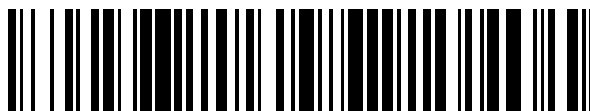


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 868**

51 Int. Cl.:

A23L 33/10 (2006.01)

A23L 33/17 (2006.01)

A23L 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2014 PCT/EP2014/063538**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15000788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2014 E 14732904 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 3016529**

54 Título: **Nuevo uso profiláctico para la prevención de infecciones**

30 Prioridad:

01.07.2013 SE 1350804

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

04.07.2018

73 Titular/es:

**HERO AG (100.0%)
Karl Roth-Strasse 8
5600 Lenzburg, CH**

72 Inventor/es:

**LÖNNERDAL, BO;
HERNELL, OLLE;
SJÖBERG, LARS-BÖRJE y
TENNEFORS, CATHARINA**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 674 868 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

Nuevo uso profiláctico para la prevención de infecciones

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo uso de composiciones nutricionales para lactantes, por ejemplo, preparados para lactantes.

10 **Antecedentes**

Se observan diferencias en la morbilidad entre lactantes amamantados y alimentados con preparados. Los lactantes amamantados tienen menos infecciones respiratorias, infecciones de oído y gastroenteritis que los lactantes alimentados con preparados. (A. L. Wright *et al.* BMJ, vol. 299, 946-949, B. Duncan *et al.* Pediatrics, 2003, vol. 91 (5) 867-873, G. Aniansson *et al.* Pediatr Infect Dis J, 1994, vol. 13 (3) 182-188 y K.G. Dewey *et al.* J Pediatr, 1992, vol. 126 (n.º 5) parte 1 695-702). Una posible explicación es que la leche materna contiene más sustancias inmunomoduladoras que la leche de vaca.

El ácido siálico se encuentra en la leche unido tanto a proteínas, por ejemplo kappa caseína con su contenido de glicopéptido macro (cGMP), como unido a lípidos en gangliósidos. El ácido siálico se encuentra en altas concentraciones en el cerebro humano y la leche materna y se ha propuesto como un factor lácteo que podría tener un impacto en el desarrollo del sistema nervioso central (B. Wang *et al.* Eur J Clin Nutr, (2003) 57, 1351-1369). El enriquecimiento de ácido siálico en la dieta de lechones ha demostrado mejorar la memoria y el aprendizaje (B. Wang *et al.* Am J Clin Nutr, 2007; 85:561-569).

Además, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) tienen un claro impacto en el desarrollo del sistema nervioso. Los niños amamantados tienen niveles más altos de ácido araquidónico (ARA) y ácido docosahexaenoico (DHA) tanto en la sangre como en el cerebro que los niños que recibieron un preparado sin la adición de ARA y DHA (M. Makrides *et al.* Am J, Clin Nutr 1994; 60:189-94).

La esfingomielina alimenticia es también probablemente importante para el desarrollo del sistema nervioso de un lactante. En estudios con ratas se sabe que el enriquecimiento con esfingomielina en la dieta aumenta la mielinización del sistema nervioso (K.S.T. Oshida *et al.* Pediatr Res, 2003. 53: págs. 589-593). La leche materna contiene esfingomielina y la cantidad es de entre 5-13 mg/100 ml. (García *et al.* Food Chem 2012 135(3): P1777-1783) Fosfolipid fingerprints of milk from different mammals determined by 31NMR).

Antecedentes especiales

Otro documento que describe que describe que la lactancia materna protege contra la otitis, infecciones respiratorias de vías bajas e infecciones gastrointestinales es (Ip, S., *et al.*, A summary of the Agency for Healthcare Research and Quality's evidence report on breastfeeding in developed countries. Breastfeed Med, 2009. 4 supl 1: págs. S17-30.). También el comentario del comité de la ESPGHAN (JPGN, 2009, 49: págs 112-125). Esto se debe probablemente a factores antimicrobianos en la leche humana que incluyen promotores del crecimiento de agentes protectores de bacterias entéricas, enzimas que lisan bacterias, anticuerpos, oligosacáridos, proteínas glicosiladas, lípidos antivirales y leucocitos (Labbok, M.H., D. Clark, y A.S. Goldman, Breastfeeding: maintaining an irreplaceable immunological resource. Nat Rev Immunol, 2004. 4(7): págs. 565-72,2). Durante las últimas décadas, la membrana de glóbulos de grasa láctea (MFGM), una fracción de leche pequeña pero biológicamente activa, ha ganado interés por tener efectos promotores de la salud en varias áreas, incluyendo infecciones (Spitsberg, V.L., revisión invitada: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. J Dairy Sci, 2005. 88(7): págs. 2289-94,3). La fracción de MFGM se ha desechado históricamente en la fabricación de preparados para lactantes. Recientemente, se han hecho comercialmente disponibles fracciones de leche bovina enriquecida con MFGM, pero, hasta donde saben los inventores, la complementación con MFGM para preparados para lactantes para la profilaxis y prevención de infecciones, especialmente otitis no se había estudiado nunca anteriormente. La MFGM comprende 120 proteínas diferentes en una bicapa fosfolipídica que rodea gotitas de grasa en la leche.

55 **Técnica anterior**

Ninguna técnica anterior da a conocer una composición nutricional para lactantes que pueda usarse para la profilaxis y prevención de infecciones, especialmente otitis y, por tanto, reducir el uso de antitérmicos.

60 **Objeto de la invención**

El presente estudio es parte de un ensayo controlado aleatorizado con el objetivo global de evaluar los efectos sobre la salud en lactantes alimentados con un preparado experimental (EF) con un contenido de proteínas y valor energético reducidos y con complementación con una fracción de MFGM bovina. Los resultados primarios en el ensayo principal fueron peso a los 6 meses, composición corporal a los 4 meses y función cognitiva a los 12 meses.

Tal como describieron los presentes inventores en el documento WO2013/153071, el grupo de EF reguló por incremento sus volúmenes ingeridos durante la intervención, por tanto, la ingesta total y energética de proteínas fue similar en ambos grupos durante la intervención, y el crecimiento lineal y ponderal y la composición corporal fueron similares hasta los 6 meses. Ahora, se ha evaluado el objeto para elucidar si la EF, en comparación con el preparado convencional (SF), puede influir en el riesgo de enfermedades infecciosas y otros síntomas de enfermedad en lactantes alimentados con preparados de manera favorable hacia niveles más próximos a lactantes amamantados. La hipótesis fue que los lactantes que recibieron el preparado EF tendrían menos infecciones durante los primeros 12 meses en comparación con lactantes que recibieron el preparado SF, y a un nivel más similar al de los lactantes amamantados.

Sumario de la invención

Una composición nutricional para un lactante, especialmente un preparado para lactantes, como producto listo para usar o producto listo para usar reconstituido con agua a partir de un polvo fabricado, que contiene sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero o proteínas de leche ricos en fosfolípidos y ricos en membrana de glóbulos de grasa láctea (MFGM) para su uso en la prevención o profilaxis de la otitis bacteriana; en la que los sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero son ricos en membrana de glóbulos de grasa láctea (MFGM) como tal y uno o más de lactoferrina, α -lactalbúmina, butirofilina, MUC₁, PAS6/7 (lactadherina), gangliósidos, CD14, TLR1 y TLR4, IgG, cGMP, ácido siálico y fosfolípidos (por ejemplo esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina); en la que dichos sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero o proteínas de leche ricos en fosfolípidos comprenden al menos el 20% en peso de fosfolípidos, preferiblemente del 20 al 70% en peso de fosfolípidos, más preferiblemente del 25 al 55% en peso de fosfolípidos, basándose en los lípidos totales de la fuente de sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero enriquecidos con fosfolípidos; y en la que la composición comprende sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero/proteínas de leche ricos en fosfolípidos y MFGM en el 5-7% en peso del peso seco total de dicha composición nutricional.

Sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero (ricos en fosfolípidos)

Los sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero ricos en fosfolípidos usados como componente en la composición nutricional según la invención son un concentrado de proteínas de lactosuero con una alta concentración de lípidos y proteínas bioactivos. El concentrado de proteínas de lactosuero tiene un alto valor nutricional, y puede aplicarse en la nutrición de lactantes y clínica. Los sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero/proteínas de leche ricos en fosfolípidos contienen la mayoría de los fragmentos de proteínas de membrana insolubles de MFGM presentes originalmente en el lactosuero, además de componentes de lactosuero, proteínas, lactosa y sales residuales. La invención usa, sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero ricos en fosfolípidos obtenidos tras la eliminación de las principales proteínas de lactosuero mediante procesamiento industrial conocido, tal como filtración, cromatografía de intercambio iónico, y similares. Esta fracción contiene la mayoría de los fragmentos de membrana insolubles, que contienen proteína y grasa asociada. Pueden usarse materias primas similares de diferentes proveedores como sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero/proteínas de leche enriquecidos con fosfolípidos en un preparado según la invención.

La fuente de sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero enriquecidos con fosfolípidos comprende al menos el 20% en peso de fosfolípidos basándose en el contenido de lípidos total, por ejemplo del 20 al 70% en peso o por ejemplo del 25 al 55% en peso de fosfolípidos basándose en los lípidos totales de la fuente de sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero enriquecidos con fosfolípidos.

