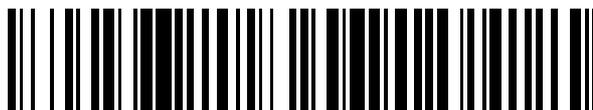


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 491**

51 Int. Cl.:

A23D 9/00	(2006.01)
A61K 31/00	(2006.01)
A23L 33/11	(2006.01)
A23L 33/13	(2006.01)
A23L 33/21	(2006.01)
A61K 31/20	(2006.01)
A61K 31/70	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2012 PCT/EP2012/070359**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057062**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2012 E 12770505 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2768311**

54 Título: **Composición para promover la angiogénesis intestinal, la absorción nutricional y la tolerancia a la alimentación enteral y/o la prevención y/o el tratamiento de las inflamaciones intestinales y/o la recuperación después de las lesiones y/o intervenciones quirúrgicas intestinales**

30 Prioridad:
18.10.2011 EP 11185606

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2018

73 Titular/es:
**NESTEC S.A. (100.0%)
CT-IAM, Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:
**GARCIA-RODENAS, CLARA y
SPRENGER, NORBERT**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 666 491 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

5 Composición para promover la angiogénesis intestinal, la absorción nutricional y la tolerancia a la alimentación enteral y/o la prevención y/o el tratamiento de las inflamaciones intestinales y/o la recuperación después de las lesiones y/o intervenciones quirúrgicas intestinales

Ámbito de la presente invención

10 La presente invención se refiere a una composición nutricional sintética para promover la angiogénesis intestinal, la absorción nutricional y la tolerancia a la alimentación enteral y/o la prevención y/o el tratamiento de inflamaciones intestinales, como la enterocolitis necrosante, y/o la recuperación después de lesiones e intervenciones quirúrgicas intestinales. Esta composición es para usar en mamíferos, preferiblemente en humanos y con mayor preferencia en bebés.

15 Antecedentes de la presente invención

La formación acelerada de vasos sanguíneos en la mucosa intestinal tiene lugar durante el período neonatal, sobre todo en recién nacidos prematuros. La neovascularización y la reparación vascular también son fundamentales durante la cicatrización después de una lesión y/o cirugía intestinal. La neovascularización y la reparación vascular tienen lugar mediante la angiogénesis.

20 Los bebés, particularmente los prematuros y los que tienen bajo peso al nacer, pueden padecer una vascularización intestinal inmadura y en consecuencia un menor flujo sanguíneo hacia la mucosa intestinal (Reber KM, Nankervis CA, Nowicki PT. Newborn intestinal circulation. *Physiology and pathophysiology [Circulación intestinal en recién nacidos. Fisiología y fisiopatología]*. Clin Perinatol 2002; 29 (1): 23-39).

25 La alteración del flujo sanguíneo puede retrasar el desarrollo intestinal, perjudicar la absorción de los nutrientes y la tolerancia a las alimentaciones enterales, afectar a la motilidad intestinal, y se considera que es un factor causante en la patogénesis de la enterocolitis necrosante (Nankervis CA, Giannone PJ, Reber KM. The neonatal intestinal vasculature: contributing factors to necrotizing enterocolitis [*Vasculatura intestinal neonatal: factores que contribuyen a la enterocolitis necrosante*]. Semin Perinatol 2008; 32 (2): 83-91).

30 La enterocolitis necrosante (ECN) afecta principalmente a los recién nacidos prematuros. Es la urgencia quirúrgica más común en recién nacidos. Aproximadamente el 12% de los bebés prematuros que pesan menos de 1.500 g se ven aquejados de ECN. La mortalidad oscila entre un 20% y un 50% y la patología incluye estricturas, adherencias y el síndrome de intestino corto.

35 No se ha determinado ningún factor único como causa de la ECN. Actualmente se piensa que la ECN es el resultado de una combinación de varios factores. Las dos manifestaciones congruentes son la prematuridad y la alimentación. El intestino prematuro reacciona anormalmente y desarrolla una respuesta inflamatoria aguda a la alimentación, que conduce a la necrosis intestinal. Algunos problemas postnatales, incluyendo anomalías cardíacas, obstrucción de la circulación en el intestino, infección o gastrosquisis también están relacionado con la ECN.

40 En el bebé prematuro la ECN suele aparecer al cabo de una semana a diez días tras el comienzo de la alimentación. En el bebé nacido a tiempo la ECN aparece entre uno y cuatro días después del nacimiento, si la alimentación empieza el primer día. El riesgo de ECN es menor con una mayor edad gestacional. Muy pocos bebés desnutridos desarrollan ECN. La vasculatura neonatal inmadura es muy sensible a las agresiones del entorno, que pueden provocar cambios drásticos en el flujo sanguíneo. La opinión actual es que el daño de la mucosa causada por vasoconstricción, seguida de lesión por isquemia-reperusión, puede ser el suceso inicial en la patogénesis de la ECN. Una teoría que relaciona la alimentación con el daño de la mucosa intestinal implica el crecimiento excesivo de bacterias aportadas mediante una fuente enteral de nutrientes, lo cual produce una invasión bacteriana a través de la mucosa previamente dañada (Nankervis CA, Giannone PJ, Reber KM. The neonatal intestinal vasculature: contributing factors to necrotizing enterocolitis [*Vasculatura intestinal neonatal: factores que contribuyen a la enterocolitis necrosante*]. Semin Perinatol 2008; 32 (2): 83-91).

45 La ECN es difícil de prevenir. Los recién nacidos prematuros alimentados con leche materna o calostro parecen tener una menor incidencia de ECN que los alimentados con fórmula infantil (Schanler RJ, Lau C, Hurst NM, Smith EO 2005 Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants [Ensayo aleatorizado de leche materna de donante frente a fórmulas de prematuros como sucedáneos de la leche propia de la madre en la alimentación de bebés extremadamente prematuros]. Pediatrics 116: 400-406). Sin embargo, a menudo no se dispone de leche materna propia ni tampoco de leche de donantes.

50 El tratamiento médico consiste en la suspensión de las alimentaciones, drenaje nasogástrico, 7-14 días de antibióticos y nutrición intravenosa. También es necesario controlar minuciosamente el estado de los fluidos, los electrolitos, la coagulación y las necesidades de oxígeno. El 60-80% de los bebés con ECN se controla

médicamente y los síntomas se resuelven sin cirugía. Las alimentaciones postoperatorias se inician lentamente. Sin embargo las dilaciones en la aportación de alimentación enteral conducen a la detención y al retraso del crecimiento, lo cual puede aumentar la morbilidad y la mortalidad prematura y producir secuelas de por vida, tales como el deterioro del desarrollo cognitivo.

