

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 631**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/21** (2006.01)

**A23L 33/10** (2006.01)

**A23L 33/135** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

**A61P 1/12** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2006 E 14181368 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2805625**

54 Título: **Composición nutricional con prebióticos y probióticos**

30 Prioridad:

**28.02.2005 EP 05075486**

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

**04.03.2019**

73 Titular/es:

**N.V. NUTRICIA (100.0%)  
Eerste Stationsstraat 186  
2712 HM Zoetermeer, NL**

72 Inventor/es:

**KNOL, JAN;  
HAARMAN, MONIQUE;  
GARSSEN, JOHAN;  
VRIESEMA, ADRIANUS JOHANNES MARIA y  
ALLES, MARTINE SANDRA**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 702 631 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composición nutricional con prebióticos y probióticos.

Campo técnico de la invención

5 [0001] La presente invención se refiere a composiciones nutricionales que comprenden al menos dos sacáridos prebióticos no digeribles diferentes y al menos una bacteria probiótica. La composición nutricional es particularmente adecuada para alimentar lactantes.

Antecedentes de la invención

10 [0002] Los lactantes están desprovistos de flora intestinal al nacer. Como resultado del contacto con la madre durante el nacimiento y la alimentación posterior con leche humana o leche de fórmula, la flora intestinal se desarrolla rápidamente. Durante el desarrollo, la flora intestinal sigue siendo inmadura y su equilibrio es frágil. Los lactantes alimentados con leche humana son menos afectados por infecciones o enfermedades que los lactantes alimentados con fórmulas. Por lo tanto, los bebés alimentados con leche humana tienen menos infecciones gastrointestinales tanto en cuanto a incidencia como a duración, menos enfermedades atópicas tales como alergia, eczema, menos cólicos y calambres, y menos estreñimiento que los lactantes alimentados con fórmulas.  
15 También afecciones que ocurren más tarde en la vida, tales como la obesidad infantil, la diabetes y el asma, están relacionadas con el tipo de alimentación durante las etapas más tempranas de la vida, estando en ventaja los lactantes alimentados con leche humana.

20 [0003] Generalmente, la flora intestinal de los lactantes alimentados con leche humana está compuesta principalmente por bifidobacterias y lactobacilos. La leche humana contiene oligosacáridos de la leche humana, que son un factor de crecimiento para las bifidobacterias en el intestino de los lactantes. La flora de los lactantes alimentados con fórmulas es más diversa y contiene en general más especies de *Bacteroides*, *Clostridium* y *Enterobacteriaceae*. Los lactantes alimentados con fórmulas tienen alrededor de una décima parte a aproximadamente dos tercios del número de bifidobacterias de los lactantes alimentados con leche humana. Las bifidobacterias y los lactobacilos se consideran importantes en el mantenimiento de una microbiota intestinal bien equilibrada y se ha postulado que las bifidobacterias y los lactobacilos tienen varios efectos saludables, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de la diarrea y de infecciones intestinales. Además, se ha demostrado que las bifidobacterias y los lactobacilos juegan un papel en el sistema inmunitario del huésped.  
25

30 [0004] El método hasta la fecha fue promover bifidobacterias en general, es decir, a nivel de género. El género *Bifidobacterium* consiste en muchas especies diferentes, que difieren en el metabolismo, la actividad enzimática, la utilización de oligo y polisacáridos, la composición de la pared celular y la interacción con el sistema inmunitario del huésped. Por lo tanto, no todas las especies de *Bifidobacterium* tienen el mismo efecto funcional en el lactante. *B. adolescentis* es más predominante en la flora de los adultos y los lactantes alérgicos, y es menos común en las heces de los lactantes sanos. *B. animalis* / *B. lactis* no es de origen natural en los seres humanos. En lactantes sanos, la flora de bifidobacterias está principalmente compuesta por *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum*. Es el objetivo de la presente invención conseguir una flora en lactantes alimentados con fórmulas que recuerde a la flora de los bebés alimentados con leche humana a nivel de especies de *Bifidobacterium*.  
35

40 [0005] EP1105002 describe el uso de dos carbohidratos no digeribles diferentes para mejorar la flora intestinal. Los carbohidratos pueden comprender especialmente galactooligosacáridos y fructopolisacáridos. Moro et al. (JPGN 34: 292-295 - 2002) describen una mezcla de galacto- y fructooligosacáridos para estimular el crecimiento intestinal de bifidobacterias y lactobacilos. EP 1 175 905 A1 enseña una combinación de carbohidratos para promover el equilibrio y la salud de la flora intestinal.

Resumen de la invención

45 [0006] Los presentes inventores han descubierto que alimentar a un infante humano con una combinación de diferentes sacáridos no digeribles aumenta el nivel de bifidobacterias en las heces y regula la población de bifidobacterias en el tracto intestinal a nivel de especie hasta un nivel que es similar a los niveles observados en los lactantes alimentados con leche humana, es decir, bajos en *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* y *B. adolescentis*. Sin embargo, la concentración de *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) resultó ser baja en relación con los lactantes alimentados con leche humana.

50 [0007] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende sacárido no digerible A y sacárido no digerible B y *B. breve*. Esta composición puede usarse ventajosamente para igualar la distribución de especies de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal de un lactante alimentado con fórmulas.

Leyenda de la figura

[0008] Figura 1: gráfico de la hipersensibilidad de la vía respiratoria como PenH (pausa aumentada) relativa frente a la concentración de metacolina en ratones que recibieron una combinación de *B. breve*, transgalactooligosacáridos y fructopolisacáridos; y un grupo de control de ratones que recibieron solución salina.

5 Descripción detallada de la invención

[0009] La presente invención proporciona una composición tal y como se define en la reivindicación 1, es decir, una composición con una viscosidad de entre 1 y 60 mPa.s a una velocidad de cizalladura de  $95 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ , una densidad calórica de entre 10 y 250 kcal por 100 ml, que comprende *Bifidobacterium breve*, un sacárido no digerible A y un sacárido no digerible B, donde:

- 10 a. el sacárido no digerible A tiene un grado de polimerización de 2-8 y al menos el 60 % en moles de las unidades monosacáridas totales del sacárido A son monosacáridos seleccionados del grupo que consiste en los monosacáridos fructosa y glucosa;
- b. el sacárido no digerible B tiene un grado de polimerización de 8-100 y al menos el 60 % en moles de las unidades monosacáridas totales del sacárido B son monosacáridos seleccionados del grupo que consiste en los monosacáridos fructosa y glucosa; y
- 15

donde el grado medio de polimerización del sacárido A es al menos 5 unidades monosacáridas inferior al grado medio de polimerización del sacárido B.