Los sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero ricos en fosfolípidos usados en la composición nutricional según la presente invención no están empobrecidos de cGMP.

Los componentes de los sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero ricos en fosfolípidos pueden afectar al desarrollo del sistema nervioso, la morbilidad y el desarrollo psicomotor de manera positiva para lactantes alimentados con la composición nutricional según la invención en comparación con lactantes alimentados con preparado para lactantes convencional o el preparado de control según la invención.

Los fosfolípidos son constituyentes importantes de membranas celulares que contribuyen significativamente a la estructura y función de la membrana.

A partir de los resultados en este estudio puede esperarse que los sólidos de proteínas de lactosuero/proteínas de leche de componente ricos en fosfolípidos y MFGM añadidos a una formulación convencional también fueran activos para la prevención y profilaxis de la otitis bacteriana en niños durante los primeros seis meses de vida.

Puede usarse Lacprodan MFGM-10 (de Arla foods) o materias primas similares de otros proveedores como sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero enriquecidos con fosfolípidos en un preparado según la invención. Por ejemplo, la fuente de sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero enriquecidos con fosfolípidos comprende al menos el 20% en peso de fosfolípidos basándose en el contenido de lípidos total, por ejemplo del 20 al 70% en peso o por ejemplo del 25 al 55% en peso de fosfolípidos basándose en los lípidos totales de la fuente de sólidos de

concentrados de proteínas de lactosuero enriquecidos con fosfolípidos.

5 Se administran sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero ricos en fosfolípidos o bien como una membrana de grasa láctea MFGM o bien como los diferentes ingredientes definidos anteriormente uno a uno, pero mezclados juntos. Es importante que el contenido de fosfolípidos basándose en el contenido de lípidos total comprenda al menos el 20% en peso de fosfolípidos basándose en el contenido de lípidos total.

10 El preparado descrito en el documento PCT/EP2013/057405 (publicado como WO 2013/153071) puede usarse para la profilaxis de la otitis bacteriana. No se había producido anteriormente un preparado tanto con un bajo contenido de proteínas como un bajo valor energético, que en combinación con esto tiene un alto contenido de ácido siálico y un alto contenido de colesterol derivado de leche con la característica adicional de que tiene un efecto profiláctico sobre la otitis bacteriana.

15 No hay nada en la bibliografía que instruya al experto en la técnica a usar un preparado similar de tal manera. Puesto que hay muchos parámetros diferentes que han de considerarse, no fue obvio el cómo componer el preparado para lactantes que cumpla la necesidad de los lactantes así como la directiva de la comisión, legislaciones nacionales y recomendaciones dentro del campo nutricional pediátrico. Entonces fue más inesperado que la formulación también tuviera un efecto profiláctico contra la otitis bacteriana.

20 A continuación se muestran diferentes realizaciones que van a usarse para la profilaxis de la otitis bacteriana. Las realizaciones son realizaciones a modo de ejemplo y no limitativas del alcance de la invención

25 Además, el preparado para lactantes nutricional en el mercado se beneficiará de la adición de sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero ricos en fosfolípidos y en MFGM tal como se definió anteriormente y proporcionará un efecto profiláctico o preventivo.

En una realización de la invención, la composición nutricional usada según la invención comprende;

30 - un valor energético total de 67 kcal/100 ml o menos, por ejemplo 62 kcal/100 ml o menos, especialmente menos de 60 kcal/100 ml o entre 58-62 kcal/100 ml o por ejemplo 58-60 kcal/100 ml

- un contenido de proteínas de 1,25 g/100 ml o menos, o por ejemplo menos de 1,25 g/100 ml o por ejemplo entre 1,1-1,25 g/100 ml o entre 1,1 g/100 ml y menos de 1,25 g/100 ml

35 - sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero/proteínas de leche ricos en fosfolípidos y MFGM que contienen el 5-7% en peso del peso seco total de la composición.

En una realización de la invención la composición nutricional usada según la invención comprende

40 - un valor energético total de 67 kcal/100 ml o menos

- un contenido de proteínas que es de 1,5 g/100 ml o menos,

45 - un valor energético de proteína del 7,2-8,6 por ciento del valor energético total de la composición nutricional,

- un valor energético de grasa que es de al menos el 47 por ciento o más del valor energético total de la composición nutricional,

50 - un contenido de ácidos grasos de cadena media que comprende de 8 a 10 carbonos que es menos del 3% en peso de la cantidad total de ácidos grasos,

- un contenido de ácido siálico de 10-25 mg/100 ml o más,

55 - un contenido de colesterol de 4-10 mg/100 ml

- un contenido de esfingomielina de 7-15 mg/100 ml

En una realización de la invención la composición nutricional usada según la invención tiene un valor energético total de 62 kcal/100 ml o menos y la composición comprende;

60 - un contenido de proteínas que es de 1,25 g/100 ml o menos,

- un contenido de colesterol de 5-10 mg/100 ml,

65 - sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero ricos en fosfolípidos y MFGM que contienen el 5-7% en peso del peso seco total de la composición.

ES 2 674 868 T3

En una realización para su uso según la invención el valor energético total de la composición nutricional es de 67 kcal/100 ml o menos y la composición comprende;

- 5 - un contenido de proteínas que es de 1,5 g/100 ml o menos,
- un valor energético de proteína del 7,2-8,6 por ciento del valor energético total de la composición nutricional,
- un valor energético de grasa que es al menos del 47 por ciento o más del valor energético total de la composición nutricional,
- 10 - un contenido de ácidos grasos de cadena media que comprende de 8 a 10 carbonos que es menos del 3% en peso de la cantidad total de ácidos grasos,
- 15 - un contenido de ácido siálico de 10-25 mg/100 ml o más,
- un contenido de colesterol de 4-10 mg/100 ml
- un contenido de esfingomielina de 7-15 mg/100 ml
- 20 - sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero/proteínas de leche ricos en fosfolípidos y MFGM en el 5-7% en peso del peso seco total de dicha composición nutricional.

En una realización la composición nutricional usada según la invención tiene un valor energético total de 62 kcal/100 ml o menos y la composición comprende;

- 25 - un contenido de proteínas que es de 1,25 g/100 ml o menos,
- un valor energético de proteína de 7,8-8,4 por ciento del valor energético total de la composición nutricional,
- 30 - un valor energético de grasa que es al menos del 49 por ciento o más del valor energético total de la composición nutricional,
- un contenido de ácidos grasos de cadena media que comprende de 8 a 10 carbonos que es menos del 3% en peso de la cantidad total de ácidos grasos,
- 35 - un contenido de ácido siálico de 10-25 mg/100 ml o más,
- un contenido de colesterol de 5-10 mg/100 ml
- 40 - un contenido de esfingomielina de 9-15 mg/100 ml o más
- sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero/proteínas de leche ricos en fosfolípidos y MFGM que contienen el 5-7% en peso del peso seco total de la composición
- 45

En otra realización de la invención la composición nutricional que va a usarse según la invención comprende;

- 50 - un valor energético total de 62 kcal/100 ml o menos, o por ejemplo menos de 60 kcal/100 ml o entre 58-62 kcal/100 ml o por ejemplo 58-60 kcal/100 ml
- un contenido de proteínas de 1,25 g/100 ml o menos, o por ejemplo menos de 1,25 g/100 ml o por ejemplo entre 1,1-1,25 g/100 ml o entre 1,1 g/100 ml y menos de 1,25 g/100 ml
- un valor energético de proteína de 7,8-8,4 por ciento del valor energético total de la composición nutricional o por ejemplo el 8,0-8,3 por ciento del valor energético total de la composición nutricional
- 55 - un contenido de grasa que es al menos del 49 por ciento o más del valor energético total de la composición nutricional o especialmente del 50 por ciento o más por ejemplo del 52-53% de energía de grasa, por ejemplo el 52,5% de la energía del preparado se deriva de grasa
- 60 - un contenido de ácidos grasos de cadena media que comprende de 8 a 10 carbonos que es del 0,5-3% en peso de la cantidad total de ácidos grasos o por ejemplo del 1-3% o por ejemplo del 1-2% de la cantidad total de ácidos grasos en la composición
- 65 - contenido de ácido siálico de 18 mg/100 ml o más, o entre 18-25 mg/100 ml