5 La cirugía es necesaria en el 20-40% de los casos, cuando falla el tratamiento médico o el intestino está perforado (desgarrado). El objetivo es eliminar solo el intestino que está totalmente necrosado (muerto) y dejar cualquier zona periférica con la esperanza de que sobreviva. Sin embargo la cirugía es causa del síndrome de intestino corto y como consecuencia puede provocar una digestión de nutrientes permanentemente deficiente, intolerancia a los alimentos y una peor calidad de vida.

10 La presente invención se refiere a una composición nutricional para promover la angiogénesis intestinal, la absorción nutricional y la tolerancia a la alimentación enteral y/o la prevención y/o el tratamiento de inflamaciones intestinales, como la enterocolitis necrosante, y/o la recuperación después de lesiones y/o intervenciones quirúrgicas intestinales, sobre todo en lactantes y niños pequeños, preferentemente bebés, que han nacido prematuros o con bajo peso (BPN) o que han sufrido retraso del crecimiento intrauterino (RCIU) o nutrición intrauterina subóptima y/o daño y/o cirugía intestinal.

15 De manera más general se necesita una intervención nutricional para mamíferos jóvenes, en particular para bebés y niños, preferentemente bebés, pero también para mascotas jóvenes.

20 Existe la necesidad de una intervención de este tipo que induzca el mantenimiento o la mejora de la angiogénesis intestinal en humanos y en animales, especialmente en mamíferos jóvenes. La patente WO2011/012655A1 describe una composición nutricional para bebés amamantados que comprende al menos un probiótico y un nutriente.

25 Resumen de la presente invención

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la administración de una mezcla de oligosacáridos específicos, en combinación con al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga (AGPI-CL) y al menos un probiótico, es particularmente eficaz para promover la angiogénesis intestinal y la absorción de nutrientes, así como la tolerancia a la alimentación enteral, y/o para la prevención y/o el tratamiento de la inflamación intestinal, como la enterocolitis necrosante, y/o la recuperación después de una lesión y/o cirugía intestinal.

30 Por tanto la presente invención proporciona una composición que lleva al menos un AGPI-CL, al menos un probiótico y una mezcla de oligosacáridos, la cual contiene al menos un oligosacárido N-acetilado, al menos un oligosacárido sialilado y al menos un oligosacárido neutro, para promover la absorción de nutrientes y la angiogénesis intestinal, así como la tolerancia a la alimentación enteral, y/o para la prevención y/o el tratamiento de la inflamación intestinal, como la enterocolitis necrosante, y/o la recuperación después de una lesión y/o cirugía intestinal.

35 La composición según la presente invención es preferiblemente de tipo nutricional.

40 El AGPI-CL se escoge preferiblemente entre el ácido araquidónico (ARA) y el ácido docosahexanoico (DHA), y con mayor preferencia el AGPI-CL es una mezcla de ARA y DHA.

45 El probiótico se elige preferiblemente entre cepas bacterianas y con mayor preferencia el probiótico es un lactobacilo o una bifidobacteria. En una forma de ejecución preferida el probiótico es *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus reuteri*.

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

55 En una forma de ejecución, la mezcla de oligosacáridos puede proceder de leche animal, tal como una o más de ellas entre las de vaca, cabra, oveja o búfala. Por ejemplo, se obtuvo mediante el fraccionamiento de leche de vaca y un tratamiento enzimático adicional.

En una segunda forma de ejecución la mezcla de oligosacáridos se puede preparar empleando medios enzimáticos, quimio-enzimáticos y/o químicos.

60 En una tercera forma de ejecución la mezcla de oligosacáridos se puede preparar empleando levadura y/o tecnologías de fermentación. Para ello, por ejemplo, se pueden utilizar células de levaduras y/o bacterias que expresen enzimas adecuados tales como glicosidasas y/o glicosiltransferasas después de efectuar o no una modificación genética.

La composición de la presente invención se usa preferiblemente para bebés que han nacido prematuramente o con bajo peso (BPN) o que han sufrido retraso del crecimiento intrauterino (RCIU) y/o nutrición intrauterina subóptima y/o lesión y/o cirugía intestinal.

5 Descripción detallada de la presente invención

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

10 El término "niño" se refiere a un humano entre el nacimiento y la pubertad. Un adulto es un humano de mayor edad que un niño.

El término "bebé" significa un niño de edad inferior a 12 meses. El término "bebé pretérmino" (o "bebé prematuro") significa un bebé nacido antes de al menos 37 semanas de gestación.

15 La expresión "bebé con bajo peso de nacimiento" se refiere a un bebé recién nacido que pesa menos de 2.500 g.

La expresión "niño pequeño" significa un niño de edad comprendida entre uno y tres años.

20 La expresión "fórmula infantil" se refiere a un producto alimenticio pensado para la nutrición de los bebés durante los primeros cuatro a seis meses de vida, que satisface 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 continuación).

25 La expresión "fórmula infantil pretérmino" significa una fórmula infantil pensada para un bebé prematuro.

La expresión "reforzante de leche materna" se refiere a un suplemento utilizado para aumentar las calorías, proteínas, minerales y vitaminas en la leche materna de los bebés amamantados prematuros o con bajo peso de nacimiento.

30 El término "fórmula de continuación" se refiere a un producto alimenticio pensado para la nutrición particular de los bebés mayores de cuatro meses, que constituye el principal elemento líquido en la dieta progresivamente diversificada de esta clase de persona.

35 El término "fórmula infantil inicial" se refiere a un producto alimenticio pensado para la nutrición particular de los bebés durante los primeros cuatro meses de vida.

El término "alimento infantil" significa un producto alimenticio pensado para la nutrición particular de los niños durante los primeros años de vida.

40 La expresión "composición infantil de cereales" se refiere a un producto alimenticio pensado para la nutrición particular de los niños durante los primeros años de vida.

45 El término "leche de crecimiento" se refiere a una bebida láctea adaptada a las necesidades nutricionales concretas de los niños pequeños.

El término "periodo de destete" se refiere al periodo en que la leche materna o la fórmula infantil son sustituidas parcial o totalmente por otros alimentos en la dieta de un bebé.

50 La frase "promoción de la absorción de nutrientes y de la angiogénesis intestinal y de la tolerancia a la alimentación enteral" significa el favorecimiento de la absorción de nutrientes y de la angiogénesis intestinal y de la tolerancia a la alimentación enteral. Engloba, por ejemplo, la prevención de la isquemia. El término "enteral" significa "intragástrico".

55 La frase "prevención y/o tratamiento de la inflamación intestinal" significa la evitación y la reducción de la frecuencia y/o la incidencia y/o la gravedad y/o la duración de la inflamación intestinal. La incidencia se relaciona con la proporción de cualquier inflamación intestinal y la frecuencia se relaciona con la proporción de la misma inflamación intestinal. Esta prevención incluye la reducción de la frecuencia y/o de la gravedad de dicha inflamación intestinal durante la vida posterior. El término "durante la vida posterior" se refiere al efecto una vez terminada la intervención. El efecto "durante la vida posterior" puede ser preferiblemente de 2 a 4 semanas, 2 a 12 meses o de años (p.ej. 2, 5, 10 años) después de dicha intervención. La enterocolitis necrosante es un ejemplo de inflamación intestinal.

