

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 260**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/702</b>	(2006.01)	<b>A23L 33/21</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/7016</b>	(2006.01)	<b>C12N 1/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/74</b>	(2015.01)	<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/741</b>	(2015.01)	<b>A61P 37/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/745</b>	(2015.01)		
<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/01</b>	(2006.01)		
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)		
<b>A23L 33/00</b>	(2006.01)		
<b>A23L 33/18</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2011 PCT/EP2011/070562**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012 WO2012076322**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2011 E 11784694 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2643005**

54 Título: **Composición que comprende proteínas hidrolizadas y oligosacáridos para tratar enfermedades de la piel**

30 Prioridad:

**23.11.2010 EP 10192229**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.06.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SPRENGER, NORBERT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 620 260 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**

Composición que comprende proteínas hidrolizadas y oligosacáridos para tratar enfermedades de la piel

5 La presente invención se refiere a una composición para prevenir y/o tratar enfermedades de la piel, por ejemplo en la promoción de la salud cutánea y en afecciones de la piel, en particular la dermatitis atópica, tal como se especifica en las reivindicaciones.

10 Antecedentes de la presente invención

10 La dermatitis atópica es una afección crónica de la piel que causa prurito y es frecuente en los niños, aunque puede aparecer a cualquier edad. También se conoce como eccema o eccema atópico. En el grupo de edad de los niños pequeños hay una fuerte relación entre las alergias alimentarias y la dermatitis atópica, y en los niños afectados de dermatitis atópica suele sospecharse la existencia de alergias alimentarias.

15 La dermatitis atópica suele darse en gente que tiene una tendencia atópica, es decir, que puede desarrollar una de estas tres enfermedades estrechamente vinculadas o todas ellas: dermatitis atópica, asma y fiebre del heno (rinitis alérgica).

20 Uno de los síntomas de la dermatitis atópica es el siguiente: inflamación de zonas de piel sensible en forma de erupción, como respuesta a ciertos desencadenantes que pueden variar entre personas. En el caso de los bebés y de los niños pequeños la lista de desencadenantes frecuentes a tener en cuenta incluye la leche de vaca y otros posibles ingredientes de las fórmulas infantiles como el trigo o la soja. La dermatitis atópica se puede convertir en un círculo vicioso. Algo irrita la piel del niño, enrojeciéndola e inflamándola, lo cual produce picor, entonces el niño se rasca y la piel se inflama aún más. Se pierde la capa externa que protege la piel y la zona afectada se vuelve más sensible a los irritantes y se seca con facilidad. El niño sigue expuesto a lo que fuera que desencadenó estos episodios en primer lugar. La erupción continúa desarrollándose y el ciclo se perpetúa.

30 No existe ninguna causa única de la dermatitis atópica. Probablemente refleja más de un trastorno. Hay muchas teorías sobre los mecanismos subyacentes. La investigación actual estudia el papel de las mutaciones del gen de la filagrina, los defectos en las células cutáneas (queratinocitos), el sistema inmunitario, los microbios en la superficie de la piel (bacterias, virus y levaduras) y muchos otros factores.

35 Todos los trastornos y enfermedades de la piel pueden afectar a la población en general, a la población de personas en riesgo de tener alergias o a la población de personas alérgicas (es decir enfermas).

40 Estos trastornos y enfermedades de la piel, y en particular la dermatitis atópica, tienen una importancia especial en los bebés o niños pequeños, pues tienen una piel sensible que experimenta un crecimiento intenso y fases de multiplicación, lo cual la hace más sensible a las enfermedades cutáneas. La población de niños que no tienen un historial familiar de alergias, pero que se vuelven alérgicos está aumentando.

45 Los alimentos hipoalérgicos son un tipo de comida que improbablemente causa reacciones alérgicas. Los alimentos hipoalérgicos han sido desarrollados en parte para las fórmulas infantiles, porque cada vez es más probable que los bebés y los niños pequeños puedan desarrollar una alergia en los primeros meses/años de su vida.

50 La leche materna humana es la referencia indiscutible en cuanto a nutrición infantil. Las fórmulas infantiles que sirven de sustituto o complemento de la leche materna humana deberían satisfacer las necesidades nutricionales de los niños, tener un sabor aceptable y ser hipoalérgicas y tolerogénicas (es decir, capaces de inducir tolerancia oral) en caso de ir destinadas a niños en riesgo de padecer alergias. En la patente EP0827697 se ha descrito la inducción de tolerancia oral a la leche de vaca. Es sabido que las alergias a la leche de vaca y a las fórmulas infantiles que contienen proteína de leche de vaca son debidas a que las proteínas de la leche de vaca difieren de las proteínas de la leche materna y pueden constituir alérgenos para los humanos. Los alérgenos de la leche de vaca principalmente reconocidos son la alfa-lactoalbúmina (aLA), la beta-lactoalbúmina (bLG) y la albúmina de suero bovino (BSA). La proteína de suero de leche bovino y/o la caseína se usan a menudo como fuente de proteína láctea en las fórmulas infantiles. Para disminuir su alergenicidad, las proteínas de la leche de vaca se hidrolizan con enzimas y por tanto se reducen a péptidos. Las actuales fórmulas hipoalérgicas que pretenden prevenir alergias, compuestas por dichas proteínas de leche de vaca hidrolizadas, también llevan otros nutrientes, como por ejemplo aceites animales, aceites vegetales, almidón, maltodextrina, lactosa y sacarosa. Estos hidrolizados proteicos también se pueden incorporar a una bebida láctea para adultos o a suplementos alimenticios. Las fórmulas infantiles hipoalérgicas tienen la desventaja de que su coste es muy superior al coste de las fórmulas habituales a base de leche de vaca.

60 No obstante aún existe la necesidad de fórmulas infantiles hipoalérgicas para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades cutáneas que pueden desarrollar los bebés e incluso los niños pequeños, entre ellas la dermatitis atópica.

65

Los oligosacáridos de la leche humana (HMOs) son en conjunto el tercer mayor componente sólido de la leche humana, tras la lactosa y la grasa. El HMO consta normalmente de lactosa en el extremo reductor, con un núcleo de carbohidrato que suele contener una fucosa o un ácido siálico en el extremo no reductor. Son aproximadamente cien los oligosacáridos de la leche que han sido aislados e identificados, pero estos representan solo una porción muy pequeña del número total que queda por caracterizar.

Anteriormente las fórmulas infantiles se desarrollaron empleando ingredientes HMO tales como oligosacáridos fucosilados, lacto-N-tetraosa, lacto-N-neotetraosa u oligosacáridos sializados, con distintos fines.

La patente EP 0 7 235 B1, de los Laboratorios Abbott, describe una composición nutricional sintética que comprende uno o más oligosacáridos, cuyos HMOs se seleccionan entre un grupo de ocho HMOs (3-fucosil-lactosa, lacto-N-fucopentaosa III, lacto-N-fucopentaosa II, difucosil-lactosa, 2'-fucosil-lactosa, lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-neotetraosa y lacto-N-fucopentaosa V), y que está pensada para casos de bebés, niños o adultos normales y sanos o para sujetos que tienen necesidades especiales como las concomitantes de ciertos estados patológicos. Esta patente europea afirma que, hablando generalmente, los oligosacáridos protegen a los niños de infecciones víricas y bacterianas del tracto respiratorio, gastrointestinal y uro-genital. No se menciona nada respecto al problema de la dermatitis atópica ni de manera más general la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cutáneas.

Heine R G y otros (Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, Rapid Science Publishers [*Opinión actual sobre nutrición clínica y problemas metabólicos*], Londres (GB), vol 11, nº 3, páginas 320-328, ISSN: 1363-1950) ofrece un método dietético para prevenir alergias alimentarias.

De lo anteriormente expuesto se puede ver que hay necesidad de una composición nutricional efectiva para prevenir la dermatitis atópica secundaria o favorecer la salud de la piel, particularmente en bebés y niños pequeños, que se pueda administrar de manera conveniente y segura.

Existe la necesidad de mejorar las afecciones o enfermedades cutáneas, como la dermatitis atópica, mediante una intervención no basada en fármacos que sea compatible con sujetos delicados como los bebés y niños pequeños.

Se necesita un efecto duradero en la reducción de la frecuencia, incidencia, gravedad y/o duración de dichas afecciones o enfermedades cutáneas. También se necesita un efecto que pueda medirse "más adelante en la vida", sobre todo algunos años después de la intervención.

Se necesita una intervención alimentaria para bebés y niños pequeños, orientada o no a los riesgos de alergia, que induzca una disminución de las manifestaciones alérgicas, especialmente en la piel.

Se necesita una intervención como esta, que induzca el mantenimiento o la mejora de la salud de la piel.

Resumen de la presente invención

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la administración de una mezcla de oligosacáridos humanos específicos junto con proteínas hidrolizadas específicas es particularmente efectiva para prevenir y/o tratar afecciones o enfermedades cutáneas y en concreto para prevenir y/o tratar la dermatitis atópica y favorecer la salud de la piel.