- un contenido de esfingomielina de 9-15 mg/100 ml o más de 10 mg/100 ml o especialmente 13 mg/100 ml
- un contenido de colesterol de entre 5-10 mg/100 ml o entre 7-10 mg/100 ml o por ejemplo del 0,2-0,3% en peso de colesterol expresado como porcentaje del contenido de grasa total del preparado o por ejemplo 8 mg/100 ml, que es el 0,23% en peso de colesterol expresado como porcentaje del contenido de grasa total del preparado
- sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero/proteínas de leche ricos en fosfolípidos que contienen el 5-7% en peso del peso seco total de la composición.
- En otra realización la composición nutricional usada según la invención comprende además
 - ácido siálico unido a lípidos como gangliósidos de entre el 1,5-5% en peso del contenido de ácido siálico total, o por ejemplo el 4% en peso de ácido siálico unido a lípidos del contenido de ácido siálico total.
- En una realización el valor energético usado en la composición nutricional que va a usarse según la invención es por ejemplo de 58-60 kcal/100 ml y el 51,8 - 53,4% de energía de grasa. El contenido de proteínas es por ejemplo de 1,1-1,25 g/100 ml y el 7,8 - 8,2% de energía de proteínas, y un bajo contenido de NPN, es por ejemplo un contenido de NPN entre 0,015-0,020 g/100 ml y un alto contenido de ácido siálico es por ejemplo de 18-20 mg/100 ml. El nivel de colesterol derivado de leche es por ejemplo de 7-9 mg/100 ml.
- En otra realización el valor energético en la composición nutricional que va a usarse según la invención es de 60 kcal/100 ml y la composición comprende el 52,5% de energía de grasa. El contenido de proteínas es de 1,2 g/100 ml y la composición comprende el 8% de energía de proteínas. En otra realización de la invención el valor energético en la composición nutricional según la invención es de 60 kcal/100 ml y el 52,5% de energía de grasa, el contenido de proteínas es por ejemplo de 1,2 g/100 ml y la composición comprende el 8% de energía de proteínas, con un contenido de nitrógeno no de proteínas de 0,015-0,020 g/100 ml o por ejemplo de 0,016 g/100 ml y 13 mg/100 ml de esfingomielina y un alto contenido de ácido siálico es por ejemplo de 19 g/100 ml. El nivel de colesterol derivado de leche es por ejemplo de 8 mg/100 ml y la composición comprende un contenido de ácido graso de cadena media (que comprende de 8 a 10 carbonos) que es de menos del 3% en peso de la cantidad total de ácidos grasos.
- Una composición nutricional que va a usarse según la invención también puede referirse a la composición de la invención como un polvo adecuado para producir una composición líquida tras su reconstitución con agua.
- La composición nutricional que va a usarse según la invención puede prepararse a partir de polvo mezclando 114 g de un polvo de composición nutricional con 900 ml de agua para producir 1000 ml de composición líquida según la invención.
- La composición nutricional que va a usarse según la invención comprende además las siguientes características en cualquier combinación.
 - En otras realizaciones que van a usarse según la invención, el preparado comprende el 5-6% en peso de sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero ricos en fosfolípidos y el 12-15% en peso de sólidos de crema expresado como porcentaje del peso total de los sólidos en la composición.
- En una realización que va a usarse según la invención, el preparado comprende además un contenido de esfingomielina en el preparado de por ejemplo entre 9-15 mg/100 ml, o 10 mg/100 ml o más por ejemplo 13 mg/100 ml.
- Las realizaciones adicionales son también realizaciones alternativas que van a usarse según la invención.
 - Una composición nutricional que va a usarse según la presente invención en la que la composición comprende proteína de leche intacta o parcialmente hidrolizada.
- Una composición nutricional que va a usarse según la presente invención en la que el contenido de aminoácidos en la composición se origina a partir de fuentes seleccionadas de por ejemplo; sólidos de lactosuero dulce, sólidos de caseína, sólidos lácteos y sólidos de crema.
- Una composición nutricional que va a usarse según la presente invención en la que el contenido de esfingomielina en la composición según la invención es de entre 9-15 mg/100 ml, o 10 mg/100 ml o más, especialmente 13 mg/100 ml.
- Una composición nutricional que va a usarse según la presente invención en la que la composición está comprendida por las siguientes materias primas;
 - sólidos de lactosuero dulce 32-40 kg/1000 kg de composición de polvo seco o entre 32,6-39,9 kg/1000 kg de

composición de polvo seco

- caseinato de sodio entre 4,6-5,7 kg/1000 kg de composición de polvo seco o entre 4,66-5,69 kg/1000 kg de composición de polvo seco

5 - sólidos de leche desnatada entre 66-81 kg/1000 kg de composición de polvo seco o entre 66,3-81 kg/1000 kg de composición de polvo seco

10 - sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero ricos en fosfolípidos entre 47-58 kg/1000 kg de composición de polvo seco o entre 47,1-57,6 kg/1000 kg de composición de polvo seco

- sólidos de crema entre 117-143 kg/1000 kg de composición de polvo seco.

15 Una composición nutricional que va a usarse según la presente invención en la que la composición comprende; sólidos de lactosuero dulce de 36,3 kg/1000 kg de composición de polvo seco, caseinato de sodio de 5,18 kg/1000 kg de composición de polvo seco, sólidos de leche desnatada de 73,7 kg/1000 kg de composición de polvo seco, sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero de 52,4 kg/1000 kg de composición de polvo seco, sólidos de crema de 130 kg/1000 kg de composición de polvo seco.

20 Una composición nutricional que va a usarse según la presente invención en la que los valores descritos anteriormente que definen los ingredientes en la composición en kg/1000 kg de polvo son los mismos cuando se definen los ingredientes en la composición en kg/8770 l de composición nutricional lista para beber.

25 Además, la composición puede comprender vitaminas (véanse, por ejemplo, las vitaminas mencionadas en el preparado EF a continuación), minerales (véanse, por ejemplo, los minerales mencionados en el preparado EF a continuación), grasas (véanse, por ejemplo, las grasas mencionadas en el preparado EF a continuación o en la descripción detallada), lactosa y/u otros nutrientes esenciales (por ejemplo colina, taurina, inositol, carnitina, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), probióticos o nucleótidos).

30 Además, la composición nutricional usada según la invención puede comprender cantidades más pequeñas de otros ingredientes, por ejemplo menos del 7% en peso del peso total del preparado. Ejemplos de otros ingredientes de este tipo son otros sólidos lácteos (no en el preparado especificado), por ejemplo, concentrado de proteínas de lactosuero ácido, sólidos de suero de mantequilla, sólidos de leche entera etc. Dichos otros ingredientes pueden estar presentes siempre que se cumpla la memoria descriptiva de la composición nutricional, descrita anteriormente, de la invención.

35 Una composición nutricional que va a usarse según la presente invención en la que la composición comprende; sólidos de lactosuero dulce de 36,3 kg/1000 kg de composición de polvo seco, caseinato de sodio de 5,18 kg/1000 kg de composición de polvo seco, sólidos de leche desnatada de 73,7 kg/1000 kg de composición de polvo seco, sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero ricos en fosfolípidos de 52,4 kg/1000 kg de composición de polvo seco, sólidos de crema de 130 kg/1000 kg de composición de polvo seco. Además, la composición puede comprender vitaminas (véanse, por ejemplo, las vitaminas mencionadas en el preparado EF a continuación), minerales (véanse, por ejemplo, los minerales mencionados en el preparado EF a continuación), grasas (véanse, por ejemplo, las grasas mencionadas en el preparado EF a continuación), lactosa /u otros nutrientes esenciales (por ejemplo colina, taurina, inositol, carnitina).

Además, la composición nutricional que va a usarse según la invención puede comprender otros ingredientes siempre que se cumpla la memoria descriptiva de la composición nutricional, descrita anteriormente, de la invención.

50 **Métodos**

Inclusión

55 Desde marzo de 2008 hasta febrero de 2012, se incluyeron 160 lactantes alimentados con preparados (80 niñas y 80 niños) y un grupo de referencia amamantado (BFR) con 80 lactantes (40 niñas y 40 niños), todos nacidos en el Umeå University Hospital, Umeå, Suecia, tras invitar a los padres por teléfono. Los criterios de inclusión fueron <2 meses de edad, edad gestacional en el nacimiento 37-42 semanas, peso al nacer 2500-4500 gramos, ausencia de enfermedad crónica, y exclusivamente alimentación por preparado o, para el grupo de referencia amamantado (BFR), exclusivamente lactancia materna en la inclusión y la intención de la madre de amamantar exclusivamente hasta los 6 meses. Todos los grupos recibieron una recomendación de sólo pequeñas cantidades (porciones de sabor) de alimentos complementarios entre 4 y 6 meses.

Aleatorización y ciego

65 Los lactantes alimentados con preparados se estratificaron por sexo y se aleatorizaron en un modelo informatizado con bloques de 8 para recibir EF o SF desde la inclusión hasta los 6 meses de edad. Los gemelos se aleatorizaron

conjuntamente para el mismo grupo de intervención. La intervención fue ciega tanto para los padres como para el personal hasta que todos los lactantes hubieron finalizado la intervención. La intervención fue ciega para los padres hasta que todos los lactantes hubieron completado el seguimiento. Se distribuyó el polvo de preparado a las familias junto con instrucciones de preparación en cajas idénticas marcadas con un número de código.

5 *Preparado de estudio*

Se usó BabySemp® como SF y el EF se modificó a partir de esto. El cuatro por ciento en peso de la proteína en el EF procedía de la complementación con un concentrado de proteínas de lactosuero enriquecido con MFGM bovina (Lacprodan® MFGM-10, Arla Foods Ingredients, Dinamarca). La composición de macronutrientes del EF y SF se presentan en la tabla 1.

