche de cabra, etc.), en fórmula de leche infantil (IMF) o en soja para bebés intolerantes de lactosa o puede contener aminoácidos como una fuente de nitrógeno para bebés con problemas relacionados con alergias o absorción.

Fórmulas de bebé o de continuación disponibles comercialmente comprenden, así, una proteína de la leche o base de proteína de soja, grasa, vitaminas, carbohidratos digeribles y minerales en cantidades diarias recomendadas y pueden ser en polvo, líquidos concentrados o composiciones listas para comer.

35 [0065] Administración de la fórmula de bebé o de continuación modificada produce un ambiente intestinal grande que se parece al de bebés amamantados, como se puede determinar por análisis de pH fecal, composición bacteriana, producción SCFA y perfiles, producción de gas, etc. Cuando la composición es una bebida, preferiblemente el volumen (comprendiendo la dosis efectiva diaria) consumido o administrado a diario está en el rango de aproximadamente 100 a 1500ml, más preferiblemente aproximadamente 450 a 1000 ml al día.

40 Cuando la fórmula es un sólido, preferiblemente la cantidad (que comprende la dosis efectiva diaria) consumida o administrado a diario está en el rango de aproximadamente 15 a 220 g/día, preferiblemente aproximadamente 70 a 150 g/día de polvo de fórmula.

45 [0066] Una dosis efectiva diaria de GOS y polifruktosa varía de aproximadamente 1 a 30 g/día, preferiblemente aproximadamente de 2 a 10 g/día para bebés y preferiblemente para adultos aproximadamente de 5 a 20 g/día.

[0067] Alimento o composiciones de suplemento alimenticio según la invención pueden adicionalmente comprender otros ingredientes activos, tales como vitaminas (A, B1, B2, B3, B5, B12, C, D, E, K, etc.), probióticos (por ejemplo bifidobacteria, Lactobacilli, etc.), otros prebióticos, fibras, lactoferrina, inmunoglobulinas, nucleótidos, y similares.

50 Nutrientes tales como proteínas, lípidos y otros carbohidratos (por ejemplo carbohidratos digeribles, carbohidratos no digeribles, carbohidratos solubles o insolubles) pueden estar presentes en varias cantidades.

Carbohidratos no digeribles insolubles típicos presentes en nutrición infantil son polisacáridos de soja, almidón resistente, celulosa y hemicelulosa.

55 Carbohidratos solubles típicos y digeribles para usar en la nutrición infantil son por ejemplo maltodextrina, lactosa, maltosa, glucosa, fructosa, sacarosa y otros mono- o disacáridos o mezclas derivadas.

La composición también puede comprender otros ingredientes inactivos y portadores, tales como por ejemplo glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados químicos de la celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina de sodio, talco, carbonato de magnesio y similares.

60 Las composiciones también pueden comprender agua, electrolitos, aminoácidos esenciales y no esenciales, oligoelementos, minerales, fibra, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, emulsionantes y estabilizadores (tales como lecitina de soja, ácido cítrico, ésteres de mono- o di-glicéridos), conservantes, ligantes, fragancias, y similares.

65 [0068] Lípidos adecuados para las composiciones, especialmente para alimento infantil o suplementos alimenticios, son grasas de leche, lípidos de planta, tales como aceite de canola, aceite de alazor, aceite de girasol, aceite de

oliva, aceites marinos, etc. o fracciones o mezclas derivadas que comprenden ácidos grasos adecuados (poliinsaturado y/o saturado).

5 [0069] Proteínas adecuadas para las composiciones especialmente para alimento infantil o suplementos alimenticios, incluyen caseína, suero de leche, leche desnatada condensada, soja, carne de res, colágeno, maíz y otras proteínas de planta o proteínas hidrolizadas, aminoácidos libres, etc. Preferiblemente, las proteínas comprendidas en el alimento infantil o composiciones de suplemento alimenticio están extensivamente hidrolizadas y/o parcialmente hidrolizadas para reducir el riesgo de alergias.

10 Las composiciones de alimento infantil según la invención preferiblemente comprenden todas las vitaminas y minerales esenciales en la dieta diaria o semanal en cantidades nutricionalmente significativas, tales como cantidades diarias recomendadas mínimas.

[0070] El alimento o composición de suplemento alimenticio puede también hacerse en una forma de realización basándose (es decir empezando con o que comprende) en una base alimenticia.

15 Puede, por ejemplo, basarse en, o comprender, un producto lácteo, tal como un producto lácteo fermentado, incluyendo pero no limitado a leche, yogur, una bebida a base de yogur o suero de leche.

Tales composiciones se pueden preparar en cierto modo conocido de por sí, por ejemplo añadiendo una cantidad eficaz de polifruktosa y GOS o TOS a un alimento o base alimenticia adecuados.

20 Otras bases alimenticias adecuadas pueden ser bases de planta, bases de carne y similares.

[0071] El alimento o composición de suplemento alimenticio según la invención se puede utilizar bien como un tratamiento y/o profilácticamente.

25 [0072] Las composiciones según la invención pueden estar en cualquier forma de dosificación, tales como líquido, sólido, semi-sólido tabletas, bebidas, polvo, etc., dependiendo del método de administración.

La administración a un sujeto es preferiblemente oral, aunque para algunos usos puede ser adecuada la alimentación por sonda o rectal (con un tubo que entra directamente en el estómago, duodeno, o intestino delgado o intestino grueso).

30 [0073] Es otra forma de realización de la invención proporcionar un método para la producción de una composición según la invención añadiendo una cantidad sinérgicamente eficaz de GOS (o TOS) y polifruktosa a una base de composición adecuada, como se ha descrito anteriormente.

[0074] Los siguientes ejemplos no limitativos describen el efecto sinérgico de GOS y polifruktosa.

35 A menos que se declare lo contrario, la práctica de la invención empleará métodos convencionales estándar de biología molecular, farmacología, inmunología, virología, microbiología o bioquímica.

Tales técnicas son descritas en Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, in Volumes 1 and 2 of Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA and Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985), *Microbiology: A Laboratory Manual* (6th Edition) by James Cappuccino, Laboratory Methods in Food Microbiology (3rd edition) by W. Harrigan (Author) Academic Press.

Leyenda de las figuras

45 [0075]

Figura 1

Formación de acetato, propionato y butirato tras 48 h de fermentación *in vitro* de TOS, inulina, una mezcla de TOS/inulina 9/1 y una mezcla de oligofruktosa e inulina 1/1 por heces frescas obtenidas de bebés.

Figura 2

50 Cantidades relativas de acetato, propionato y butirato formadas tras 48 h de fermentación *in vitro* de TOS, inulina, una mezcla de TOS/inulina 9/1 y una mezcla de oligofruktosa e inulina 1/1 por heces frescas obtenidas de bebés.

La suma de acetato más propionato más butirato formada fue fijada a 100 % para cada una de la fibra evaluada.

55 Figura 3

La formación de gas tras 48 h de fermentación *in vitro* de TOS, inulina, una mezcla de TOS/inulina 9/1 y una mezcla de oligofruktosa e inulina 1/1 por heces frescas obtenidas de bebés.

La cantidad de gas formado (ml era en relación con la cantidad de SCFA total formada (en mmol por g de fibra)

60 Figura 4

Efectos de mezclas de SCFA (acetato/propionato/butirato en una proporción de 90/5/5 en una base molar) y de L-lactato.

Figura 4A: Efecto de 0, 0,1, 0,5, 1 y 4 mM de la mezcla de SCFA o L-lactato en expresión de muc-2 en un co-cultivo CCD18/T84 (n=6).