60 La frase "recuperación tras una lesión y/o cirugía intestinal" significa el favorecimiento de la curación y la recuperación tras una lesión y/o cirugía intestinal.

65 El término "composición nutricional" significa una composición que alimenta a un sujeto. Esta composición nutricional suele ser para tomar por vía oral, intragástrica o intravenosa, e incluye una fuente de lípidos o grasas y una fuente de proteínas.

El término “mezcla sintética” significa una mezcla obtenida por medios químicos y/o biológicos, que puede ser idéntica químicamente a la mezcla natural existente en las leches de los mamíferos.

El término “composición hipoalérgica” significa una composición que improbablemente causa reacciones alérgicas.

El término “probiótico” se refiere a preparaciones de células microbianas o a componentes de células microbianas o a metabolitos 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).

El término “oligosacárido” significa un carbohidrato que tiene un grado de polimerización (GP) comprendido entre 2 y 20, exceptuando la lactosa.

El término “oligosacárido neutro” significa un oligosacárido que no tiene ninguna carga ni ningún resto N-acetilo.

El término “oligosacárido sialilado” se refiere a un oligosacárido que tiene un resto de ácido siálico (tal como el ácido N-acetilneuramínico y/o el ácido N-glicolilneuramínico).

El término “oligosacárido N-acetilado” se refiere a un oligosacárido que tiene al menos una hexosa unida a un resto de N-acetilo.

Todos los porcentajes están expresados en peso, a no ser que se indique de otro modo.

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

- al menos un AGPI-CL,
- al menos un probiótico, y
- una mezcla de oligosacáridos que contiene al menos un oligosacárido N-acetilado seleccionado del grupo formado por GalNAc α 1,3Gal β ,4Glc (= 3'GalNAc-lac = N-acetil-galactosaminil-lactosa) y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc (= 6'Gal-3GalNAc-lac = galactosil-N-acetil-galactosaminil-lactosa), Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc (lacto-N-neotetraosa) y Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc (lacto-N-tetraosa), al menos un oligosacárido sialilado seleccionado del grupo constituido por NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc (= 3'-sialil-lactosa) y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc (= 6'-sialil-lactosa), y al menos un oligosacárido neutro seleccionado del grupo constituido por Gal β 1,6Gal (= β 1,6-digalactósido); Gal β 1,6Gal β 1,4Glc (= 6'Gal-lac); Gal β 1,6Gal β 1,6Glc; Gal β 1,3Gal β 1,3Glc; Gal β 1,3Gal β 1,4Glc (= 3'Gal-lac); Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc (= 6',6-diGal-lac); Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc (= 6',3-diGal-lac); Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc (= 3', 6-diGal-lac); Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc (= 3',3-diGal-lac); Gal β 1,4Gal β ,4Glc (= 4'Gal-lac); y Gal β 1,4Gal β 1,4Gal β 1,4Glc (= 4',4-diGal-lac); y Fuc α 1,2Gal β 1,4Glc (= 2' fucosil-lactosa o FL),

para promover la absorción de nutrientes, la angiogénesis intestinal y la tolerancia a la alimentación enteral y/o la prevención y/o el tratamiento de inflamaciones intestinales tales como la enterocolitis necrosante, y/o la recuperación después de lesiones y/o intervenciones quirúrgicas intestinales.

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

- 0,25-20% e.p., preferiblemente 0,3-10% e.p., con mayor preferencia 0,3-5% e.p. y sobre todo aproximadamente 0,5% e.p., respecto al peso total de la mezcla de oligosacáridos, de al menos un oligosacárido N-acetilado,
- 0,5-30% e.p., preferiblemente 0,75-15% e.p., con mayor preferencia 0,75-10% e.p. y sobre todo aproximadamente 1% e.p., respecto al peso total de la mezcla de oligosacáridos, de al menos un oligosacárido sialilado, y
- 50-99,3% e.p., preferiblemente 20-80% e.p., con mayor preferencia 10-50% e.p. y sobre todo aproximadamente 50% e.p., respecto al peso total de la mezcla de oligosacáridos, de al menos un oligosacárido neutro,

para promover la angiogénesis intestinal, la absorción de nutrientes y la tolerancia a la alimentación enteral y/o la prevención y/o el tratamiento de inflamaciones intestinales tales como la enterocolitis necrosante, y/o la recuperación después de lesiones y/o intervenciones quirúrgicas intestinales.

Según una forma de ejecución preferida, la mezcla de oligosacáridos está presente en una proporción del 0,5-70%, con mayor preferencia del 1-20%, sobre todo del 2-5%, respecto al peso total de la composición.

Los compuestos oligosacáridos se definen por sus estructuras, de manera que GalNAc es N-acetil galactosamina, GlcNAc es N-acetil glucosamina, Gal es galactosa, NeuAc es ácido N-acetil neuramínico, Fuc es fucosa y Glc es glucosa.

La mezcla de oligosacáridos de la composición de acuerdo con la presente invención puede ser la única fuente de oligosacáridos en la composición. En una primera forma de ejecución el oligosacárido neutro se elige preferiblemente entre los FOS y GOS, con mayor preferencia GOS como los arriba citados.

- 5 En una segunda forma de ejecución, independiente o no de la primera forma de ejecución, el oligosacárido neutro es preferiblemente 2'-fucosil-lactosa (FL). En este caso la FL se incluye preferiblemente en el grupo de oligosacáridos neutros de la mezcla de oligosacáridos durante su elaboración.

El oligosacárido neutro se puede preparar como mezcla, adquiriendo y combinando los componentes individuales. Por ejemplo, los galacto-oligosacáridos sintetizados, tales como Gal β 1,6Gal, Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Glc, Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc, Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc, Gal β 1,4Gal β 1,4Glc y Gal β 1,4Gal β 1,4Gal β 1,4Glc y mezclas de los mismos están disponibles comercialmente con las marcas registradas Vivinal® de Friesland Campina, Países Bajos, y Elix'or®. Otros proveedores de oligosacáridos son Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH y Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Alternativamente pueden utilizarse glicosiltransferasas y/o glicosidasas específicas, tales como galactosiltransferasas, y/o fucosiltransferasas y/o galactosidasas y/o fucosidasas, para producir galacto-oligosacáridos y/u oligosacáridos fucosilados.

La fucosil-lactosa es un oligosacárido fucosilado (es decir, un oligosacárido con un resto de fucosa). Este oligosacárido fucosilado se puede aislar por cromatografía o tecnología de filtración a partir de una fuente natural tal como leches animales. Como alternativa se puede producir por medios biotecnológicos, utilizando fucosiltransferasas específicas y/o fucosidasas con el uso de tecnología de fermentación enzimática (enzimas recombinantes o naturales) o tecnología de fermentación microbiana. En el último caso, los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o pueden modificarse genéticamente para producir los sustratos y enzimas respectivos.