Conforme a ello la presente invención ofrece una composición para prevenir y/o tratar enfermedades cutáneas; dicha composición nutricional comprende al menos una N-acetil lactosamina, al menos un oligosacárido sializado y al menos un oligosacárido fucosilado, y un hidrolizado de proteínas parcial y/o extensamente hidrolizadas, tal como se especifica en las reivindicaciones.

La composición es una composición nutricional sintética. La composición comprende tres tipos diferentes de usos como composición nutricional sintética. En el primer caso los sujetos, y en concreto los niños, son sanos y sin ningún riesgo de padecer alergias, debido a la ausencia de un historial familiar de ellas. En el segundo caso los sujetos, y en concreto los niños, son sanos pero tienen riesgo de padecer alergias, teniendo en cuenta la existencia de un historial de alergias en la familia. En el tercer caso los sujetos, y en concreto los niños, son alérgicos y por lo tanto enfermos. El segundo y tercer caso son los objetivos preferidos de acuerdo con la presente invención; el tercer caso es un objetivo aún más preferente.

Los aspectos no comprendidos en el ámbito de las reivindicaciones no forman parte de lo reclamado por la presente invención.

Descripción detallada de la presente invención

Tal como se usan aquí, los términos siguientes tienen los significados siguientes.

El término “bebé” significa un niño de edad inferior a los 12 meses.

El término “niño pequeño” significa un niño de edad comprendida entre uno y tres años.

5 El término “fórmula infantil” significa un producto alimenticio pensado para la nutrición especial de los bebés durante los primeros cuatro hasta seis meses de vida, que satisface por sí solo las necesidades nutricionales de esta clase de persona (artículo 1.2 de la directiva 91/321/EEC de la Comisión europea, de 14 de mayo de 1991, sobre fórmulas infantiles y fórmulas de seguimiento).

10 El término “fórmula de seguimiento” significa un producto alimenticio pensado para la nutrición particular de niños con edad superior a los cuatro meses, que constituye el elemento líquido principal en la dieta gradualmente diversificada de esta clase de persona.

15 El término “fórmula infantil inicial” significa un producto alimenticio pensado para la nutrición particular de los bebés durante los primeros cuatro meses de vida.

El término “comida para bebés” significa un producto alimenticio pensado para la nutrición particular de los niños durante los primeros años de vida.

20 El término “composición infantil de cereales” significa un producto alimenticio pensado para la nutrición particular de los niños durante los primeros años de vida.

El término “leche de crecimiento” significa una bebida láctea adaptada a las necesidades nutricionales concretas de los niños pequeños.

25 El término “periodo de destete” significa el periodo durante el cual la leche materna es sustituida por otro alimento en la dieta de un niño.

30 El término “enfermedad cutánea” significa dermatitis atópica y otros problemas relacionados con la piel. El eccema es una dermatitis atópica.

El término “prevención y/o tratamiento de enfermedades cutáneas” se refiere a la prevención y disminución de la frecuencia y/o incidencia y/o gravedad y/o duración de las enfermedades cutáneas, es decir de la dermatitis atópica y otros problemas relacionados con la piel, en particular la dermatitis atópica. La incidencia está relacionada con el número de cualquier enfermedad cutánea. La frecuencia está relacionada con la misma enfermedad cutánea. Esta prevención incluye la reducción de la frecuencia y/o de la gravedad de dichas enfermedades cutáneas más adelante en la vida. El término “más adelante en la vida” incluye el efecto posterior a la intervención. El efecto “más adelante en la vida” se puede referir preferiblemente a 2 hasta 4 semanas, 2 hasta 12 meses o años (p.ej. 2, 5, 10 años) una vez terminada dicha intervención.

40 El término “afecciones de la piel” se refiere a los trastornos irritantes, obstructivos o inflamatorios de la piel. Las afecciones de la piel pueden causar síntomas de enfermedades cutáneas tales como enrojecimiento, hinchazón, quemazón y prurito.

45 El término “prevención y/o tratamiento de afecciones cutáneas” se refiere a la promoción de la salud cutánea y/o a la prevención de la deshidratación de la piel y/o al incremento de la hidratación de la piel y/o a la reducción de las erupciones, rugosidades y/o sequedad de la piel. Esta prevención incluye además el establecimiento de un fenotipo, visible u oculto, concomitante con la disminución de la frecuencia, incidencia, gravedad y/o duración de dichas afecciones cutáneas más adelante en la vida.

50 El término “aumento de la tolerancia oral a los alérgenos” significa la reducción de la sensibilidad a los alérgenos, cuando se toma por vía oral.

55 El término “composición nutricional” se refiere a una composición que nutre a un sujeto. Esta composición nutricional es para tomar normalmente por vía oral o para administrar por vía intravenosa, y habitualmente incluye una fuente de lípidos o grasas y una fuente de proteínas.

60 El término “mezcla sintética” significa una mezcla obtenida por medios químicos y/o biológicos, la cual puede ser químicamente idéntica a la mezcla de origen natural en las leches de los mamíferos. Se dice que una composición es sintética siempre que al menos uno de sus componentes se haya obtenido por medios químicos y/o biológicos (p.ej. enzimáticos).

65 El término “composición nutricional hipoalérgica” significa una composición nutricional que improbablemente puede causar reacciones alérgicas.

El término "oligosacárido sializado" significa un oligosacárido que tiene un resto de ácido siálico.

El término "oligosacárido fucosilado" significa un oligosacárido que tiene un resto de fucosa.

5 El término "prebiótico" se refiere a carbohidratos no digeribles que benefician al huésped estimulando de manera selectiva el crecimiento y/o la actividad de bacterias saludables tales como las bifidobacterias en el colon de los humanos (Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics [*Modulación dietética de la microbiota colónica humana: introducción del concepto de prebióticos*]. J Nutr. 995;125:1401-12).

10 El término "probiótico" se refiere a preparados celulares microbianos o componentes de células microbianas que tienen un efecto beneficioso en la salud o bienestar del huésped. (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. y otros, "Probiotics: how should they be defined" [*Probióticos: cómo deberían definirse*], Trends Food Sci. Technol. 1999;10 107-10).

15 Una "alergia" es aquella que ha sido detectada por un médico y que se puede tratar ocasionalmente o de manera más duradera. También se podría calificar de "alergia declarada".

20 Todos los porcentajes están expresados en peso, a no ser que se indique lo contrario.

La composición según la presente invención es normalmente hipoalérgica.

Dicha composición contiene al menos una N-acetil-lactosamina. Es decir, contiene N-acetil-lactosamina y/o un oligosacárido que contiene N-acetil-lactosamina, elegido entre lacto-N-tetraosa (LNT) y lacto-N-neotetraosa (LNnT).

25 Así, de acuerdo con la presente invención, la N-acetil-lactosamina se elige del grupo formado por lacto-N-tetraosa (LNT) y lacto-N-neotetraosa (LNnT).

30 La LNT y la LNnT se pueden sintetizar químicamente por transferencia enzimática de unidades sacáridas desde fragmentos donantes hasta fragmentos aceptores, usando glicosiltransferasas tal como se describe, por ejemplo, en las patentes US nº 5,288,637 y WO 96/10086. Como alternativa la LNT y la LNnT se pueden preparar convirtiendo químicamente ceto-hexosas (p.ej. fructosa), libres o unidas a un oligosacárido, en N-acetil-hexosamina o en un oligosacárido que contenga N-acetil-hexosamina, como se describe en Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) Angew. Chem. Int. Ed. 38:827-828. La N-acetil-lactosamina producida de esta manera se puede transferir luego a lactosa como fragmento aceptor.

35 La composición según la presente invención contiene preferiblemente de 0,1 a 3 g de N-acetil-lactosamina lactosa(s) por 100 g de composición, tomando como base el peso seco.

40 Según la presente invención, el oligosacárido sializado se elige del grupo formado por 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa. Tanto la 3'-sialil-lactosa como la 6'-sialil-lactosa están preferiblemente presentes en dicha composición. En esta forma de ejecución la relación entre 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa está comprendida preferiblemente entre 5:1 y 1:2.

45 Las formas 3'- y 6'- de sialil-lactosa se pueden aislar mediante tecnología cromatográfica o de filtración a partir de una fuente natural como la leche de animales. Alternativamente se pueden producir por medios biotecnológicos, usando sialiltransferasas o sialidasas o neuraminidasas específicas, bien por tecnología de fermentación enzimática (con enzimas recombinantes o naturales) o por síntesis química o tecnología de fermentación microbiana. En este último caso los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales, o bien se pueden diseñar mediante ingeniería genética para producir los correspondientes sustratos y enzimas. Se pueden usar cultivos microbianos simples o mixtos. La formación de sialil-oligosacáridos se puede iniciar mediante sustratos aceptores, partiendo de cualquier grado de polimerización (DP), desde DP = 1 en adelante. Alternativamente las sialil-lactosas se pueden producir por síntesis química a partir de lactosa y ácido N'-acetilneuramínico (ácido siálico) libre. Las sialil-lactosas también están disponibles en el comercio, por ejemplo de Kyowa Hakko Kogyo, Japón.

