

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 674**

51 Int. Cl.:

A23L 33/105	(2006.01)	A23L 33/22	(2006.01)
A23L 33/21	(2006.01)	A23L 33/125	(2006.01)
A61K 31/01	(2006.01)		
A61K 31/702	(2006.01)		
A61K 31/715	(2006.01)		
A61K 31/733	(2006.01)		
A23L 33/00	(2006.01)		
A23L 29/244	(2006.01)		
A23L 29/30	(2006.01)		
A23L 33/10	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2005 E 10181110 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2266422**

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

30 Prioridad:

17.05.2004 EP 04076479

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

29.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 757 674 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

Sinergia de GOS y polifruetosa

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la salud y la nutrición humanas. Proporciona nuevas mezclas sinérgicas de mezclas prebióticas de galactooligosacáridos (GOS, por ejemplo, TOS) y polifruetosa (inulina), así como composiciones nutricionales que las comprenden. Las composiciones nutricionales tienen efectos beneficiosos cuando se suministran a lactantes alimentados con biberón o parcialmente alimentados con biberón y también tienen efectos que mejoran la salud cuando las ingieren adultos con problemas intestinales, como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) o el síndrome del intestino irritable (SII).

15 Antecedentes de la invención

[0002] La microflora del intestino grueso humano (típicamente dividida en ciego, colon y recto) desempeña un papel crucial tanto en la nutrición como en la salud humana. La composición bacteriana está influenciada y puede ser modulada por la ingesta de alimentos. Los carbohidratos que han pasado por el estómago y el intestino delgado son metabolizados por las bacterias y, como un producto final principal del metabolismo, se forman ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como acetato, propionato, butirato y valerato, que luego se liberan en la sangre. Otros productos finales de la fermentación bacteriana incluyen, por ejemplo, lactato y succinato. Las composiciones y cantidades totales (cantidades relativas) de estos productos finales a su vez tienen un profundo efecto sobre el crecimiento bacteriano, el pH, la exclusión de especies patógenas, etc. Un método para influenciar beneficiosamente la flora microbiana y la salud humana es la administración de prebióticos. Los "prebióticos" se definieron como "ingredientes alimenticios no digeribles que afectan de manera beneficiosa al hospedador al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una bacteria o de un número limitado de bacterias en el colon y, por lo tanto, mejorar la salud del hospedador" (Gibson and Roberfroid 1995, J. Nutr. 125, 1401-1412) Los criterios que debe cumplir un compuesto para ser clasificado como prebiótico son: 1) no debe hidrolizarse ni absorberse en la parte superior del tubo digestivo (estómago, intestino delgado), 2) debe ser fermentado selectivamente por una o más bacterias potencialmente beneficiosas en el colon, 3) debe alterar la microbiota del colon hacia una composición más saludable y 4) debe inducir preferiblemente efectos que sean beneficiosos para la salud del sujeto. Los prebióticos de uso común son los llamados carbohidratos no digeribles (o "fibras alimentarias solubles"), que pasan sin digerir a través de la parte superior del tubo digestivo hacia el intestino grueso. Estos incluyen, por ejemplo, fructooligosacáridos (FOS), oligofruetosa, inulina y transgalactooligosacáridos (TOS). Cabe señalar que, en la literatura, a menudo hay una incongruencia entre el uso de varios términos, como fructooligosacárido, inulina, oligofruetosa e inulooligosacáridos, y el mismo término puede usarse para diferentes compuestos o composiciones.

[0003] Las bacterias beneficiosas ampliamente conocidas, que son estimuladas por la absorción de prebióticos, son bacterias del ácido láctico, como los lactobacilos y las bifidobacterias, y se ha determinado que sus beneficios para la salud se deben a este efecto de estimulación. Por ejemplo, se han descrito los efectos beneficiosos de la inulina y de los fructanos de tipo inulina, como la oligofruetosa, sobre la función intestinal (Jenkins *et al.* 1999, J. Nutrition 129, 1431S-1433S) y se cree que este efecto se debe a un efecto bifidogénico, que se refiere a un efecto estimulante del crecimiento selectivo sobre las bifidobacterias totales, medido *in vivo* a través de conteos de bifidobacterias en las heces o *in vitro* (véase, por ejemplo, Roberfroid, Am J Clin Nutr 2001, 73 (supl.), 406S-409S).

[0004] La leche humana también parece tener un efecto bifidogénico, ya que las bacterias dominantes que se establecen en los lactantes son las bifidobacterias. En contraste, la colonización bacteriana de lactantes alimentados con fórmula láctea no está dominada por las bifidobacterias y es más diversa en especies bacterianas (Harmsen *et al.* 2000, J. Pediatr. Gastroenterol Nutr. 30, 61-67). Se cree que los oligosacáridos presentes en la leche humana son responsables del efecto bifidogénico o prebiótico, y se ha intentado modificar la fórmula para lactantes de tal manera que se parezca lo más posible a la leche humana y, especialmente, que tenga el mismo efecto prebiótico que la leche humana o muy similar a este. Esto se ha hecho agregando prebióticos a la fórmula de leche para lactantes (Boehm *et al.* Acta Paediatr. Supl. 2003, 441, 64-67 y Moro *et al.* 2002, J. Pediatr. Gastroenterol Nutr 34, 291-295). Por ejemplo, se ha descrito que la suplementación de fórmula de leche bovina con una mezcla de oligosacáridos que comprende transgalactooligosacáridos (TOS) e inulina con un alto grado de polimerización (HP) aumenta el recuento fecal de bifidobacterias en lactantes alimentados con biberón (Boehm *et al.* 2002, Arch Dis Child 86, F178-F181).

[0005] Además, se ha descrito que la suplementación de fórmula de leche para lactantes con TOS e inulina tiene un efecto bifidogénico y disminuye el pH fecal (Boehm *et al.* 2003 *supra*; Moro *et al.* 2003, Acta Paediatr. Supl. 441: 77-79; Marini *et al.* 2003, Acta Paediatr. Supl. 441: 80-81; Boehm *et al.* 2002, Arch. Dis. Child Fetal. Neonata Ed. 86: F178-F181; Moro *et al.* 2002, J. Pediatr. Gastroenterol Nutr. 34: 291-295; Schmelzle *et al.* 2003, J. Pediatr. Gastroenterol Nutr. 36: 343-51).

[0006] Con la fermentación de los prebióticos por las bacterias del ácido láctico, se producen ácidos orgánicos y el pH disminuye. Los lactobacilos producen o bien lactato o bien lactato y acetato (un ácido graso de cadena corta; AGCC). El lactato puede estar en forma L o D. Las bifidobacterias, por otro lado, producen L-lactato y acetato, pero no D-lactato. Las bifidobacterias (y otras bacterias del ácido láctico) generalmente no llevan a la producción de gases, como el H₂ y CH₄. Tampoco producen otros AGCC, como propionato, butirato, isobutirato, valerato e isovalerato. La presencia de AGCC, como isobutirato e isovalerato, es indicativa de la fermentación de carbohidratos por otras especies bacterianas, como *Clostridia* y *Bacteroides* o *Enterobacteriaceae* o es indicativa de la fermentación de proteínas (de la que las bifidobacterias tienen poca capacidad). Además, otras bacterias intestinales son capaces de producir acetato o lactato, como las *Propionibacteria*, *Enterococci* y *Pediococci*.

[0007] Anteriormente se ha divulgado que la ingesta de ciertos carbohidratos prebióticos aumenta las cantidades (relativas) de bifidobacterias y/o lactobacilos. De manera simultánea, se ha observado una mayor formación de AGCC y una disminución del pH. Sin embargo, también se ha detectado la formación de gases, que produce síntomas no deseados, como flatulencia y dolor abdominal, al introducir prebióticos como la inulina o los GOS en la dieta. Además, no solo se ha detectado acetato, sino también aumentos en, por ejemplo, el butirato, lo cual no es deseable. Por lo tanto, se ha descrito un conjunto de efectos no deseados resultantes del consumo de composiciones nutricionales suplementadas con determinados prebióticos.