65 Las barras de error muestran el SEM.

El aumento a 1 y 4 mM mezcla SCFA y 0,5, 1 y 4 mM L-lactato es estadísticamente significativo.

Figura 4B: Efecto de 0, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de mezcla SCFA o L-lactato en la respuesta espontáneo PGE1 y PGE2 en células CCD18 (n=7).

Las barras de error muestran el SEM.

El aumento de PGE1 en 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de mezcla SCFA y 100  $\mu\text{M}$  de L-lactato es estadísticamente significativo.

El aumento de PGE2 a 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de mezcla SCFA y 250  $\mu\text{M}$  de L-lactato es estadísticamente significativo ( $P < 0,05$ )

Figura 5

Efectos de acetato sódico y L-lactato de sodio en la contracción espontánea en la parte distal y proximal del colon.

El blanc (con una tensión fijada a 1 g) es 0%.

La tensión tras añadir 40 mM KCl fue establecida a 100%.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Estudios de fermentación *in vitro* muestran efectos sinérgicos en los modelos de fermentación

#### 1.1 Materiales y métodos

##### Microorganismos

[0076] Los microorganismos fueron obtenidos de heces frescas de bebés alimentados con biberón.

Material fecal fresco de bebés de 1 a 4 meses de edad fue agrupado y puesto en el medio de conservación en 2 h.

##### Composiciones/sustrato

[0077] Como sustrato se usa bien mezcla de prebióticos (TOS; TOS (de VivinalGOS, Boreculo Domo ingredientes, el Países Bajos) e inulina (RaftilinHP de Orafiti, Bélgica) a una proporción de 9/1 (p/p); inulina; mezcla de oligofruktosa y de inulina en una proporción de 1/1 (p/p), o nada (blanc).

##### Medios

[0078] Medio McBain & MacFarlane: agua de peptona tamponada 3,0 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l. Mucina (bordes de cepillo) 0,8 g/l, triptona 3,0 g/l, L-Cisteína-HCl 0,4 g/l, sales de bilis 0,05 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  2,6 g/l,  $\text{NaHCO}_3$  0,2 g/l, NaCl 4,5 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/l,  $\text{CaCl}_2$  0,228 g/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,005 g/l. Botellas Scott de 500 ml fueron rellenas con el medio y esterilizadas durante 15 minutos a 121°C.

[0079] Medio tamponado:  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  2,6 g/l,  $\text{NaHCO}_3$  0,2 g/l, NaCl 4,5 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/l,  $\text{CaCl}_2$  0,228 g/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,005 g/l. PH fue ajustado a  $6,3 \pm 0,1$  con  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  o  $\text{NaHCO}_3$ . Botellas Scott de 500ml fueron rellenas con el medio y esterilizadas durante 15 minutos a 121°C.

[0080] Medio de conservante: peptona tamponada 20,0 g/l L-Cisteína-HCl 0,5 g/l, tioglicolato de sodio 0,5 g/l, tableta de resazurina 1 por litro. PH fue ajustado a  $6,7 \pm 0,1$  con 1 M NaOH o HCl.

El medio fue hervido en microondas. Botellas de 30 MI de suero fueron rellenas con 25 ml de medio y esterilizadas durante 15 minutos a 121°C.

[0081] Las heces frescas fueron mezcladas con el medio de conservación.

Heces frescas se pueden conservar de esta forma durante varias horas a 4°C.

[0082] Suspensión fecal: la solución conservada de heces fue centrifugada a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos.

El sobrenadante fue quitado y las heces fueron mezcladas con el medio McBain & Mac Farlane en una proporción en peso de 1:5.

##### Fermentación

[0083] 3,0 ml de la suspensión fecal fueron combinados con 85 mg de glucosa o prebiótico o sin adición (blanc) en una botella y mezclados exhaustivamente.

Una muestra  $t=0$  fue retirada (0,5 ml). 2,5 ml de la suspensión resultante fue portada en un tubo de diálisis en una botella de 60 ml lleno de 60 ml del medio tamponado.

La botella fue cerrada bien e incubada a 37°C.

Se tomaron muestras del tubo de diálisis (0,2 ml) o del tampón de diálisis (1,0 ml) con una jeringa hipodérmica después de 3, 24, y 48 horas e inmediatamente se pusieron en el hielo para parar la fermentación.

Determinación de los ácidos grasos de cadena corta y lactato

[0084] Véase ejemplo 2.  
Valores fueron corregidos para blanc.

5 Determinación de gas

[0085] A t=3; t=24 y t=48 la presión del gas en el espacio de cabeza de la botella de 60 ml fue medida por un medidor de presión de gas (Druckmessumformer, Econtronic, Alemania) mediante el pinchazo de una jeringa hipodérmica de 6 ml a través de la tapa de caucho de la botella y retirada de gas del espacio de aire por esta jeringa hasta que la presión del gas fue 0 bar.  
El volumen en la jeringa fue el volumen de gas formado.  
Los valores fueron corregidos para blanc.

15 1.2 Resultados

[0086] La fermentación *in vitro* se efectuó utilizando las muestras siguientes:  
1.) 85mg TOS (de VivinalGOS, Borculo Domo Ingredients, Países Bajos)  
2.) 85 mg inulina (RaftilinHP, de Orafti, Bélgica)  
3.) 85 mg TOS/inulina con una proporción de TOS/inulina de 9/1 (p/p) y  
20 4.) 85 mg de (raftiloseP95, de Orafti, Bélgica)/inulin (RaftilinHP) en una proporción de OF/inulina de 1/1 (p/p).

Cantidad Total de SCFA producido

[0087] Los resultados se muestran en la figura 1.  
La Figura 1 muestra que la mezcla TOS/inulina resultó en una cantidad significativamente más alta de SCFA por g de fibra que los componentes únicos, pero también superior a la mezcla de oligofruktosa (OF) e inulina.  
También se evaluaron 85 mg TOS/inulina en una proporción de 1/1 (datos no mostrados), que también proporcionaron un efecto sinérgico.

Producción de L- y D-lactato

[0088] L- y D-lactato solo pudo ser determinado a t=3.  
La tabla 1 muestra los productos metabólicos finales formados en aquel momento en el tiempo.

Tabla 1 - productos finales metabólicos (mmol/g fibroso) formados tras 3 horas de fermentación *in vitro*

	Acetato	Propionato	Butirato	L-lactato	D-lactato
40 TOS	0,23	0	0	0,14	0,03
Inulina	0	0	0	0,00	0,00
TOS/Inulina	0,40	0	0	0,17	0,04
OF/Inulina	0,30	0	0	0,04	0,02

[0089] Otra vez una formación sinérgicamente más alta de lactato se observa para la mezcla TOS/inulina en comparación con los componentes únicos TOS e inulina.  
En comparación con la mezcla con OF e inulina el porcentaje de lactato (basada en ácidos totales) y la proporción L/d lactato es más alta en la mezcla TOS/inulina.

50 Cantidades relativas de SCFA

[0090] La Figura 2 muestra el modelo de productos de fermentación tras 48 h. La mezcla de TOS/inulina muestra un porcentaje significativamente más alto de acetato que los componentes únicos, que es también superior al de la mezcla de oligofruktosa (OF) e inulina.  
55 Heces de bebés amamantados muestran un porcentaje alto de acetato, así la mezcla de TOS/inulina produce un modelo de productos de fermentación que además se parece al de bebés amamantados.

Formación de Gas

[0091] Los resultados se muestran en la figura 3.  
Con respecto a la formación de gas, TOS y la mezcla TOS/inulina forman la cantidad mínima de gas por mmol SCFA formado. Inulina y la mezcla de OF/inulina muestran una cantidad mucho más alta de formación de gas.  
Por mmol SCFA formado la cantidad de gas es más baja en la mezcla TOS/inulina.