Se pueden emplear cultivos microbianos individuales y/o cultivos mixtos. La formación de oligosacáridos fucosilados puede ser iniciada por sustratos aceptores, partiendo de cualquier grado de polimerización (GP), desde GP = 1 en adelante. Como alternativa los oligosacáridos fucosilados pueden producirse por síntesis química a partir de lactosa y fucosa libres. Los oligosacáridos fucosilados también son asequibles, por ejemplo de Kyowa, Hakko, Kogyo, Japón.

Según la presente invención, el oligosacárido sialilado puede elegirse del grupo formado por 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa. Preferiblemente el oligosacárido sialilado incluye tanto 3'-sialil-lactosa como 6'-sialil-lactosa. En esta forma de ejecución la relación entre 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa está preferiblemente en el intervalo entre 5:1 y 1:2.

Las formas 3'- y 6'- de sialil-lactosa pueden obtenerse añadiendo a la composición una fuente natural tal como leche animal, o pueden aislarse por tecnología cromatográfica o de filtración a partir de dicha fuente natural. Como alternativa se pueden producir por medios biotecnológicos, utilizando sialiltransferasas específicas o sialilasas, neuraminidasas, mediante una tecnología de fermentación enzimática (enzimas recombinantes o naturales), mediante síntesis química o mediante una tecnología de fermentación microbiana. En el último caso los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o pueden modificarse genéticamente para producir los sustratos y enzimas respectivos. Se pueden usar cultivos microbianos individuales o cultivos mixtos. La formación de sialiloligosacáridos puede ser iniciada por sustratos aceptores, partiendo de cualquier grado de polimerización (GP), desde GP = 1 en adelante. Como alternativa las sialil-lactosas pueden producirse por síntesis química a partir de lactosa y ácido N'-acetilneuramínico libre (ácido siálico). Las sialil-lactosas también están disponibles en el comercio, por ejemplo, en Kyowa Hakko Kogyo de Japón.

Los oligosacáridos N-acetilados se pueden obtener añadiendo a la composición una fuente natural como leche animal. Como alternativa pueden prepararse por la acción de glucosaminidasa y/o galactosaminidasa sobre N-acetilglucosa y/o N-acetil galactosa. A tal fin también pueden usarse N-acetil-galactosil transferasas y/o N-acetil-glicosil transferasas. Los oligosacáridos N-acetilados también se pueden producir empleando tecnología de fermentación con los enzimas respectivos (recombinantes o naturales) y/o fermentación microbiana. En el último caso los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o pueden modificarse genéticamente para que produzcan los sustratos y enzimas respectivos. Se pueden utilizar cultivos microbianos individuales o cultivos mixtos. La formación de oligosacáridos N-acetilados puede ser iniciada por sustratos aceptores, partiendo de cualquier grado de polimerización (GP), desde GP = 1 en adelante. Otra opción es la transformación química de ceto-hexosas (p.ej. fructosa), libres o unidas a un oligosacárido (p.ej. lactulosa), en N-acetilhexosamina o en un oligosacárido que contenga N-acetilhexosamina, tal como está descrito en Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) Angew. Chem. Int. Ed. 38: 827-828.

La LNnT y LNT se pueden sintetizar por transferencia enzimática de unidades sacáridas desde fragmentos donantes a fragmentos aceptores, usando glicosilhidrolasas y/o glicosiltransferasas, tal como está descrito, por ejemplo, en las patentes US nº 5,288,637 y WO 96/10086. Como alternativa, la LNnT se puede preparar por transformación química de ceto-hexosas (p.ej. fructosa), libres o unidas a un oligosacárido (p.ej. lactulosa), en N-acetilhexosamina o en un

oligosacárido que contenga N-acetilhexosamina, tal como está descrito en Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* 38: 827-828. La N-acetil-lactosamina producida de este modo puede transferirse luego a lactosa como fragmento aceptor.

- 5 El oligosacárido N-acetilado se elige del grupo formado por lacto-N-neotetraosa (o LNnT) y lacto-N-tetraosa (o LNT). La LNnT y/o la LNT se incluyen preferiblemente en el grupo de oligosacáridos sialilados de la mezcla oligosacárida durante su elaboración.

10 La cepa bacteriana probiótica incluida en la composición de la presente invención se puede escoger de cualquier cepa que cumpla la definición de probiótico y tenga una vida útil aceptable para la composición a la que debe incorporarse. Por ejemplo, el requisito para incorporar la composición a fórmulas infantiles es que dichas fórmulas se mantengan estables y efectivas durante un periodo de hasta 12 meses. La cepa bacteriana probiótica es preferentemente un lactobacilo o una bifidobacteria.

15 Como ejemplos de especies preferidas de lactobacilos cabe citar *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus reuteri*. Las cepas particularmente preferidas son *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 y *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116. El probiótico es con mayor preferencia *Lactobacillus rhamnosus*, término que engloba el *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 y el *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724.

20 El *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 se puede adquirir de Valio Oy, de Finlandia, con la marca comercial LGG; el *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 lo vende BioGaia A.B con la marca comercial Reuteri.

25 Como ejemplos de especies preferidas de bifidobacterias cabe mencionar *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium infantis*. Las cepas particularmente preferidas son *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 vendidas, entre otras, por la compañía Christian Hansen de Dinamarca con la marca comercial Bb12, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA999 vendida por Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón con la marca comercial BB536, la cepa de *Bifidobacterium breve* vendida por Danisco con la marca comercial Bb-03, la cepa de *Bifidobacterium infantis* vendida por Procter & Gamble Co. con la marca comercial Bifantis y la cepa de *Bifidobacterium breve* vendida por el Institut Rosell (Lallemand) con la marca comercial R0070.

30 Según la presente invención, el probiótico se elige entre cepas bacterianas probióticas; preferiblemente el probiótico es un lactobacilo o una bifidobacteria, con mayor preferencia el probiótico es *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium lactis*.

35 El contenido del probiótico en la composición puede variar dentro de una amplia gama de porcentajes, siempre que el probiótico produzca el efecto descrito. Con todo, el contenido del probiótico en la composición equivale preferiblemente a una cantidad de 10^2 a 10^{12} ufc (= unidad formadora de colonias) de cepa bacteriana probiótica, con mayor preferencia entre 10^6 y 10^9 ufc, por cada gramo de la composición. Esta expresión incluye las posibilidades de que las bacterias estén vivas, inactivadas o muertas o incluso presentes en forma de fragmentos tales como ADN, materiales de pared celular, materiales intracelulares o metabolitos de bacterias. En otras palabras, la cantidad de bacterias que contiene la composición se expresa como la capacidad formadora de colonias de esta cantidad de bacterias, como si todas las bacterias estuvieran vivas, independientemente de si están de hecho vivas, inactivadas o muertas, fragmentadas o en un estado mixto de todos los citados.