50 La composición según la presente invención contiene preferiblemente de 0,05 a 2 g, con mayor preferencia de 0,1 a 2 g, de oligosacárido(s) sializado(s) por 100 g de composición, tomando como base el peso seco.

60 El oligosacárido fucosilado se elige del grupo formado por 2'-fucosil-lactosa, 3-fucosil-lactosa, difucosil-lactosa, lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-fucopentaosa II, lacto-N-fucopentaosa III y lacto-N-fucopentaosa V, lacto-N-difucohexaosa I, fucosil-lacto-N-hexaosa, difucosil-lacto-N-hexaosa I y difucosil-lacto-N-neohexaosa II. Un oligosacárido fucosilado particularmente preferido es la 2'-fucosil-lactosa (2'-FL).

65 El oligosacárido fucosilado se puede aislar mediante tecnología cromatográfica o de filtración a partir de una fuente natural como la leche de animales. Alternativamente se puede producir por medios biotecnológicos, empleando

- fucosil-transferasas específicas y/o fucosidasa, bien por tecnología de fermentación enzimática (con enzimas recombinantes o naturales) o por síntesis química o tecnología de fermentación microbiana. En este último caso los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales, o bien se pueden diseñar mediante ingeniería genética para producir los correspondientes sustratos y enzimas. Se pueden usar cultivos microbianos simples o mixtos. La formación de oligosacáridos fucosilados se puede iniciar mediante sustratos aceptores, partiendo de cualquier grado de polimerización (DP), desde DP = 1 en adelante. Alternativamente los oligosacáridos fucosilados se pueden producir por síntesis química a partir de lactosa y de fucosa libre. Los oligosacáridos fucosilados también están disponibles en el comercio, por ejemplo de Kyowa Hakko Kogyo, Japón.
- 5
- 10 La composición según la presente invención contiene preferiblemente de 0,1 a 3 g, de oligosacárido(s) fucosilado(s) por 100 g de composición, tomando como base el peso seco.
- En una forma de ejecución preferida, la composición según la presente invención contiene de 0,05 hasta 3 g de la cantidad total de lactosamina(s) N-acetilada(s), oligosacárido(s) sializado(s) y oligosacárido(s) fucosilado(s) respecto a 100 g de composición.
- 15
- La composición según la presente invención contiene proteínas parcial y/o extensamente hidrolizadas.
- Es muy aconsejable aportar proteínas parcial y/o extensamente hidrolizadas, en particular para bebés que tengan supuestamente el riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca. El proceso de hidrólisis para la elaboración de las proteínas parcial y/o extensamente hidrolizadas en el hidrolizado de la presente invención se puede llevar a cabo como se desee y es conocido del estado técnico.
- 20
- El hidrolizado de la presente invención está hecho normalmente de proteínas parcial o extensamente hidrolizadas, pero el hidrolizado de la presente invención también puede comprender una mezcla de proteínas parcialmente hidrolizadas y proteínas extensamente hidrolizadas.
- 25
- Las proteínas hidrolizadas se pueden caracterizar como "parcialmente hidrolizadas" o "extensamente hidrolizadas", dependiendo del grado al que se lleve a cabo la reacción de hidrólisis. Actualmente no hay ninguna definición legal/clínica aprobada de productos extensamente hidrolizados conforme a las directrices de la WAO (Organización mundial de alergia) para la alergia a la proteína de leche de vaca (ALV), pero se reconoce que según la WAO las fórmulas hidrolizadas han resultado ser una fuente proteica útil, usada en general para bebés que sufren ALV. En la presente invención son proteínas parcialmente hidrolizadas aquellas en que el 60-70% de la población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular inferior a 1000 Daltons, mientras que proteínas extensamente hidrolizadas son aquellas en que al menos el 95% de la población de proteínas/péptidos tiene un peso molecular inferior a 1000 Daltons. Estas definiciones se emplean hoy en día en la industria. Las proteínas parcialmente hidrolizadas suelen considerarse hipoalérgicas (HA), mientras que proteínas extensamente hidrolizadas se consideran normalmente no alérgicas.
- 30
- 35
- 40 El hidrolizado de la presente invención comprende proteínas hidrolizadas que tienen entre el 10% y el 100%, y con mayor preferencia entre el 15% y el 95%, de su población de proteínas/péptidos con un peso molecular inferior a 1000 Daltons.
- El hidrolizado de la presente invención puede tener un grado de hidrólisis caracterizado por el % de NPN/TN. El nitrógeno no proteico sobre nitrógeno total se utiliza en general como medida de los péptidos solubles producidos por la hidrólisis enzimática. % de NPN/TN significa nitrógeno no proteico dividido por nitrógeno total x 100. El % de NPN/TN se puede medir del modo detallado en Adler-Nissen J., 1979, J. Agric. Food Chem., 27 (6), 1256-1262. En general las proteínas extensamente hidrolizadas se caracterizan por tener un % de NPN/TN superior al 95%, mientras que las proteínas parcialmente hidrolizadas tienen un % de NPN/TN comprendido en el intervalo del 75%-85%. En una forma de ejecución preferida, las proteínas hidrolizadas de la presente invención tienen un % de NPN/TN comprendido en el intervalo del 70-90%, preferiblemente del 75 hasta el 85%. Estas últimas son proteínas "parcialmente" hidrolizadas. Las proteínas hidrolizadas también pueden caracterizarse por tener un 60-70% de su población de proteínas/péptidos con un peso molecular inferior a 1000 Daltons.
- 45
- 50
- 55 Según la presente invención, el grado de hidrólisis de las proteínas hidrolizadas está comprendido en el intervalo del 50 al 100 y preferiblemente del 65 al 99% de NPN/TN.
- Según otra forma de ejecución preferida, cuando se desean proteínas "extensamente" hidrolizadas, el hidrolizado de la presente invención tiene un % de NPN/TN en el intervalo superior al 95%. Este hidrolizado también se puede caracterizar porque al menos el 95% de su población de proteínas/péptidos con un peso molecular inferior a 1000 Daltons.
- 60
- El grado de hidrólisis también se puede medir empleando un reactivo tal como el ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), el cual reacciona con lisina libre. El % de nitrógeno amínico (lisina) que reacciona con TNBS / el TN de las

proteínas hidrolizadas de acuerdo con la presente invención suele estar comprendido en el intervalo del 8-15%, preferiblemente del 9-14%.

5 La composición de la presente invención puede llevar asimismo una cepa bacteriana probiótica, preferiblemente de la clase de las bifidobacterias y/o de los lactobacilos.

10 Como cepas bacterianas probióticas son adecuadas el *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, suministrado por Valio Oy de Finlandia con la marca comercial LGG, el *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, el *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116, el *Lactobacillus reuteri*, que vende BioGaia A.B con la marca comercial Reuteri, el *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225, el *Streptococcus salivarius* DSM 13084, que vende BLIS Technologies Limited de Nueva Zelanda con la denominación KI2, el *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446, que vende entre otros la compañía Christian Hansen de Dinamarca con la marca comercial Bb 12, el *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, que vende Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón con la marca comercial BB536, el *Bifidobacterium breve*, que vende Danisco con la marca comercial Bb-03, el *Bifidobacterium breve*, que vende Morinaga con la marca comercial M-16V, el *Bifidobacterium infantis*, que vende Procter & Gamble Co. con la marca comercial Bifantis y el *Bifidobacterium breve*, que vende el Institut Rosell (Lallemand) con la marca comercial R0070.

20 La composición según la presente invención contiene preferiblemente  $10^3$  hasta  $10^{12}$  ufc de cepas bacterianas probióticas, con mayor preferencia entre  $10^7$  y  $10^{12}$  ufc, por g de composición, tomando como base el peso seco.

Además la composición de la presente invención puede contener al menos un prebiótico, normalmente en una proporción comprendida entre el 0,3 y el 10% en peso de la composición.

25 En general los prebióticos no son digeribles, es decir, no son descompuestos ni absorbidos en el estómago ni en el intestino delgado y por tanto permanecen intactos al pasar hacia el colon, donde son fermentados selectivamente por las bacterias beneficiosas. Como ejemplos de prebióticos cabe mencionar algunos oligosacáridos, tales como los fructo-oligosacáridos (FOS) y los galacto-oligosacáridos (GOS). Se puede usar una combinación de prebióticos tal como 90% de GOS con 10% de fructo-oligosacáridos de cadena corta, como en el producto BENE0-Orafti, vendido con la marca comercial Orafti® oligofruktosa (anteriormente Raftilose®), o con 10% de inulina, como en el producto BENE0-Orafti vendido con la marca comercial Orafti® inulina (anteriormente Raftiline®). Una combinación de prebióticos especialmente preferida lleva 70% de fructo-oligosacáridos de cadena corta y 30% de inulina, que es un producto vendido por BENE0-Orafti con la marca comercial "Prebio 1".

35 La composición según la presente invención es preferiblemente una composición nutricional sintética. En este caso puede ser una fórmula infantil inicial, una fórmula infantil, una comida para bebés, una composición de cereales para niños, una fórmula de seguimiento o una leche de crecimiento, y dicha composición es preferiblemente una fórmula infantil inicial.