- [0010] En otro aspecto, la composición de la presente invención es para uso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos gastrointestinales y trastornos inmunitarios, donde la población de especies de *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal de lactantes alimentados con leche no humana o leche parcialmente humana se normaliza a la población de especies de *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus* de lactantes alimentados con leche humana. En otro aspecto, la composición de la presente invención es para uso en la prevención y/o el tratamiento de la rinitis alérgica.
- 20

Viscosidad

- 25 [0011] La presente composición tiene una viscosidad de entre 1 y 60 mPa.s, preferiblemente entre 1 y 20 mPa.s, más preferiblemente entre 1 y 10 mPa.s, de la forma más preferible entre 1 y 6 mPa.s. La baja viscosidad asegura una administración apropiada del líquido, por ejemplo, un pasaje apropiado a través del agujero de una tetina. Esta viscosidad también se parece mucho a la viscosidad de la leche humana. Además, una viscosidad baja produce un vaciado gástrico normal y una mejor toma de energía, que es esencial para los lactantes que necesitan la energía para un crecimiento y desarrollo óptimos. La presente composición se prepara preferiblemente por adición de una composición en polvo con agua. Normalmente, la fórmula infantil se prepara de tal manera. La presente invención se refiere también así a una composición en polvo empaquetada donde dicho paquete dispone de instrucciones para mezclar el polvo con una cantidad adecuada de líquido, dando así como resultado una composición líquida con una viscosidad de entre 1 y 60 mPa.s.
- 30

- 35 [0012] La viscosidad del líquido se determina usando un reómetro Physica MCR 300 (Physica Messtechnik GmbH, Ostfilden, Alemania) a una velocidad de cizalladura de  $95 \text{ s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ .

*Bifidobacterium breve*

- [0013] *Bifidobacterium breve* es una bacteria gram-positiva anaeróbica en forma de bastón ramificado. El presente *B. breve* tiene preferiblemente al menos un 95 % de identidad de la secuencia del ARNr 16S cuando se compara con la cepa tipo *B. breve* ATCC 15700, más preferiblemente al menos un 97% de identidad (Stackebrandt & Goebel, 1994, Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 846-849). El *Bifidobacterium* usado en la presente invención hibrida preferiblemente con la sonda de *B. breve* y da una señal con el método de ensayo de la nucleasa 5' como se describe más adelante en este documento.
- 40

- [0014] Las cepas preferidas de *B. breve* son aquellas aisladas de las heces de lactantes sanos alimentados con leche humana. Típicamente, estas están disponibles comercialmente de productores de bacterias ácido lácticas, pero también pueden aislarse directamente de heces, identificarse, caracterizarse y producirse. Según una forma de realización preferida, la presente composición contiene al menos un *B. breve* seleccionado del grupo que consiste en *B. breve* Bb-03 (Rhodia), *B. breve* M-16V (Morinaga), *B. breve* R0070 (Institute Rosell, Lallemand), DSM 20091, y LMG 11613. De la forma más preferible, el *B. breve* es *B. breve* M-16V (Morinaga).
- 45

[0015] La presente composición contiene preferiblemente de  $10^2$  a  $10^{13}$  unidades formadoras de colonias (UFC) de *B. breve* por gramo de peso seco de la presente composición, preferiblemente de  $10^4$  a  $10^{12}$ , más preferiblemente de  $10^5$  a  $10^{10}$ , de la forma más preferible de  $10^5$  a  $1 \times 10^9$  UFC de *B. breve* por gramo de peso seco de la presente composición.

5 [0016] Preferiblemente, la presente composición contiene de  $10^4$  a  $10^{12}$ , más preferiblemente de  $10^5$  a  $10^{11}$ , de la forma más preferible de  $10^7$  a  $5 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) de *B. breve* por g del total de sacárido A y B.

10 [0017] La dosis de *B. breve* según la presente invención se administra preferiblemente a una dosis diaria de  $10^2$  a  $10^{13}$ , más preferiblemente de  $10^5$  a  $10^{11}$ , de la forma más preferible de  $10^8$  a  $5 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC).

#### Sacáridos no digeribles

[0018] La presente invención proporciona una composición que comprende sacárido no digerible A y sacárido no digerible B, de ahora en adelante referidos como sacárido A y sacárido B, respectivamente. El sacárido A y el sacárido B son sacáridos diferentes y tienen un grado de polimerización diferente.

15 [0019] El término sacárido A como se usa en la presente invención se refiere preferiblemente a una mezcla de sacáridos no digeribles. El término sacárido B como se usa en la presente invención se refiere preferiblemente a una mezcla de sacáridos no digeribles. Esto es práctica común, debido a que el uso de sacáridos con por ejemplo una longitud de cadena es muy caro. Preferible y comúnmente, los miembros de tal mezcla difieren entre sí solo en el número del monosacárido predominante.

20 [0020] El término sacárido no digerible se refiere a sacáridos que permanecen sin digerir en el tracto gastrointestinal y alcanzan el intestino grueso sin absorber, es decir, sacáridos que no se digieren en el tracto intestinal superior de un humano, preferiblemente un lactante humano, por ejemplo, no digerido por los ácidos o las enzimas presentes en el tracto intestinal humano. Debe notarse que los sacáridos digeribles no son parte de los sacáridos A y B. Así, por ejemplo, la glucosa, la fructosa, la galactosa, la sacarosa, la lactosa, la maltosa y las maltodextrinas se consideran digeribles.

25

[0021] Preferiblemente, el sacárido A y el B son hidrosolubles. Los sacáridos hidrosolubles son al menos un 50% hidrosolubles, según un método descrito por L. Prosky et al, J. Assoc. Anal. Chem 71: 1017-1023, 1988.

30 [0022] En una forma de realización preferida, al menos el 80 % en peso de sacárido no digerible A y B es fermentable. El término "fermentable" como se utiliza en este caso se refiere a la capacidad de sufrir una descomposición por microorganismos en la parte inferior del tracto gastrointestinal (por ejemplo, el colon) en moléculas más pequeñas, en particular ácidos grasos de cadena corta y lactato. La fermentabilidad de sacárido no digerible A y B se determina preferiblemente por el método descrito en Am. J. Clin. Nutr. 53, 1418-1424 (1991). En una forma de realización más preferida, al menos el 80 % en peso de sacárido no digerible A y B son prebióticos. Los "prebióticos" se definen como ingredientes alimenticios no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o más especies bacterianas en el colon y afectan así beneficiosamente al huésped (Gibson y Roberfroid, J. Nutr. 125: 1401-1412(1995)).

35

#### Composición monosacárida

40 [0023] Al menos el 60 % en moles, preferiblemente al menos el 75 % en moles, más preferiblemente al menos el 90 en moles, de la forma más preferible al menos el 98 % en moles de las unidades monosacáridas totales de sacárido A y B son monosacáridos seleccionados de los monosacáridos fructosa (fru) y glucosa (glu).

45 [0024] Preferiblemente al menos el 50 % en peso, preferiblemente al menos el 75 % en peso del peso acumulativo de sacárido A y B son sacáridos no digeribles con un GP de 2-8. Usando una mezcla con un alto porcentaje en peso de sacáridos pequeños, se aumentará la fermentabilidad y el efecto de estimulación en el crecimiento de las bacterias ácido lácticas y bifidobacterias.

[0025] El porcentaje de un monosacárido en el sacárido puede calcularse sencillamente por división de la cantidad de la unidad monosacárida respectiva (por ejemplo, glucosa) en el sacárido entre la cantidad total de las unidades monosacáridas en ese sacárido y se multiplica por 100. Cuando el sacárido es una mezcla de

sacáridos, la aportación de cada sacárido individual en la mezcla de sacáridos debe tenerse en cuenta. El porcentaje de una mezcla de sacáridos puede determinarse sencillamente hidrolizando completamente la mezcla y determinando el porcentaje molar para cada monosacárido.