40 La composición contiene al menos un AGPI-CL, que normalmente es un AGPI-CL n-3 o un n-6. El AGPI-CL n-3 puede ser un ácido graso C20 o C22 n-3. El AGPI-CL C20 o C22 n-3 está contenido preferiblemente en una cantidad de al menos 0,1% en peso respecto a todos los ácidos grasos de la composición. Preferiblemente el AGPI-CL n-3 es ácido docosahexanoico (DHA, C22: 6, n-3).

45 El AGPI-CL n-6 puede ser un ácido graso C20 o C22 n-6. El AGPI-CL C20 o C22 n-6 está contenido preferiblemente en una cantidad de al menos el 0,1% respecto a todos los ácidos grasos de la composición. Preferiblemente, el AGPI-CL n-6 es ácido araquidónico (ARA, C20:4 n-6). La fuente de AGPI-CL puede ser, por ejemplo, lípidos de huevo, aceite fúngico, aceite de pescado bajo en EPA o aceite de algas. El AGPI-CL de la composición de la presente invención se puede aportar mediante pequeñas cantidades de aceites que contengan elevadas cantidades de ácido araquidónico y ácido docosahexanoico preformados, como los aceites de pescado o los aceites microbianos. La composición según la presente invención es una composición nutricional sintética. En este caso puede ser una fórmula infantil pretérmino, un reforzante de leche materna, una fórmula infantil inicial, una fórmula de continuación, una fórmula de comida para bebés, una fórmula infantil de cereales, una leche en crecimiento, un producto alimenticio médico para nutrición clínica o un suplemento para ser usado normalmente durante una estancia hospitalaria y/o después del alta hospitalaria. Un suplemento puede ser para un bebé prematuro o para un niño o un adulto. Dicha composición es preferiblemente un producto de alimentación pretérmino, tal como una fórmula para bebés prematuros, un reforzante de leche humana o un suplemento para bebés prematuros. De acuerdo con una forma de ejecución, la composición es preferiblemente una fórmula para bebés prematuros, un

reforzante de leche humana o un suplemento. La composición conforme a la presente invención también pueden ser productos para niños o adultos, tales como yogur o alimentos médicos, así como comida para mascotas.

5 Según una forma de ejecución particularmente preferida, la composición de acuerdo con la presente invención está destinada a bebés y niños pequeños que nacieron prematuros o con BPN o que sufrieron RCIU, preferiblemente a bebés que padecieron RCIU y/o sufrieron una nutrición intrauterina subóptima y/o una lesión o cirugía intestinal.

10 La composición de acuerdo con la presente invención se puede usar antes y/o durante y/o después de un periodo de destete.

Todos los usos arriba citados están previstos en particular para bebés y niños pequeños, preferiblemente para bebés, en el caso de humanos. Pero todos estos usos también están previstos para mascotas jóvenes.

15 Las composiciones y usos según la presente invención son especialmente convenientes para bebés y niños pequeños, preferiblemente para bebés, que nacieron prematuros o con BPN o que sufrieron RCIU, preferiblemente a bebés que padecieron RCIU y/o sufrieron una nutrición intrauterina subóptima y/o una lesión o cirugía intestinal.

20 Sin querer limitarse a la teoría, los presentes inventores piensan que la eficacia de la combinación de la mezcla oligosacárida de la composición arriba descrita en la angiogénesis intestinal, en la absorción de nutrientes y en la tolerancia a la alimentación enteral y/o en la prevención y/o el tratamiento de inflamaciones intestinales tales como la enterocolitis necrosante, y/o en la recuperación después de una lesión y/o cirugía intestinal, puede ser el resultado de la combinación sinérgica de los efectos inmunomoduladores desencadenados por la cepa bacteriana probiótica y el AGPI-CL mediante su estimulación con la mezcla de oligosacáridos específicos.

25 La mezcla oligosacárida, el AGPI-CL y la cepa bacteriana probiótica se pueden administrar en la misma composición o secuencialmente.

30 Para tratar el grupo de bebés prematuros y de BPN es preferible que la composición sea de tipo nutricional, consumida, por ejemplo, en forma líquida. Puede ser una fórmula nutricional completa tal como una fórmula infantil (pretérmino), un suplemento, un reforzante de la leche materna, una fórmula de continuación o una leche en crecimiento. Como alternativa, para el grupo de mamíferos jóvenes, la composición puede ser una comida para mascotas.

35 La composición de acuerdo con la presente invención también puede contener una fuente proteica. No se cree que el tipo de proteína sea crítico para la presente invención, siempre que se cumplan los requisitos mínimos del contenido de aminoácidos esenciales y se asegure un crecimiento satisfactorio. Por lo tanto se pueden usar fuentes proteicas a base de suero de leche, caseína y mezclas de las mismas, así como fuentes proteicas basadas en soja. Por lo que respecta a las proteínas de suero de leche, la fuente proteica puede estar basada en suero de leche ácido o dulce o en mezclas de los mismos y puede contener alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina en cualquier proporción deseada. Por último, las proteínas pueden hidrolizarse parcialmente para mejorar la tolerancia oral a los alérgenos, sobre todo a los alérgenos alimentarios. En este caso la composición es de tipo hipoalérgico.

45 La composición según la presente invención también puede contener una fuente de hidratos de carbono además de la mezcla de oligosacáridos. Esto es especialmente preferible en caso de que la composición de la presente invención sea una fórmula infantil. En tal caso se puede emplear cualquier fuente de carbohidratos encontrada normalmente en las fórmulas infantiles, por ejemplo lactosa, sacarosa, maltodextrina, almidón y mezclas de las mismas, aunque la fuente preferida de carbohidratos es la lactosa. En cualquier caso la mezcla de oligosacáridos es preferiblemente la única fuente de prebióticos en la composición conforme a la presente invención. La composición según la presente invención también puede contener una fuente de lípidos además de AGPI-CL. Esto es de particular importancia 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 que sea adecuada para usar en fórmulas infantiles. Las fuentes de grasa preferidas incluyen ácido oleico de palma, aceite de girasol alto en oleico y aceite de cártamo alto en oleico. También se pueden agregar los ácidos grasos esenciales linoleico y ácido α -linolénico. En la composición, la fuente de grasa (incluyendo un AGPI-CL como ARA y/o DHA) tiene preferiblemente una relación de ácidos grasos n-6 a n-3 de aproximadamente 1:2 hasta 10:1, sobre todo de 3:1 hasta 8:1 aproximadamente.

60 La composición de la presente invención también puede contener todas las vitaminas y minerales que se consideran esenciales para la dieta diaria, en cantidades nutricionalmente significativas. Se han establecido los requisitos mínimos de ciertas vitaminas y minerales. Como ejemplos de minerales, vitaminas y otros nutrientes contenidos opcionalmente en la composición de la presente invención cabe citar 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, zinc, manganeso, cloro, potasio, sodio, selenio, cromo, molibdeno, taurina y L-carnitina. Los minerales suelen añadirse en forma salina. La presencia y las cantidades de minerales específicos y de otras vitaminas varían según la población prevista.