## Cinética de formación de SCFA

[0092] La tabla 2 muestra la cinética de formación de SCFA.

- 5 La una combinación de TOS/inulina todavía muestra una formación SCFA alta entre 24 y 48 h, indicando que en la parte distal del colon todavía se forma SCFA y teniendo un efecto beneficioso en la permeabilidad de colon, la formación mucosa y efectos antipatogénicos etc. También en las primeras 3 h la cantidad máxima de SCFA es formada, como es el caso con oligosacáridos de leche humana (datos no mostrados). Una fermentación rápida a principios del colon es importante debido a los efectos antipatogénicos.

10

Tabla 2: cinética de formación de SCFA (mmol) SCFA (blanc corregido)

	Intervalo de tiempo (horas)		
	0-3 h	3-24 h	24-48 h
Prebióticos			
TOS	0,23	3,85	0,13
TOS/inulina HP	0,40	4,49	0,24
Inulina HP	0,00	3,05	0,05
OF/Inulina HP	0,11	4,26	0,00

OF = oligofruktosa

## Ejemplo 2

15

[0093] Estudio clínico con TOS/inulina: un aumento relativo de acetato y relativa reducción de butirato no se correlaciona con un aumento de Bifidobacteria. TOS e inulina tienen un efecto sinérgico.

20

## 2.1 Materiales y métodos

[0094] Se reclutaron 63 embarazadas que habían decidido amamantar y 57 que eligieron no hacerlo durante su último trimestre de embarazo.

25 Bebés con peso de nacimiento normal, ninguna anomalía congénita, enfermedad congénita o enfermedad gastrointestinal fueron catalogados tras un máximo de 3 días tras el parto.

El estudio fue aprobado por el comité ético del centro médico, St. Radboud, Nijmegen, Países Bajos. Consentimiento informado escrito se obtuvo de los padres antes de apuntarse al estudio.

30 [0095] Bebés de madres que han decidido no amamantar, fueron asignados a uno de dos grupos de fórmula (OSF, SF) al azar y doblemente a ciegas.

El grupo de fórmula estándar (SF; n=19 recibió una fórmula para lactantes regular, no suplementada (Nutrilon 1, Nutricia, Países Bajos).

Los datos composicionales principales de la fórmula estándar a una dilución estándar de 131 g/l se dan en la tabla 3.

35 El grupo de fórmula prebiótica (OSF; n=19) recibió la misma fórmula de bebé estándar suplementada con una mezcla de 6 g/l de transgalacto-oligosacáridos (TOS; Vivinal GOS, Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Países Bajos) e inulina (PF; RaftilineHP, Orafiti active food ingredient, Tienen, Bélgica).

La mezcla comprendió 90% TOS y 10% de inulina (polifruktosa).

Las fórmulas de estudio fueron administradas *ad libitum* durante el periodo de estudio.

40 Madres que decidieron amamantar fueron animadas a continuar la lactancia durante el curso del estudio y fueron ayudadas por un consultor de lactancia cuando lo necesitaron.

Al terminar la lactancia sus bebés recibieron una de las dos fórmulas.

La adaptabilidad fue evaluada contando el número de latas de fórmula sin usar durante cada visita y comparando la cantidad de fórmula consumida con la toma de alimento registrada.

45

Tabla 3: Composición de la fórmula estándar por litro

Energía	kcal	670
Proteína	g	14
Proporción de caseína/lactosuero		40/60
Grasa	g	35
Carbohidratos totales	g	75
Lactosa	g	75
Minerales		

Calcio	mg	540
Fósforo	mg	270
Magnesio	mg	50
Sodio	mg	190
Potasio	mg	680
Cloruro	mg	430
Hierro	mg	5
Zinc	mg	5

### Questionarios

5 [0096] Los datos demográficos, clínicos y antropométricos de la madre son recogidos antes del nacimiento. Información del parto se obtuvo de las madres 5 días después del parto. Información de la toma de alimento infantil, tolerancia de fórmula, características de deposición, salud y antropométricos se obtuvieron de cuestionarios a 5, 10, 28 días tras el nacimiento y una vez cada 4 semanas hasta que el final del estudio.

### 10 Muestras fecales

15 [0097] Se pidió a los padres que recogieran muestras fecales de sus bebés, en los días 5, 10, 28 tras el parto y una vez cada 4 semanas a partir de ahí. Las muestras se tomaron del pañal, tan pronto como fue posible tras la defecación, se depositaron en contenedores de heces (Greiner Labortechnik, Países Bajos) y se almacenaron inmediatamente a -20°C por el progenitor y se transportaron en un congelador portátil al laboratorio por los investigadores.

### Preparación de muestras fecales:

20 [0098] Para la determinación de SCFA, 1 gramo de las muestras fue descongelado en la agua helada diluida 10x en el MilliQ y homogeneizado durante 10 minutos usando un stomacher ((IUL Instruments, Barcelona, España). 350 µl heces homogeneizadas fueron mezcladas con 200 µl 5% (v/v) ácido fórmico, 100 µl 1,25 g/l ácido 2-etilbutírico (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos) y 350 µl MilliQ. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 25 14.000 r.p.m. para eliminar partículas grandes y el sobrenadante fue almacenado a -20°C. Para el análisis FISH y mediciones de ácido láctico, las muestras fueron descongeladas en agua helada, diluidas 10x (p/v) en el suero salino tamponado con fosfato, pH 7,4 (PBS) y homogeneizadas durante 10 minutos usando un stomacher. Las heces homogeneizadas fueron almacenadas a -20°C.

### Hibridación in situ con fluorescencia

30 [0099] Análisis FISH fue realizado como se describe en Langendijk et al, 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61:3069-3075.) con algunas modificaciones ligeras. Muestras fijadas de paraformaldehído fueron aplicadas a láminas de vidrio recubiertas de gelatina (láminas de objeto PTFE recubierto de 8-pocillos [1 cm<sup>2</sup>/pocillo], CBN labsuppliers, Drachten, Países Bajos) y secadas al aire. Las muestras secas fueron deshidratadas en 96% etanol durante 10 minutos.

35 Tampón de hibridación (20 mM Tris-HCl, 0,9 M NaCl, 0,1% SDS [pH 7.1]) con 10 ng/l Cy3 sonda específica de *Bifidobacterium* marcado Bif164mod (5'-CAT CCG GYA TTA CCA CCC), fue precalentado y añadido a las muestras secas.

40 Bif 164 mod es una versión modificada de sonda S-G-Bif-a-0164-a-A-18 ((Langendijk et al, 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61:3069-3075.).

Las láminas fueron incubadas durante toda la noche en una cámara húmeda oscura a 50°C.

Después de la hibridación las láminas fueron lavadas durante 30 minutos en 50 ml de tampón de lavado precalentado (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl [pH 7.2]) y brevemente enjuagadas en el MilliQ.

45 Para la coloración de todas bacterias, las muestras fueron incubadas con 0,25 ng/l 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Tras coloración DAPI las láminas fueron brevemente enjuagadas en el MilliQ, secadas, montadas con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA., E.E.U.U.) y cubiertas con un cubreobjetos.

Las láminas fueron automáticamente analizadas utilizando un microscopio de epifluorescencia Olimpo AX70 con software de análisis de imagen automatizado (Analysis 3.2, Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Alemania).

50 El porcentaje de bifidobacteria por muestra fue determinado analizando 25 posiciones microscópicas elegidas de forma aleatoria.