Tabla 1

15 Contenido de macronutrientes en el preparado experimental (EF) y el preparado convencional (SF) por 100 ml.

	EF	SF
Energía (kcal)	60	66
Proteínas (g)	1,20	1,27
Caseína (g)	0,35	0,50
Lactosuero (g)	0,85	0,80
Hidratos de carbono/lactosa (g)	6,0	7,4
Lípidos (g)	3,5	3,5
FA saturados (g)	1,35	1,30
Ácidos grasos monoinsaturados (g)	1,35	1,40
Ácidos grasos poliinsaturados (g)	0,60	0,60
Ácido linoleico (mg)	460	460
Ácido α -linolenico (mg)	70	70
Ácido araquidónico (mg)	15	15
Ácido docosahexaenoico (mg)	9	9
Colesterol (mg)	8	4
Fosfolípidos (mg)	70	30

Mediciones

20 Las visitas se realizaron en la inclusión (<2 meses), 4 meses, 6 meses y 12 meses. En cada visita, se obtuvieron datos antropométricos, muestras de sangre y heces. Se pidió que los padres completaran un diario de síntomas cada día durante el periodo de intervención (hasta los 6 meses de edad) con la consistencia y frecuencia de las heces, cualquier síntoma de enfermedad, medicación u hospitalización. Se notificó la consistencia de las heces en cada porción como una puntuación desde 1 (diarrea acuosa) hasta 4 (heces duras). Entre los 6-12 meses, se pidió a los padres que anotaran cualquier síntoma de enfermedad, medicación u hospitalización en el diario. Se recogieron los diarios en cada visita. Todos los diarios de síntomas recogidos se incluyeron en el análisis.

Análisis estadísticos

30 Se realizaron cálculos estadísticos usando IBM SPSS Statistics versión 19 (©IBM 1989, 2010). Todos los análisis se realizaron basándose en la intención de tratar. Los días con síntomas de enfermedad y uso de antibióticos se compararon con la prueba de la U de Mann-Whitney no paramétrica. Las comparaciones de las proporciones se realizaron mediante la prueba de ji-cuadrado o, si cualquier célula tuvo un recuento inesperado <5, prueba exacta de Fisher (2 caras).

Resultados

35 Las tasas de abandonos y no cumplimiento se muestran en la figura 1. Desde la inclusión hasta los 6 meses de edad, se recogieron los diarios de síntomas recogidos por los padres de 75 (94%), 74 (93%) y 74 (93%) de los lactantes que cubren el 89%, el 89% y el 90% del número total de días de estudio para el grupo de EF, SF y BFR, respectivamente. Entre los 6 y 12 meses de edad, se recogieron los diarios de síntomas de 57 (75%), 58 (81%) y 64 (89%) de los lactantes en el grupo de EF, SF y BFR, respectivamente.

45 Número de lactantes incluidos en el estudio, incluidos en el análisis (cajas blancas) y tras la intervención/aún con lactancia materna a los 6 meses (cajas grises) para los grupos de preparado experimental (EF), preparado convencional (SF) y de referencia amamantado.

Infecciones

Durante la intervención, desde la inclusión hasta los 6 meses de edad, los padres de lactantes alimentados con el EF notificaron menos episodios de otitis media aguda (OMA) tratados con antibióticos en comparación con los padres de lactantes alimentados con la SF. No hubo otras diferencias significativas entre los grupos de preparado en infecciones bacterianas tratadas con antibióticos o infecciones virales que conducen a hospitalización antes de los 6 meses de edad, ni entre los 6 y 12 meses de edad (tabla 2).

Tabla 2

Infecciones bacterianas tratadas con antibióticos e infecciones virales que conducen a hospitalización durante los primeros 12 meses de vida para los grupos del preparado experimental (EF), preparado convencional (SF) y de referencia con lactancia materna (BFR), número (%) de lactantes.

	EF	SF	valor p (EF frente a SF)	BFR
<i>Inclusión - 6 meses</i>				
Otitis	1 (1)	7 (9)	0,034	0 (0)
Neumonía	0 (0)	1 (1)	1,0	0 (0)
Otra infección bacteriana invasiva	1 (1) ^a	0 (0)	1,00	0 (0)
Otra infección bacteriana no invasiva	0 (0)	0 (0)	1,0	5 (7) ^b
Gastroenteritis, hospitalizados	0 (0)	2 (3)	0,25	0 (0)
Otra infección viral, hospitalizados	1 (1) ^c	1 (1) ^c	1,0	1 (1) ^c
<i>6 - 12 meses</i>				
Otitis	6 (11)	4 (7)	0,53	4 (6)
Neumonía	1 (2)	2 (3)	1,0	2 (3)
Otra infección bacteriana invasiva	0 (0)	0 (0)	1,0	0 (0)
Otra infección bacteriana no invasiva	2 (4) ^d	2 (4) ^e	1,0	2 (3) ^f
Gastroenteritis, hospitalizados	1 (2)	2 (3)	1,0	0 (0)
Otra infección viral, hospitalizados	0 (0)	3 (5) ^g	0,24	1 (2) ^h

^a Infección de las vías urinarias

^b Conjuntivitis (n=4), infección cutánea (n=1)

^c Bronquitis obstructiva

^d Conjuntivitis (n=1), infección cutánea (n=1)

^e Infección cutánea (n=2)

^f Infección cutánea (n=1), estomatitis fúngica (n=1)

^g Bronquitis obstructiva (n=1), infección viral no especificada de otro modo (n=1), convulsión febril (n=1)

^h Bronquitis obstructiva

El grupo de EF notificó menos uso de antitérmicos durante la intervención en comparación con el grupo de SF (tabla 3). 61 (81%), 59 (80%) y 63 (85%) de los lactantes habían recibido vacuna neumocócica desde los 3 meses de edad en el grupo de EF, SF y BFR, respectivamente.

Tabla 3

Medicación consumida relacionada con infección para los grupos del preparado experimental (EF), preparado convencional (SF) y de referencia con lactancia materna (BFR) (número (%) de lactantes y número total de días).

	EF		SF		valor p (EF frente a SF)		BFR	
	n (%)	Días	n (%)	Días	Proporción	n.º de días	n (%)	Días
<i>Inclusión - 6 meses</i>								
Antibióticos	2 (3)	18	7 (9)	42	0,086	0,092	5 (7)	58
Antitérmicos	19 (25)	54	32 (43)	118	0,021	0,016	33 (45)	119
Dilatación de las vías respiratorias	13 (17)	63	14 (19)	77	0,80	0,79	15 (20)	142
<i>6 meses - 12 meses</i>								
Antibióticos	8 (14)	61	8 (14)	101	0,97	0,87	8 (13)	77
Antitérmicos	28 (49)	137	30 (52)	148	0,78	0,77	38 (59)	226
Dilatación de las vías	15 (26)	316	18 (31)	150	0,58	0,57	30 (47)	278

respiratorias								
---------------	--	--	--	--	--	--	--	--

En conclusión, el presente estudio ha demostrado que la complementación con una fracción de MFGM bovina a un preparado para lactantes disminuye la incidencia de otitis media aguda (OMA) en lactantes alimentados con preparados entre 0-6 meses de edad hasta un nivel similar al de lactantes amamantados. El efecto se debe probablemente a factores antimicrobianos y/o inmuoestimulantes de MFGM no presentes previamente en el preparado para lactantes o presentes en una concentración menor que en la leche humana.

Además, el método de producción de la invención se describe según las siguientes realizaciones.

Un método para producir una composición nutricional para su uso según la presente invención con el fin de obtener un alto contenido de ácido siálico, un alto contenido de esfingomiélna y un alto contenido de colesterol en combinación con un bajo contenido de proteínas y valor energético, que comprende las etapas;

- proporcionar ingredientes por 1000 kg de polvo seco o por 8770 l de composición nutricional lista para beber;

- sólidos de lactosuero dulce entre 32-40 kg/1000 kg de composición de polvo seco o por 8770 l de composición nutricional lista para beber

- caseinato de sodio entre 4,6-5,7 kg/1000 kg de composición de polvo seco o por 8770 l de composición nutricional lista para beber

- sólidos de leche desnatada entre 66-81 kg/1000 kg de composición de polvo seco o por 8770 l de composición nutricional lista para beber

- sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero ricos en fosfolípidos entre 47-58 kg/1000 kg de composición de polvo seco o por 8770 l de composición nutricional lista para beber

- sólidos de crema entre 117-143 kg/1000 kg de composición de polvo seco o por 8770 l de composición nutricional lista para beber

- que comprende además, por ejemplo, vitaminas, minerales, grasas, lactosa y otros nutrientes esenciales (por ejemplo colina, taurina, inositol, carnitina); y,

- mezclar los ingredientes.

Un método para producir una composición nutricional para su uso según la invención en la que no se añaden aminoácidos libres distintos de los aminoácidos libres que se producen de manera natural presentes en materias primas lácteas.

Es posible además, añadir pequeñas cantidades de otros ingredientes en la composición para su uso según la invención siempre que se cumpla la memoria descriptiva de la composición nutricional, descrita anteriormente de la invención. Por ejemplo, pueden usarse sólidos de lactosuero ácido.

Un método para producir una composición nutricional para su uso según la invención en la que no se añaden aminoácidos libres distintos de las adiciones realizadas añadiendo materias primas de fuentes seleccionadas de; sólidos de lactosuero dulce, sólidos de caseína, sólidos lácteos y sólidos de crema.

Descripción detallada

La definición de un lactante es un niño de menos de 12 meses de edad.

El uso de crema láctea como ingrediente en la composición nutricional presente (o el uso de sólidos de crema láctea cuando se produce un polvo de composición nutricional que va a mezclarse con agua) contribuye a los altos niveles de colesterol derivado de leche en la composición nutricional según la invención. Este uso de crema láctea contribuye a los altos niveles de colesterol (5-10 mg/100 ml) en la composición según la invención. Debido a la composición especial según la invención, la adición de colesterol como ingrediente (debido a la adición de crema láctea y concentrado de proteínas de lactosuero rico en fosfolípidos) proporciona un nivel de colesterol en sangre similar que en lactantes amamantados durante el periodo de alimentación pero probablemente también de manera más tardía en la vida para aquellos lactantes alimentados con la composición nutricional según la invención.