5 [0026] Preferiblemente, el sacárido B contiene al menos el 67 % en moles de fructosa, aún más preferiblemente al menos el 75 % en peso de fructosa.

#### Grado de polimerización

[0027] La incorporación de un sacárido con un grado de polimerización aumentado reduce la carga osmótica, que es ventajoso para una nutrición infantil y mejora la estimulación prebiótica de la flora intestinal también en partes más distales del colon.

10 [0028] El sacárido A tiene un GP de 2-8. El sacárido B tiene un GP de 8-100. La diferencia en el GP medio entre el sacárido A y el sacárido B es de al menos 5, más preferiblemente al menos 10, aún más preferiblemente al menos 15.

15 [0029] Por ejemplo, si el sacárido A es una mezcla de glu-fru<sub>m=2-7</sub> y fru<sub>m=2-6</sub> con un GP medio de 4,5 unidades monosacáridas y el sacárido B es glu-fru<sub>n=12-100</sub> con un GP medio de 25 unidades monosacáridas; entonces la diferencia en el GP medio (25-4,5 =) 20,5.

#### Concentración de sacárido A y B

20 [0030] La presente composición comprende preferiblemente al menos 5 mg de sacárido A por 100 ml, preferiblemente al menos 50 mg de sacárido A por 100 ml, aún más preferiblemente al menos 0,1 g de sacárido A por 100 ml, de la forma más preferible al menos 0,5 g de sacárido A por 100 ml. Preferiblemente, la presente composición no contiene más de 10 g de sacárido A por 100 ml, preferiblemente no más de 2,0 g por 100 ml. La presente composición comprende preferiblemente al menos 5 mg de sacárido B por 100 ml, preferiblemente al menos 10 mg de sacárido B por 100 ml, aún más preferiblemente al menos 25 mg de sacárido B por 100 ml, de la forma más preferible al menos 50 mg de sacárido B por 100 ml. Preferiblemente, la presente composición no contiene más de 10 g de sacárido B por 100 ml, preferiblemente no más de 1 g por 100 ml.

25 [0031] La proporción en peso entre sacárido A y sacárido B es preferiblemente de entre 0,01 y 100, más preferiblemente entre 0,5 y 100, aún más preferiblemente entre 4 y 100, de la forma más preferible entre 24 y 99. Una alta proporción en peso es particularmente ventajosa cuando el sacárido A tiene un GP bajo y el sacárido B tiene un GP relativamente alto. Esto asegura un equilibrio óptimo entre osmolalidad y fermentabilidad.

30 [0032] El sacárido A y el sacárido B comprenden preferiblemente entre el 5 y el 100 % en peso basado en el peso total de los sacáridos no digeribles en la presente composición, más preferiblemente del 50 al 100 % en peso.

[0033] Los sacáridos no digeribles A y B según la presente invención son preferiblemente administrados a una dosis diaria de 0,1 a 30 g (peso de sacárido A + peso de sacárido B), más preferiblemente de 0,5 a 15 g, más preferiblemente de 3 a 10 g.

#### *Lactobacillus paracasei*

35 [0034] En una forma de realización preferida, la presente composición comprende *Lactobacillus paracasei*. Se ha descubierto que esta bacteria está presente en cantidades limitadas en lactantes alimentados con leche no humana. Por consiguiente, la administración de una composición que comprende sacárido no digerible A, sacárido no digerible B, *B. breve* y *L. paracasei* posibilita la normalización de bifidobacterias a nivel de especie, pero también posibilita la normalización de la población de especies de *Lactobacillus* hasta un nivel equivalente al  
40 presente en el tracto gastrointestinal de lactantes alimentados con leche humana. Esto es importante, ya que diferentes especies de *Lactobacillus* ejercen efectos diferentes en el huésped. Por ejemplo, *L. delbrueckii* forma D-lactato que puede dar lugar a acidosis en lactantes prematuros, mientras que *L. paracasei* forma L-lactato.

45 [0035] Preferiblemente, la presente cepa de *Lactobacillus* tiene al menos el 95, más preferiblemente al menos el 97 % de identidad de la secuencia del ARNr 16S cuando se compara con la cepa tipo *L. paracasei* ATCC 25032 (Stackebrandt & Goebel, 1994, Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 846-849). El *Lactobacillus* usado en la presente invención híbrida preferiblemente con la sonda de *L. paracasei* y da una señal con el método de ensayo de la nucleasa 5' como se describe más adelante en este documento.

[0036] Las cepas de *L. paracasei* preferidas son aquellas aisladas de las heces de lactantes sanos alimentados con leche humana. Varias cepas *L. paracasei* están disponibles comercialmente de productores de bacterias ácido lácticas, pero también pueden aislarse directamente de heces, identificarse, caracterizarse y producirse. Según una forma de realización preferida, la presente composición contiene al menos *L. paracasei* seleccionado del grupo que consiste en *L. paracasei* F19 (Arla, Suecia), *L. paracasei* LAFTI L26 (DSM Food Specialties, Países Bajos) y *L. paracasei* CRL 431 (Chr. Hansen, Dinamarca), LMG 12165 y LMG 11407.

[0037] La presente composición contiene preferiblemente de  $10^2$  a  $10^{13}$  unidades formadoras de colonias (UFC) del *L. paracasei* por gramo de peso seco de la presente composición, preferiblemente de  $10^4$  a  $10^{12}$ , más preferiblemente de  $10^5$  a  $10^{10}$ , de la forma más preferible de  $10^5$  a  $1 \times 10^9$  UFC de *L. paracasei* por gramo de peso seco de la composición.

[0038] Preferiblemente, la presente composición contiene de  $10^4$  a  $10^{12}$ , más preferiblemente de  $10^5$  a  $10^{11}$ , de la forma más preferible de  $10^7$  a  $5 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) de *L. paracasei* por g del total de sacárido A y B.

[0039] La dosis de *L. paracasei* según la presente invención se administra preferiblemente a una dosis diaria de  $10^2$  a  $10^{13}$ , más preferiblemente de  $10^5$  a  $10^{11}$ , de la forma más preferible de  $10^8$  a  $5 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC).

#### Macronutrientes

[0040] La presente composición contiene preferiblemente grasa, carbohidratos y proteínas.

[0041] Preferiblemente, la presente composición contiene un carbohidrato digerible seleccionado del grupo que consiste en maltodextrina, almidón, lactosa, maltosa, glucosa, fructosa y sacarosa. Preferiblemente, la presente composición contiene lactosa. Preferiblemente, al menos el 35 % en peso, más preferiblemente al menos el 50 % en peso, de la forma más preferible al menos el 75 % en peso del carbohidrato digerible es lactosa. Cuando está en forma líquida, la presente composición comprende preferiblemente de 6 a 19 g de carbohidratos digeribles por 100 ml, más preferiblemente de 6 a 10 g por 100 ml.