En cada posición, el porcentaje de bifidobacteria fue determinado contando todas las células con un conjunto de filtro DAPI (SP 100, Chroma Technology Corp., Brattleboro, E.E.U.U.) y contando toda la bifidobacteria que utiliza un Cy3 conjunto de filtro (41007, Chroma Technology, Brattleboro, U.S.A.).

5 Análisis de ácidos grasos de cadena corta

[0100] Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), ácidos acéticos, propiónicos, n-butiíricos, isobutiíricos y n-valéíricos fueron determinados de forma cuantitativa por un cromatógrafo de gas Varian 3800 (GC) (Varian Inc., Walnut Creek, E.E.U.U.) equipado con un detector de ionización de llamas. 0,5 µl de la muestra fue inyectado a 80°C en la columna (Stabilwax, 15 x 0,53 mm, grosor de película 1,00 µm, Restek Co., E.E.U.U.) que usa helio como un gas portador (3,0 psi).

Tras la inyección de la muestra, el horno fue calentado a 160°C a una velocidad de 16 °C/min, seguido de calentamiento a 220°C a una velocidad de 20 °C/min y finalmente mantenido a una temperatura de 220°C durante 1,5 minutos.

15 La temperatura del inyector y detector fue de 200°C. Ácido 2-etilbutiírico fue usado como un estándar interno.

Análisis de lactato

[0101] Heces homogeneizadas fueron descongeladas en el hielo y centrifugadas durante 5 minutos a 14,000 r.p.m. 100 µl sobrenadante fue calentado durante 10 minutos a 100°C para desactivar todas las enzimas.

20 Lactato fue determinado enzimáticamente, utilizando un equipo de detección de ácido de L-lactato con D- y L-lactato-deshidrogenasa (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania).

Lactato fue solo determinado en aquellas muestras fecales que fueron lo suficientemente grandes.

25 Análisis de pH

[0102] Tras el almacenamiento a -20°C, las muestras fecales fueron descongeladas y el pH fue directamente medido en las heces a temperatura ambiente utilizando un Handylab pH meter (Scott Glas, Maguncia, Alemania) equipada con un Inlab 423 pH electrode (Mettler-Toledo, Columbo, E.E.U.U.)

30 Análisis de datos

[0103] Antes del estudio, cálculos de potencia mostraron que para detectar una diferencia en el porcentaje de bifidobacteria entre el grupo de fórmula de intervención y el grupo de fórmula estándar de 30% con un SD de 25%, 13 bebés por grupo deberían ser incluidos. Debido a una esperada caída de 30% en los grupos de fórmula, más lactantes de los calculados fueron incluidos en el estudio. El paquete estadístico SPSS (versión 11/0) fue usado para análisis estadístico de los resultados. La normalidad de todos los valores fue controlada por inspección visual de los gráficos de probabilidad normal. La importancia de las diferencias en el porcentaje de bifidobacteria, pH, cantidades relativas de SCFA y lactato entre los grupos fue evaluada usando análisis de varianza. En caso de una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ), los grupos fueron comparados usando la prueba Bonferroni *post hoc*: como no es posible asignar doblemente a ciegas alimentación de pecho o de biberón y para asegurar la aleatorización adecuada, ningún análisis estadístico fue realizado para comparar la lactancia con cualquiera de los grupos de alimentación de fórmula. Los datos del grupo alimentado con leche materna sólo se dan cuando el niño sólo era alimentado con leche materna en ese punto del tiempo.

45 2.2 Resultados

[0104] En total, 120 (bebés de grupo -pro fueron incluidos. 57 Bebés comenzaron con alimentación de fórmula directamente después del nacimiento y fueron igualmente divididos entre los grupos de fórmula.

50 De los 63 bebés que fueron alimentados con leche materna directamente después del nacimiento, 24 cambiaron a alimentación de fórmula antes de las 16 semanas y 5 bebés lo dejaron.

Las características de los sujetos del estudio se muestran en la tabla 4.

En los grupos de fórmula, 9 bebés dejaron el estudio en las primeras 16 semanas después del nacimiento (4 en el grupo SF, 5 en el grupo OSF).

55 Razones para el abandono incluyen: cólicos, sospecha de alergia a la leche de vaca, estreñimiento y problemas prácticos.

Tabla 4 - características de objetos de estudio

		Fórmula estándar, SF N=19	Fórmula prebiótica, OSF N=19	Leche materna, BF N=63
Sexo	Masculino	5	12	33
	Femenino	14	7	30

Lugar de nacimiento	Casa	7	8	40
	Hospital	12	11	23
Modo de parto	Vaginal	14	16	59
	Cesárea	5	3	4
Peso al nacer		3600±501	3318±602	3651±601

Bifidobacteria fecal

5 [0105] Los porcentajes de bifidobacteria en heces a los 5 días, 10 días de edad, y a las 4, 8, 12, y 16 semanas de los grupos de alimentación se muestran en la tabla 5 y las cantidades en la tabla 5. El grupo OSF tiende a tener una bifidobacteria más alta % que el grupo SF de cuenta bacteriana total en todas las edades, pero las diferencias no eran estadísticamente diferentes. De forma imprevista, el porcentaje de *Bifidobacteria* en bebés amamantados fue también relativamente bajo y estuvo de acuerdo con los grupos alimentados con fórmula.

10 [0106] Los datos preliminares también muestran un aumento en *Lactobacilli* en los grupos BF y OSF, pero las cantidades de *Lactobacilli* en la flora fecal son al menos un orden de magnitud inferior a la *Bifidobacteria*, el modelo total cambia muy poco.

15 Resultados de pH

[0107] Los valores de pH medidos en las heces de los bebés alimentados con preparados se muestran en la tabla 6. El pH más bajo se descubrió en bebés alimentados con leche materna. pH fecal de heces de bebés alimentados con la fórmula OSF fue inferior que en el grupo SF ( $p < 0,045$  en todas las edades excepto 5 días).

Resultados SCFA

25 [0108] La cantidad total de SCFA en las heces se muestra en más abajo en la tabla 5.

[0109] El porcentaje de SCFA diferente de SCFA total se muestran en la tabla 6. No hay diferencias estadísticamente significativas encontradas en la concentración SCFA total entre los grupos de fórmula.

30 También la cantidad de SCFA es comparable a la de los otros grupos de alimentación. Sin embargo, ya tras 10 días, pueden verse las diferencias en los perfiles SCFA entre bebés alimentados con OSF o leche materna en comparación con bebés alimentados con la fórmula estándar. Bebés alimentados con la fórmula que contiene GOS y polifruktosa y alimentados con leche materna tienen porcentajes más altos de acetato y porcentajes inferiores de propionato, butirato, iC4-6 SCFA en comparación con bebés alimentados con la fórmula estándar.

35 Resultados de lactato

[0110] Las concentraciones de lactato (mmol/kg heces) de todos los grupos se muestran en la tabla 5. Ya a los 5 días de edad, el OS fórmula (no sign.) y los grupos de leche materna tienen cantidades más altas de lactato en comparación con el grupo de fórmula estándar.

40 La cantidad relativa de lactato (como un porcentaje de la suma de SCFA y lactato) es más alto en bebés amamantados y más bajo en los bebés alimentados con fórmula estándar. Bebés alimentados con una fórmula que contiene TOS/inulina tienen una cantidad relativa intermedia de acetato. El porcentaje de lactato en bebés alimentados con OSF a las 16 semanas (con respecto a ácidos totales) difiere significativamente del de bebés SF.