[0008] En el colon y las heces de los lactantes alimentados con leche materna, el AGCC predominante encontrado es el acetato. Además, se encuentran altas concentraciones de lactato. Estas cantidades (relativas) son más elevadas que las observadas en adultos (donde las concentraciones de lactato son generalmente insignificantes) o en lactantes alimentados con fórmula láctea estándar. Ulteriormente, las concentraciones de propionato y especialmente de butirato son mucho más bajas en el colon y en las heces de los lactantes alimentados con leche materna que en los adultos, e incluso más bajas que en los lactantes alimentados con fórmula de leche para lactantes estándar. El pH de las heces es más bajo en niños alimentados con leche materna. Como se ha mencionado anteriormente, es deseable proporcionar composiciones nutritivas, especialmente composiciones de fórmula de leche que, cuando se consumen, dan como resultado una microflora intestinal muy parecida a la de los lactantes alimentados con leche materna.

[0009] Se han descrito muchos efectos sobre la salud de los AGCC y del lactato y un pH bajo en el colon. Se ha descrito que el pH bajo y la presencia de ácidos orgánicos tienen un efecto antipatógeno y proporcionan una ventaja a las bacterias tolerantes a los ácidos, como las bacterias del ácido láctico (incluyendo las bifidobacterias). También se han descrito los efectos de los AGCC en la pared intestinal. Los AGCC son una fuente de energía de los colonocitos y, por lo tanto, contribuyen a la integridad de la barrera intestinal. Los AGCC también están involucrados en los efectos sobre la peristalsis, el metabolismo de los ácidos biliares, la absorción de agua y la diferenciación celular (véase, por ejemplo, la patente EP1105002). Se sabe que los AGCC estimulan la producción de mucosidad y están involucrados en la absorción de minerales y la producción de mucosidad.

Descripción detallada de la invención

[0010] Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que los GOS (especialmente los TOS) y la polifruktosa (inulina), cuando se administran juntos, proporcionan una serie de efectos beneficiosos que no pueden explicarse por un aumento en el número de bifidobacterias intestinales y que, por lo tanto, no se deben al efecto bifidogénico descrito para los TOS o la inulina de algo grado de polimerización en la técnica anterior (por ejemplo, en Boehm *et al.* 2002, *supra*). En particular, se ha descubierto inesperadamente que, después de la administración de mezclas de GOS y polifruktosa, hubo un aumento en las cantidades totales de AGCC formados, un aumento en las cantidades relativas de acetato y lactato y una disminución en el pH fecal de los lactantes, por lo que estos efectos no se correlacionaron con una mayor cantidad (relativa) de bifidobacterias. Además de una cantidad y un perfil beneficiosos de AGCC y una mayor cantidad de lactato, se observó una disminución en la formación de gases. Además, se descubrió que el propio lactato tiene un efecto beneficioso hasta ahora desconocido sobre el colon, ya que se descubrió que aumentó la secreción de prostaglandina E1 y prostaglandina E2. Este efecto solo se había descrito anteriormente para los AGCC, especialmente acetato (Willemsen *et al.* 2003, *Gut* 52, 1442-1447). Las composiciones que comprenden lactato y las composiciones que comprenden prebióticos que estimulan la producción de lactato, por lo tanto, pueden usarse para estimular la producción de mucinas y contribuir a la integridad de la barrera mucosa (mucoprotección). Además, se ha descubierto que el lactato disminuye las contracciones espontáneas y la tensión en los músculos del colon, lo que resulta en un alivio de los calambres y el dolor.

[0011] Por lo tanto, las composiciones prebióticas son novedosas, ya que no aumentan, o no aumentan significativamente, el número de bifidobacterias, a la vez que dan como resultado un aumento en las cantidades totales de AGCC, cambios beneficiosos en el perfil de AGCC (aumentos del acetato, disminuciones del butirato y propionato), un aumento del ácido láctico (y los efectos resultantes de reducción de la contracción y la tensión y el efecto estimulador de la mucosidad), una disminución en el pH fecal, una disminución en la formación de gases y una formación más gradual de AGCC (incluida la formación en la parte distal del colon), es decir, en general, un patrón óptimo de productos de fermentación (más L-lactato, menos butirato, etc.). Todos estos cambios hacen que el entorno del colon se parezca más al de los bebés alimentados con leche materna. Por lo tanto, en una forma de

realización de la invención se proporciona el uso de mezclas de GOS y polifruktosa en cantidades efectivas para la preparación de composiciones que conducen a un entorno colónico esencialmente similar al de los lactantes alimentados con leche materna.

5 [0012] Los efectos beneficiosos descubiertos fueron significativamente más pronunciados después de la coadministración que cuando se administró solamente GOS o polifruktosa (por ejemplo, TOS o inulina), lo que indica que el GOS y la polifruktosa actúan sinérgicamente. En la técnica anterior no se han llevado a cabo estudios en los que los efectos individuales de la administración de TOS e inulina se hayan comparado directamente con la coadministración de estos dos tipos de compuestos, y claramente tales estudios individuales independientes no se pueden comparar entre sí y no son adecuados para identificar efectos sinérgicos.

10 [0013] Esta novedosa interacción sinérgica de GOS y polifruktosa (por ejemplo, TOS e inulina), y los efectos *in vivo* de la coadministración de estos, llevan a nuevos usos de composiciones que comprenden tanto GOS como polifruktosa en cantidades adecuadas (sinérgicas), tales como el tratamiento o la prevención de alergias. Además, una composición que comprende lactato (D-lactato y/o L-lactato, preferiblemente L-lactato) puede usarse para tratar o prevenir uno o más de estos síntomas o trastornos.

15 [0014] Por lo tanto, inesperadamente, la fermentación de las mezclas específicas de prebióticos (GOS y polifruktosa) por la flora intestinal da como resultado una formación mejorada y cinéticamente ventajosa de AGCC y lactato y un patrón mejorado de productos finales metabólicos. Como consecuencia, se producen muchos efectos beneficiosos, como efectos sobre la producción de mucosidad, efectos antiinflamatorios, efectos sobre la percepción del dolor y efectos sobre los calambres/cólicos abdominales (a través tanto de la relajación del colon como de la disminución de las contracciones espontáneas).

25 Definiciones

[0015] "Polisacáridos" se refiere a cadenas de carbohidratos de unidades de monosacáridos con una longitud de cadena de al menos 10 unidades. En contraste, los "oligosacáridos" tienen una longitud de cadena de menos de 10 unidades.

30 [0016] El "grado de polimerización" o "GP" se refiere al número total de unidades de sacáridos en una cadena de oligo o polisacárido. El "GP medio" se refiere al GP medio de cadenas de oligosacáridos o polisacáridos en una composición, sin tener en cuenta los posibles mono o disacáridos (que preferiblemente se eliminan si están presentes). El GP medio de una composición se usa para diferenciar entre composiciones. Además, el % de unidades de sacáridos, como el % de glucosa y el % de unidades de fructosa en una composición son rasgos diferenciadores.

35 [0017] "Polifruktosa" o "polifruktano" o "fructopolisacárido" se refiere a un carbohidrato polisacárido que comprende una cadena de unidades de fructosa unidas por enlaces β con un grado de polimerización de 10 o más y comprende, por ejemplo, inulina (por ejemplo, inulina HP), levano y/o un "tipo mixto de polifruktano" (véase más adelante).