[0042] Preferiblemente, del 10% al 80% del contenido energético total de la presente composición está proporcionado por el carbohidrato digerible. Más preferiblemente, la presente composición contiene del 25 al 75 % en. de carbohidratos. % en. es la abreviatura para el porcentaje de energía y representa la cantidad relativa de cada constituyente que contribuye al valor calórico total de la preparación. El valor calórico está proporcionado por carbohidratos digeribles, proteínas y grasa.

[0043] Los ingredientes típicos para uso como una fuente de lípidos incluyen grasa animal, grasa vegetal y aceite de fermentación microbiana. La grasa es una fuente de energía importante y de importancia máxima para un desarrollo apropiado de un lactante. La presente invención contiene preferiblemente ácido linoléico (AL; un ácido graso omega 6) y ácido  $\alpha$ -linoléico (AAL; un ácido graso omega 3). La composición comprende preferiblemente de 0,3 a 1,5 g de AL por 100 ml, y de 0,05 a 5 g de AAL por 100 ml. La proporción en peso AL/AAL es preferiblemente de entre 5 y 15. Preferiblemente, la presente composición comprende ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA LC), más preferiblemente ácido eicosapentanoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA). En una forma de realización preferida, la composición comprende (ARA) de ácido araquidónico. Preferiblemente, la composición comprende de 1 a 25 mg, más preferiblemente de 4 a 15 mg de DHA por 100 ml. Preferiblemente, la composición comprende de 2 a 50 mg, más preferiblemente de 6 a 30 mg ARA por 100 ml. La presencia de LC-PUFA afecta ventajosamente a la colonización de lactobacilos y/o bifidobacterias, especialmente de *Lactobacillus paracasei*. La presente composición preferiblemente comprende del 30 al 60 % en. de grasa, más preferiblemente del 39 al 50 % en. de grasa. La composición comprende preferiblemente de 2,1 a 6,5 g de grasa por 100 ml.

[0044] Preferiblemente, la presente composición comprende del 5 al 16 % en., más preferiblemente del 8 al 12 % en. de proteína. Preferiblemente, la presente composición comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en caseína, suero de leche, leche desnatada, proteína de soja, proteína de guisante, colágeno, proteína de arroz y/o proteína de maíz. Preferiblemente, al menos el 25 % en peso, más preferiblemente al menos el 50 % en peso, de la forma más preferible al menos el 90 % en peso de la proteína total de la presente composición se proporciona por proteína hidrolizada y/o aminoácido libre. El uso de hidrolizado de proteínas y/o aminoácidos libres reduce el riesgo de alergia, particularmente de alergia a la leche de vaca. Cuando la composición está en una forma líquida, preferiblemente comprende de 1,0 a 6,0 g, más preferiblemente de 1,0 a 2,5 g de proteína por 100 ml.

5 [0045] La presente composición es preferiblemente líquida. Las irregularidades intestinales (por ejemplo, heces duras, volumen de deposición insuficiente, diarrea) son un gran problema en muchos bebés y sujetos enfermos que reciben alimentos líquidos. Por lo tanto, la presente composición tiene preferiblemente una osmolalidad de entre 50 y 500 mOsm/kg, más preferiblemente entre 100 y 400 mOsm/kg. Con esta osmolalidad, la presente composición es particularmente adecuada para el tratamiento y/o la prevención de diarrea.

10 [0046] Es importante también que la presente composición no tenga una densidad calórica excesiva, sin embargo todavía proporciona calorías suficientes para alimentar al sujeto. Por lo tanto, el alimento líquido tiene preferiblemente una densidad calórica de entre 10 y 250 kcal por 100 ml, aún más preferiblemente una densidad calórica de entre 50 y 90 kcal/ml, de la forma más preferible entre 60 y 71 kcal por 100 ml. La densidad calórica óptima también contribuye a la aparición reducida de diarrea.

15 [0047] La presente composición comprende preferiblemente minerales, oligoelementos y vitaminas, colina, taurina, carnitina, mioinositol y/o mezclas derivadas. Preferiblemente, la presente composición contiene taurina, que reduce los síntomas de asma (Adv. Exp. Med. Biol. 2003 526: 403-10). La taurina actúa sinérgicamente con los componentes en la presente composición. Preferiblemente, la presente composición comprende nucleótidos. Preferiblemente, la composición comprende citidina 5'-monofosfato, uridina 5'-monofosfato, adenosina 5'-monofosfato, guanosina 5'-monofosfato e inosina 5'-monofosfato. Preferiblemente, la composición comprende de 0,75 a 10, más preferiblemente de 1,5 a 5 mg de nucleótidos por 100 ml. La presencia de nucleótidos apoya ventajosamente la supervivencia y/o el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, especialmente *B. breve* y/o *L. paracasei*. Preferiblemente, la presente composición contiene ácidos orgánicos, aromas y/o colorantes.

20

#### Aplicaciones

25 [0048] Se ha descubierto que la composición según la presente invención es particularmente útil como nutrición infantil. Además, la composición es especialmente adecuada para la normalización de la población de *Bifidobacterium* y/o de *Lactobacillus* según la distribución de especies en lactantes alimentados con leche humana en el tracto gastrointestinal de lactantes que se alimentaron con leche no o parcialmente humana, en particular los bebés que han nacido prematuramente, bebés nacidos maduros, así como los lactantes que están en el periodo de adaptación a alimentos sólidos. Preferiblemente, el lactante tiene una edad de entre 0 y 36 meses, aún más preferiblemente entre 0 y 18 meses, de la forma más preferible entre 0 y 12 meses.

30 [0049] La flora gastrointestinal tiene un efecto importante en trastornos tales como trastornos gastrointestinales, trastornos inmunitarios y/o trastornos endocrinos. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente composición puede usarse ventajosamente en la producción de un medicamento para uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de la rinitis alérgica.

#### **Ejemplos** (todos comparativos y proporcionados para información)

35 Ejemplo 1: estudio clínico (comparativo)

40 [0050] En este estudio, se evaluó el efecto de una nutrición infantil que contiene transgalactooligosacáridos y fructopolisacáridos en las bifidobacterias y lactobacilos intestinales. El estudio se realizó y se analizaron las muestras fecales como se describe en WO2005/039319. Los lactantes se asignaron de forma aleatoria a uno de dos grupos de tratamiento: un grupo (grupo FE) recibió una fórmula infantil estándar (Aptamil 1 Milupa) y; un grupo (grupo FEGF) una fórmula estándar suplementada con 0,72 g/100 ml de transgalactooligosacáridos (GOS, Vivinal™ (Borculo Domo Ingredients, Países Bajos) y 0,08 g/100 ml de fructopolisacáridos (inulina, Raftilin HP, Orafiti, Bélgica). Un grupo de lactantes alimentados con leche humana se incluyó como un grupo de referencia (grupo ALH).

45 [0051] La cuantificación relativa de las diferentes especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en muestras fecales se determinó por ensayos dúplex de nucleasa 5'. Las sondas y los cebadores se diseñaron y validaron para especies de *Bifidobacterium* como se describe en WO2005/039319 y para *Lactobacillus*. Las sondas y los cebadores para las especies de *Lactobacillus* se muestran en la tabla 1. F es el cebador directo, R es el cebador inverso y P es la sonda. La tabla 2 muestra el cebador óptimo final y las concentraciones de sonda usadas en ensayos dúplex de nucleasa 5' para *Lactobacillus*. La cantidad total de *Bifidobacterium* se determinó también con ayuda de FISH, como se ha descrito anteriormente (Langendijk et al. 1995 Appl. Environ. Microbiol. 61: 3069-75.).