La crema también mejora el sabor del preparado de la invención. El preparado también contiene concentrado de proteínas de lactosuero rico en fosfolípidos que también contribuyen al contenido de colesterol derivado de leche en el preparado de la invención así como de la esfingomiélna de fosfolípidos derivada de leche. La esfingomiélna se incluye en una cantidad de preferiblemente 10 mg/100 ml o más. El preparado de la invención comprende, por ejemplo, en base seca entre el 26-32 por ciento en peso de grasa o, por ejemplo, en base seca el 30,7 por ciento en

peso de grasa de la cual entre el 15-19 por ciento en peso de la cantidad de grasa total es grasa vegetal, o por ejemplo el 18,5 por ciento en peso del contenido de grasa total es grasa vegetal.

5 El contenido de ácidos grasos de cadena media (MCT) que comprende de 8 a 10 carbonos en la composición nutricional según la invención es, por ejemplo, del 0,5 - 3 por ciento en peso de la cantidad total de ácidos grasos o por ejemplo, del 1- 2 por ciento en peso de la cantidad total de ácidos grasos en la composición. El preparado de la invención imita el contenido de MCT en la leche materna. La leche materna madura tiene el 1-2 por ciento en peso de MCT de ácidos grasos totales (R.A. Gibson *et al.* Am. J. Clin. Nutr. 34: 252-257, 1981).

10 Además el lactosuero dulce, la crema y el concentrado de proteínas de lactosuero rico en fosfolípidos, comprenden cGMP. Mediante, por ejemplo, no eliminando cGMP de la composición nutricional según la invención, el contenido de ácido siálico se mantiene alto. Un alto contenido de ácido siálico es, por ejemplo, de aproximadamente 10-25 mg/100 ml o entre 18-20 mg/100 ml de la composición nutricional según la invención. Al no eliminar cGMP de las materias primas usadas para producir el preparado, es probable que la composición nutricional según la invención
15 aumente, por ejemplo, el nivel de ácido siálico en la saliva (más similar al de lactancia materna). La mayor ingesta de ácido siálico puede tener un efecto en, por ejemplo, la morbilidad y el comportamiento cognitivo en los lactantes alimentados con preparado de la invención.

20 La esfingomielina es el principal componente de la fracción de fosfolípidos en la leche materna, y se encuentra en menores concentraciones en composiciones nutricionales convencionales en comparación con el preparado según la invención. La esfingomielina se metaboliza en ceramida cuya concentración se correlaciona con el grado de mielinización del sistema nervioso. Los experimentos en ratas con mielinización experimentalmente inhibida han mostrado que los complementos de esfingomielina aumentan mielinización (K. Oshida *et al.* *Pediatr Res*, 2003, vol. 53 (4) 589-593). El contenido de esfingomielina derivada de leche en el preparado según la invención es de 9
25 mg/100 ml o más, o entre 9-15 mg/100 ml, o 13 mg/100 ml.

La composición nutricional según la invención comprende una composición especial de materias primas. La composición nutricional según la presente invención tiene aún un efecto de carga bajo en el sistema metabólico del lactante alimentado con preparado aunque comprende cGMP.

30 Los niveles de ácido araquidónico (ARA) y ácido docosahexaenoico (DHA) en la composición nutricional según la invención son de niveles similares a los presentes en la leche materna. (Brenna *et al.* DHA and ARA concentrations in human breast milk worldwide *Am J Clin Nutr* 85, P1457-1464).

35 La presente invención proporciona una composición nutricional y un método para producir una composición de este tipo.

Nitrógeno no proteico

40 Nitrógeno no proteico (NPN) es un término usado para referirse colectivamente a componentes que no son proteínas que están presentes en los alimentos y que comprenden nitrógeno. (NPN en la leche es principalmente urea-nitrógeno (aproximadamente el 50%), creatina, creatinina, NH₃ etc.).

45 Puesto que es importante no tener un excedente de nitrógeno en los preparados para lactantes se ha procurado tener un nivel bajo de NPN < 20 mg/100 ml en la composición nutricional según la invención, por ejemplo, un valor de nitrógeno no proteico (NPN) bajo entre 0,015-0,020 g/100 ml. De manera sorprendente, el preparado de la invención tiene un valor de NPN bajo aunque tiene una composición de materias primas totalmente nueva.

Perfil de aminoácidos

50 Se sabe que un preparado para lactantes necesita un perfil de aminoácidos determinado para satisfacer las necesidades de los niños. Esto también está regulado por la Directiva de la Comisión del gobierno 2006/141/CE. El suministro de aminoácidos en los primeros meses de vida de un lactante debe ser suficiente en cantidad así como en calidad para satisfacer las necesidades de este periodo de vida. Se han establecido directrices, recomendaciones
55 con valores mínimos con respecto a la composición de aminoácidos de los preparados para lactantes. Un perfil de aminoácidos de la composición nutricional según la invención se presenta en la tabla a continuación. El estudio clínico confirma que la composición de aminoácidos en el preparado de la invención es adecuada para el requisito de crecimiento.

Aminoácido	Valor mínimo Directiva de la Comisión (mg/100 kcal)	Intervalo según la invención (mg/100 kcal)
Leucina	166	197-229 ó 217
Lisina	113	165-192 ó 180
Metionina	23	36-42 ó 40

Cistina	38	40-46 ó 44
Fenilalanina	83	83-96 u 87
Tirosina	76	64-74 ó 72
Treonina	77	114-132 ó 124
Triptófano	32	35-41 ó 39
Valina	88	116-135 ó 127
Isoleucina	90	116-135 ó 127
Histidina	40	46-53 ó 50
Cistina+Metionina*	61	76-88 u 84
Fenilalanina+Tirosina*	159	147-170 ó 159

La concentración de metionina y cisteína puede calcularse conjuntamente puesto que el aminoácido cisteína puede formarse a partir de metionina. Además, la concentración de tirosina y fenilalanina puede calcularse conjuntamente puesto que el aminoácido tirosina puede formarse a partir de fenilalanina. Por tanto, también se especifican niveles combinados de estos aminoácidos en la tabla anterior *.

Fuentes de aminoácido de la presente composición nutricional:

El preparado según la invención tiene una composición que es tal que se logra el perfil de aminoácidos deseado sin la adición de ningún aminoácido libre. El preparado según la invención se fabrica sin la adición de ningún aminoácido libre (o aminoácidos aislados) para obtener un perfil de aminoácidos deseado.

La expresión aminoácidos libres o aminoácidos aislados en esta solicitud significa descripciones para una sustancia de aminoácido que se aísla como ácido libre o como sal.

El preparado según la presente invención, por tanto, no se enriquece con aminoácidos aislados, por ejemplo aminoácidos libres. Esto es una ventaja puesto que los aminoácidos libres son habitualmente de sabor amargo. También es costoso añadir aminoácidos en su forma pura. Usando los ingredientes según la presente invención la composición nutricional según la invención no necesita adición adicional de aminoácidos libres o aislados y es, por tanto, más similar a la leche materna en sabor.

Método de producción

El preparado según la invención se produce según una realización mezclando los ingredientes a continuación en kg por 1000 kg de polvo seco de composición nutricional o kg por 8770 l de composición nutricional terminada.

Materia prima	Intervalo en el preparado según la invención (kg/1000 kg de polvo seco o kg/8770 l)	Cantidad en el preparado según la invención (kg/1000 kg de polvo seco o kg/8770 l)
Sólidos de lactosuero dulce	32-40	36 ± 2
Caseinato de sodio	4,6-5,7	5,2 ± 0,3
Sólidos de leche desnatada	66-81	74 ± 4
Sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero (ricos en fosfolípidos)	47-58	52 ± 3
Sólidos de crema	117-143	130 ± 6

La composición nutricional puede comprender además vitaminas, minerales, grasas, lactosa y/u otros nutrientes esenciales (por ejemplo colina, taurina, inositol, carnitina, nucleótidos).

Además, la composición nutricional según la invención puede comprender otros ingredientes siempre que se cumpla la memoria descriptiva de la composición nutricional, descrita anteriormente de la invención.

Lactosuero dulce

El lactosuero dulce es rico en α -lactalbúmina. El alto contenido de α -lactalbúmina lo hace idealmente adecuado como fuente de proteínas en preparados para lactantes con el fin de satisfacer un patrón de aminoácidos deseado. El lactosuero dulce también contiene cGMP que es una fuente de ácido siálico.

Crema

La crema es una fuente natural y valiosa de ácidos grasos de cadena corta y media así como colesterol derivado de leche. Los fosfolípidos derivados de leche en la crema son, además de sustancias nutricionales importantes, también valiosos emulsionantes. El preparado según la invención puede fabricarse usando crema o sólidos de crema. El contenido de grasa de la crema usada según la invención es por ejemplo del 36-40% en peso de grasa o

especialmente el 37% en peso de grasa.