40 Según una forma de ejecución preferida, la composición según la presente invención está destinada a los bebés y niños pequeños que sufren alergias, en particular alergias alimentarias. En una forma de ejecución, los bebés y los niños pequeños que han sido diagnosticados de afección o patología alérgica o de estado alérgico. En una forma de ejecución, las composiciones y aplicaciones según la presente invención son especialmente adecuadas para bebés y niños en riesgo de padecer alergias, que tengan un historial familiar de alergias o que ya hayan experimentado algunos episodios de alergias (sobre todo alergias respiratorias o alergias cutáneas). En una forma de ejecución, las composiciones y aplicaciones de la presente invención van dirigidas a adolescentes o adultos en riesgo de padecer alergias o que tienen episodios de alergias (sobre todo alergias respiratorias o alergias cutáneas).

La composición según la presente invención se puede usar antes de un periodo de destete y/o durante el mismo.

50 Por lo tanto la composición según la presente invención tiene preferiblemente por objeto reducir la frecuencia y/o la incidencia y/o la gravedad y/o la duración de la dermatitis atópica, y/o favorecer la salud de la piel.

En una implementación, la composición según la presente invención sirve para favorecer la salud de la piel y/o para aumentar la tolerancia oral a los alérgenos.

55 La composición según la presente invención se prefiere particularmente para incrementar la tolerancia oral a los alérgenos.

60 La presente invención también incluye el uso de una composición que lleva al menos una N-acetil lactosamina, al menos un oligosacárido sializado, al menos un oligosacárido fucosilado y un hidrolizado que comprende proteínas parcial y/o extensamente hidrolizadas, como agente nutricional sintético para elaborar un medicamento destinado a la prevención y/o al tratamiento de enfermedades cutáneas, preferiblemente la dermatitis atópica, y al aumento de la tolerancia oral a los alérgenos, tal como se define en las reivindicaciones.

Dicho uso engloba el caso en que la composición sea un suplemento, suministrado preferiblemente en forma de dosis unitarias.

La composición según la presente invención puede comprender además otros compuestos nutricionales que tengan efectos sinérgicos con los oligosacáridos reivindicados y con las proteínas hidrolizadas, a fin de proporcionar los beneficios reivindicados en la piel, como en el caso de alergias cutáneas o dermatitis atópica. Estos compuestos adicionales pueden ser, por ejemplo, proteínas poco alergénicas (es decir, proteínas todavía más hidrolizadas o parcialmente hidrolizadas), ingredientes bajos en lactosa, sacáridos bajos en lactosa o sacáridos hidrolizados. Se propone que la sinergia de los ingredientes puede darse por el hecho de que todos ellos juntos ayudan a mantener un nivel fisiológicamente bajo de un efector que se encuentra por debajo de un umbral a partir del cual empiezan a mostrarse los efectos sobre la piel (tales como la dermatitis atópica).

Todos los usos arriba citados están pensados en particular para bebés y niños pequeños.

Sin querer limitarse a la teoría, los presentes inventores creen que la eficacia de la combinación de oligosacáridos con las proteínas parcial y/o extensamente hidrolizadas arriba descrita en la prevención y/o el tratamiento de las afecciones y enfermedades cutáneas, sobre todo de la dermatitis atópica, puede ser el resultado de la combinación sinérgica de efectos moduladores de la inmunidad mucosal desencadenados por bacterias de ácido láctico mediante su estimulación con una mezcla específica de oligosacáridos y un hidrolizado específico. Los presentes inventores creen que el establecimiento de una microbiota asociada a la mucosa, con una mínima estimulación inflamatoria general, se consigue mediante la promoción selectiva de bacterias comensales beneficiosas de ácido láctico con la modulación simultánea de reguladores inflamatorios tales como las galectinas (p.ej. galectina-1 y galectina-3). Además esta composición puede modular el metabolismo de la microbiota endógena mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta que contribuyan a la activación de células inmunológicas subyacentes en la mucosa del intestino. Una vez desencadenado el sistema inmunitario de la mucosa, las células inmunológicas activadas, los compuestos inmunológicamente activos y/o los mediadores inmunológicos circularán hacia ubicaciones distales, incluyendo la piel, donde ejercerán su acción moduladora. Todos estos mecanismos contribuirán conjuntamente a equilibrar las potenciales condiciones inflamatorias de la piel, mejorando manifestaciones clínicas relacionadas tales como dermatitis y eccema. Además los presentes inventores creen que esta inmunidad organizada se traduce en una menor sensibilidad cutánea frente a los irritantes exógenos y en una mejor función de barrera de la piel, para reducir las erupciones, la aspereza y la sequedad asociada a la piel reactiva.

Los oligosacáridos y las proteínas parcial y/o extensamente hidrolizadas se pueden administrar en la misma composición o bien de manera sucesiva.

Cuando va dirigida al grupo de edad de 0 hasta 12 meses, la composición es preferiblemente una composición nutricional que se consume en forma líquida. Puede tratarse de una fórmula nutricional completa, tal como una fórmula infantil, una fórmula de seguimiento o una leche de crecimiento. Alternativamente, para el grupo de niños pequeños, la composición puede ser un zumo u otra bebida refrigerada o estable al almacenamiento, o una sopa, por ejemplo, o una comida para niños o una composición infantil de cereales.

La composición según la presente invención contiene una fuente de proteínas, preferiblemente en una proporción inferior a 2,0 g por 100 kcal, con mayor preferencia inferior a 1,8 g por 100 kcal. Las proteínas son generalmente una mezcla de proteínas intactas y proteínas hidrolizadas, siendo estas últimas una parte del hidrolizado de la presente invención. Se cree que el tipo de proteína es crítico en la presente invención y es preferible que haya una proporción de aminoácidos esenciales superior al mínimo requerido, especialmente de arginina, para asegurar un crecimiento satisfactorio. Además la fracción de proteína hidrolizada está en general exenta de lactosa. La fracción de proteína hidrolizada consta preferiblemente de proteínas de suero de leche hidrolizadas.

Se pueden emplear fuentes de proteínas basadas en suero de leche, caseína y mezclas de las mismas, así como fuentes de proteínas basadas en soja. Cuando se trata de proteínas de suero de leche, la fuente proteica puede estar basada en suero de leche ácido o en suero de leche dulce o en mezclas de ellos.

El aporte de proteínas parcial y/o extensamente hidrolizadas según la presente invención es de particular interés para los niños supuestamente en riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca. Como se requieren proteínas hidrolizadas, el proceso de hidrólisis se puede llevar a cabo del modo deseado y es conocido del estado técnico. Por ejemplo, un hidrolizado de proteína de suero de leche se puede preparar hidrolizando enzimáticamente la fracción de suero de leche en una o más etapas. Si la fracción de suero de leche empleada como material de partida está sustancialmente libre de lactosa, se encuentra que la proteína sufre mucho menos bloqueo de lisina durante el proceso de hidrólisis, lo cual permite reducir el nivel de bloqueo de lisina desde aproximadamente un 15% en peso de lisina total hasta aproximadamente menos del 10% en peso de lisina, por ejemplo hasta aproximadamente un 7% en peso de lisina, lo cual mejora mucho la calidad nutricional de la fuente proteica.

La fuente proteica tiene preferiblemente un contenido aproximado del 1,5% al 2,5% en peso de arginina, sobre todo en la forma básica libre.



La fuente proteica puede incluir otros aminoácidos libres deseados, como la L-tirosina y la L-histidina.

5 La composición según la presente invención lleva en general una fuente de carbohidratos. Esto es especialmente preferible en el caso de que la composición nutricional de la presente invención sea una fórmula infantil. Entonces se puede usar cualquiera de las fuentes de carbohidratos existentes normalmente en las fórmulas infantiles, como por ejemplo lactosa, sacarosa, maltodextrina, almidón y mezclas de ellas, aunque la fuente preferida de carbohidratos es la lactosa.

10 La composición según la presente invención contiene en general una fuente de lípidos. Esto es particularmente importante si la composición nutricional de la presente invención es una fórmula infantil. En este caso la fuente de lípidos puede ser cualquier lípido o grasa apta para utilizar en fórmulas infantiles. Las fuentes de grasa preferidas comprenden oleína de palma, aceite de girasol alto en oleico y aceite de cártamo alto en oleico. También se pueden añadir los ácidos grasos esenciales linoleico y  $\alpha$ -linolénico, así como pequeñas proporciones de aceites que lleven elevadas cantidades de ácido araquidónico preformado y de ácido docosahexaenoico, como los aceites de pescado o los aceites microbianos. La fuente de grasa tiene preferiblemente una relación de ácidos grasos n-6 a n-3 de aproximadamente 5:1 hasta 15:1, por ejemplo de 8:1 hasta 10:1 aproximadamente.