40 [0018] "Inulina" o "inulina no hidrolizada" o "inulina HP" (con alto grado de polimerización) se usa en el presente documento para referirse a cadenas de fructosa terminadas con glucosa con la mayoría de las cadenas (al menos el 90 %, preferiblemente al menos el 95 %) que tienen un grado de polimerización (GP) de 10 o más. La inulina se puede describir como GF_n , en donde G representa una unidad glucosilo, F representa una unidad fructosilo y n es el número de unidades fructosilo unidas entre sí, donde n es 9 o más. La relación G/F es de aproximadamente 0,1 a 0. Sin embargo, una pequeña parte de las moléculas de inulina puede no tener una unidad de glucosa terminal. El GP medio es preferiblemente al menos 15, más preferiblemente 20 o más, tal como 20, 21, 22, 23, 25, 30, 40, 45 60, 70, 100, 150 o más en el presente documento. En la inulina, las unidades de fructosa están unidas con un enlace $\beta(2 \rightarrow 1)$. Una inulina adecuada es, por ejemplo, la disponible comercialmente como Raffiline®HP (Orafti) con un GP medio > 23.

50 [0019] "Inulina hidrolizada" u "oligofruktosa" se refiere a mezclas de cadenas de fructosa terminadas con glucosa y fructosa, con un GP inferior a 10. Por lo tanto, la inulina hidrolizada se puede describir como una mezcla de cadenas GF_n y cadenas F_n (en donde G es una unidad glucosilo, F es una unidad fructosilo y n = 1-8). La inulina hidrolizada es un producto de hidrólisis (enzimática o ácida) o un producto de hidrólisis parcial de la inulina, resultante de la escisión de enlaces de fructosil-fructosa $\beta(1-2)$. El término inulina hidrolizada también abarca inulina preparada sintéticamente o de manera recombinante que tiene la misma composición estructural.

55 [0020] "Levano" o "levulano" o "levulino" o "levulosano" se refiere a un polisacárido que consiste en polifruktosa en el que las unidades de fructosa están unidas con enlaces $\beta(2 \rightarrow 6)$. Puede estar presente un resto de glucosa inicial, pero esto no es necesario. El grado de polimerización es superior a 10.

60 [0021] En los "polifruktanos de tipo mixto", las unidades de fructosa están unidas con enlaces $\beta(2 \rightarrow 1)$ y $\beta(2 \rightarrow 6)$. Los polifruktanos de tipo mixto son ramificados y tienen un GP > 10.

5 [0022] "GOS" o "galactooligosacáridos", o "transgalactooligosacáridos" o "TOS" se refiere a oligosacáridos compuestos por unidades de galactosa, con un GP de 10 o menos y un GP medio de 2, 3, 4, 5 o 6. Una unidad de glucosa puede estar presente en el extremo reductor de la cadena. Preferiblemente, el GOS contiene al menos 2/3 unidades de galactosa. Los más preferidos son los transgalactooligosacáridos (TOS) con enlaces glucosídicos β -(1-4). Tal GOS es, por ejemplo, el que se encuentra en Vivinal®GOS (disponible comercialmente de Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Países Bajos), que comprende transgalactooligosacáridos con enlaces glucosídicos β -1-4) y enlaces glucosídicos β -(1-6).

10 [0023] "AGCC" o "ácidos grasos de cadena corta" se refiere a ácidos grasos con una longitud de cadena de carbono de hasta C6, producidos como un producto final de la fermentación intestinal bacteriana, como acetato (C2), propionato (C3), butirato e isobutirato (C4), valerato e isovalerato (C5) y otros. La expresión "iC4-5" se refiere a la suma de isobutirato, valerato e isovalerato.

15 [0024] Una "cantidad sinérgicamente efectiva" se refiere a una cantidad de GOS y polifruktosa (por ejemplo, TOS e inulina) que, cuando se coadministra, confiere uno (o más) efectos fisiológicos específicos (como se describe en otra parte del presente documento), por lo que el efecto total de la coadministración es significativamente mayor que la suma del efecto de la administración individual de GOS o polifruktosa. Por ejemplo, si el efecto de la administración de GOS solo es X y el efecto de la administración de polifruktosa sola es Y, entonces el efecto de la coadministración de GOS y polifruktosa es mayor que X + Y y, por ejemplo, el efecto de la coadministración de $\frac{1}{2}$ la concentración de GOS más $\frac{1}{2}$ la concentración de polifruktosa tiene un efecto mayor que $\frac{1}{2} X + \frac{1}{2} Y$, etc.

20 [0025] La "coadministración" de dos o más sustancias se refiere a la administración de estas sustancias a un individuo, ya sea en una composición o en composiciones separadas (combinación; como una composición combinada) que se administran al mismo tiempo (simultáneamente) o dentro de un breve período de tiempo (uso separado o secuencial, por ejemplo, en minutos u horas).

25 [0026] "Enteral" se refiere en este documento a la administración directamente en el tubo digestivo de un sujeto (por ejemplo, por vía oral o por medio de un tubo, catéter o estoma).

30 [0027] El término "que comprende" debe interpretarse como que especifica la presencia de las partes, pasos o componentes indicados, pero sin excluir la presencia de una o más partes, pasos o componentes adicionales.

35 [0028] "Lactante" se refiere aquí a humanos de 0 a 36 meses, preferiblemente de 0 a 18 meses, o más preferiblemente de 0 a 12 meses.

40 [0029] "Lactantes alimentados con leche materna" se refiere a los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna humana. Los "lactantes no alimentados con leche materna o parcialmente alimentados con leche materna" son lactantes no alimentados exclusivamente con leche materna humana. Esto incluye a los lactantes alimentados con al menos un biberón (aproximadamente 80 ml) de fórmula de leche al día.

[0030] "Porcentaje" o "media" generalmente se refiere a porcentajes de medias en peso, a menos que se especifique lo contrario o que esté claro que se entiende que es de otro modo.

45 [0031] En una forma de realización, la presente invención proporciona varios usos novedosos de composiciones que comprenden tanto GOS como polifruktosa en cantidades adecuadas (eficaces sinérgicamente).

Usos y métodos según la invención

50 [0032] En los varios usos descritos aquí, un sujeto es preferiblemente un sujeto humano, más preferiblemente un lactante, tal como un lactante recién nacido nuevo hasta un lactante de 12 meses de edad. En particular, se hace referencia a lactantes alimentados con biberón parcialmente alimentados con biberón. De forma alternativa, un sujeto también puede ser un niño, un adolescente o un adulto. En particular se pueden prevenir o tratar problemas intestinales, tales como, pero no limitados a, alergias resultantes de un funcionamiento subóptimo del intestino.

55 [0033] Se pueden usar composiciones que comprenden GOS y polifruktosa, tales como composiciones que comprenden TOS e inulina, en una forma de realización para inducir la producción de AGCC en el intestino grueso de un sujeto y para aumentar significativamente la cantidad total (intestinal y/o fecal) de AGCC producido después de la administración y/o para modificar significativamente las cantidades relativas (intestinales y/o fecales) de AGCC producidos, en particular para aumentar la cantidad relativa (intestinal y/o fecal) de acetato de los AGCC totales, y/o para aumentar significativamente la cantidad (absoluta y relativa) de lactato intestinal producido, y/o para reducir o evitar significativamente la formación de gas intestinal, y/o para extender la producción de AGCC a la parte distal del colon, y/o para reducir significativamente el pH en el intestino grueso y el pH fecal. Asimismo, la suma de butirato, isobutirato, valerato y/o isovalerato intestinal y/o fecal con respecto a los AGCC totales se puede disminuir. Estos efectos se consiguen tras la administración, sin tener un efecto significativo en el número total y/o relativo de bifidobacterias intestinales. En la presente, se proporcionan composiciones para el tratamiento o

profilaxis de cualquier enfermedad, trastorno o molestia asociados a o causados por uno o más de estos efectos intestinales.

5 [0034] La presente invención proporciona el uso de galactooligosacáridos y polifruktosa para la producción de una composición para el tratamiento o la prevención de alergias, eczemas o enfermedades atópicas.