Tabla 5 - concentración de lactato y SCFA total (mmol/kg heces) y *Bifidobacteria* (\* $1,10^{13}$ /kg heces) pH entre el nacimiento y las 16 semanas de edad. Medio  $\pm$  SEM. Salvo pH, no se encontraron diferencias estadísticamente.

		Lactato	SCFA	pH	<i>Bifidobacteria</i>
5 días	SF	13,5±7,7	54,7±12,6	5,93±0,15	0,58±0,49
	OSF	10,7±4,3	56,5±7,7	5,49±0,15	1,20±2,24
	BF	13,3±2,8	48,7±4,4	5,27±0,07	0,47±0,39
10 días	SF	4,6±3,0	62,0±7,9	6,88±0,15	0,96±0,83
	OSF	9,7±3,6	62,3±7,2	5,95±0,20	1,10±0,99

	BF	15,1±3,2	54,7±4,9	5,35±0,07	0,48±0,61
4 semanas	SF	2,6±1,4	68,3±10,3	6,77±0,21	0,97±0,96
	OSF	9,9±3,4	83,1±8,8	<u>5,88±0,18*</u>	1,20±0,55
	BF	22,8±4,4	59,8±4,8	5,45±0,12	0,56±0,64
8 semanas	SF	7,6±6,8	76,5±13,2	6,80±0,20	0,89±0,56
	OSF	24,4±5,3	76,0±8,4	<u>5,68±0,18*</u>	1,00±0,52
	BF	30,9±5,3	62,8±5,4	5,27±0,15	0,58±0,59
12 semanas	SF	14,1±9,4	73,9±11,9	6,88±0,20	0,91±0,80
	OSF	18,4±7,0	76,1±12,1	<u>5,60±0,18*</u>	1,30±0,99
	BF	42,1±7,1	60,4±4,9	5,29±0,17	1,40±1,38
16 semanas	SF	1,7±1,2	68,6±14,0	7,09±0,15	1,00±0,80
	OSF	18,5±5,7	67,7±11,7	<u>5,60±0,20*</u>	1,30±0,76
	BF	45,1±9,0	59,2±6,9	5,68±0,24	0,89±0,78

Tabla 6 - cantidades relativas de SCFA (% de SCFA total), lactato (% de ácidos de total), % *Bifidobacteria* entre el nacimiento y las 16 semanas de edad.

Día / semana		Acetato	Propionato	Butirato	Suma iC4-C5	% <i>Bifidobacteria</i>	Lactato
5d	SF	84,3±3,4	12,9±3,2	1,7±0,5	1,1±0,4	45±3,6	13,8±18,5
	OS	85,8±5,1	12,0±4,7	0,5±0,5	1,7±0,7	50±8,6	8,7±13,3
	F						
	BF	89,5±1,8	7,0±1,5	1,6±0,4	2,0±0,4	54±4,1	12,5±14,0
10d	SF	70,9±2,0	21,3±2,6	4,6±1,1	3,2±0,5	65±6,0	4,3±10,8
	OS	<u>84±2,4*</u>	13,5±2,3	<u>1,4±0,4*</u>	1,1±0,4	61±6,3	8,2±9,8
	F						
	BF	89,3±1,9	5,8±1,3	2,3±0,3	2,6±0,4	42±4,1	13,4±13,8
4s	SF	71,8±2,8	17,8±3,3	5,0±1,1	5,5±2,6	52±5,4	6,9±16,4
	OS	77,7±2,2	15,4±2,0	5,8±2,2	1,1±0,3	71±4,5	8,4±10,7
	F						
	BF	91,0±1,8	4,3±1,2	2,6±0,6	2,1±0,4	47±5,4	19,6±17,0
8s	SF	74,6±2,9	16,4±2,0	6,1±1,2	2,9±0,7	50±6,3	3,5±9,9
	OS	83,5±2,7	11,4±2,1	3,7±1,2	1,4±0,4	64±4,1	17,7±15,2
	F						
	BF	91,2±1,6	5,4±1,4	1,9±0,5	1,6±0,3	41±4,5	21,7±13,4
12s	SF	73,9±2,9	17,8±3,3	5,0±1,1	3,2±0,5	56±5,4	5,4±11,9
	OS	86,5±2,1	11,2±1,8	<u>1,2±0,3*</u>	1,0±0,4	60±5,0	13,6±13,2
	F						
	BF	86,1±3,3	7,5±2,2	3,0±0,7	3,5±0,8	59±4,5	30,2±16,3
16s	SF	69,9±3,9	19,6±2,7	5,6±0,9	4,9±0,8	52±6,3	0,6±0,9
	OS	82,2±5,3	14,3±4,9	<u>2,1±0,5*</u>	<u>1,5±0,4*</u>	69±7,7	<u>16,4±12,0*</u>
	F						
	BF	89,7±2,7	6,4±2,1	1,6±0,4	2,2±0,5	47±6,3	35,6±20,4

P<0,05 en comparación con SF; SF = alimentado con fórmula estándar, OSF = SF suplementado con GOS+inulina; BF = amamantado.

[0111] Lo anterior demuestra que en heces de bebés alimentados con esta combinación de GOS y polifruktosa se baja el pH, que se forma más lactato, y que se forma un ácido (acetato y lactato) modelo que es más similar al de bebés amamantados y que este efecto no se pueden atribuir al aumento cuantitativo de Bifidobacteria.

5 Ejemplo 3 - efectos beneficiosos de la mezcla de lactato y SCFA en Muc-2. Expresión de PGE1 y PGE2.

### 3.1 Material y métodos

10 [0112] El efecto de lactato y una mezcla SCFA fue analizado como se describe en Willemsen, LEM, Koetsier MA, van Deventer SJH, van Tol EAF (2003), Gut 52:1442-1447, con las modificaciones siguientes: lactato y una mezcla de acetato/propionato/butirato 90/5/5 fueron evaluados.

Para los experimentos de producción mucosa se usó un co-cultivo de células CCD18 y T84, mientras que para los experimentos de producción PGE1 y PGE2 se usó un monocultivo de células CCD18.

15 3.2 Resultados

[0113] SCFA, en una mezcla de 90/5/5 (acetato/propionato/butirato), y dosis de IL-lactato induce dependientemente a la expresión MUC-2 en un co-cultivo de células CCD18 y T84 como se puede observar en la figura 4A.

20 También la concentración de PGE1 y PGE2 aumenta en células CCD18 como se puede observar en la figura 4B.

A concentraciones más altas de los ácidos orgánicos adicionados el aumento alcanza importancia estadísticamente.

Ejemplo 4: efecto de lactato en la contracción de colon

### 4.1 Material y métodos

25 [0114] Ratas Wistar macho (CKP/Harlan, Wageningen/Horst, Países Bajos) fueron alojadas bajo condiciones de temperatura controlada y ciclo ligero y se les proporcionó libre acceso a gránulos alimenticios y agua.

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de N<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub> e isoflurano, el abdomen fue abierto y el colon fue quitado inmediatamente.

30 El tejido fue colocado en tampón Krebs-Henseleit pH 7,4 (composición en mM: 118,0 NaCl, 4,75 KCl, 1,18 MgSO<sub>4</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa, 1,17 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 24,9 NaHCO<sub>3</sub>).

[0115] El colon fue cortado en una porción distal y proximal y fue enjuagado con un tampón Krebs-Henseleit mientras se extraía suavemente el contenido fecal.

35 Para aproximarse a condiciones *in vivo* tanto como fuera posible, segmentos completamente intactos de 1 cm fueron unidos longitudinalmente a un transductor de fuerza isométrica (F30 tipo 372, HSE, Alemania) en 20 ml baños de órgano cubierto de agua (37°C) (Schuler, HSE, Alemania) que contiene tampón Krebs-Henseleit gaseado continuamente con 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>.