65

Si es preciso, 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.

5 La composición de la presente invención también puede contener otras sustancias que tengan un efecto beneficioso, como por ejemplo lactoferrina, nucleótidos, nucleósidos, gangliósidos, poliaminas y similares.

A continuación se describe como ejemplo la preparación de la composición según la presente invención.

10 La fórmula se puede preparar de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, puede prepararse mezclando una fuente proteica, una fuente de carbohidratos (diferente de la mezcla de oligosacáridos) y una fuente de grasa, incluyendo el AGPI-CL, en proporciones apropiadas. En caso de usarse, los emulsionantes se pueden incluir en este momento. Las vitaminas y los minerales se pueden agregar en este punto, pero generalmente se añaden más tarde para evitar su degradación térmica. Cualquier vitamina, emulsionante y similares de carácter lipófilo se puede disolver en la fuente de grasa antes de efectuar la mezcla. Para formar una mezcla líquida se puede añadir agua, preferiblemente
15 tratada por ósmosis inversa. La temperatura del agua está comprendida convenientemente en un intervalo aproximado de 50°C a 80°C para ayudar a dispersar los ingredientes. Se pueden utilizar licuadores comercialmente disponibles para formar la mezcla líquida. La mezcla de oligosacáridos se agregará en esta etapa, si el producto final debe tener forma líquida. Si el producto final va a ser en polvo los oligosacáridos se pueden agregar también en esta etapa, si se desea. Luego la mezcla líquida se homogeneiza, por ejemplo, en dos etapas.

20 Luego la mezcla líquida se puede tratar térmicamente para reducir las cargas bacterianas, calentándola rápidamente a una temperatura comprendida en un intervalo aproximado de 80°C hasta 150°C durante un tiempo comprendido aproximadamente entre 5 segundos y 5 minutos, por ejemplo, lo cual puede llevarse a cabo inyectando vapor, en un autoclave o mediante un intercambiador de calor, por ejemplo con un intercambiador de calor de placas.

25 Después la mezcla líquida se puede enfriar a una temperatura comprendida aproximadamente entre 60°C y 85°C, por ejemplo mediante una rápida refrigeración. Luego la mezcla líquida se puede homogeneizar de nuevo, por ejemplo en dos etapas, entre aproximadamente 10 MPa y 30 MPa en la primera etapa y entre 2 MPa y 10 MPa aproximadamente en la segunda etapa. A continuación, la mezcla homogeneizada se puede seguir enfriando para incorporar cualquier componente sensible al calor, como las vitaminas y los minerales. En este punto se ajusta convenientemente el pH y el contenido de sólidos de la mezcla homogeneizada.

35 La mezcla homogeneizada se transfiere a un aparato de secado conveniente tal como, por ejemplo, un secador por pulverización o un liofilizador, y se convierte en polvo. El polvo debe tener un contenido de humedad inferior al 5% en peso aproximadamente. La mezcla de oligosacáridos se puede añadir en esta etapa, mezclándola en seco con la(s) cepa(s) bacteriana(s) probiótica(s), o bien mezclándola en forma de un jarabe cristalino con la(s) cepa(s) bacteriana(s) probiótica(s) y secando por pulverización (o liofilizando).

40 Si se prefiere una composición líquida, la mezcla homogeneizada se puede esterilizar asépticamente y luego envasarla en recipientes adecuados o primero envasarla en los recipientes y después esterilizarla en autoclave.

45 En otra forma de ejecución, la composición de la presente invención puede ser un suplemento en cantidad suficiente para conseguir el efecto deseado en un individuo. Esta forma de administración suele ser más apropiada para bebés prematuros o con BPN o RCIU, niños mayores y adultos.

La cantidad de mezcla de oligosacáridos, de AGPI-CL y de cepa bacteriana probiótica que debe llevar el suplemento se elegirá según el modo en que debe ser administrado.

50 El suplemento puede estar por ejemplo en forma de polvo, tabletas, cápsulas, pastillas o líquido. El suplemento puede llevar además hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes formadores de película, agentes/materiales de encapsulación, materiales de pared/envoltura, compuestos de matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes surfactantes, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, vehículos, cargas, compuestos auxiliares, agentes dispersantes, agentes humectantes, coadyuvantes de proceso (disolventes), agentes fluidificantes, agentes de enmascaramiento del sabor, agentes
55 espesante, agentes gelificantes y agentes formadores de gel. El suplemento también puede llevar aditivos farmacéuticos convencionales y coadyuvantes, excipientes y diluyentes, incluyendo, sin limitarse a ellos, agua, gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, sulfonato de lignina, talco, azúcares, almidón, goma arábiga, aceites vegetales, polialquilenglicoles, agentes aromatizantes, conservantes, estabilizantes, emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, cargas y similares.

60 El suplemento se puede agregar a un producto aceptable para el consumidor (sea un ser humano o un animal) como vehículo o soporte ingerible, respectivamente. Como ejemplos de dichos vehículos o soportes cabe citar un producto farmacéutico o alimenticio o una composición de comida para mascotas. Son ejemplos no limitativos de dichas composiciones la leche, el yogurt, la cuajada, el queso, las leches fermentadas, los productos fermentados a base
65 de leche, los productos fermentados a base de cereales, las leches en polvo, la leche materna, la fórmulas pretérmino, las fórmulas infantiles, los suplemento orales y alimentación por sonda.

El suplemento puede contener asimismo un vehículo orgánico o inorgánico adecuado para administración enteral o parenteral, así como vitaminas, trazas de minerales y otros micronutrientes de acuerdo con las recomendaciones de organismos gubernamentales como la USRDA.

5 Las ventajas, la naturaleza y diversas características adicionales de la presente invención se apreciarán de manera más completa, teniendo en cuenta el ensayo ilustrativo descrito a continuación de forma detallada en relación con las figuras adjuntas:

FIG. 1: es un diagrama que ilustra el protocolo de los ensayos.

10 FIG. 2: es un gráfico de barras que representa los resultados de los ensayos relacionados con la expresión normalizada del ARNm ($\times 10^{-3}$) de CD34.

FIG. 3: es un gráfico de barras que representa los resultados de los ensayos relacionados con la expresión normalizada del ARNm ($\times 10^{-3}$) de VEGF.

15 FIG. 4: es un gráfico de barras que representa los resultados de los ensayos relacionados con la expresión normalizada del ARNm ($\times 10^{-3}$) de FGF.

Ejemplo

20 Se llevaron a cabo ensayos sobre el efecto de la suplementación de una mezcla de oligosacáridos de leche de vaca (OSLV) enriquecida con galacto-oligosacáridos (suero de leche permeado, delactosado y desmineralizado o SLPDD), AGPI-CL (ácido araquidónico -ARA- y ácido docosahexaenoico -DHA-) y *Bifidobacterium lactis* (BL), y opcionalmente 2'-fucosil-lactosa (FL), en crías.