10 [0035] A menos que se especifique lo contrario, un "aumento significativo" (de, por ejemplo, AGCC, acetato o lactato) se refiere aquí a un aumento de al menos el 5 %, preferiblemente al menos el 10 %, más preferiblemente al menos el 20 %, o más, en comparación con la cantidad producida se administran únicamente GOS o polifruktosa (por ejemplo inulina). De forma similar, a menos que se especifique lo contrario una "reducción significativa" (de, por ejemplo, la formación de gas) se refiere a una reducción de al menos el 5 %, preferiblemente al menos el 10 %, más preferiblemente al menos el 20 %, 25 %, 50 % o más (por ejemplo el 70 %, 80 %, 90 %, 100 %) comparado con la cantidad producida cuando se administra únicamente polifruktosa (por ejemplo inulina).

15 [0036] Un aumento en la cantidad total de AGCC producida como producto de fermentación de GOS y composiciones de polifruktosa también se pueden medir como una reducción significativa en el pH de las muestras fecales de los sujetos, reflejando una reducción *in vivo* en el pH en el intestino grueso. En lactantes, se ha observado que el pH fecal disminuía hasta aproximadamente un pH de 5,8 o menos, tal como pH 5,6; 5,5 o 5,4 o 5,2 tras la coadministración de TOS y polifruktosa (por ejemplo inulina), mientras el pH de los lactantes alimentados con fórmula estándar fue de aproximadamente o por encima de un pH 6, tal como aproximadamente un de pH 5,9; 6,8 o incluso 7,0. Una reducción significativa en el pH se refiere por lo tanto a una reducción en el pH de al menos el 15 % o 0,9 unidades en comparación con los lactantes alimentados con una fórmula estándar.

25 [0037] Otro efecto beneficioso de la coadministración de GOS y polifruktosa en cantidades adecuadas es que la composición de AGCC es significativamente diferente que cuando se administran GOS o polifruktosa. Especialmente, la cantidad relativa de butirato se reduce significativamente, mientras la cantidad relativa de acetato aumenta significativamente. De este modo, las composiciones pueden usarse para alterar no solo las cantidades de AGCC totales, sino también las proporciones de AGCC relativas. En lactantes a los que se ha coadministrado TOS y polifruktosa (por ejemplo inulina), los niveles de AGCC relativos se parecían más a los niveles encontrados en lactantes alimentados con leche materna, con relaciones de acetato: propionato: butirato generalmente de aproximadamente 80-85 %: 10-15 %: 1-5 %, mientras que en lactantes alimentados con fórmula de leche estándar las relaciones fueron generalmente de aproximadamente 69-74 %: 16-19 %: 5-6 % (tal y como se muestra en los ejemplos). De este modo, especialmente, las cantidades relativas de acetato aumentan y las cantidades relativas de propionato y butirato disminuyen mediante las composiciones según la invención. La coadministración de GOS y polifruktosa tiene como resultado relaciones de acetato: propionato: butirato mucho más similares a las de los lactantes alimentados con leche materna que las de los lactantes alimentados con fórmula (que producen altos niveles de butirato y propionato y niveles relativamente bajos de acetato). El efecto en las proporciones de AGCC relativas se puede medir mediante métodos conocidos en la técnica, tales como la cromatografía de gases de muestras fecales en varios puntos temporales después de la administración, ya sea usando estudios *in vivo* o unos sistemas de fermentación *in vitro* como, por ejemplo, se describe en los ejemplos. Un "una composición de AGCC modificada significativamente" o una "cantidad de acetato aumentada significativamente" se refiere a la cantidad de acetato (% de total de AGCC) de al menos aproximadamente el 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, o más, superior cuando no se administra GOS o polifruktosa o cuando se administran individualmente GOS o polifruktosa. Preferiblemente, las cantidades relativas de propionato y/o butirato son inferiores que cuando no se administra GOS o polifruktosa o cuando son administran individualmente GOS o polifruktosa. En una forma de realización, la composición según la invención es adecuada para aumentar el acetato intestinal y/o fecal hasta aproximadamente por encima del 85 %, tal como 86 %, 87 %, 88 %, 90 % o más, de los AGCC totales.

50 [0038] Además, otro efecto beneficioso observado cuando se coadministran GOS y polifruktosa es una reducción significativa en los AGCC ramificados, en comparación con la proporción de AGCC ramificados encontrados cuando solo se administra GOS o polifruktosa. Una "reducción significativa en los AGCC ramificados", tal y como se utiliza en este caso, se refiere a una reducción de al menos el 70 % en comparación con la concentración hallada en lactantes no alimentados con prebióticos o que tiene como resultado una proporción fecal inferior al 1,5 % de AGCC totales. La proporción de AGCC ramificados con respecto a los AGCC totales se puede medir dividiendo la suma de AGCC ramificados, es decir, isobutirato, más isovalerato más valerato, entre la suma de AGCC totales, es decir acetato, más propionato, más butirato, más isobutirato, más isovalerato, más valerato, etc. Reducir la proporción de AGCC ramificados es beneficioso para la salud del sujeto, ya que los AGCC ramificados son nocivos. Esto indica una menor degradación de proteína, lo que no se desea porque la fermentación de proteína provoca un aumento del pH y la formación de agentes nocivos tales como H₂S.

60 [0039] Una reducción significativa del butirato se refiere a una reducción de al menos el 50 % en comparación con la concentración hallada en lactantes no alimentados con prebióticos o que tiene como resultado una proporción fecal inferior al 4 % de AGCC totales. En una forma de realización, la composición según la invención es adecuada para disminuir la suma de butirato, isobutirato, valerato e isovalerato intestinal (y/o fecal) está por debajo del 7 % de AGCC totales, tal como el 6,5 %; 6 %; 5 %; 4 % o menos de AGCC totales.

[0040] En otra forma de realización, las composiciones que comprenden GOS y polifruktosa son adecuadas para aumentar la longitud de fermentación en el colon. En particular, la fermentación bacteriana todavía estará activa en las partes más distales del colon tras la coadministración, como indicada la producción de AGCC en la parte distal del colon. No se producen, o se producen muy pocos, AGCC en la parte distal del colon tras la administración de composiciones que solo comprenden GOS o polifruktosa. Además, se observa una fermentación rápida al principio del colon tras la coadministración, lo que es especialmente importante para los efectos antipatógenos y también se observa en lactantes alimentados con leche materna. En general, esto indica que las composiciones son adecuadas para establecer y/o mantener un patrón de fermentación relativamente homogéneo en todo el colon de un sujeto y para extender la fermentación y producción de AGCC al extremo distal del colon. De este modo, se producen AGCC y, muy probablemente, también otros productos de fermentación, especialmente lactato, a lo largo de todo el colon, al principio, en la mitad y el extremo del colon.

[0041] En otra forma de realización, la coadministración de GOS y polifruktosa en cantidades sinérgicas se puede usar para aumentar significativamente la producción de lactato, como se puede determinar nuevamente analizando muestras fecales de sujetos de prueba y sujetos de control, que recibieron composiciones que comprendían o solo GOS o solo polifruktosa o composiciones de base equivalentes sin prebióticos. Un "aumento significativo del lactato" se refiere a al menos el 5 %, 10 %, 20 % o incluso el 50 % o más lactato producido en sujetos a los que se han coadministrado composiciones que comprenden GOS y polifruktosa, en comparación con sujetos a los que no se ha administrado GOS o polifruktosa. Por ejemplo, los lactantes alimentados con fórmula de leche estándar suplementada con 6 g/l de mezclas de TOS/inulina (90 %: 10 %) produjeron a las 16 semanas aproximadamente el 16 % de lactato (como % de ácidos totales), mientras que los lactantes alimentados con fórmula estándar produjeron aproximadamente el 0,6 % y los lactantes alimentados con leche materna produjeron aproximadamente el 35 % de lactato. Aunque no coincide con la cantidad de lactato producida por los lactantes alimentados con leche materna, la suplementación de la fórmula de leche estándar con mezclas de TOS e inulina conllevó un aumento significativo en la producción de lactato. Como se muestra en los ejemplos, se descubrió que el lactato tenía efectos beneficiosos inesperados. De forma similar al acetato aumentó la producción de prostaglandina E1 y prostaglandina E2 y provocó una expresión de mucina epitelial mejorada. La mucosa intestinal juega un papel importante en la salud humana, ya que sirve de barrera frente a los patógenos infecciosos, los alérgenos y los carcinógenos. Las composiciones que influyen positivamente en el desarrollo y/o integridad de la mucosa pueden, por lo tanto, usarse para ayudar al desarrollo de una mucosa sana en lactantes recién nacidos y para ayudar al establecimiento de una mucosa sana en lactantes alimentados con biberón o parcialmente alimentados con biberón y en sujetos que sufren síntomas o enfermedades provocados por o asociados con una mucosa intestinal que no funciona correctamente.