Caseinato

5 Puede usarse caseinato de sodio o parcialmente otras sales de caseinatos en el preparado de la invención.

Proteína hidrolizada

10 La fuente de proteínas en el preparado que va a usarse según la invención puede ser una proteína hidrolizada.

A continuación se encuentra una descripción ejemplificada del proceso de producción del preparado que va a usarse según la invención, el siguiente ejemplo de la invención no es limitativo del alcance de la invención:

15 La presente invención proporciona una composición nutricional lista para beber o un preparado en polvo que se pretende reconstituir con agua para dar una composición nutricional lista para beber y un método para producir tales composiciones.

20 En una realización, la composición es un polvo adecuado para producir una composición líquida tras su reconstitución con agua. Alternativamente, la composición es, por ejemplo, un producto líquido listo para usar.

A continuación se encuentra un ejemplo de los ingredientes para producir la composición nutricional que va a usarse según la invención.

25 Ejemplo de cantidades de ingredientes (kg/1000 kg) de un preparado en polvo seco que va a usarse según la invención que se pretende reconstituir con agua antes de su uso (cantidades de ingredientes para el preparado listo para beber se describen a continuación en kg/8770 l);

Descripción	Cantidad (intervalo) (kg/1000 kg o kg/8770 l))
Lactosa	476-527
Sólidos de crema	123-136
Sólidos de leche desnatada	70,0-77,3
Aceite de colza	51,6-57,0
Aceite de oleína de palma	51,6-57,0
Sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero ricos en fosfolípidos	49,7-55,0
Aceite de girasol	38,3-42,3
Sólidos de lactosuero dulce	34,5-38,1
Aceite de girasol HO	24,9-27,6
Minerales	16,1-17,8
Caseinato de sodio	4,92-5,44
Lecitina seca	4,26-4,70
Aceite de ácido araquidónico	1,60-3,50
Aceite de ácido docosahexaenoico	1,60-2,17
Mezcla de vitaminas	1,29-1,43
Colina, taurina, mioinositol, L-carnitina	1,21-1,34

30 Ejemplos de métodos de producción según la invención, no limitativos del alcance de la invención;

Método de producción de una composición nutricional de polvo según la invención:

35 Se mezclan materias primas a base de leche para dar una suspensión. Se mezclan leche estandarizada o polvo de leche y lactosuero líquido o polvo de lactosuero, si es necesario, con agua adicional. El equipo adecuado mezcla la suspensión en un tanque con presión negativa para reducir la formación de espuma e incorporación de aire.

40 Se añaden emulsionante y vitaminas solubles en grasa a una combinación de aceites vegetales. Entonces, se incorpora la fase de grasa en la fase de leche o bien en el tanque de mezclado o bien dosificada en línea antes de la homogenización. La dosificación en línea de aceite significa que una parte de la fase de leche se calienta, el aceite se dosifica en la corriente, se homogeniza y se enfría de nuevo.

45 Se añaden vitaminas solubles en agua, aditivos tales como taurina y minerales con un efecto pro oxidativo tal como las sales ferrosas y de cobre, justo antes de concentrar la suspensión por medio de un acabador hasta un contenido de materia seca final del 50 - 55%. Entonces se trata el concentrado con calor para garantizar la calidad microbiológica, se seca por pulverización, se enfría y se almacena el polvo. Tras el control de calidad, el producto se envasa o, si es un semiproducto, se combina en primer lugar, combinando el semiproducto secado por pulverización

con minerales, vitaminas, ingredientes bioactivos y ácido cítrico adicionales.

Método de producción de una composición nutricional lista para beber según la invención:

- 5 Se mezcla agua, hecha alcalina con hidróxido de calcio, con lactosuero o polvo de lactosuero. Se neutraliza la disolución antes de añadir la fuente de hidratos de carbono y leche estandarizada. Se añaden ingredientes adicionales tales como colina, taurina, inositol y carnitina antes de la pasteurización e inyección de fase de grasa y homogenización. La fase de grasa está compuesta por aceites vegetales, emulsionantes y vitaminas solubles en grasa. Antes de la esterilización, se añaden vitaminas y se realiza una verificación de la calidad. El producto se trata con UHT, un tratamiento térmico rápido a aproximadamente 140°C durante 5 segundos, se enfría y se envasa de manera aséptica.

(UHT significa temperatura ultra alta. Los productos de un proceso de UHT tienen buenas calidades de conservación con valores nutricionales retenidos).

- 15 A continuación se encuentra un ejemplo de la composición nutricional según la invención y también una descripción de un preparado de control, ambas usadas en un estudio comparativo. El ejemplo a continuación de la invención no es limitativo del alcance de la invención;

- 20 El preparado para lactantes (preparado EF) usado en el estudio es un ejemplo de una composición nutricional según la invención. El preparado de control (SF) se usa para comparación. El preparado de control comparativo (SF) es un preparado para lactantes representativo de buena calidad disponible en el mercado. Compárense también la memoria descriptiva de las formulas en la tabla 1 anterior.

- 25 Las formulas incluidas en el estudio tienen las siguientes composiciones (véase la tabla a continuación), el preparado EF es un ejemplo de la composición nutricional según la invención;

Descripción	Preparado EF (kg/1000 kg)	Preparado de control (SF)(kg/ 1000 kg)
Lactosa	502	536
Sólidos de crema	130	89,6
Sólidos de leche desnatada	73,7	105
Aceite de colza	54,3	43,4
Aceite de oleína de palma	54,3	75,9
Sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero (ricos en fosfolípidos)	52,4	
Aceite de girasol	40,3	30,7
Sólidos de lactosuero dulce	36,3	61,1
Aceite de girasol HO	26,3	30,7
Minerales	17,0	10,1
Caseinato de sodio	5,18	6,56
Lecitina seca	4,48	4,03
Aceite de ácido araquidónico	3,33	2,91
Aceite de ácido docosahexaenoico	2,07	1,80
Mezcla de vitaminas	1,38	1,48
Colina, taurina, mioinositol, L-carnitina	1,27	1,04
L-arginina		0,689
Citrato de potasio	4,68	2,58
Carbonato de calcio	3,33	3,33
Cloruro de potasio	3,08	2,19
Hidrogenofosfato de calcio	1,94	
Sulfato de magnesio	1,78	0,583
Cloruro de sodio	1,40	0,972
Ácido ascórbico	1,08	1,22
Cloruro de colina	0,648	0,486
Citrato de sodio	0,500	
Taurina	0,415	0,370
Sulfato ferroso	0,178	0,150
Mioinositol	0,135	0,120
Sulfato de zinc	0,0863	0,0769
Palmitato de ascorbilo	0,0782	0,0751
L-carnitina	0,0756	0,0656
Vitamina D ₃	0,0539	0,0480
Vitamina A	0,0476	0,0424

ES 2 674 868 T3

DL-a-tocoferol	0,0350	0,0362
D-Pantotenato de calcio	0,0296	0,0263
Niacina	0,0180	0,0160
Sulfato de cobre	0,00846	0,00754
Clorhidrato de tiamina	0,00676	0,00602
Vitamina K ₁	0,00561	0,00500
Clorhidrato de piridoxina	0,00546	0,00486
Yoduro de potasio	0,00073	0,00073
Ácido fólico	0,00062	0,00055
Selenita de sodio	0,00039	0,00039
Biotina	0,00011	0,00010

El preparado EF, que es una composición nutricional que va a usarse según la invención, con los ingredientes descritos anteriormente, comprende los valores nutricionales presentados a continuación como listos para su consumo (se mezclan 114 g de preparado EF en polvo con 900 ml de agua lo que da 1000 ml de producto listo para beber);

- 5 - un valor energético total de 60 kcal/100 ml,
- un contenido de proteínas de 1,2 g/100 ml,
- 10 - un valor energético de proteína de 8,0 (% de E) del valor energético total de la composición nutricional
- una razón de proteína:energía de 2,0/100 kcal
- 15 - un contenido de grasa que es del 52,5 (% de E) del valor energético total de la composición nutricional según el preparado EF
- un contenido de ácido graso de cadena media (que comprende de 8 a 10 carbonos) del 1,6% en peso de la cantidad total de ácidos grasos en el preparado EF
- 20 - contenido de ácido siálico de 19 mg/100 ml
- un contenido de colesterol de 8 mg/100 ml
- 25 - ácido siálico unido a lípidos como gangliósidos del 4% en peso del contenido de ácido siálico total
- contenido de esfingomielina de 13 mg/100 ml

El preparado EF tiene un alto contenido de ácido siálico de fuentes naturales en comparación con preparados convencionales. El contenido de ácido siálico procede de dos fuentes diferentes, una de sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero (ricos en fosfolípidos), que se une a lípidos y la otra de GMP, que se une a hidratos de carbono. El preparado EF tiene un alto contenido de esfingomielina derivada de leche de fuentes naturales en comparación con el preparado de control (SF), concretamente sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero (ricos en fosfolípidos). Es una ventaja usar dichas fuentes naturales de ácido siálico y esfingomielina.