50

## ES 2 702 631 T3

**Tabla 1:** Cebadores y sondas diseñados para uso en los ensayos de nucleasa 5'.

	Cebadores y sondas	Secuencia (5' → 3')
<i>L. acidophilus</i>	F	GAAAGAGCCCAAACCAAGTGATT
	R	CTTCCCAGATAATTCAACTATCGCTTA
	P	TACCACTTTGCA GTCCTACA
<i>L. casei</i>	F	CTATAAGTAAGCTTTGATCCGGAGATTT
	R	CTTCCTGCGGGTACTGAGATGT
	P	ACAAGCTATGAATTCCTACT TGC
<i>L. delbrueckii</i>	F	CACTTGACGTTGAAAACCTGAATATCTTAA
	R	CGAACTCTCTCGGTGCGTTT
	P	CCGAGAATCATTGAGATC
<i>L. fermentum</i>	F	AACCGAGAACACCGCGTTAT
	R	ACTTAACCTTACTGATCGTAGATCAGTCA
	P	TAATCGCATACTCAACTAA
<i>L. paracasei</i>	F	ACATCAGTGTATTGCTTGTCAGTGAATAC
	R	CCTGCGGGTACTGAGATG TTTC
	P	TGCCGCCGGCCAG
<i>L. plantarum</i>	F	TGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAT
	R	TGTTCTCGGTTTCATTATGAAAAAATA
	P	ACATTCTTCGAAACTTTGT
<i>L. reuteri</i>	F	ACCGAGAACACCGCGTTATTT
	R	CATAACTTAACCTAAACAATCAAAGAT TGTCT
	P	ATCGCTAACTCAATTAAT
<i>L. rhamnosus</i>	F	CGGCTGGATCACCTCCTTT
	R	GCTTGAGGGTAAATCCCCT CAA
	P	CCTGCACACACGAAA
Género <i>Lactobacillus</i>	F	TGGATGCCTTGGCACTAGGA
	R	AAATCTCCGGATCAAAGCTTACTTAT
	P	TATTAGTTCCGTCCTTCATC
Todas las bacterias*	F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT
	R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
	P	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

\* Las sondas y los cebadores se derivaron de Nadkami et al, 2002, Microbiology 148: 257-266.

**Tabla 2:** Cebador final optimizado y concentraciones de sonda usados en los diferentes ensayos dúplex de nucleasa 5'

Diana	Ensayo de nucleasa 5'	Cebador directo (nM)	Cebador inverso (nM)	Sonda (nM)
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	900	900	200
	Género <i>Lactobacillus</i>	900	900	200
<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>	900	900	200
	Género <i>Lactobacillus</i>	300	300	50
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. delbrueckii</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	900	900	200
<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	300	300	100
<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	300	300	100

<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	300	300	100
<i>L. reuteri</i>	<i>L. reuteri</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	900	900	200
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	900	450	200
	Género <i>Lactobacillus</i>	150	100	100
Género	Género <i>Lactobacillus</i>	600	600	100
<i>Lactobacillus</i>	Todas las bacterias	300	300	100

Resultados:

5 [0052] El porcentaje del género *Bifidobacterium* como un porcentaje de bacterias totales fue del 75, 47 y 68% en el grupo ALH, el FE y el FEGF, después de un periodo de alimentación de 6 semanas, respectivamente. La cantidad de lactobacilos fue del 3,9, 0,4 y 4,2 %, respectivamente. Las diferencias entre el grupo FEGF y el FE fueron estadísticamente significativas.

[0053] En la tabla 3 se muestra el porcentaje de especies de *Bifidobacterium* en relación a la cantidad total de bifidobacterias.

10 [0054] Tabla 3: porcentaje de especies de *Bifidobacterium* con respecto al número total de bifidobacterias en las heces de lactantes alimentados con leche humana (ALH) y lactantes que recibieron una fórmula estándar (FE) o una fórmula estándar suplementada con TOS/polifruktosa (FEGF), por tanto no según la presente invención, después de un periodo de alimentación de 6 semanas.

Especies	ALH % (SE)	FEGF % (SE)	FE % (SE)
<i>B. catenulatum</i>	1,9 (0,6)	1,4 (1,0) <sup>b</sup>	8,1 (4,1) <sup>b</sup>
<i>B. adolescentis</i>	0,3 (0,9) <sup>a</sup>	0,2 (0,1) <sup>a</sup>	2, (1,9)
<i>B. breve</i>	11,7 (9,6)	5,4 (10,8)	4,9 (10,7) <sup>a</sup>
<i>B. longum</i>	7,3(13,9)	5,4 (10,7)	6,2 (9,4)
<i>B. bifidum</i>	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)
<i>B. angulatum</i>	<0,0 (0,0)	<0,1 (0,2)	<0,1 (0,0)
<i>B. infantis</i>	32,0 (18,9)	32,1 (20,0)	37,8 (18,4)
<i>B. dentium</i>	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)

<sup>a</sup>: una disminución significativa durante el periodo de estudio  
<sup>b</sup>: una diferencia significativa entre el grupo FEGF y el FE.

15 [0055] Una gran variedad de especies de *Bifidobacterium* está presente en los tres grupos diferentes. Además, una reducción significativa en *B. adolescentis* es visible en lactantes alimentados con leche humana y en lactantes que recibieron FEGF a diferencia de lactantes que recibieron una fórmula estándar. Después de 6 semanas de alimentación, *B. adolescentis* es mucho más alto en bebés alimentados con FE que en bebés que se alimentaron con FEGF o leche humana. Los análisis de las muestras fecales de lactantes FEGF muestran una gran variedad en la flora de bifidobacterias similar a los lactantes alimentados con leche humana. Los perfiles de lactantes alimentados con leche humana y lactantes que recibieron FEGF también mostraron menos *B. catenulatum* (+ *B. pseudocatenulatum*) que el perfil de lactantes que recibieron una fórmula estándar. *B. infantis* y *B. longum* parecen ser predominantes en lactantes alimentados con leche humana así como en lactantes que recibieron una fórmula estándar (FE) o una fórmula estándar suplementada con prebióticos (FEGF). También *B. breve* fue dominante en los tres grupos, pero, en el grupo que recibió la leche humana, *B. Breve* como un % de bifidobacterias totales fue más alto (11,7 %) que en el grupo FE (4,9 %) y el FEGF (5,4%).

25 [0056] En la tabla 4 se da la distribución de especies de lactobacilos en las heces de los lactantes alimentados de diferentes maneras.

[0057] Tabla 4: porcentaje de especies de *Lactobacillus* con respecto al número total de lactobacilos en las heces de lactantes alimentados con leche humana (ALH) y lactantes que recibieron una fórmula estándar (FE) o una

fórmula estándar suplementada con TOS/fructopolisacáridos (FEGF) después de un periodo de alimentación de 6 semanas.