20 La composición nutricional de la presente invención también lleva preferiblemente proporciones nutricionalmente significativas de todas las vitaminas y minerales que se consideran esenciales en la dieta diaria. Se han fijado unos requerimientos mínimos de ciertas vitaminas y minerales. Como ejemplos de minerales, vitaminas y otros nutrientes opcionalmente presentes en la composición de la presente invención cabe mencionar: vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina E, vitamina K, vitamina C, vitamina D, ácido fólico, inositol, niacina, biotina, ácido pantoténico, colina, calcio, fósforo, yodo, hierro, magnesio, cobre, cinc, manganeso, cloro, potasio, sodio, selenio, cromo, molibdeno, taurina y L-carnitina. Los minerales suelen añadirse en forma de sal. La presencia y las proporciones de minerales específicos y de otras vitaminas pueden variar en función de la población a la cual van destinadas.

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

La composición de la presente invención también puede contener otras sustancias de efecto beneficioso tales como lactoferrina, nucleótidos, nucleósidos y similares.

35 A continuación se describe un ejemplo de una composición según la presente invención.

40 La fórmula se puede preparar de cualquier manera conveniente. Por ejemplo, se puede preparar mezclando las proteínas parcial y/o extensamente hidrolizadas, la fuente de carbohidratos y la fuente de grasa en proporciones adecuadas. En caso de usar emulsionantes, se pueden incorporar en este momento. Las vitaminas y los minerales se pueden añadir en este punto, pero suelen incorporarse más tarde para evitar su degradación térmica. Cualquier vitamina, emulsionante y similar de tipo lipófilo se puede disolver en la fuente de grasa antes de incorporarlo a la mezcla. Luego se puede añadir agua, preferiblemente sometida con anterioridad a ósmosis inversa, para formar una mezcla líquida. Conviene que la temperatura del agua esté comprendida aproximadamente entre 50°C y 80°C para ayudar a dispersar los ingredientes. Para formar la mezcla líquida se pueden usar agentes licuefactores disponibles en el comercio. En esta etapa se añadirán la(s) N-acetil-lactosamina(s), el o los oligosacáridos sializados y el o los oligosacáridos fucosilados, si el producto final debe tener una forma líquida. Cuando el producto final tiene que ser en polvo los oligosacáridos también se pueden incorporar en esta etapa, si se desea. Después se homogeneiza la mezcla líquida, por ejemplo en dos etapas.

50 Luego la mezcla líquida se puede tratar térmicamente para reducir la carga bacteriana, calentando rápidamente la mezcla líquida a una temperatura comprendida aproximadamente entre 80°C y 150°C durante un tiempo aproximado de 5 segundos hasta 5 minutos, por ejemplo, lo cual se puede efectuar inyectando vapor, mediante un autoclave o mediante un intercambiador de calor, por ejemplo con un intercambiador de calor de placas.

55 Después la mezcla líquida se puede enfriar a una temperatura comprendida aproximadamente entre 60°C y 80°C, por ejemplo mediante enfriamiento instantáneo. Luego la mezcla líquida se puede homogeneizar de nuevo, por ejemplo en dos etapas, aproximadamente entre 10 MPa y 30 MPa en la primera etapa y entre 2 MPa y 10 MPa en la segunda etapa. Después la mezcla homogeneizada se puede seguir enfriando para poder incorporar componentes sensibles al calor tales como las vitaminas y los minerales. En este punto se ajusta convenientemente el pH y el contenido en sólidos de la mezcla homogeneizada.

60 La mezcla homogeneizada se transfiere a un aparato de secado apropiado, tal como un secador por pulverización o un liofilizador, y se convierte en polvo. El polvo debería tener aproximadamente un contenido de humedad inferior al 5% en peso. La(s) N-acetil-lactosamina(s), el o los oligosacáridos sializados y el o los oligosacáridos fucosilados se pueden añadir en esta etapa mezclándolos en seco con la(s) cepa(s) bacteriana(s) probiótica(s), en caso de usarlas,

o combinándolos en un jarabe cristalino con la(s) cepa(s) bacteriana(s) probiótica(s), en caso de usarlas, y luego se procede al secado por pulverización (o a la liofilización).

5 Si se prefiere una composición líquida, la mezcla homogeneizada se puede esterilizar y luego envasar de manera aséptica en recipientes adecuados, o bien llenar primero los recipientes y luego esterilizarlos en autoclave.

10 En otra forma de ejecución la composición de la presente invención puede ser un suplemento que incluya la(s) N-acetil-lactosamina(s), el o los oligosacáridos sializados y el o los oligosacáridos fucosilados y las proteínas parcial y/o extensamente hidrolizadas en proporción suficiente para lograr el efecto deseado en un sujeto. Esta forma de administración es más apropiada para niños mayores y adultos.

15 La cantidad de oligosacáridos que debe incluirse en el suplemento dependerá de su modo de administración. Por ejemplo, si el suplemento debe administrarse dos veces al día, cada suplemento puede contener 0,05 hasta 1,5 g de N-acetil-lactosamina, 0,05 hasta 1 g de oligosacárido sializado y 0,05 hasta 1,5 g de oligosacárido fucosilado.

20 El suplemento puede estar en forma de tabletas, cápsulas, pastillas o líquido, por ejemplo. Además el suplemento puede contener hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes filmógenos, agentes/materiales de encapsulación, materiales de pared/cobertura, compuestos matriciales, recubrimientos, emulsionantes, agentes tensioactivos, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, vehículos, cargas, compuestos auxiliares, agentes dispersantes, agentes humectantes, coadyuvantes de proceso (disolventes), agentes fluidificantes, agentes enmascaradores del sabor, agentes espesantes, agentes gelificantes y formadores de gel. El suplemento también puede contener los aditivos y adyuvantes farmacéuticos, excipientes y diluyentes usuales, incluyendo, sin limitarse a ellos, agua, gelatina de cualquier procedencia, gomas vegetales, sulfonato de lignina, talco, azúcares, almidón, goma arábiga, aceites vegetales, polialquilen glicoles, agentes saborizantes, conservantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, cargas y similares.

25 Además el suplemento puede contener un vehículo orgánico o inorgánico adecuado para la administración oral o parenteral, así como vitaminas, trazas de elementos minerales y otros micronutrientes según las recomendaciones de organismos gubernamentales como el USRDA.

35 A continuación se indica un ejemplo de la composición de una fórmula infantil según la presente invención. Esta composición solo se ofrece a modo de ejemplo. Otro ejemplo está basado en la fórmula infantil comercial NAN HA (hipoalérgica con proteínas hidrolizadas) (de Nestlé, Suiza), a la cual se han añadido los oligosacáridos específicos de la presente invención en las proporciones abajo indicadas.

Nutriente	por 100 kcal	por litro
Energía (kcal)	100	670
Hidrolizado (g) 77% de NPN/TN 10% de N de lisina reactiva con TNBS/TN	1,83	12,3
Grasa (g)	5,3	35,7
Ácido linoleico (g)	0,79	5,3
Ácido $\alpha$ -linolénico (mg)	101	675
Lactosa (g)	11,2	74,7
Prebiótico (70% de FOS, 30% de insulina) (g)	0,64	4,3
Minerales (g)	0,37	2,5
Na (mg)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Mn ( $\mu$ g)	8	50
Se ( $\mu$ g)	2	13
Vitamina A ( $\mu$ g de RE)	105	700
Vitamina D ( $\mu$ g)	1,5	10
Vitamina E (mg de TE)	0,8	5,4
Vitamina K1 ( $\mu$ g)	8	54
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,47
Vitamina B2 (mg)	0,15	1,0
Niacina (mg)	1	6,7

Vitamina B6 (mg)	0,075	0,50
Acido fólico (µg)	9	60
Acido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 (µg)	0,3	2
Biotina (µg)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (µg)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
Nutriente	por 100 kcal	por litro
3'-sialil-lactosa (mg)	30	200
6'-sialil-lactosa (mg)	6	40
LNnT (mg)	30	200
2-FL (mg)	300	2000

#### Datos experimentales:

#### Resumen de los resultados

5 Los resultados abajo descritos demuestran que una mezcla específica de oligosacáridos favorece la actividad metabólica y el crecimiento de bacterias de ácido láctico como la subespecie *infantis* de *Bifidobacterium longum*. Sin querer limitarse a la teoría, este efecto podría explicar en parte la observación de que en el calostro de las madres  
10 cuyos bebés nacidos por cesárea habían desarrollado alergias atópicas, y especialmente eccema atópico hasta la edad de 2 años, se encontraron cantidades relativamente bajas de dichas mezclas específicas de oligosacáridos. Esto indica que, de acuerdo con la presente invención, el suministro de una composición nutricional con un nivel asegurado de la mezcla específica de oligosacáridos junto con proteínas hidrolizadas (total, extensa o parcialmente) puede restablecer el equilibrio natural bacteriano del tracto intestinal de los bebés y/o influir positivamente en el estado de salud relacionado con la prevención y/o el tratamiento de las afecciones y enfermedades cutáneas, con  
15 preferencia de la dermatitis atópica.