[0042] Asimismo, las contracciones espontáneas y la tensión abdominal se redujeron significativamente de manera dosis dependiente tras la administración de D- o L-lactato.

[0043] Dado que se ha descubierto que el propio lactato tiene efectos previamente desconocidos, también es un objeto de la invención proporcionar composiciones que comprendan lactato en cantidades adecuadas, que se pueden usar para tratar o evitar los síntomas y trastornos descritos anteriormente. En una forma de realización, las composiciones solo comprenden lactato en cantidades adecuadas, mientras que en otra forma de realización las composiciones de GOS y polifruktosa descritas aquí comprenden además lactato para aumentar adicionalmente los niveles de lactato intestinal. Una composición según la invención de este tipo comprende TOS e inulina en cantidades eficaces sinérgicamente y comprende además lactato en cantidades adecuadas. En una forma de realización, las composiciones se proporcionan de modo que sean adecuadas para aumentar el lactato intestinal y/o fecal hasta aproximadamente heces por encima 10 mmol/kg.

[0044] Se entiende que cuando se hace referencia al análisis de muestras fecales, esta es una medida indirecta del efecto *in vivo* real. Asimismo, se pueden llevar a cabo ensayos *in vitro*, mediante los cuales se cultivan poblaciones bacterianas *in vitro* y se añaden cantidades adecuadas de composiciones a los cultivos. En particular, se puede usar el sistema de fermentación *in vitro* descrito en los ejemplos.

[0045] Por lo tanto se puede usar la coadministración de composiciones que comprenden GOS y polifruktosa para conseguir uno o varios de los siguientes efectos fisiológicos:

- un aumento significativo en los AGCC totales
- una reducción significativa en el pH
- una composición de AGCC significativamente modificada
- una reducción significativa en los AGCC ramificados
- una reducción significativa en la producción de gas por mol de AGCC producidos
- una fermentación más largas y más homogénea, que incluye fermentación incluso en las partes más distales del colon, y/o
- una alta formación inicial de AGCC y/o formación de ácido láctico en la parte más proximal del colon
- promover la producción de AGCC en el principio, la mitad y el extremo del colon
- un aumento significativo del ácido láctico (absoluto y/o relativo) y/o

- un aumento de la cantidad relativa de L-lactato como una relación de ácido láctico total formado.

[0046] En una forma de realización preferida, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o todos estos efectos se ven significativamente modificados cuando se usan composiciones que comprenden tanto GOS como polifru-
 5 polifru-
 ctosa. En particular, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o todos estos efectos son significativamente mayores tras la coadministración de una (cantidad eficaz sinérgicamente) de GOS y polifru-
 ctosa que la suma del o los efectos de la administración de GOS y polifru-
 ctosa individualmente.

[0047] Las composiciones sinérgicas según la invención son, por lo tanto, particularmente adecuadas para
 10 desarrollar y/o mantener una microflora sana en el intestino grueso de un lactante tras la administración de una
 cantidad eficaz sinérgicamente. En una forma de realización preferida, se alimenta a un lactante únicamente con
 una composición de base, tal como fórmula láctea, suplementada con una cantidad eficaz sinérgicamente de GOS
 y polifru-
 15 ctosa en las primeras semanas después del nacimiento. Una composición preferida es, por lo tanto, una
 composición dietética para lactantes. En otra forma de realización, se alimenta solo parcialmente a un lactante con
 una composición según la invención. El sujeto puede, en este caso, ser cualquier sujeto, que varía desde un
 lactante, un niño, un adolescente a un adulto. Evidentemente, las composiciones de base a las que se añaden
 GOS y polifru-
 20 ctosa en cantidades eficaces sinérgicamente variarán dependiendo de la edad del sujeto, el modo
 de administración y de los síntomas principales que se van a tratar o evitar. Para los lactantes, por ejemplo, la
 composición de base es preferiblemente una fórmula para lactantes o de continuación líquida o en polvo, mientras
 que para los adultos puede ser más adecuada una composición de suplemento nutritivo (líquido, semilíquido o
 sólido) o alimentación por sonda.

[0048] En una forma de realización preferida, se coadministran GOS y polifru-
 25 ctosa en una cantidad eficaz
 sinérgicamente adecuada para aumentar significativamente la cantidad total de AGCC intestinales formados y/o
 para mejorar significativamente la composición de AGCC intestinales (especialmente para aumentar
 significativamente el porcentaje de acetato con respecto a la cantidad de total de AGCC) y/o para aumentar
 significativamente la producción de lactato y/o para bajar el pH intestinal y/o para reducir significativamente la
 formación de gas intestinal. Se proporciona un uso de composiciones que comprenden una cantidad eficaz
 sinérgicamente de GOS y polifru-
 30 ctosa para el tratamiento y/o la prevención de alergias.

[0049] A través de estos cambios en los niveles y perfiles de AGCC y pH intestinal, las composiciones son capaces
 provocar uno o varios de los siguientes efectos beneficiosos en fases posteriores:

- a) Se disminuye la permeabilidad intestinal en el sitio de producción de AGCC. Esto es importante para evitar
 35 enfermedades y mantener la salud, especialmente para evitar que se desarrollen alergias. El hallazgo de que
 la coadministración de GOS y polifru-
 ctosa causa una fermentación más homogénea y extiende la fermentación
 a la parte distal del colon es importante a este respecto, ya que la permeabilidad del intestino, incluyendo las
 partes distales del colon, se puede reducir uniformemente y, de esta forma, el intestino se puede mantener
 uniformemente en un estado sano.
- b) Se mejora la motilidad o movimiento peristáltico del intestino, que reduce o evita el estreñimiento, un
 40 problema común observado en los lactantes alimentados con fórmula.
- c) Se disminuye la cantidad de contracciones espontáneas y la tensión del músculo colónico, lo que provoca
 menos calambres y menos dolor abdominal.
- d) Se aumenta la absorción de ion de calcio, lo que es importante para la mineralización de los huesos y el
 45 desarrollo de los huesos del sujeto, especialmente si el sujeto es un lactante.
- e) Se pueden reducir los síntomas secundarios de una salud debilitada tales como el cansancio, la depresión
 y los cambios de humor.
- f) Se mejora significativamente la producción de mucosidad de la mucosa intestinal, lo que proporciona
 protección contra la fijación y la colonización de los patógenos. En particular, se ha observado que los niveles
 50 de lactato se correlacionaban positivamente con la producción de mucosidad. De este modo, las composiciones
 según la invención se pueden usar para estimular la producción de mucosidad.
- g) Se puede modificar el metabolismo biliar hasta niveles y/o patrones como los observados en los lactantes
 alimentados con leche materna.
- h) Se inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos intestinales a lo largo de todo el colon.

[0050] Por lo tanto, se puede usar una composición que comprende una cantidad eficaz sinérgicamente de GOS
 y polifru-
 55 ctosa para mantener o establecer (por ejemplo en un recién nacido, nacido de forma prematura o madura
 o en un bebé no alimentado con leche materna o solo parcialmente alimentado con leche materna, u otros sujetos,
 tales como adultos, uno o más de los efectos fisiológicos anteriores y mantener o mejorar la salud del sujeto
 asegurando o estableciendo un entorno del intestino grueso sano y una actividad óptima del intestino grueso.