Especies	ALH % (SE)	FEGF % (SE)	FE % (SE)
<i>L. acidophilus</i>	23,5 (4,5) <sup>a</sup>	24,5 (3,9) <sup>a</sup>	19,2 (4,1)
<i>L. casei</i>	6,0 (1,8) <sup>a</sup>	10,7 (2,5) <sup>a</sup>	8,3 (2,0) <sup>a</sup>
<i>L. delbrueckii</i>	<0,001 (0,00)	0,01 (0,01) <sup>bc</sup>	6,9 (2,8) <sup>ac</sup>
<i>L. fermentum</i>	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)	0,05 (0,03)
<i>L. paracasei</i>	22,1 (6,1) <sup>a</sup>	16,8 (4,2) <sup>a</sup>	5,6 (3,3)
<i>L. plantarum</i>	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)
<i>L. reuteri</i>	1,4 (0,6)	1,3 (0,4)	6,4 (3,2)
<i>L. rhamnosus</i>	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)

<sup>a</sup>: un aumento significativo durante el periodo de estudio  
<sup>b</sup>: una disminución significativa durante el periodo de estudio  
<sup>c</sup>: una diferencia significativa entre el grupo FEGF y el FE.

[0058] Como se puede observar en la tabla 4, una gran variedad de especies de *Lactobacillus* está presente en los lactantes alimentados con leche humana y alimentados con fórmula estándar. Sin embargo, la distribución de especies no es similar en lactantes alimentados con leche humana y en los alimentados con fórmula estándar. Una disminución en *L. delbrueckii* es visible en lactantes alimentados con leche humana a diferencia de lactantes que recibieron una fórmula estándar, donde se observa un aumento. Después de 6 semanas de alimentación se observa un aumento significativo de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. paracasei* en lactantes alimentados con leche humana, mientras que el aumento de *L. acidophilus* y *L. paracasei* no es significativo en lactantes alimentados con fórmulas. En comparación con lactantes alimentados con leche humana, los lactantes alimentados con fórmula estándar tienden a tener concentraciones relativas más altas de *L. fermentum* y *L. reuteri*. Sorprendentemente, los análisis de las muestras fecales de lactantes FEGF muestran una gran variedad en la flora de *Lactobacillus* similar a los lactantes alimentados con leche humana. La distribución de especies en lactantes alimentados con FEGF es muy similar a la observada en lactantes alimentados con leche humana. Como se observa en lactantes alimentados con leche humana, los lactantes alimentados con FEGF tienen cantidades relativamente reducidas de *L. delbrueckii*, *L. reuteri* y *L. fermentum* y cantidades aumentadas de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. paracasei*. Sin embargo, las cantidades relativas de *L. paracasei* en lactantes alimentados con FEGF tienden a ser inferiores a las de lactantes alimentados con leche humana.

[0059] Estos resultados son indicativos de que la alimentación con una mezcla de sacáridos no digeribles A y B, que comprenden al menos el 60, especialmente al menos el 98 % en moles de una o más unidades monosacáridas seleccionadas del grupo que consiste en galactosa, fructosa y glucosa, y en la que A y B difieren en la estructura química, produce una distribución de especies de bifidobacterias y lactobacilos similar a las observadas en lactantes alimentados con leche humana (es decir, relativamente disminuida en *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum* y/o *L. reuteri* y relativamente aumentada en *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *L. casei*, *L. paracasei* y/o *L. acidophilus*). Estos resultados son también indicativos de que la administración de esta mezcla de sacárido no digerible A y B en combinación con *B. breve* o con *B. breve* más *L. paracasei* restaurará la flora intestinal en lactantes de manera que imite la de lactantes alimentados con leche humana con respecto a la distribución de especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*; hacer que la flora intestinal recuerde más a la de lactantes alimentados con leche humana tendrá un efecto beneficioso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos gastrointestinales, trastornos inmunitarios y/o trastornos endocrinos en lactantes.

#### Ejemplo 2: efecto en la reacción alérgica (comparativo)

[0060] Se obtuvieron ratones machos BALB/c sin patógenos específicos de Charles River (Maastricht, Países Bajos). El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum* y los ratones se usaron cuando tenían 6-9 semanas de edad.

[0061] Los ratones se sensibilizaron mediante dos inyecciones i.p. con 10 µg de ovalbúmina adsorbida sobre 2,25 mg de hidróxido de aluminio en 100 µl de solución salina o solo solución salina en los días 0 y 7. Los ratones se expusieron en los días 35, 38 y 41 mediante inhalación de aerosoles de ovalbúmina en una cámara de exposición de plexiglás durante 20 minutos. Los aerosoles se generaron por nebulización de una solución de ovalbúmina (10 mg/ml) en solución salina utilizando un nebulizador Pari LC Star (Pari respiratory Equipment, Richmond, VA, USA).

5 [0062] Los ratones se trataron a diario con  $1 \times 10^9$  UFC de *Bifidobacterium breve* y 25 mg de una mezcla de transgalactooligosacáridos y fructopolisacáridos (9:1) (TOS/mezcla de fructopolisacáridos del ejemplo 2) por vía oral mediante alimentación forzada (0,2 ml, solución salina fisiológica) a partir del día 28 hasta el final del experimento (es decir, el día 42). Como un control se administraron 0,2 ml de solución salina fisiológica mediante alimentación forzada.

[0063] La sensibilidad de las vías respiratorias a la metacolina nebulizada inhalada se determinó 24 horas después de la exposición final al aerosol, en ratones conscientes no restringidos utilizando pletismografía de cuerpo entero (BUXCO EMKA, París, Francia). La respuesta de las vías respiratorias se expresó como pausa aumentada (PenH).

10 [0064] Resultados: las mediciones en la hipersensibilidad de las vías respiratorias muestran que, en comparación con los controles, los ratones que reciben el *B. breve*, TOS y fructopolisacárido muestran una hipersensibilidad de las vías respiratorias estadísticamente reducida, indicativa de una reacción asmática reducida. En la figura 1, la hipersensibilidad de las vías respiratorias se representa como la PenH (pausa aumentada) relativa frente a la concentración de metacolina para ratones que reciben una combinación de *B. breve* + una mezcla de TOS/fructopolisacárido y un grupo de control de ratones que reciben solución salina en su lugar. Los valores fijados de PenH relativa se obtienen después de sustraer los valores del blanco obtenidos para ratones no sensibilizados a la ovoalbúmina y normalizar al valor obtenido para el grupo de control a la concentración máxima de metacolina.