El % de energía (% de E) es una forma normal de expresar la cantidad de kcal, que viene de la grasa, las proteínas y los hidratos de carbono en una formulación nutricional. La Agencia nacional de los alimentos en Suecia (Livsmedelsverket) ha identificado esto en <http://www.slv.se/sv/grupp1/Mat-ochnaring/naringsrekommendationer/Kalorier-kilojoule-och-energi-procent---hur-raknar-man/>

El preparado de control, con los ingredientes descritos en la tabla anterior, comprende los valores nutricionales presentados a continuación como listos para su consumo (se mezclan 130 g de preparado de control en polvo con 900 ml lo que da 1000 ml de producto listo para beber);

- 45 - un valor energético total de 66 kcal/100 ml
- un contenido de proteínas de 1,27 g/100 ml,
- un contenido de % de energía de proteínas de 7,7 del valor energético total de la composición nutricional según el preparado de control
- 50 - un contenido de % de energía de grasas de 44,7 del valor energético total de la composición nutricional según el preparado de control

- un contenido de ácido graso de cadena media (que comprende de 8 a 10 carbonos) del 1,5% en peso de la cantidad total de ácidos grasos en el preparado de control

- contenido de ácido siálico de 16 mg/100 ml

- un contenido de colesterol de 4 mg/100 ml

- ácido siálico unido a lípidos como gangliósidos del 2% en peso del contenido de ácido siálico total según el preparado de control

- esfingomiélin 1,8 mg

Estudio

Diseño del estudio

El estudio es un ensayo de intervención de doble ciego aleatorizado con lactantes exclusivamente amamantados como grupo de referencia lo que significa que participan tres grupos de niños en el estudio:

1) Niños que son amamantados.

2) Niños que reciben un preparado para lactantes experimental, (EF), según la invención (véase la descripción anterior).

3) Niños que reciben un preparado para lactantes representativo de buena calidad, denominado en el presente documento "preparado de control" (SF) (véase la descripción anterior).

Se estableció el estudio para detectar una posible diferencia de desviación estándar de 0,5 (DE) para cada variable de resultado, que se corresponde con una diferencia de peso de aproximadamente 0,4 kg a los 6 meses o una diferencia del 3,25 por ciento de grasa corporal medida mediante pletismografía a los 2 meses de edad. La agudeza visual equivalente a una DE de 0,5 es de 0,25 octavas a los 4 meses de edad, que es la diferencia observada cuando se compara con los niños con alimentación con o sin complemento de DHA. Con un "poder" estadístico del 80%, se requiere un tamaño de grupo de poco más de 60 niños. Se incluyeron 80 niños por grupo, lo que dio un número suficiente de niños por grupo que completó el estudio. Figura 1.

Discusión

La hipótesis, de que la complementación con MFGM en preparados para lactantes daría lugar a una reducción en la morbilidad infecciosa, fue respaldada por los hallazgos de que los lactantes alimentados con el EF tuvieron una incidencia menor de OMA y un número de días reducido con medicamentos antipiréticos durante el periodo de intervención. Los estudios observacionales han mostrado un claro efecto protector de la lactancia materna en algunas infecciones (Ip, S., *et al.*, A summary of the Agency for Healthcare Research and Quality's evidence report on breastfeeding in developed countries. *Breastfeed Med*, 2009. 4 supl 1: p. S17-30.), y se han realizado varios estudios con complementación de diferentes factores en el preparado para lactantes con el fin de intentar acortar esta brecha. La complementación con lactoferrina en preparado para lactantes se asoció con menos infecciones respiratorias de vías bajas durante el primer año de vida (King, J.C., Jr., *et al.*, A double-blind, placebo-controlled, pilot study of bovine lactoferrin supplementation in bottle-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007. 44(2): págs. 245-514).

Se han descrito varios componentes de la MFGM que tienen un efecto antimicrobiano. En una caracterización proteómica de MFGM humana, se identificaron 191 proteínas de las cuales el 19,9% estaban implicadas en la función inmunitaria (Liao, Y., *et al.*, Proteomic characterization of human milk fat globule membrane proteins during a 12 month lactation period. *J Proteome Res*, 2011. 10(8): págs. 3530-41.6). En MFGM bovina, se identificaron 120 proteínas diferentes de las cuales el 4% tenía efectos inmunológicos y el 21% tenía un efecto desconocido (Liao, Y., *et al.*, Proteomic characterization of human milk fat globule membrane proteins during a 12 month lactation period. *J Proteome Res*, 2011. 10(8): págs. 3530-41.). El análisis de fracciones de leche comerciales enriquecidas con MFGM ha demostrado una alta concentración de proteínas de MFGM relevantes tanto en concentrados de proteínas de lactosuero como en concentrados de suero de mantequilla (Affolter, M., *et al.*, Qualitative and quantitative profiling of the bovine milk fat globule membrane proteome. *J Proteomics*, 2010. 73(6): págs. 1079-88.). Además, la fracción lipídica de MFGM bovina tenía un efecto antiviral *in vitro* (Fuller, K.L., *et al.*, Milk fat globule membrane isolated from buttermilk or whey cream and their lipid components inhibit infectivity of rotavirus *in vitro*. *J Dairy Sci*, 2013. 96(6): págs. 3488-97.), y se ha sugerido que los gangliósidos de la MFGM desempeñan un papel importante en el desarrollo de la microbiota intestinal, la inmunidad de los intestinos y por consiguiente, en la defensa de infecciones (Rueda, R., The role of dietary gangliosides on immunity and the prevention of infection. *Br J Nutr*, 2007. 98 supl 1: p. S68-73.).

La complementación con MFGM ha demostrado previamente tener un efecto positivo en infecciones en niños más mayores. El enriquecimiento con MFGM en alimentos complementarios para lactantes de 6-12 meses de edad, mostró efectos positivos en la diarrea en un estudio en Perú (Zavaleta, N., *et al.*, Efficacy of an MFGM-enriched complementary food in diarrhea, anemia, and micronutrient status in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2011. 53(5): págs. 561-8) y la leche de preparado enriquecido con MFGM para niños de 2,5-6 años de edad dio una reducción de episodios febriles en un estudio belga (Veereman-Wauters, G., *et al.*, Milk fat globule membrane (INPULSE) enriched formula milk decreases febrile episodes and may improve behavioral regulation in young children. *Nutrition*, 2012. 28(7-8): págs. 749-52.).

El mecanismo detrás del efecto en la OMA observado en el presente estudio no está claro. Una posible explicación sería que factores de la MFGM son bloques de construcción esenciales en el sistema inmunitario celular o humoral y contribuyen a su maduración. La evidencia de crecimiento también sugiere un vínculo entre la microbiota del intestino y el sistema inmunitario periférico (Cerf- Bensussan, N. y V. Gaboriau-Routhiau, The immune System and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(10): págs. 735-44), y factores inmunoestimulantes y antimicrobianos alimenticios de la MFGM podrían, afectando a la microbiota del intestino, tener un efecto positivo en la defensa del lactante contra los patógenos. De todas formas, la interpretación es que el EF ha tenido un efecto general en la función inmunitaria en vez de un efecto específico en la OMA, respaldado por los hallazgos de que el uso de antitérmicos fue mayor en el grupo de SF y de que otros resultados mostraron una tendencia a favor hacia el grupo de EF, por ejemplo hospitalización debido a gastroenteritis hasta los 12 meses de edad y respiración y tos hasta los 6 meses de edad. Véase la tabla 4.

Tabla 4

Síntomas notificados relacionados con infección para los grupos de preparado experimental (EF), preparado convencional (SF) y de referencia con lactancia materna (BFR) (número (%) de padres que notifican cada síntoma y número total de días).

	EF		SF		valor p (EF frente a SF)		BFR	
	n (%)	Días	n (%)	Días	Proporción	n.º de días	n (%)	Días
<i>Inclusión - 6 meses</i>								
Fiebre	37 (49)	110	35 (47)	192	0,80	0,78	43 (58)	105
Tos	46 (61)	721	53 (72)	615	0,18	0,29	49 (66)	572
Dificultades para respirar	10 (13)	30	14 (19)	61	0,35	0,36	12 (16)	42
Erupción cutánea	13 (17)	77	19 (26)	292	0,22	0,23	22 (30)	480
<i>6 meses - 12 meses</i>								
Fiebre	43 (75)	230	39 (67)	129	0,33	0,16	51 (80)	339
Tos	44 (77)	638	45 (78)	949	0,96	0,79	57 (89)	1204
Dificultades para respirar	10 (18)	26	12 (21)	55	0,81	0,57	11 (18)	48
Erupción cutánea	13 (23)	181	8 (14)	256	0,21	0,29	24 (38)	597

La incidencia de enfermedades infecciosas durante los primeros 6 meses en países desarrollados es baja, y la OMA es la causa más común de tratamiento con antibióticos (McCaig, L.F., R.E. Besser, y J.M. Hughes, Trends in antimicrobial prescribing rates for children and adolescents. *JAMA*, 2002. 287(23): págs. 3096-102). Los antibióticos son más útiles en niños menores de dos años de edad con OMA bilateral o tanto con OMA como otorrea (Venekamp, R.P., *et al.*, Antibiotics for acute otitis media in children. *CochraneDatabase Syst Rev*, 2013. 1: p. CD000219.). En el presente estudio, todos los lactantes a los que se había diagnosticado con OMA recibieron tratamiento con antibióticos. La introducción de la vacuna neumocócica en lactantes, ha cambiado la epidemiología de la otitis en lactantes en muchos países (Coker, T.R., *et al.*, Diagnosis, microbial epidemiology, and antibiotic treatment of acute otitis media in children: a systematic review. *JAMA*, 2010. 304(19): págs. 2161-9.), y aproximadamente el 80% de los lactantes en el presente estudio recibieron una vacuna neumocócica decavalente a partir de los 3 meses de edad tras la introducción de la vacunación neumocócica general para lactantes nacidos en el área de Umeå después de octubre de 2008.