40 Los segmentos fueron gradualmente estirados a una tensión de reposo de 1 g y se les permitió equilibrar durante 45 minutos con lavados intermitentes.

Las tensiones de los segmentos en el resto y en respuesta a estímulos diferentes fueron amplificadas por un módulo de amplificador de transductor (HSE; Alemania) y registrado en un registrador multi-pen (Rikadenki, HSE, Alemania).

45 [0116] Los segmentos fueron incubados con 40 mM KCl durante 5 minutos y las respuestas contráctiles fueron medidas.

KCl fue eliminado por tres lavados consecutivos a 5 minutos intervalos.

Los segmentos fueron luego incubados con concentraciones en aumento hasta 100 mM de acetato o L-lactato de sodio.

50 Las soluciones ácidas fueron preparadas de nuevo en el agua destilada.

NaOH se añadió a acetato para obtener un pH neutro.

Al final de la incubación con un ácido graso, 40 mM KCl se añadió para decidir si la respuesta contráctil a KCl estaba influida por el ácido graso.

Antes de una incubación nueva los segmentos se dejaron equilibrar durante 45 minutos en tampón Krebs-Henseleit nuevo con lavados intermitentes.

55 [0117] El protocolo experimental consistió en dos secciones proximales y dos secciones distales del colon.

Para análisis de datos (n=3), el nivel de contracción inducido por los estímulos fue definido como la tensión en g tras 5 minutos de incubación.

60 Datos obtenidos de segmentos idénticos (proximales o distales) fueron usados para calcular un valor medio y cada segmento sirvió como su propia muestra de control.

### 4.2 Resultados

65 [0118] Como se puede observar en la figura 5, acetato sódico y especialmente sodio-L-lactato reducen la tensión de contracciones tónicas.

Los efectos de relajación son más altos en la parte distal del colon que en la parte proximal del colon.

[0119] También el número de contracciones espontáneas, las contracciones fásicas, disminuyen en la parte proximal del colon tras la adición del acetato de sodio y de sodio-L-lactato, mientras que no se observan efectos en la parte distal del colon.

5

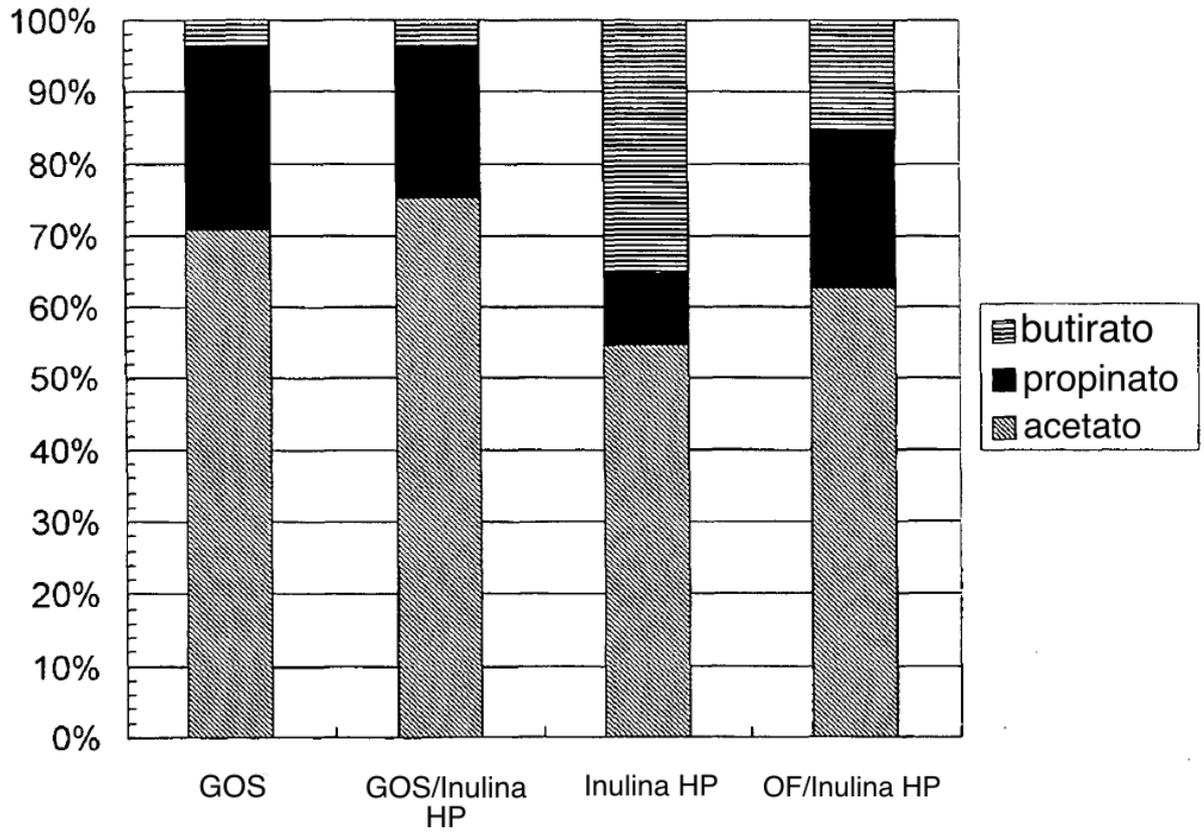
[0120] En la parte proximal del colon las contracciones tónicas como una respuesta a KCl, sin embargo, son comparables en presencia o ausencia de 25 mM de acetato de sodio o L-lactato de sodio. A concentraciones más altas una relajación significativa es observada incluso tras la adición de KCl.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de galacto-oligosacáridos y polifruetosa para la producción de una composición para el tratamiento o prevención de dolor abdominal debido a contracciones espontáneas y tensión en los músculos del colon.
2. Uso según la reivindicación 1, donde la cantidad de galacto-oligosacáridos:polifruetosa tiene una proporción de 3:97 a 97:3.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1 o 2, donde el galacto-oligosacárido es transgalacto-oligosacárido y/o la polifruetosa es inulina.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la polifruetosa es inulina con un grado medio de polimerización de 20 o mayor.
- 15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la dosis diaria de galacto-oligosacáridos y polifruetosa varía de aproximadamente 1 a 30 g/día, preferiblemente de aproximadamente 2 a 10 g/día para bebés.
- 20 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición es una composición alimenticia o una composición de suplemento alimenticio.
7. Uso según la reivindicación 6, donde la composición comprende además proteínas, lípidos, y carbohidratos diferentes de los galacto-oligosacáridos y la polifruetosa.
- 25 8. Uso según la reivindicación 6 o 7, donde la composición es alimento de bebé, alimento infantil o alimento de niño.
9. Uso según la reivindicación 8, donde la composición es una fórmula infantil o fórmula de continuación.
- 30 10. Uso según la reivindicación 9, donde el volumen de la composición administrado a diario está en el rango de aproximadamente 450 a 1000 ml.
11. Uso según la reivindicación 9 o 10, donde la composición es un alimento infantil donde las proteínas son extensivamente hidrolizadas y/o parcialmente hidrolizadas.
- 35 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-11, donde la composición comprende al menos 4 g/l de una mezcla de galacto-oligosacáridos y polifruetosa.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición comprende además lactato.
- 40 14. Composición que comprende galacto-oligosacáridos y polifruetosa para su uso en el tratamiento o prevención de dolor abdominal debido a contracciones espontáneas y tensión en los músculos del colon.
15. Composición para su uso según la reivindicación 14 que comprende además lactato.