Ejemplo 3 (comparativo)

20 [0065] Una fórmula de leche infantil que contiene por 100 ml de producto final una viscosidad de  $2,0 \pm 0,2$  mPa.s y:

13 % de energía de proteína (caseína y lactosuero)	2,2 g
49 % de energía de carbohidratos digeribles	8,6 g
37 % de energía de grasa	3,0 g
TOS (presente en GOS de Vivinal) (GP medio entre 2 y 4)	0,72 g
FOS (Raftiline HP) (GP medio entre 23-25)	0,08 g
<i>B. breve</i>	$1,6 \times 10^8$ UFC
<i>L. paracasei</i>	$1,6 \times 10^8$ UFC

Tabla 2: Cebador final optimizado y concentraciones de sonda usados en los diferentes ensayos dúplex de nucleasa 5'

Diana	Ensayo de nucleasa 5'	Cebador directo (nM)	Cebador inverso (nM)	Sonda (nM)
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	900	900	200
	Género <i>Lactobacillus</i>	900	900	200
<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>	900	900	200
	Género <i>Lactobacillus</i>	300	300	50
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. delbrueckii</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	900	900	200
<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	300	300	100
<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	300	300	100
<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	300	300	100
<i>L. reuteri</i>	<i>L. reuteri</i>	300	300	100
	Género <i>Lactobacillus</i>	900	900	200
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	900	450	200
	Género <i>Lactobacillus</i>	150	100	100

Género	Género <i>Lactobacillus</i>	600	600	100
<i>Lactobacillus</i>	Todas las bacterias	300	300	100

Resultados:

5 [0066] El porcentaje del género *Bifidobacterium* como un porcentaje de bacterias totales fue del 75, 47 y 68% en el grupo ALH, el FE y el FEGF, después de un periodo de alimentación de 6 semanas, respectivamente. La cantidad de lactobacilos fue del 3,9, 0,4 y 4,2 %, respectivamente. Las diferencias entre el grupo FEGF y el FE fueron estadísticamente significativas.

[0067] En la tabla 3 se muestra el porcentaje de especies de *Bifidobacterium* en relación a la cantidad total de bifidobacterias.

10 Tabla 3: porcentaje de especies de *Bifidobacterium* con respecto al número total de bifidobacterias en las heces de lactantes alimentados con leche humana (ALH) y lactantes que recibieron una fórmula estándar (FE) o una fórmula estándar suplementada con TOS/polifruktosa (FEGF) después de un periodo de alimentación de 6 semanas.

Especies	ALH % (SE)	FEGF % (SE)	FE % (SE)
<i>B. catenulatum</i>	1,9 (0,6)	1,4 (1,0) <sup>b</sup>	8,1 (4,1) <sup>b</sup>
<i>B. adolescentis</i>	0,3 (0,9) <sup>a</sup>	0,2 (0,1) <sup>a</sup>	2, (1,9)
<i>B. breve</i>	11,7 (9,6)	5,4 (10,8)	4,9 (10,7) <sup>a</sup>
<i>B. longum</i>	7,3(13,9)	5,4 (10,7)	6,2 (9,4)
<i>B. bifidum</i>	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)
<i>B. angulatum</i>	<0,0 (0,0)	<0,1 (0,2)	<0,1 (0,0)
<i>B. infantis</i>	32,0 (18,9)	32,1 (20,0)	37,8 (18,4)
<i>B. dentium</i>	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)	<0,1 (0,0)

<sup>a</sup>: una disminución significativa durante el periodo de estudio  
<sup>b</sup>: una diferencia significativa entre el grupo FEGF y el FE.

15 [0068] Una gran variedad de especies de *Bifidobacterium* está presente en los tres grupos diferentes. Además, una reducción significativa en *B. adolescentis* es visible en lactantes alimentados con leche humana y en lactantes que recibieron FEGF a diferencia de lactantes que recibieron una fórmula estándar. Después de 6 semanas de alimentación, *B. adolescentis* es mucho más alto en bebés alimentados con FE que en bebés que se alimentaron con FEGF o leche humana. Los análisis de las muestras fecales de lactantes FEGF muestran una gran variedad en la flora de bifidobacterias similar a los lactantes alimentados con leche humana. Los perfiles de lactantes alimentados con leche humana y lactantes que recibieron FEGF también mostraron menos *B. catenulatum* (+ *B. pseudocatenulatum*) que el perfil de lactantes que recibieron una fórmula estándar. *B. infantis* y *B. longum* parecen ser predominantes en lactantes alimentados con leche humana así como en lactantes que recibieron una fórmula estándar (FE) o una fórmula estándar suplementada con prebióticos (FEGF). También *B. breve* fue dominante en los tres grupos, pero, en el grupo que recibió la leche humana, *B. Breve* como un % de bifidobacterias totales fue más alto (11,7 %) que en el grupo FE (4,9 %) y el FEGF (5,4%).

25 [0069] En la tabla 4 se da la distribución de especies de lactobacilos en las heces de los lactantes alimentados de diferentes maneras.

Tabla 4: porcentaje de especies de *Lactobacillus* con respecto al número total de lactobacilos en las heces de lactantes alimentados con leche humana (ALH) y lactantes que recibieron una fórmula estándar (FE) o una fórmula estándar suplementada con TOS/fructopolisacáridos (FEGF) después de un periodo de alimentación de 6 semanas.

Especies	ALH % (SE)	FEGF % (SE)	FE % (SE)
<i>L. acidophilus</i>	23,5 (4,5) <sup>a</sup>	24,5 (3,9) <sup>a</sup>	19,2 (4,1)
<i>L. casei</i>	6,0 (1,8) <sup>a</sup>	10,7 (2,5) <sup>a</sup>	8,3 (2,0) <sup>a</sup>
<i>L. delbrueckii</i>	<0,001 (0,00)	0,01 (0,01) <sup>bc</sup>	6,9 (2,8) <sup>ac</sup>
<i>L. fermentum</i>	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)	0,05 (0,03)
<i>L. paracasei</i>	22,1 (6,1) <sup>a</sup>	16,8 (4,2) <sup>a</sup>	5,6 (3,3)

<i>L. plantarum</i>	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)
<i>L. reuteri</i>	1,4 (0,6)	1,3 (0,4)	6,4 (3,2)
<i>L. rhamnosus</i>	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)	<0,001 (0,00)
<sup>a</sup> : un aumento significativo durante el periodo de estudio <sup>b</sup> : una disminución significativa durante el periodo de estudio <sup>c</sup> : una diferencia significativa entre el grupo FEGF y el FE.			