La ventilación del biberón usado también puede influir en el riesgo de otitis media en lactantes alimentados con biberón, los biberones con poca o sin ventilación crean una presión negativa que continúa hasta el oído medio y que aumenta probablemente el riesgo de OMA (Brown, C.E. y B. Magnuson, On the physics of the infant feeding bottle and middle ear sequela: ear disease in infants can be associated with bottle feeding. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2000. 54(1): págs. 13-20.). Desafortunadamente, no se tienen datos sobre el fabricante de biberón en nuestra población de estudio, pero con la aleatorización, no se espera ninguna diferencia entre el grupo de EF y SF.

El grupo de EF tuvo heces ligeramente más duras que el grupo de SF, pero sus padres no notificaron más síntomas gastrointestinales o el uso de laxantes. Las heces del grupo de BFR estaban más sueltas que en los grupos de preparado y el grupo de BFR tuvo menos síntomas gastrointestinales y menos uso de laxantes, lo que está en línea

con estudios previos (Tunc, V.T., *et al.*, Factors associated with defecation patterns in 0-24-month-old children. Eur J Pediatr, 2008. 167(12): págs. 1357-62).

5 En conclusión, el presente estudio ha demostrado que la complementación con una fracción de MFGM bovina en un preparado para lactantes disminuye la incidencia de OMA en lactantes alimentados con preparados entre 0-6 meses de edad hasta un nivel similar al de lactantes amamantados. El efecto se debe probablemente a factores antimicrobianos y/o inmunoestimulantes de la MFGM no presentes previamente en el preparado para lactantes o presentes en una concentración menor que en la leche humana. Los resultados deberían ser de interés para recomendaciones futuras sobre la composición de preparados para lactantes.

10

REIVINDICACIONES

1. Composición nutricional para un lactante, especialmente un preparado para lactantes, como producto listo para usar o un producto listo para usar reconstituido con agua a partir de un polvo fabricado, que contiene sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero o proteínas de leche ricos en fosfolípidos y ricos en membrana de glóbulos de grasa láctea (MFGM) para su uso en la prevención o profilaxis de la otitis bacteriana; en la que los sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero son ricos en membrana de glóbulos de grasa láctea (MFGM) como tal y uno o más de lactoferrina, α -lactalbúmina, butirofilina, MUC₁, PAS6/7 (lactadherina), gangliósidos, CD₁₄, TLR₁ y TLR₄, IgG, cGMP, ácido siálico y fosfolípidos (por ejemplo esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina); en la que dichos sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero o proteínas de leche ricos en fosfolípidos comprenden al menos el 20% en peso de fosfolípidos, preferiblemente del 20 al 70% en peso de fosfolípidos, más preferiblemente del 25 al 55% en peso de fosfolípidos, basándose en los lípidos totales de la fuente de sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero enriquecidos con fosfolípidos; y en la que la composición comprende sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero/proteínas de leche ricos en fosfolípidos y MFGM en el 5-7% en peso del peso seco total de dicha composición nutricional.
2. Composición nutricional para su uso según la reivindicación 1, en la que el valor energético total es de 67 kcal/100 ml o menos y la composición comprende:
 - un contenido de proteínas que es de 1,5 g/100 ml o menos,
 - un valor energético de proteína del 7,2-8,6 por ciento del valor energético total de la composición nutricional,
 - un valor energético de grasa que es al menos del 47 por ciento o más del valor energético total de la composición nutricional,
 - un contenido de ácidos grasos de cadena media que comprende de 8 a 10 carbonos que es menos del 3% en peso de la cantidad total de ácidos grasos,
 - un contenido de ácido siálico de 10-25 mg/100 ml o más,
 - un contenido de colesterol de 4-10 mg/100 ml,
 - un contenido de esfingomielina de 7-15 mg/100 ml, y
 - sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero/proteínas de leche ricos en fosfolípidos y MFGM en el 5-7% en peso del peso seco total de dicha composición nutricional.
3. Composición nutricional para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que el valor energético total es de 67 kcal/100 ml o menos y la composición comprende:
 - un contenido de proteínas que es de 1,5 g/100 ml o menos,
 - un valor energético de proteína del 7,2-8,4 por ciento del valor energético total de la composición nutricional,
 - un valor energético de grasa que es al menos del 49 por ciento o más del valor energético total de la composición nutricional,
 - un contenido de ácidos grasos de cadena media que comprende de 8 a 10 carbonos que es menos del 3% en peso de la cantidad total de ácidos grasos,
 - un contenido de ácido siálico de 10-25 mg/100 ml o más,
 - un contenido de colesterol de 5-10 mg/100 ml,
 - un contenido de esfingomielina de 9-15 mg/100 ml, y
 - sólidos de concentrados de proteínas de lactosuero/proteínas de leche ricos en fosfolípidos y MFGM en el 5-7% en peso del peso seco total de dicha composición nutricional.
4. Composición nutricional para su uso según la reivindicación 2 ó 3, en la que la composición comprende además ácido siálico unido a lípidos como gangliósidos y en la que el contenido de ácido siálico unido a lípidos como gangliósidos es del 1,5-5% en peso o el 4% en peso del contenido de ácido siálico total.
5. Composición nutricional para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el contenido de colesterol es del 0,2-0,3% en peso del contenido de grasa total de dicha composición nutricional o el 0,23% en peso del contenido de grasa total.
6. Composición nutricional para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el contenido de colesterol es de entre 7-10 mg/100 ml o 8 mg/100 ml.
7. Composición nutricional para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho colesterol es colesterol derivado de leche.
8. Composición nutricional para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende proteína de leche intacta o parcialmente hidrolizada.

9. Composición nutricional para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el contenido de aminoácidos en la composición se origina a partir de sólidos lácteos, sólidos de lactosuero dulce, sólidos de caseína y sólidos de crema, concentrado de proteínas de lactosuero rico en fosfolípidos.
- 5 10. Composición nutricional para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el valor energético de grasa es de entre el 47-54% del valor energético total de la composición nutricional o entre el 52-53% del valor energético total de la composición.
- 10 11. Composición nutricional para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el valor energético en la composición nutricional es menor de 60 kcal/100 ml.
12. Composición nutricional para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ácido siálico está entre 10-30 mg/100 ml.
- 15 13. Composición nutricional para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende esfingomielina, y en la que el contenido de esfingomielina en la composición según la invención es de entre 9-17 mg/100 ml o 13 mg/100 ml.
- 20 14. Composición nutricional para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la otitis bacteriana es otitis media aguda (OMA).
15. Composición nutricional para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición nutricional se administra a lactantes de hasta 6 meses de edad.

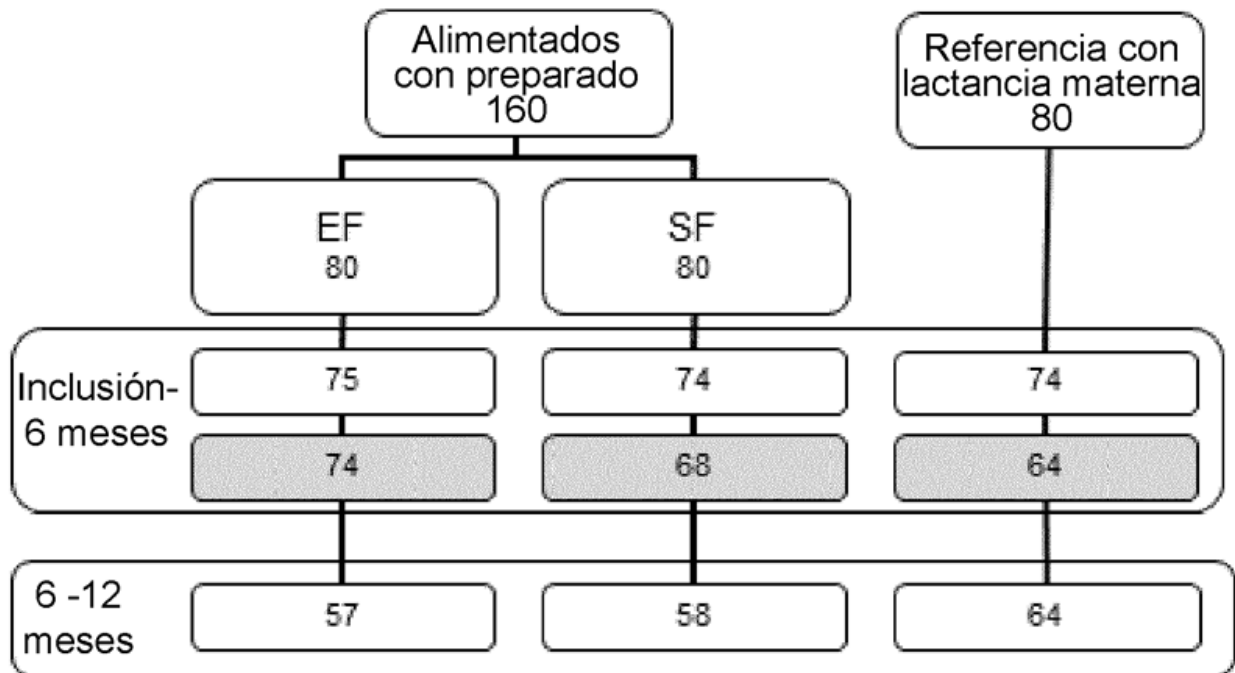


Fig. 1