#### **Modelo de estudio 1: estimulación de la subespecie *infantis* de *Bifidobacterium longum***

#### Método:

20 La subespecie *infantis* de *Bifidobacterium longum* (ATCC15697) se cultivó anaeróticamente en un medio de cultivo API suplementado con 1% (p/v) de glucosa o con 1% (p/v) de 2'-fucosil-lactosa (2FL) o con 1% (p/v) de lacto-N-neotetraosa (LNnT) o con 1% (p/v) de 6'-sialil-lactosa (6SL) o con 1% (p/v) de una combinación de cantidades iguales de 2FL, LNnT y 6SL. Cada cultivo nocturno se diluyó para tener una DO<sub>600</sub> inicial de 0,1 en DMEM (medio de  
25 Eagle modificado por Dulbecco) que contenía 0,1% de glucosa como fuente de carbono. Este medio se utilizó sin ningún otro suplemento de carbohidratos o con 1% (p/v) adicional de glucosa o de 2'-fucosil-lactosa (2FL) o de lacto-N-neotetraosa (LNnT) o de 6'-sialil-lactosa (6SL) o de una combinación de cantidades iguales de 2FL, LNnT y 6SL. Los medios de DMEM se acondicionaron anaeróticamente a 37°C

30 Tras otra noche de incubación, el cultivo de las bacterias se controló midiendo la DO a 600 nm. Luego los medios acondicionados se centrifugaron y los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de 0,22 micrómetros, con el fin de eliminar las bacterias. El acetato en los medios acondicionados se cuantificó por HPLC, empleando una columna Hi-Plex H y un detector UV.

#### Resultados:

35 Sorprendentemente hallamos que una mezcla de oligosacáridos compuesta por partes iguales de un oligosacárido fucosilado (p.ej. 2'FL), un oligosacárido N-acetilado (p.ej. LNnT) y un oligosacárido sializado (p.ej. 6SL) aumentaba significativamente la actividad metabólica de una bacteria de ácido láctico (p.ej. bifidobacterium), tal como se vio por  
40 la formación de acetato (figura 1).

La mezcla de oligosacáridos también estimuló el crecimiento de la bacteria (figura 2).

45 *La figura 1 ilustra los resultados experimentales que indican una estimulación metabólica de un bifidobacterium (subespecie *infantis* de *B. longum*) en medio de cultivo DMEM, ya sea sin carbohidratos adicionales o con glucosa (Glc) o lacto-N-neotetraosa (LNnT) o 2'-fucosil-lactosa (2FL) o 6'-sialil-lactosa (6SL) o una mezcla de LNnT, 6SL y 2FL adicionales. (n = 6; se representa la media con ESM; se indica la significancia por ANOVA (p < 0,01)). Nota: solo la mezcla de LNnT, 6SL y 2FL estimuló significativamente la producción de acetato.*

La figura 2 ilustra los resultados experimentales que representan el crecimiento in vitro de un bifidobacterium (subespecie infantis de *B. longum*) en medio de cultivo, ya sea sin carbohidratos adicionales o con glucosa (Glc) o lacto-N-neotetraosa (LNnT) o 2'-fucosil-lactosa (2FL) o 6'-sialil-lactosa (6SL) o una mezcla de LNnT, 6SL y 2FL adicionales. (n = 4; se representa la media con ESM; se indica la significancia por ANOVA ( $p < 0,02$ ) mediante letras minúsculas).

## **Modelo de estudio 2: análisis epidemiológico retrospectivo de muestras de leche materna e incidencia de enfermedades alérgicas hasta la edad de 2 años**

### Método:

De una cohorte de aproximadamente 52 pares de madres de bebés nacidos por cesárea analizamos las cantidades de oligosacáridos presentes en muestras de calostro. Para ello las muestras de leche desengrasadas se diluyeron 10 hasta 100 veces en agua y se analizaron con un aparato de cromatografía HPAEC (Dionex) equipado con una columna CarboPac PA1 (Dionex) y un detector electroquímico. La identificación y cuantificación de oligosacáridos se llevó a cabo con patrones de oligosacáridos auténticos. Representamos gráficamente la ausencia o presencia de (A) enfermedades alérgicas, (B) alergias atópicas, (C) eccema atópico en los bebés frente a las cantidades de una mezcla de oligosacáridos compuesta por 2FL, LNnT y 6SL (figura 3) o por 2FL, LNnT, LNT (lacto-N-tetraosa), 6SL y 3SL (3'-sialil-lactosa) (figura 4).

La figura 3 ilustra los resultados experimentales que indican la ausencia (no) o incidencia (sí) de (A) enfermedades alérgicas, (B) alergias atópicas y (C) eccema atópico en niños nacidos por cesárea hasta los 2 años de edad. Están representadas las cantidades de una mezcla específica de oligosacáridos medidas en la leche materna. En este caso la mezcla de oligosacáridos representada es la suma de 2'-fucosil-lactosa (2FL), lacto-N-neotetraosa (LNnT) y 6'-sialil-lactosa (6SL). (Se indica la significancia estadística)

La figura 4 ilustra los resultados experimentales que indican la ausencia (no) o incidencia (sí) de (A) enfermedades alérgicas, (B) alergias atópicas y (C) eccema atópico en niños nacidos por cesárea hasta los 2 años de edad. Están representadas las cantidades de una mezcla específica de oligosacáridos medidas en la leche materna. En este caso la mezcla de oligosacáridos representada es la suma de 2'-fucosil-lactosa (2FL), lacto-N-neotetraosa (LNnT), lacto-N-tetraosa (LNT), 6'-sialil-lactosa (6SL) y 3'-sialil-lactosa (3SL). (Se indica la significancia estadística)

### Resultados:

Sorprendentemente encontramos una tendencia hacia niveles bajos de mezclas específicas de oligosacáridos en la leche materna cuando los niños desarrollaron una enfermedad alérgica (figuras 3A, 4A). Para las enfermedades atópicas, y en particular el eccema atópico, medimos unos niveles significativamente menores de las mezclas de oligosacáridos en el calostro de las madres cuyos niños desarrollaron estas alergias hasta los 2 años de edad.