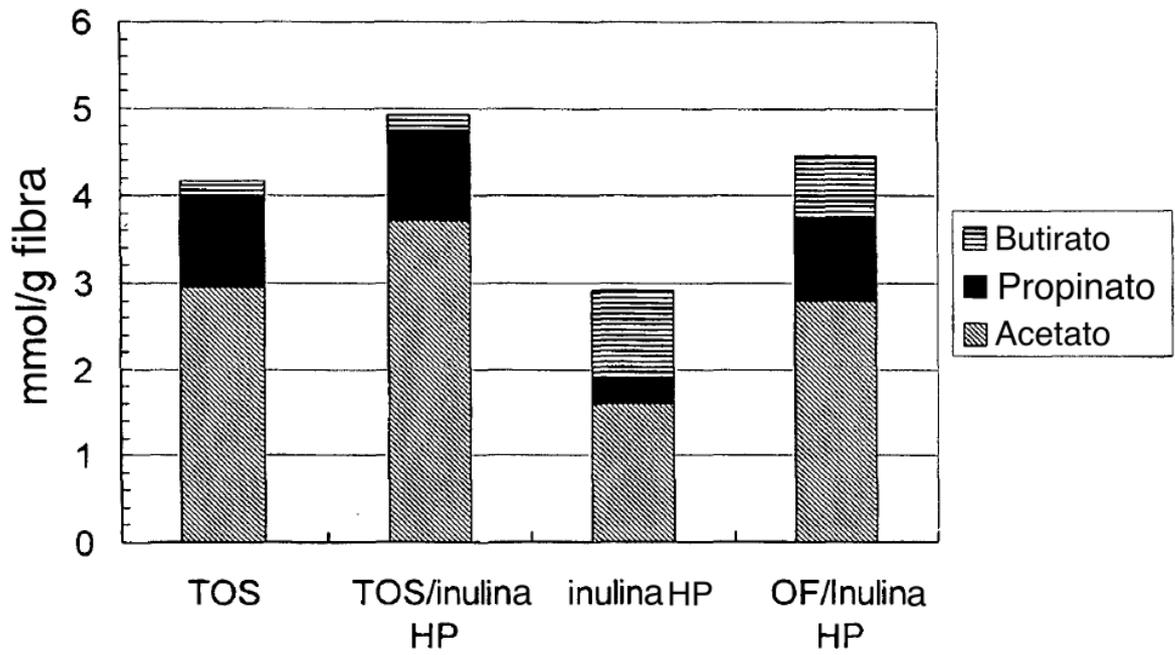
Fig 1

Patrón de formación de SCFA



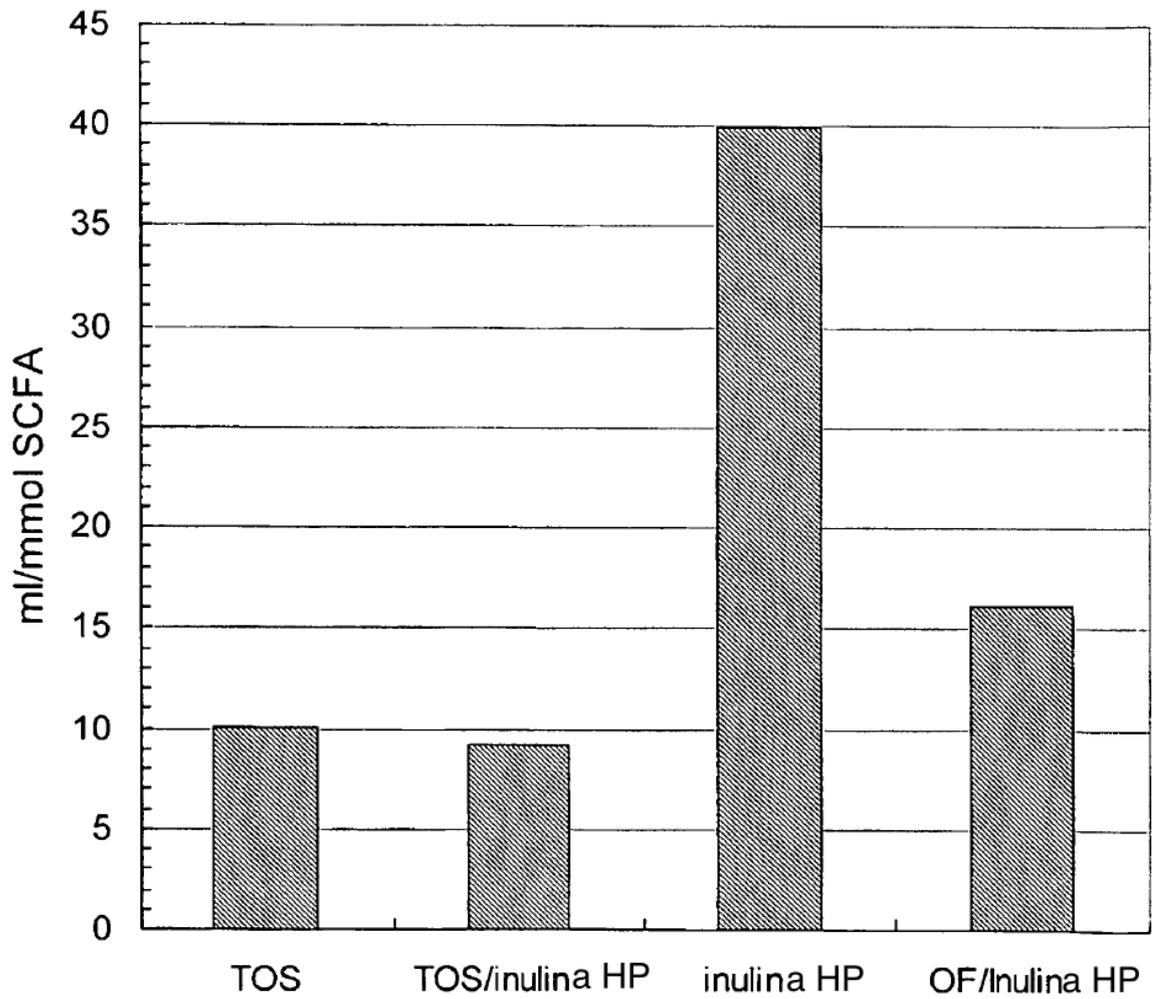
*Fig 2*

Formación de SCFA



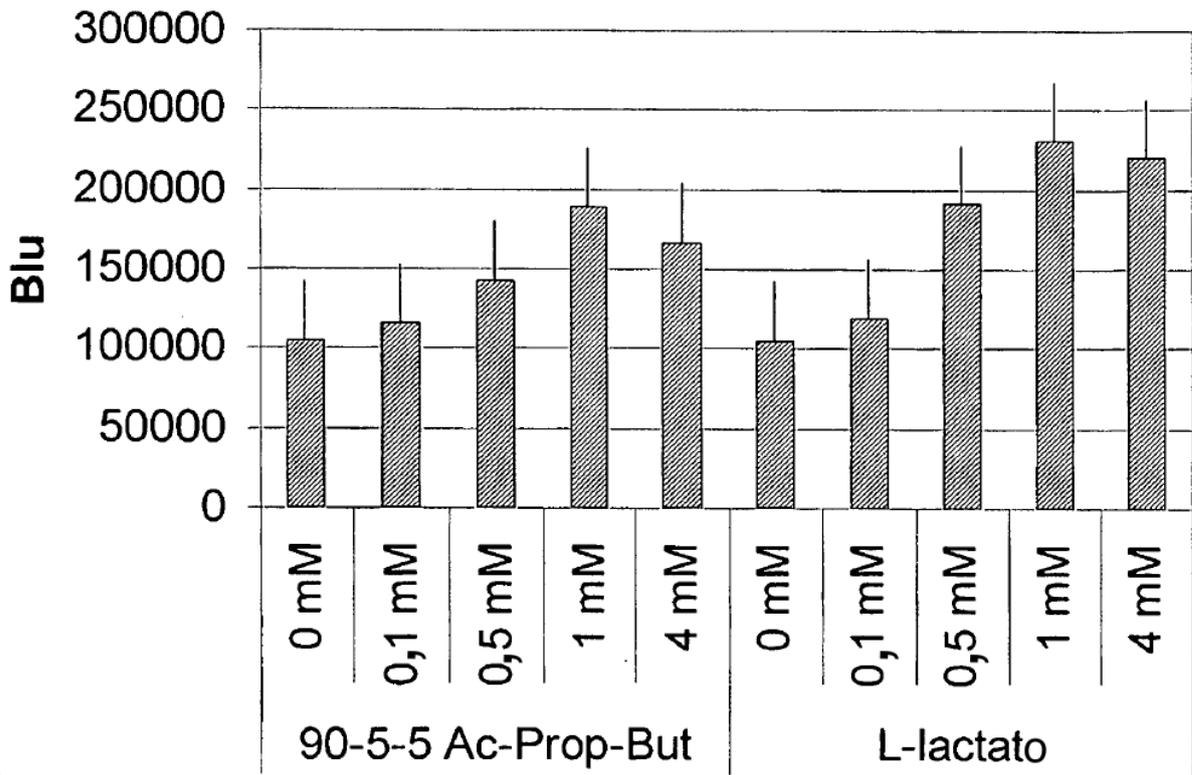