[0070] Como se puede observar en la tabla 4, una gran variedad de especies de *Lactobacillus* está presente en los lactantes alimentados con leche humana y alimentados con fórmula estándar. Sin embargo, la distribución de especies no es similar en lactantes alimentados con leche humana y en los alimentados con fórmula estándar. Una disminución en *L. delbrueckii* es visible en lactantes alimentados con leche humana a diferencia de lactantes que recibieron una fórmula estándar, donde se observa un aumento. Después de 6 semanas de alimentación se observa un aumento significativo de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. paracasei* en lactantes alimentados con leche humana, mientras que el aumento de *L. acidophilus* y *L. paracasei* no es significativo en lactantes alimentados con fórmulas. En comparación con lactantes alimentados con leche humana, los lactantes alimentados con fórmula estándar tienden a tener concentraciones relativas más altas de *L. fermentum* y *L. reuteri*. Sorprendentemente, los análisis de las muestras fecales de lactantes FEGF muestran una gran variedad en la flora de *Lactobacillus* similar a los lactantes alimentados con leche humana. La distribución de especies en lactantes alimentados con FEGF es muy similar a la observada en lactantes alimentados con leche humana. Como se observa en lactantes alimentados con leche humana, los lactantes alimentados con FEGF tienen cantidades relativamente reducidas de *L. delbrueckii*, *L. reuteri* y *L. fermentum* y cantidades aumentadas de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. paracasei*. Sin embargo, las cantidades relativas de *L. paracasei* en lactantes alimentados con FEGF tienden a ser inferiores a las de lactantes alimentados con leche humana. Estos resultados son indicativos de que la alimentación con una mezcla de sacáridos no digeribles A y B, que comprenden al menos el 60, especialmente al menos el 98 % en moles de una o más unidades monosacáridas seleccionadas del grupo que consiste en galactosa, fructosa y glucosa, y en la que A y B difieren en la estructura química, produce una distribución de especies de bifidobacterias y lactobacilos similar a las observadas en lactantes alimentados con leche humana (es decir, relativamente disminuida en *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum* y/o *L. reuteri* y relativamente aumentada en *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *L. casei*, *L. paracasei* y/o *L. acidophilus*). Estos resultados son también indicativos de que la administración de esta mezcla de sacárido no digerible A y B en combinación con *B. breve* o con *B. breve* más *L. paracasei* restaurará la flora intestinal en lactantes de manera que imite la de lactantes alimentados con leche humana con respecto a la distribución de especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*; hacer que la flora intestinal recuerde más a la de lactantes alimentados con leche humana tendrá un efecto beneficioso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos gastrointestinales, trastornos inmunitarios y/o trastornos endocrinos en lactantes.

#### Ejemplo 2: efecto en la reacción alérgica

[0071] Se obtuvieron ratones machos BALB/c sin patógenos específicos de Charles River (Maastricht, Países Bajos). El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum* y los ratones se usaron cuando tenían 6-9 semanas de edad.

[0072] Los ratones se sensibilizaron mediante dos inyecciones i.p. con 10 µg de ovalbúmina adsorbida sobre 2,25 mg de hidróxido de aluminio en 100 µl de solución salina o solo solución salina en los días 0 y 7. Los ratones se expusieron en los días 35, 38 y 41 mediante inhalación de aerosoles de ovalbúmina en una cámara de exposición de plexiglás durante 20 minutos. Los aerosoles se generaron por nebulización de una solución de ovalbúmina (10 mg/ml) en solución salina utilizando un nebulizador Pari LC Star (Pari respiratory Equipment, Richmond, VA, USA).

[0073] Los ratones se trataron a diario con  $1 \times 10^9$  UFC de *Bifidobacterium breve* y 25 mg de una mezcla de transgalactooligosacáridos y fructopolisacáridos (9:1) (TOS/mezcla de fructopolisacáridos del ejemplo 2) por vía oral mediante alimentación forzada (0,2 ml, solución salina fisiológica) a partir del día 28 hasta el final del experimento (es decir, el día 42). Como un control se administraron 0,2 ml de solución salina fisiológica mediante alimentación forzada.

[0074] La sensibilidad de las vías respiratorias a la metacolina nebulizada inhalada se determinó 24 horas después de la exposición final al aerosol, en ratones conscientes no restringidos utilizando pletismografía de cuerpo entero (BUXCO EMKA, París, Francia). La respuesta de las vías respiratorias se expresó como pausa aumentada (PenH).

5 [0075] Resultados: las mediciones en la hipersensibilidad de las vías respiratorias muestran que, en comparación con los controles, los ratones que reciben el *B. breve*, TOS y fructopolisacárido muestran una hipersensibilidad de las vías respiratorias estadísticamente reducida, indicativa de una reacción asmática reducida. En la figura 1, la hipersensibilidad de las vías respiratorias se representa como la PenH (pausa aumentada) relativa frente a la concentración de metacolina para ratones que reciben una combinación de *B. breve* + una mezcla de TOS/fructopolisacárido y un grupo de control de ratones que reciben solución salina en su lugar. Los valores fijados de PenH relativa se obtienen después de sustraer los valores del blanco obtenidos para ratones no sensibilizados a la ovoalbúmina y normalizar al valor obtenido para el grupo de control a la concentración máxima de metacolina.

10 Ejemplo 3

[0076] Una fórmula de leche infantil que contiene por 100 ml de producto final una viscosidad de  $2,0 \pm 0,2$  mPa.s y:

13 % de energía de proteína (caseína y lactosuero)	2,2 g
49 % de energía de carbohidratos digeribles	8,6 g
37 % de energía de grasa	3,0 g
TOS (presente en GOS de Vivinal) (GP medio entre 2 y 4)	0,72 g
FOS (Raftiline HP) (GP medio entre 23-25)	0,08 g
<i>B. breve</i>	$1,6 \times 10^8$ UFC
<i>L. paracasei</i>	$1,6 \times 10^8$ UFC

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que tiene una viscosidad de entre 1 y 60 mPa.s, como se determina usando un reómetro Physica MCR 300 (Physica Messtechnik GmbH, Ostfilden, Alemania) a una velocidad de cizalladura de  $95 \text{ s}^{-1}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , una densidad calórica de entre 10 y 250 kcal por 100 ml, que comprende *Bifidobacterium breve*, un sacárido no digerible A y un sacárido no digerible B, donde:
- 10 a. el sacárido no digerible A tiene un grado de polimerización de 2-8 y al menos el 60 % en moles de las unidades monosacáridas totales del sacárido A son monosacáridos seleccionados del grupo que consiste en los monosacáridos fructosa y glucosa; y
- 10 b. el sacárido no digerible B tiene un grado de polimerización de 8-100 y al menos el 60 % en moles de las unidades monosacáridas totales del sacárido B son monosacáridos seleccionados del grupo que consiste en los monosacáridos fructosa y glucosa; y donde el grado de polimerización medio del sacárido A es al menos 5 unidades monosacáridas inferior al grado de polimerización medio del sacárido B.
- 15 2. Composición según la reivindicación 1 donde la viscosidad es de entre 1 y 6 mPa.s.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1 o 2, donde la proporción en peso entre el sacárido A y el sacárido B es de entre 24 y 99.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el grado de polimerización medio del sacárido A es al menos 10 unidades monosacáridas inferior al grado de polimerización medio del sacárido B.
- 20 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprenden además *Lactobacillus paracasei*.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde una cadena de sacárido del sacárido B comprende al menos el 67 % en moles de unidades de fructosa basado en las unidades monosacáridas totales presentes en el sacárido B.
- 25 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende de  $10^2$  a  $10^{13}$  unidades formadoras de colonias de *Bifidobacterium breve* por g de peso seco de la composición.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende de 5 a 16 % en. de proteína, 30 a 60 % en. de grasa y 25 a 75 % en. de carbohidratos.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende al menos 5 mg de sacárido A por 100 ml y/o al menos 5 mg sacárido B por 100 ml.
- 30 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende de 0,75 a 10 mg de nucleótidos por 100 ml.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es una composición para nutrición infantil.
- 35 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos gastrointestinales y trastornos inmunitarios, donde la población de especies *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal de lactantes alimentados con leche no humana o parcialmente humana se normaliza a la población de especies *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus* de lactantes alimentados con leche humana.
- 40 13. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en la prevención y/o el tratamiento de la rinitis alérgica.

*Fig 1*