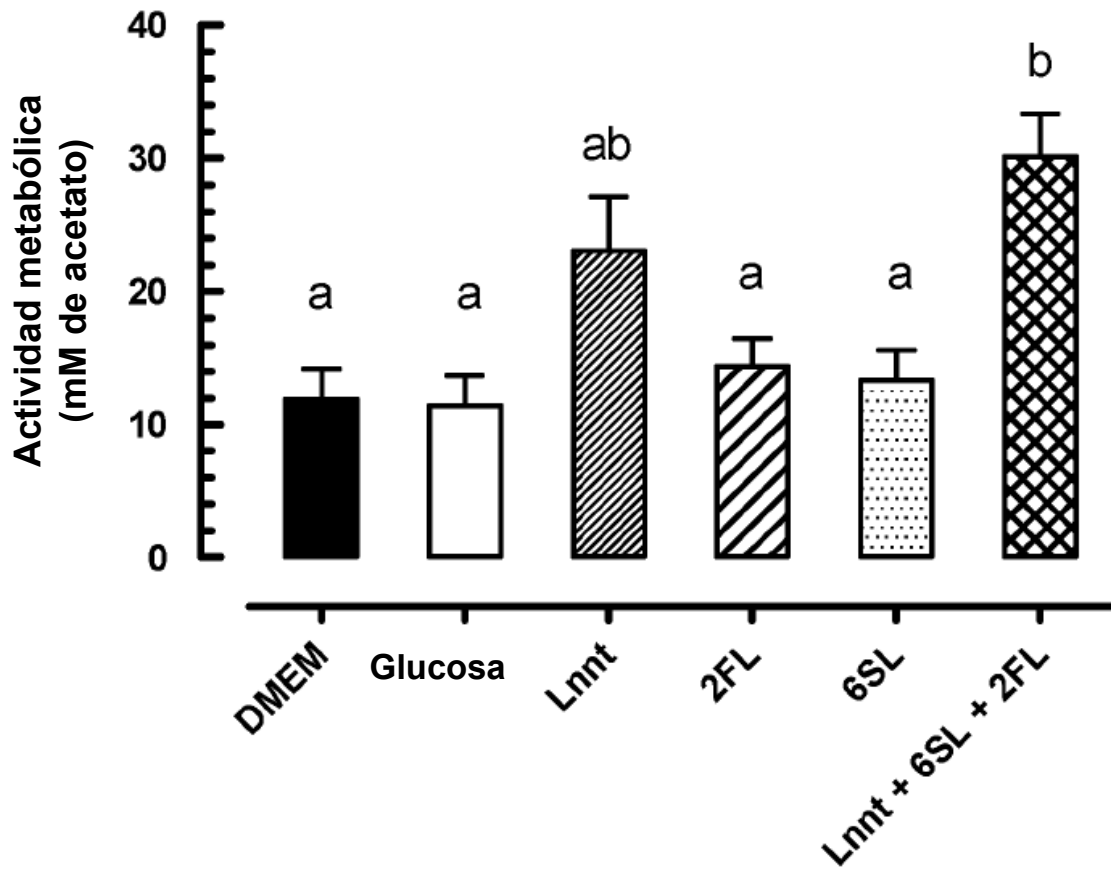
## REIVINDICACIONES

1. Composición nutricional sintética que lleva al menos una N-acetil-lactosamina, al menos un oligosacárido sializado y al menos un oligosacárido fucosilado, y un hidrolizado que incluye proteínas parcial y/o extensamente hidrolizadas, para prevenir y/o tratar enfermedades cutáneas, preferiblemente la dermatitis atópica, en la cual el hidrolizado comprende proteínas hidrolizadas que tienen entre el 10% y el 100% y con mayor preferencia entre el 15% y el 95% de su población de proteínas/péptidos con un peso molecular inferior a 1000 Dalton, y en la cual la N-acetil-lactosamina está seleccionada del grupo formado por lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa, y en la cual el oligosacárido sializado está seleccionado del grupo formado por 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa, y preferiblemente dicha composición comprende tanto la 3'-sialil-lactosa como la 6'-sialil-lactosa, estando la relación entre 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa comprendida preferiblemente en el intervalo entre 5:1 y 1:2, y en la cual el oligosacárido fucosilado está seleccionado del grupo formado por 2'-fucosil-lactosa, 3-fucosil-lactosa, difucosil-lactosa, lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-fucopentaosa II, lacto-N-fucopentaosa III y lacto-N-fucopentaosa V, lacto-N-difucohexaosa I, fucosil-lacto-N-hexaosa, difucosil-lacto-N-hexaosa I y difucosil-lacto-N-neohexaosa II, y preferiblemente el oligosacárido fucosilado es 2'-fucosil-lactosa (2-FL).
2. Composición para usar según la reivindicación 1, en la cual el grado de hidrólisis de las proteínas hidrolizadas está comprendido entre el 50 y el 100, preferiblemente entre el 65 y el 99% de NPN/TN.
3. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el % de nitrógeno amínico (lisina) que reacciona con TNBS / el TN de las proteínas hidrolizadas está comprendido dentro del intervalo del 8-15%, preferiblemente del 9-14%.
4. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual comprende además, por lo menos, una cepa bacteriana probiótica que pertenece preferiblemente al género de las bifidobacterias y/o de los lactobacilos.
5. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual comprende además, por lo menos, un prebiótico.
6. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual es una fórmula infantil inicial, una fórmula infantil, una fórmula de seguimiento, una comida para bebés, una fórmula de cereales para niños o una leche de crecimiento, y dicha composición es preferiblemente una fórmula infantil inicial.
7. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, destinada a bebés y niños pequeños con alergias, sobre todo con alergias alimentarias.
8. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, antes y/o durante un periodo de destete.
9. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, destinada a la prevención y a la disminución de la frecuencia y/o incidencia y/o gravedad y/o duración de dichas enfermedades cutáneas, sobre todo de la dermatitis atópica.
10. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, destinada a favorecer la salud de la piel y/o a incrementar la tolerancia oral a los alérgenos.
11. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, destinada a incrementar la tolerancia oral a los alérgenos.
12. Uso de una composición nutricional sintética que comprende al menos una N-acetil-lactosamina, al menos un oligosacárido sializado, al menos un oligosacárido fucosilado y un hidrolizado que incluye proteínas parcial y/o extensamente hidrolizadas, como agente nutricional sintético para elaborar un medicamento destinado a prevenir y/o tratar enfermedades cutáneas, preferiblemente dermatitis atópica, y a incrementar la tolerancia oral a los alérgenos, en la cual el hidrolizado comprende proteínas hidrolizadas que tienen entre el 10% y el 100% y con mayor preferencia entre el 15% y el 95% de su población de proteínas/péptidos con un peso molecular inferior a 1000 Dalton, y en la cual la N-acetil-lactosamina está seleccionada del grupo formado por lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa, y en la cual el oligosacárido sializado está seleccionado del grupo formado por 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa, y preferiblemente dicha composición comprende tanto la 3'-sialil-lactosa como la 6'-sialil-lactosa, estando la relación entre 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa comprendida preferiblemente en el intervalo entre 5:1 y 1:2, y en la cual el oligosacárido fucosilado está seleccionado del grupo formado por 2'-fucosil-lactosa, 3-fucosil-lactosa, difucosil-lactosa, lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-fucopentaosa II, lacto-N-fucopentaosa III y lacto-N-fucopentaosa V, lacto-N-difucohexaosa I, fucosil-lacto-N-hexaosa, difucosil-lacto-N-hexaosa I y difucosil-lacto-N-neohexaosa II, y preferiblemente el oligosacárido fucosilado es 2'-fucosil-lactosa (2-FL).

13. Uso según la reivindicación 12, en la cual la composición es un suplemento, suministrado preferiblemente en forma de dosis unitarias.

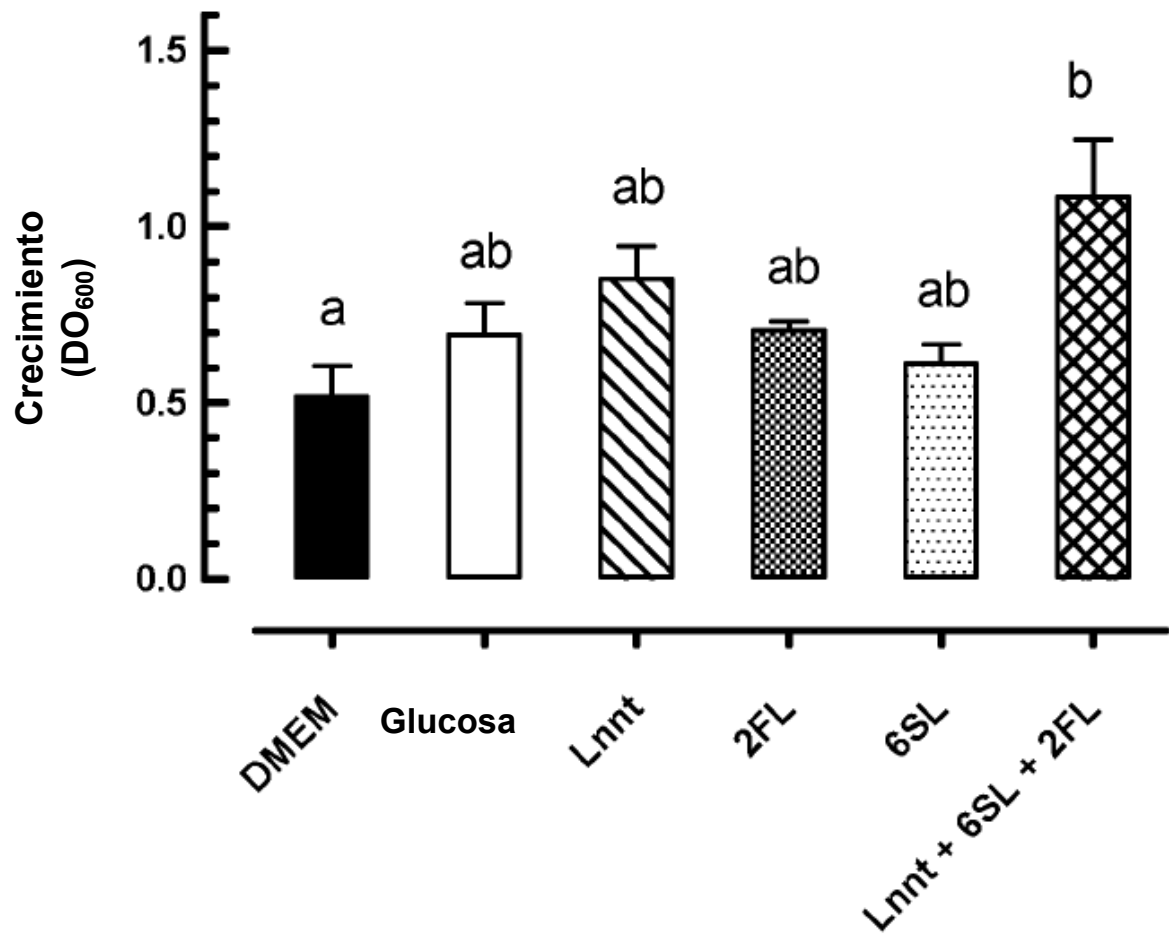
5

FIGURA 1



**Figura 1.** Resultados experimentales que indican una estimulación metabólica de un bifidobacterium (subespecie *infantis* de *B. longum*) en medio de cultivo DMEM, ya sea sin carbohidratos adicionales o con glucosa (Glc) o lacto-N-neotetraosa (LNnT) o 2'-fucosil-lactosa (2FL) o 6'-sialil-lactosa (6SL) o una mezcla de LNnT, 6SL y 2FL adicionales. (n = 6; se representa la media con ESM; se indica la significancia por ANOVA ( $p < 0,01$ )).  
 Nota: solo la mezcla de LNnT, 6SL y 2FL estimuló significativamente la producción de acetato.