*Fig 3*

Formación de gas



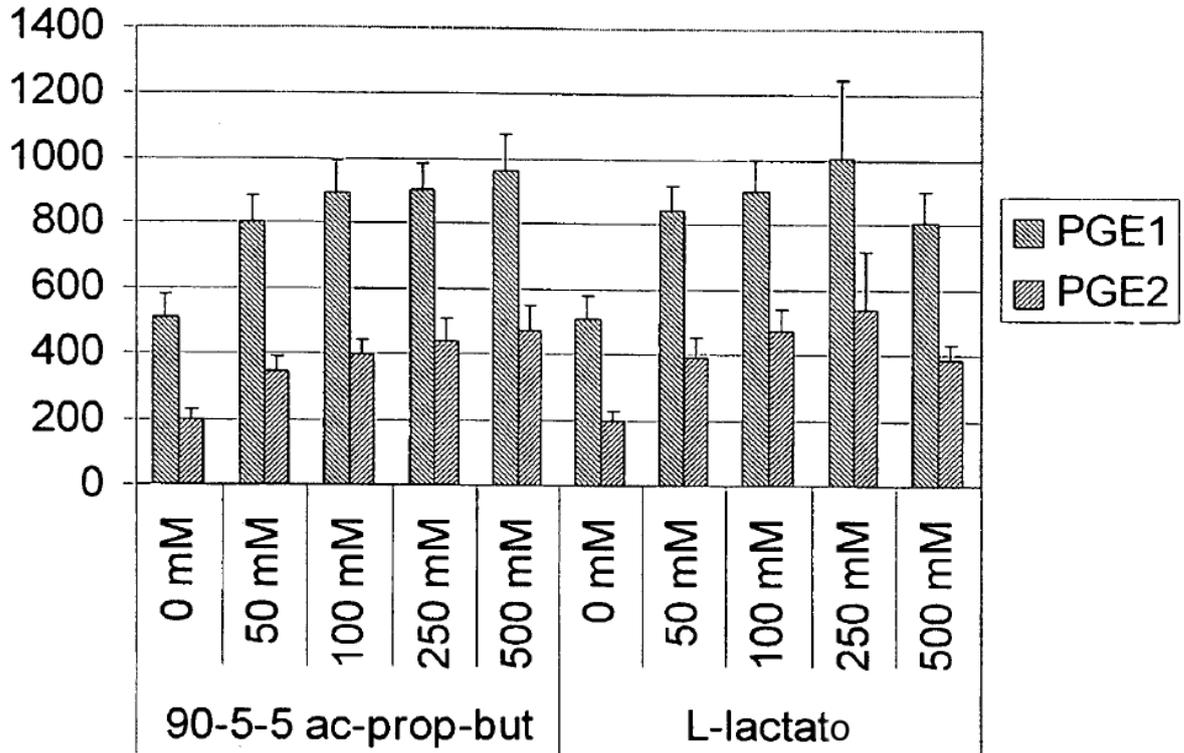
*Fig 4a*

**A: Expresión mucosa**

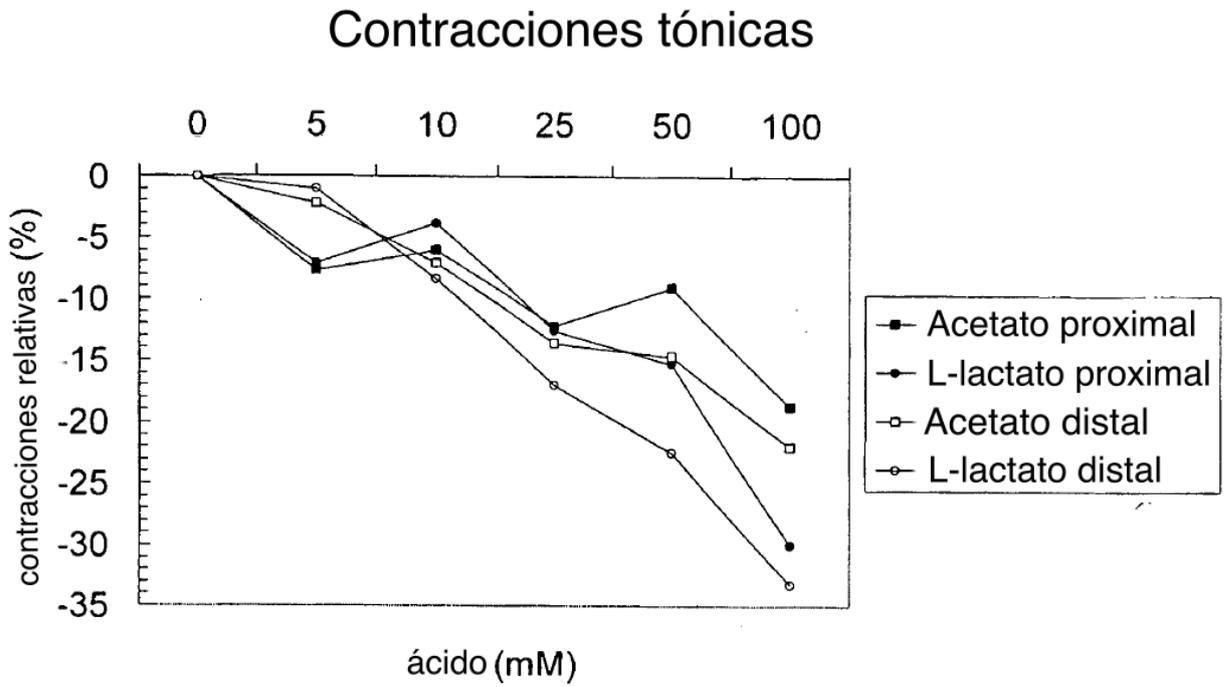


*Fig 4b*

**B: Síntesis de PGE**



*Fig 5*



Á