1. Metodología

25 Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con la Ley Suiza de Protección Animal (nivel de gravedad 1) y fueron aprobados por el Office Vétérinaire Cantonal (Lausana, Suiza, autorizaciones nº 2028 y 2028.1). Se adquirieron ratas macho reproductoras y hembras vírgenes Long-Evans Hooded a Janvier (Francia), que llegaron al centro de cuidado animal dos semanas antes del apareamiento.

30 Las hembras gestantes recibieron alimento (Kliba 3437) y agua a voluntad, se alojaron a temperatura y humedad constantes, y se mantuvieron en un ciclo de oscuridad/luz 12:12. Las condiciones de alojamiento se mantuvieron durante todo el tiempo del protocolo. En el día postnatal (= DPN) 2 tras el nacimiento (B) se sacaron las madres de sus jaulas de maternidad y se determinó el sexo de las crías. Se asignaron camadas estandarizadas de 8 crías macho para crianza, después de aleatorizarlas por peso corporal. Las madres y sus crías se asignaron a una de estas dos condiciones de crianza: 1) grupos de privación materna, expuestos a un período de 180 min de separación materna diaria desde el DPN2 hasta el DPN14 (**MS**), o 2) controles no tratados (**NS**).

35 Las crías MS se destetaron (W) el DPN15. Se aleatorizaron por peso y madre lactante y se distribuyeron en grupos de 16 animales, que fueron alimentados hasta el DPN26 con una dieta de control (AIN-93G modificado, grupo MS-Cont) o una dieta similar adaptada para contener AGPI-CL, *Bifidobacterium lactis* CNCM I -3446 (BL) y oligosacáridos (SLPDD). Los animales MS (**grupo MS-Cont**) se alojaron en grupos de 8 crías hasta el DPN21, para reducir la carga de estrés del destete prematuro, y después individualmente hasta el final del ensayo. Los animales del grupo NS se destetaron el DPN21 y recibieron la dieta de control (**grupo NS-Cont**), y se alojaron individualmente hasta el final del ensayo.

40 Los animales se sacrificaron (†) el DPN26 por sangrado exhaustivo, anestesiados con isoflurano. Se tomaron muestras intestinales para el posterior análisis por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) de la expresión del ARNm del marcador angiogénico.

2. Tratamiento y dietas

45 En la siguiente tabla 1 se detallan los ingredientes funcionales usados para la alimentación experimental por sonda gástrica y la composición dietética del SLPDD a 98,8% de materia seca.

55

Tabla 1: Composición de la mezcla de SLPDD	
	% de materia seca
Lactosa	33,4
Total de oligosacáridos	25,51
Glucosa	9,06
Galactosa	8,13
Proteína	4,03
Cenizas	11,43
Desconocido	8,44

El SLPDD se obtiene normalmente según las revelaciones de la patente WO2007/101675 o WO 2007/090894 y suele contener una mezcla de aproximadamente 30% e.p. de GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc; 50% e.p. de Gal β 1,6Gal β 1,4Glc y Gal β 1,3Gal β 1,4Glc; 20% e.p. de NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc.

Los animales fueron alimentados desde el destete hasta el final del ensayo con las dietas semisintéticas adaptadas nutricionalmente (AIN-93 G modificado), cuya composición está indicada en las tablas 2, 3 y 4.

Tabla 2: Composición de las dietas (per 100 g de dieta)

	Control	AGPI-BL-SLPDD	AGPI-BL-SLPDD-FL
Caseinato de K (g)	20,00	20,00	20,00
Almidón de maíz (g)	33,95	33,95	33,95
Maltodextrina (g)	20,00	13,69	13,85
Sacarosa (g)	10,00	10,00	10,00
Lactosa (g)	2,82	-	0,28
Glucosa (g)	0,55	-	0,06
Galactosa (g)	0,63	-	0,06
SLPDD (g) ¹	-	9,94	8,95

(Continuación)

	Control	AGPI-BL-SLPDD	AGPI-BL-SLPDD-FL
FL (g) ²	-	-	0,43
Mezcla de grasas (g) (ver composición abajo)	7,00	7,00	7,00
Mezcla de minerales (AIN-93-G) (g)	3,50	3,50	3,50
Mezcla de vitaminas (AIN-93-VX) (g)	1,00	1,00	1,00
L-cisteína (g)	0,30	0,30	0,30
Bitartrato de colina (g)	0,25	0,25	0,25
DAB 10 (g)	-	-	-
<i>B. lactis</i> en polvo (BL) (5,40E+10 ufc/g) (g) ³	-	0,37	0,37
Total (g)	100,00	100,00	100,00

¹ SLPDD (suero de leche permeado, delactosado y desmineralizado); ² FL = 2-fucosil-lactosa;

³ *B. lactis* = BL = *B. lactis* CNCM I-3446, secado por pulverización

Tabla 3: Mezcla de grasas (g/100 g de mezcla de grasas)

	Control	AGPI-BL-SLPDD	AGPI-BL-SLPDD-FL
Aceite de soja	21,80	21,90	21,90
Manteca de cacao	37,34	27,41	27,41
Aceite de maíz	40,86	40,10	40,10
ARASCO (AGPI)	-	5,15	5,15
DHASCO (AGPI)	-	5,44	5,44

Tabla 4: Composición nutricional de las dietas

	Control	AGPI-BL-SLPDD	AGPI-BL-SLPDD-FL
Kcal digeribles/100 g (previsto) ⁴	415	408	408
Proteína (g/100 g, N x 6,25) ⁵	17,87	18,36	18,20
Grasa (g/100 g) ⁶	7,11	7,09	7,03
AA (% de AG) ⁷	NA	NA	NA
DHA (% de AG) ⁸	NA	NA	NA
<i>B. lactis</i> (ufc/100 g de dieta) ⁹	ND	1,24E+09	4,00E+09

⁴ previsto según la composición nutricional (1 g de carbohidrato digerible = 4 Kcal;

1 g de oligosacárido = 2 Kcal; 1 g de proteína = 4 Kcal; 1 g de grasa = 9 Kcal);

⁵ analizada por Kjeldhal; ⁶ analizada por Soxhlet; ⁷ AA = ácido araquidónico, ⁸ DHA = ácido

docosahexaenoico; ⁹ analizado por método de cultivo standard y PCR; NA = no analizado;

ND = por debajo de los límites de detección (menos que 1,00E+03)

El perfil de ácidos grasos de las tres dietas se equilibró para proporcionar una relación similar de n-6/n-3 y una relación similar de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Por lo tanto, la composición de ácidos grasos de las tres dietas fue casi la misma en cuanto al perfil de ácidos grasos.

Los animales se sacrificaron el día 26 posterior al nacimiento, DPN.