[0051] En particular, se pueden reducir, abolir o evitar la incidencia, la duración y/o la gravedad de las
 enfermedades, trastornos o síntomas tales como las alergias, los eczemas, el asma inducido por alergias y otras
 enfermedades atópicas mediante la administración de una composición según la invención.

Composiciones según la invención

- 5 [0052] Las composiciones adecuadas para los usos anteriormente descritos comprenden tanto polifruetosa como GOS en cantidades eficaces sinérgicamente. Las composiciones comprenden GOS/polifruetosa en relaciones que varían de 3/97 a 97/3, preferiblemente de 5/95 a 95/5, más preferiblemente de 90/10 a 45/55. Todas las relaciones individuales entre estos extremos se engloban aquí, tales como 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 55/45, 60/40, 70/30, 80/20, 85/15, 90/10, etc.
- 10 [0053] Las dosis requeridas y la relación de GOS/polifruetosa para alcanzar el efecto sinérgico (óptimo) pueden variar, dependiendo del tipo de composición y del método y la frecuencia de administración. Sin embargo, más adelante se proporcionan unos pocos ejemplos. Un experto en la materia puede determinar fácilmente qué dosis de cada componente se requiere para conseguir el mejor efecto fisiológico y qué relación de GOS/polifruetosa es la más adecuada. Por ejemplo, si el objetivo principal es mejorar el nivel total de AGCC después de la
- 15 administración oral de una composición que comprende GOS y polifruetosa, un experto en la materia hará varias composiciones (que comprendan GOS más polifruetosa, únicamente GOS, únicamente polifruetosa) y comparará su eficiencia en la inducción de altos niveles de AGCC usando pruebas *in vivo* o *in vitro* tal y como se conoce en la técnica. Se entiende que, cuando se haga referencia a una "dosis diaria" o "dosis por día", esto no implica que la dosis deba administrarse al sujeto de una sola vez.
- 20 [0054] Una fórmula para lactantes eficaz sinérgicamente puede, por ejemplo, consistir en una composición de base (por ejemplo fórmula para lactantes estándar) que comprende aproximadamente 4 g/l, 5 g/l o más de una mezcla de GOS y polifruetosa, donde las relaciones de GOS a polifruetosa pueden variar tal y como se describe en otra parte de la presente (por ejemplo 90 % de GOS: 10 % de polifruetosa).
- 25 [0055] La polifruetosa es inulina. La polifruetosa, para usar en las composiciones pueden o bien extraerse de fuentes naturales (plantas o bacterias) o bien hacerse por síntesis *de novo* o por tecnologías de ADN recombinante tal y como se conoce en la técnica. Se han descrito métodos de extracción, separación de tamaño y purificación de la inulina, por ejemplo en De Leenheer (1996), US6569488 y US5968365. Se han descrito métodos de producción recombinante, por ejemplo, en la patente US6559356. La síntesis implica generalmente el uso de moléculas y enzimas de sacarosa con actividad de fructosiltransferasa. La inulina adecuada para usar en las composiciones también está ya disponible comercialmente, por ejemplo Raftiline®HP, Orafiti.
- 30 [0056] Las inulinas vegetales tienen generalmente un grado de polimerización muy inferior al de las inulinas bacterianas (hasta 150, en comparación con hasta 100 000 en bacterias). Las fuentes vegetales incluyen especies dicotiledóneas, tal como las *Compositae*. Algunos ejemplos de especies que producen cantidades relativamente altas de inulina, principalmente en sus raíces, bulbos o tubérculos, son la achicoria, el espárrago, la dalia, el tupinambo, el ajo y otros (ver Kaur y Gupta, J. Biosci. 2002, 27,703-714). Dado que la inulina preferiblemente no debería comprender oligofruetosa, se debería evitar la hidrólisis o se deberían eliminar la oligofruetosa y/o los mono- o disacáridos presentes antes del uso.
- 35 [0057] La inulina tiene un GP de al menos 20, 50, 70, 100, 120, 130, 150, 200, 300, 500 o.
- 40 [0058] Los GOS se pueden obtener de fuentes naturales, tales como plantas (por ejemplo achicoria, soja) o bacterias, o se pueden hacer sintéticamente o por tecnología de ADN recombinante tal y como se conoce en la técnica. Los GOS pueden ser β -galactooligosacárido o α -galactooligosacárido o una mezcla de ambos. En particular, los residuos de galactosa se enlazan mediante enlaces glicosídicos $\beta(1-4)$ y $\beta(1-6)$ (trans GOS o TOS). Los GOS adecuados para usar en las composiciones también están ya disponibles comercialmente, por ejemplo Vivinal®GOS, Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Países Bajos. Los GOS también se pueden derivar de la lactosa, mediante el tratamiento de la lactosa enzimáticamente con β -galactosidasa o mediante hidrólisis de poliglucano. En una forma de realización preferida, se usan TOS. En una forma de realización, la polifruetosa es inulina HP de modo que la combinación de TOS e inulina HP también es una forma de realización preferida aquí.
- 45 [0059] Otras composiciones proporcionadas son composiciones que comprenden lactato en cantidades adecuadas, en particular para los usos anteriormente descritos. Las cantidades adecuadas de lactato pueden variar, y pueden por ejemplo variar de 1 a 30 gramos al día.
- 50 [0060] Las composiciones según la invención pueden ser o bien composiciones alimenticias, composiciones de suplemento alimenticio o composiciones farmacéuticas. Además de polifruetosa y GOS (y/o lactato), pueden comprender ingredientes adicionales. Para las composiciones alimenticias o las composiciones de suplemento alimenticio estas deberían ser de uso alimentario y fisiológicamente aceptables. "Alimenticio" se refiere a composiciones dietéticas líquidas, sólidas o semisólidas, especialmente las composiciones alimenticias totales (sustitución alimentaria), que no requieren una ingesta de nutrientes adicionales o composiciones de suplemento alimenticio. Las composiciones de suplemento alimenticio no reemplazan completamente la ingesta de nutrientes por otros medios. Las composiciones alimenticias y de suplemento alimenticio son, en una forma de realización preferida, alimento para bebés o suplementos alimenticios, alimento o suplementos alimenticios para bebés
- 55
- 60
- 65

nacidos prematuramente, alimento para lactantes, alimento para infantes, etc., que se administran preferiblemente enteralmente, preferiblemente oralmente varias veces al día. Las composiciones alimenticias o de suplemento alimenticio son particularmente adecuadas para lactantes no alimentados con leche materna o parcialmente alimentados con leche materna. Asimismo, la composición se puede administrar beneficiosamente a lactantes en su periodo de adaptación a alimentos sólidos o a lactantes que están cambiando de la alimentación con leche materna al biberón. La composición también puede ser parte de un suplemento de enriquecimiento de la leche humana.

[0061] En una forma de realización, la composición es una fórmula para lactantes o de continuación como, por ejemplo, se conoce en la técnica, especialmente tal y como se describe en la directiva de la Comisión Europea 91/321/EEC y sus enmiendas, pero se puede modificar para que comprenda una cantidad eficaz de polifruktosa y GOS. La fórmula para lactantes o de continuación puede ser a base de leche (leche de vaca, leche de cabra, etc.), fórmula de leche para lactantes (IMF) o de soja para lactantes intolerantes a la lactosa o puede contener aminoácidos como una fuente de nitrógeno para lactantes con problemas relacionados con las alergias o la absorción. Las fórmulas para lactantes o de continuación disponibles comercialmente comprenden, de este modo, una base de proteína de leche o de soja, grasa, vitaminas, carbohidratos digeribles y minerales en cantidades diarias recomendadas y pueden ser polvos, concentrados líquidos o composiciones listas para comer.