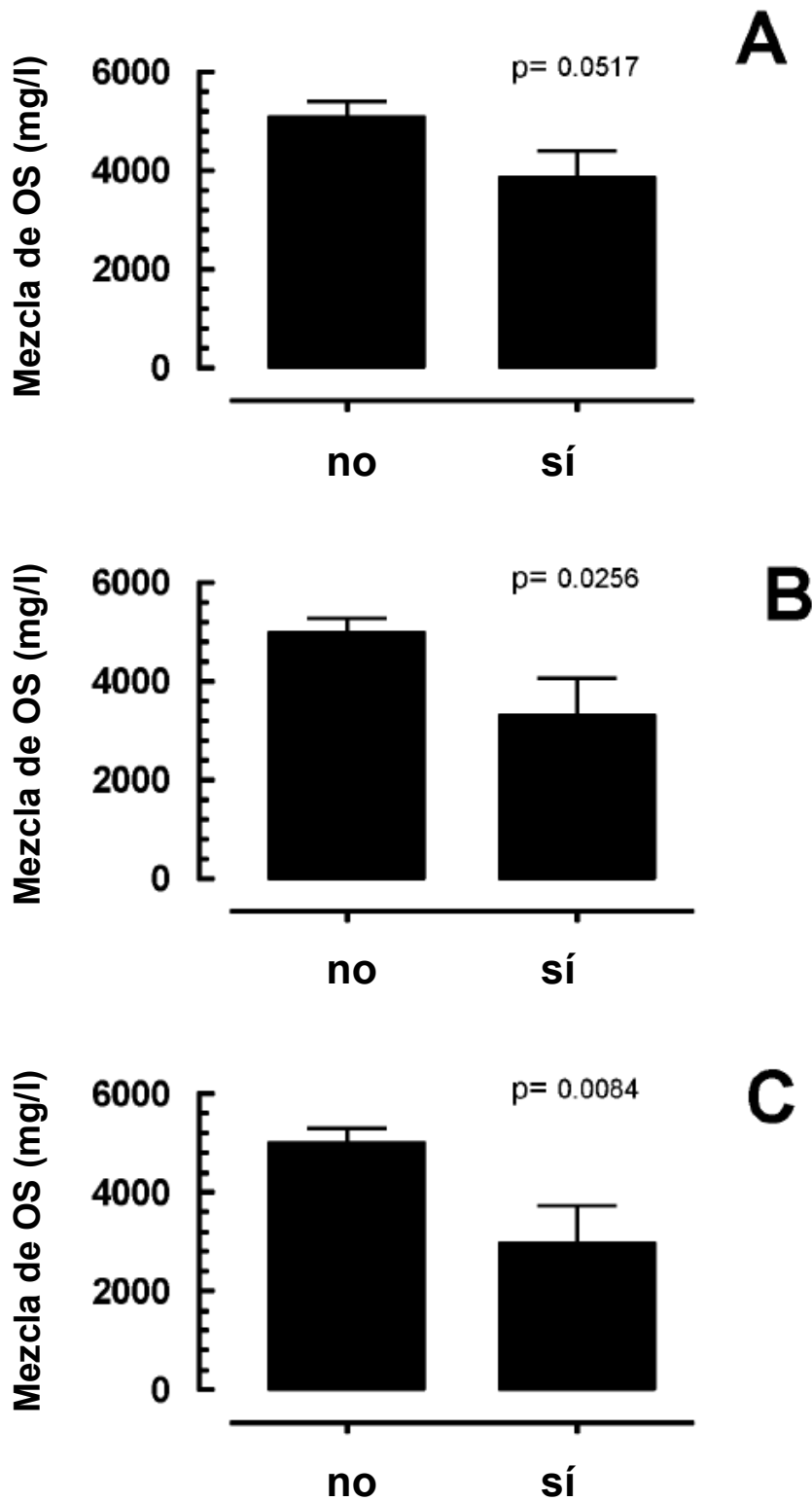
FIGURA 2



**Figura 2.** Resultados experimentales que representan el crecimiento in vitro de un bifidobacterium (subespecie infantis de *B. longum*) en medio de cultivo, ya sea sin carbohidratos adicionales o con glucosa (Glc) o lacto-N-neotetraosa (LNnT) o 2'-fucosil-lactosa (2FL) o 6'-sialil-lactosa (6SL) o una mezcla de LNnT, 6SL y 2FL adicionales. (n = 4; se representa la media con ESM; se indica la significancia por ANOVA ( $p < 0,02$ ) mediante letras minúsculas).

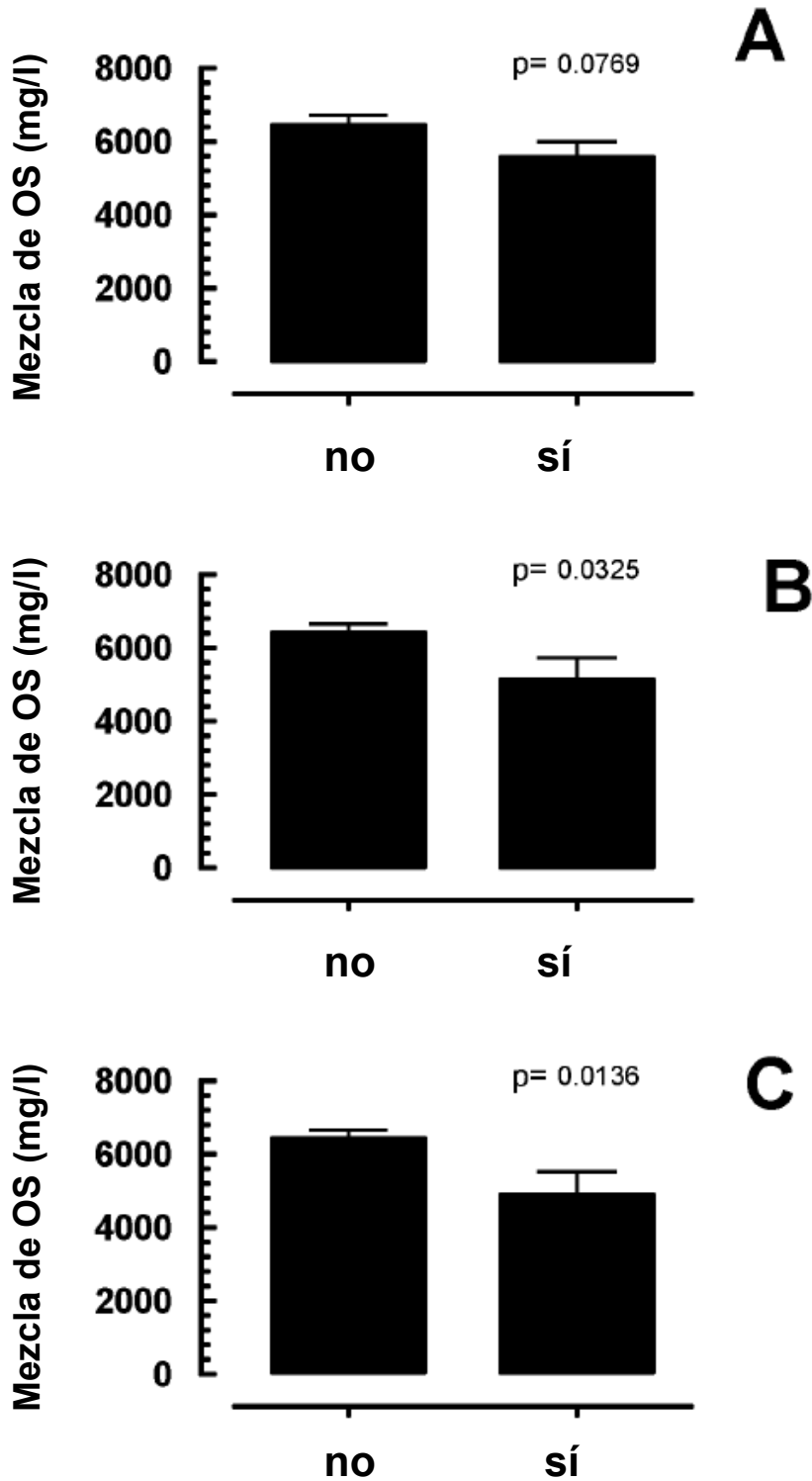


## FIGURA 3



**Figura 3.** Resultados experimentales que indican la ausencia (no) y la incidencia (sí) de (A) enfermedades alérgicas, (B) alergias atópicas y (C) eccema atópico en niños nacidos por cesárea hasta los 2 años de edad. Están representadas las cantidades de una mezcla específica de oligosacáridos medidas en la leche materna. En este caso la mezcla de oligosacáridos representada es la suma de 2'-fucosil-lactosa (2FL), lacto-N-neotetraosa (LNnT) y 6'-sialil-lactosa (6SL). (Se indica la significancia estadística)

## FIGURA 4



**Figura 4.** Resultados experimentales que indican la ausencia (no) y la incidencia (sí) de (A) enfermedades alérgicas, (B) alergias atópicas y (C) eccema atópico en niños nacidos por cesárea hasta los 2 años de edad. Están representadas las cantidades de una mezcla específica de oligosacáridos medidas en la leche materna. En este caso la mezcla de oligosacáridos representada es la suma de 2'-fucosil-lactosa (2FL), lacto-N-neotetraosa (LNnT), lacto-N-tetraosa (LNT), 6'-sialil-lactosa (6SL) y 3'-sialil-lactosa (3SL). (Se indica la significancia estadística)