3. Parámetros de angiogénesis

5 Se analizaron los marcadores de angiogénesis, es decir CD34, que es una proteína altamente expresada en las células endoteliales, y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y FGF (factor de crecimiento fibroblástico), que son factores angiogénicos.

Es sabido que los indicadores libres CD34, VEGF y FGF revelan una mejor vascularización del intestino.

10 De los resultados representados en las figuras 2, 3 y 4 se desprende que las composiciones AGPI-BL-SLPDD y AGPI-BL-SLPDD-FL según la presente invención muestran una expresión de los factores de crecimiento angiogénicos y de los marcadores de angiogénesis mejor que las dos composiciones de control NS-CONT y MS-CONT. En concreto, las expresiones normalizadas del ARNm de CD34 y VEGF son incluso mejores que las del control NS-CONT.

15 Por tanto, las mezclas AGPI-BL-SLPDD y AGPI-BL-SLPDD-FL según la presente invención proporcionaron una mejor vascularización que el control MS y también que el control NS, lo cual es una auténtica ventaja de las composiciones conforme a la presente invención.

20 Es sabido que el flujo sanguíneo alterado retrasa el desarrollo intestinal perjudicando la absorción de nutrientes y se cree que es un factor causal en la patogénesis de ECN. Por consiguiente las mezclas AGPI-BL-SLPDD y AGPI-BL-SLPDD-FL ayudan efectivamente a que el sujeto que las ingiere no tenga un flujo sanguíneo reducido hacia la mucosa intestinal.

25 Así, las composiciones nutricionales de acuerdo con la presente invención tuvieron efecto en la angiogénesis intestinal y en la absorción de nutrientes y también en la tolerancia a la alimentación enteral y/o en la prevención y/o tratamiento de las inflamaciones intestinales tales como la enterocolitis necrosante, y/o en la recuperación después de lesiones y/o intervenciones quirúrgicas intestinales.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga (AGPI-CL), al menos un probiótico y una mezcla de oligosacáridos, la cual a su vez contiene al menos un oligosacárido N-acetilado, al menos un oligosacárido sialilado y al menos un oligosacárido neutro, de tal manera que dicha composición es una composición nutricional sintética para la promoción de la angiogénesis intestinal y de la absorción de nutrientes, así como de la tolerancia a la alimentación enteral, y/o para la prevención y/o el tratamiento de inflamaciones intestinales como la enterocolitis necrosante, y/o para la recuperación después de lesiones y/o intervenciones quirúrgicas intestinales.
2. Composición según la reivindicación anterior, en que el oligosacárido neutro se elige entre fructooligosacáridos (FOS) y/o galactooligosacáridos (GOS), preferiblemente GOS.
3. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, en que dicha mezcla de oligosacáridos contiene al menos un oligosacárido N-acetilado elegido del grupo formado por GalNAc α 1,3Gal β ,4Glc (= 3'GalNAc-lac = N-acetilgalactosaminil-lactosa) y Gal β 1,6GalNAc α 1,3Gal β 1,4Glc (= 6'Gal-3GalNAc-lac = galactosil-N-acetil-galactosaminil-lactosa), Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc (lacto-N-neotetraosa) y Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc (lacto-N-tetraosa), al menos un oligosacárido sialilado seleccionado del grupo constituido por NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc (= 3'-sialil-lactosa) y NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc (= 6'-sialil-lactosa), y al menos un oligosacárido neutro seleccionado del grupo constituido por Gal β 1,6Gal (= β 1,6-digalactósido); Gal β 1,6Gal β 1,4Glc (= 6'Gal-lac); Gal β 1,6Gal β 1,6Glc; Gal β 1,3Gal β 1,3Glc; Gal β 1,3Gal β 1,4Glc (= 3'Gal-lac); Gal β 1,6Gal β 1,6Gal β 1,4Glc (= 6',6-diGal-lac); Gal β 1,6Gal β 1,3Gal β 1,4Glc (= 6',3-diGal-lac); Gal β 1,3Gal β 1,6Gal β 1,4Glc (= 3', 6-diGal-lac); Gal β 1,3Gal β 1,3Gal β 1,4Glc (= 3',3-diGal-lac); Gal β 1,4Gal β ,4Glc (= 4'Gal-lac); y Gal β 1,4Gal β 1,4Gal β 1,4Glc (= 4',4-diGal-lac) ; y Fuca α 1,2Gal β 1,4Glc (= 2' fucosil-lactosa o FL).
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que la mezcla de oligosacáridos contiene:
- 0,25-20% e.p., preferiblemente 0,3-10% e.p., con mayor preferencia 0,3-5% e.p. y sobre todo aproximadamente 0,5% e.p., respecto al peso total de la mezcla de oligosacáridos, de al menos un oligosacárido N-acetilado,
 - 0,5-30% e.p., preferiblemente 0,75-15% e.p., con mayor preferencia 0,75-10% e.p. y sobre todo aproximadamente 1% e.p., respecto al peso total de la mezcla de oligosacáridos, de al menos un oligosacárido sialilado, y
 - 50-99,3% e.p., preferiblemente 20-80% e.p., con mayor preferencia 10-50% e.p. y sobre todo aproximadamente 50% e.p., respecto al peso total de la mezcla de oligosacáridos, de al menos un oligosacárido neutro.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual la mezcla de oligosacáridos está contenida en una proporción del 0,5-70%, con mayor preferencia del 1-20% y sobre todo del 2-5%, respecto al peso total de la composición.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que el AGPI-CL se escoge entre el ácido araquidónico (ARA) y el ácido docosahexanoico (DHA), y preferiblemente el AGPI-CL es una mezcla de ARA y DHA.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el probiótico se elige entre cepas bacterianas y preferiblemente el probiótico es un lactobacilo o una bifidobacteria, y con mayor preferencia el probiótico es *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus reuteri*.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que el oligosacárido N-acetilado se elige del grupo formado por lacto-N-neotetraosa (o LNNT) y lacto-N-tetraosa (o LNT).
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que el oligosacárido sialilado se elige del grupo formado por 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa, y preferiblemente el oligosacárido sialilado incluye tanto 3'-sialil-lactosa como 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.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que el oligosacárido neutro es 2'-fucosil-lactose (o FL).
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha composición es una fórmula infantil pretérmino, un reforzante de leche materna, una fórmula infantil inicial, una fórmula de continuación, una fórmula de comida para bebés, una fórmula infantil de cereales, una leche en crecimiento, un producto alimenticio médico para nutrición clínica o un suplemento, y preferiblemente dicha composición es una fórmula infantil pretérmino, un reforzante de leche materna o un suplemento.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, destinada a lactantes y niños pequeños, preferentemente bebés, que han nacido prematuros o con bajo peso, o que han padecido un retraso del crecimiento intrauterino o una nutrición intrauterina subóptima y/o daño y/o cirugía intestinal.