[0062] La administración de la fórmula para lactantes o de continuación modificada tiene como resultado un entorno del intestino grueso que se parece al de los lactantes alimentados con leche materna, como se puede determinar mediante análisis del pH fecal, la composición bacteriana, la producción y los perfiles de AGCC, la producción de gas, etc. Cuando la composición es una bebida, preferiblemente el volumen (que comprende la dosis diaria efectiva) consumido o administrado a diario está en el rango de aproximadamente 100 a 1500 ml, más preferiblemente de aproximadamente 450 a 1000 ml al día. Cuando la fórmula es un sólido, preferiblemente la cantidad (que comprende la dosis diaria efectiva) consumida o administrada a diario está en el rango de aproximadamente 15 a 220 g/día, preferiblemente de aproximadamente 70 a 150 g/día de polvo de fórmula.

[0063] Una dosis diaria efectiva de GOS y polifruktosa varía de aproximadamente 1 a 30 g/día, preferiblemente de aproximadamente 2 a 10 g/día para lactantes y preferiblemente para adultos de aproximadamente 5 a 20 g/día.

[0064] Las composiciones alimenticias o de suplemento alimenticio según la invención pueden comprender adicionalmente otros ingredientes activos, tales como vitaminas (A, B1, B2, B3, B5; B12, C, D, E, K, etc.), probióticos (por ejemplo bifidobacterias, lactobacilos, etc.), otros prebióticos, fibras, lactoferrina, inmunoglobulinas, nucleótidos, y similares. Pueden estar presentes nutrientes tales como proteínas, lípidos y otros carbohidratos (por ejemplo carbohidratos digeribles, carbohidratos no digeribles, carbohidratos solubles o insolubles) en varias cantidades. Los carbohidratos no digeribles insolubles típicos presentes en la nutrición para lactantes son polisacáridos de soja, almidón resistente, celulosa y hemicelulosa. Los carbohidratos solubles típicos y digeribles para usar en la nutrición para lactantes son, por ejemplo, maltodextrina, lactosa, maltosa, glucosa, fructosa, sacarosa y otros mono- o disacáridos o mezclas de los mismos. La composición también puede comprender otros ingredientes inactivos y portadores, tales como, por ejemplo, glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados químicos de la celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina de sodio, talco, carbonato de magnesio y similares. Las composiciones también pueden comprender agua, electrolitos, aminoácidos esenciales y no esenciales, oligoelementos, minerales, fibra, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, emulsionantes y estabilizadores (tales como lecitina de soja, ácido cítrico, ésteres de mono- o diglicéridos), conservantes, ligantes, aromas y similares.

[0065] Son lípidos adecuados para las composiciones, especialmente para el alimento para lactantes o los suplementos alimenticios, las grasas de la leche, lípidos vegetales, tales como aceite de canola, aceite de alazor, aceite de girasol, aceite de oliva, aceites marinos, etc. o fracciones o mezclas de los mismos que comprenden ácidos grasos adecuados (poliinsaturados y/o saturados).

[0066] Las proteínas adecuadas para las composiciones especialmente para el alimento para lactantes o los suplementos alimenticios, incluyen caseína, suero de leche, leche desnatada condensada, soja, carne de res, colágeno, maíz y otras proteínas vegetales o proteínas hidrolizadas, aminoácidos libres, etc. Preferiblemente, las proteínas comprendidas en las composiciones alimenticias para lactantes o de suplemento alimenticio están extensivamente hidrolizadas y/o parcialmente hidrolizadas para reducir el riesgo de alergias. Las composiciones alimenticias para lactantes según la invención comprenden preferiblemente todas las vitaminas y los minerales esenciales en la dieta diaria o semanal en cantidades nutricionalmente significativas, tales como cantidades diarias mínimas recomendadas.

[0067] La composición alimenticia o de suplemento alimenticio también puede, en una forma de realización, estar hecha a base de (es decir empezando a partir de o que comprende) una base alimenticia. Puede, por ejemplo, basarse en, o comprender, un producto lácteo, tal como un producto lácteo fermentado, que incluye pero no se limita a leche, yogur, una bebida a base de yogur o suero de mantequilla. Tales composiciones se pueden preparar de forma conocida per se, por ejemplo añadiendo una cantidad eficaz de polifruktosa y GOS o TOS a un alimento

o base alimenticia adecuado. Otras bases alimenticias adecuadas pueden ser bases vegetales, bases cárnicas y similares.

5 [0068] La composición alimenticia o de suplemento alimenticio según la invención se puede usar como un tratamiento y/o profilácticamente. Esto significa que se puede administrar después de que se hayan diagnosticado problemas o enfermedades gastrointestinales a un sujeto o, de forma alternativa, antes de la aparición de síntomas (por ejemplo en pacientes de alto riesgo, con posibilidades de desarrollar problemas gastrointestinales).

10 [0069] En una forma de realización, las composiciones se administran profilácticamente, para sostener el desarrollo de una microflora sana y/o de un entorno del intestino grueso sano. Un "entorno del intestino grueso sano" se refiere a una fisiología y actividad intestinal normal, especialmente una absorción normal de los nutrientes, el agua, resistencia de la mucosa a la fijación de patógenos, colonización e infección, etc. Como se puede determinar mediante análisis fecal y la producción de gas. Especialmente, se hace referencia a una fisiología y actividad óptima. Cualquier funcionamiento subóptimo del intestino grueso provoca síntomas como los descritos y se puede determinar mediante análisis fecal y/o producción de gas. En la presente, se incluyen enfermedades intestinales o trastornos causados por un funcionamiento subóptimo.

20 [0070] Las composiciones según la invención pueden estar en cualquier forma de dosificación, como líquida, sólida, semisólida, comprimidos, bebidas, polvos, etc., dependiendo del método de administración. La administración a un sujeto es preferiblemente oral, aunque para algunos usos puede ser adecuada la alimentación rectal o por sonda (con una sonda que entra directamente en el estómago, duodeno, o intestino delgado o intestino grueso).

25 [0071] Una forma de realización adicional de la invención consiste en proporcionar un método para la producción de una composición según la invención añadiendo una cantidad eficaz sinérgicamente de GOS (o TOS) y polifruktosa a una base de composición adecuada, tal y como se ha descrito anteriormente.

30 [0072] Los siguientes ejemplos no limitativos describen el efecto sinérgico de los GOS y la polifruktosa. A menos que se indique lo contrario, la práctica de la invención empleará métodos convencionales estándar de biología molecular, farmacología, inmunología, virología, microbiología o bioquímica. Estas técnicas se describen en Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel *et al.* (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, EE. UU. y Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17ª ed. (1985), Microbiology: A Laboratory Manual (6ª edición) por James Cappuccino, Laboratory Methods in Food Microbiology (3ª edición) por W. Harrigan (autor) Academic Press, todos incorporados aquí por referencia.

35 Leyendas de las figuras

[0073]

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

45 Figura 2
Cantidades relativas de acetato, propionato y butirato formado después de 48 h de fermentación *in vitro* de TOS, inulina, una mezcla de TOS/inulina 9/1 y una mezcla de oligofruktosa e inulina 1/1 mediante heces frescas obtenidas de bebés. La suma de acetato más propionato más butirato formada se estableció en un 100 % para cada una de las fibras evaluadas.

50 Figura 3
Formación de gas después de 48 h de fermentación *in vitro* de TOS, inulina, una mezcla de TOS/inulina 9/1 y una mezcla de oligofruktosa e inulina 1/1 mediante heces frescas obtenidas de bebés. La cantidad de gas formado (ml relacionado con la cantidad total de AGCC formados (en mmol por g de fibra)

55 Figura 4
Efectos de las mezclas de AGCC (acetato/propionato/butirato en una relación de 90/5/5 en una base molar) y de L-lactato.

Figura 4A: efecto de 0; 0,1; 0,5; 1 y 4 mM de la mezcla de AGCC o L-lactato en la expresión de muc-2 en un cocultivo CCD18/T84 (n = 6). Las barras de error muestran el SEM. El aumento en 1 y 4 mM de la mezcla de AGCC y 0,5; 1 y 4 mM de L-lactato es estadísticamente significativo.

60 Figura 4B: efecto de 0, 50, 100, 250 y 500 µM de mezcla de AGCC o L-lactato en la respuesta espontánea de PGE1 y PGE2 en las células CCD18 (n = 7). Las barras de error muestran el SEM. El aumento de PGE1 en 100, 250 y 500 µM de mezcla de AGCC y 100 µM de L-lactato es estadísticamente significativo. El aumento de PGE2 en 100, 250 y 500 µM de mezcla de AGCC y 250 µM de L-lactato es estadísticamente significativo (P < 0,05)

65 Figura 5

Efectos del acetato de sodio y el L-lactato de sodio en la contracción espontánea en las partes distal y proximal del colon. El blanco (fijado en una tensión de 1 g) es del 0 %. La tensión después de la adición de 40 mM de KCl se fijó en el 100 %.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

Los estudios de fermentación *in vitro* muestran efectos sinérgicos en los patrones de fermentación

10

1.1 Materiales y métodos

Microorganismos

15 [0074] Los microorganismos se obtuvieron a partir de heces frescas de bebés alimentados con biberón. El material fecal fresco de los bebés de 1 a 4 mes de edad se agrupó y colocó en un medio conservante antes de que pasaran 2 h.

Composiciones/sustrato

20

[0075] Como sustrato, se usaron o una mezcla de prebióticos (TOS; TOS (de VivinalGOS, Borculo Domo Ingredients, Países Bajos) e inulina (raffilinHP de Orafiti, Bélgica) en una relación de 9/1 (p/p); inulina; mezcla de oligofruktosa e inulina en una relación de 1/1 (p/p) o nada (blanco).

Medios

25 [0076] Medio McBain & MacFarlane: agua de peptona tamponada 3,0 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l, mucina (borde en cepillo) 0,8 g/l, triptona 3,0 g/l, L-Cisteína-HCl 0,4 g/l, sales de bilis 0,05 g/l, K₂HPO₄·3H₂O 2,6 g/l, NaHCO₃ 0,2 g/l, NaCl 4,5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,5 g/l, CaCl₂ 0,228 g/l, FeSO₄·7H₂O 0,005 g/l. Se llenaron botellas Scott de 500 ml con el medio y se esterilizaron durante 15 minutos a 121 °C.

30

[0077] Medio tamponado: K₂HPO₄·3H₂O 2,6 g/l, NaHCO₃ 0,2 g/l, NaCl 4,5 g/l, MgSO₄·7H₂O, 0,5 g/l, CaCl₂ 0,228 g/l, FeSO₄·7H₂O 0,005 g/l. Se ajustó el pH a 6,3 ± 0,1 con K₂HPO₄ o NaHCO₃. Se llenaron botellas Scott de 500 ml con el medio y se esterilizaron durante 15 minutos a 121 °C.

35

[0078] Medio conservante: peptona tamponada 20,0 g/l, L-Cisteína-HCl 0,5 g/l, tioglicolato de sodio 0,5 g/l, comprimido de resazurina 1 por litro. Se ajustó el pH a 6,7 ± 0,1 con 1 M de NaOH o HCl. El medio se hirvió en el microondas. Se llenaron de botellas de suero de 30 ml con 25 ml del medio y se esterilizaron durante 15 minutos a 121 °C.

40

[0079] Las heces frescas se mezclaron con el medio de conservante. Las heces frescas se pueden conservar de esta forma durante varias horas a 4 °C.

45 [0080] Suspensión fecal: la solución conservada de heces se centrifugó a 13 000 r.p.m. durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y las heces se mezclaron con el medio McBain & Mac Farlane medio en una relación en peso de 1:5.

Fermentación

50 [0081] Se combinaron 3,0 ml de la suspensión fecal con 85 mg de glucosa o prebiótico o sin adición (blanco) en una botella y se mezclaron exhaustivamente. Se retiró una muestra t = 0 (0,5 ml). 2,5 ml de la suspensión resultante se llevaron en un tubo de diálisis en una botella rellena de 60 ml con 60 ml del medio tamponado. La botella se cerró bien y se incubó a 37 °C. Se recogieron las muestras del tubo de diálisis (0,2 ml) o del tampón de diálisis (1,0 ml) con una jeringa hipodérmica después de 3, 24 y 48 horas y se colocaron inmediatamente en hielo para detener la fermentación.

55

Determinación de los ácidos grasos de cadena corta y el lactato

[0082] Véase el ejemplo 2. Se corrigieron los valores para el blanco.

60

Determinación del gas

[0083] En t = 3, t = 24 y t = 48 la presión del gas en el espacio de cabeza de la botella de 60 ml se midió mediante un medidor de presión del gas (Druckmessumformer, Econtronic, Alemania) pinchando una jeringa hipodérmica de 6 ml a través de la tapa de caucho de la botella y la extracción de gas del espacio de cabeza mediante esta

65

jeringa hasta que la presión del gas fue de 0 bar. El volumen en la jeringa fue el volumen de gas formado. Se corrigieron los valores para el blanco.

1.2 Resultados

[0084] La fermentación *in vitro* se llevó a cabo usando las muestras siguientes:

- 1.) 85 mg de TOS (de VivinalGOS, Borculo Domo Ingredients, Países Bajos)
- 2.) 85 mg de inulina (raftilinHP, de Orafti, Bélgica)
- 3.) 85 mg de TOS/inulina con una relación de TOS/inulina de 9/1 (p/p) y
- 4.) 85 mg de OF (rafitloseP95, de Orafti, Bélgica)/inulina (raftilinHP) en una relación de OF/inulina de 1/1 (p/p).

Cantidad total de AGCC producidos

[0085] Los resultados se muestran en la figura 1. La figura 1 muestra que la mezcla TOS/inulina dio como resultado una cantidad significativamente más alta de AGCC por g de fibra que los componentes individuales, pero también superior a la mezcla de oligofructosa (OF) e inulina. También se evaluaron 85 mg de TOS/inulina en una relación de 1/1 (datos no mostrados), que también proporcionó un efecto sinérgico.

Producción de L- y D-lactato

[0086] Solo se pudo administrar L y D-lactato en t = 3. La tabla 1 muestra los productos finales metabólicos formados en ese momento.

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

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

[0087] Nuevamente, se observa una formación sinérgica más alta de lactato para la mezcla TOS/inulina en comparación con los componentes individuales TOS e inulina. En comparación con la mezcla con OF e inulina, el porcentaje de lactato (basado en los ácidos totales) y la proporción de L-/D- lactato es superior en la mezcla de TOS/inulina.

Cantidades relativas de AGCC

[0088] La figura 2 muestra el patrón de productos de fermentación después de 48 h. La mezcla de TOS/inulina muestra un porcentaje significativamente más alto de acetato que los componentes individuales, que también es superior a la mezcla de oligofructosa (OF) e inulina. Las heces de bebés alimentados con leche materna muestran un alto porcentaje de acetato de modo que la mezcla TOS/inulina tiene como resultado un patrón de productos de fermentación que es el que más se parece al de los bebés alimentados con leche materna.

Formación de gas

[0089] Los resultados se muestran en la figura 3. Con respecto a la formación de gas, los TOS y la mezcla de TOS/inulina forman la cantidad más baja de gas por mmol de AGCC formado. La inulina y la mezcla de OF/inulina muestran una cantidad muy superior de formación de gas. Por mmol de AGCC formado, la cantidad de gas es la más baja en la mezcla de TOS/inulina.

Cinética de la formación de AGCC

[0090] La tabla 2 muestra la cinética de la formación de AGCC. La combinación de TOS/inulina todavía muestra una alta formación de AGCC entre 24 y 48 h, indicando que en la parte distal del colon todavía se forman AGCC y con un efecto beneficioso en la permeabilidad del colon, la formación mucosidad y los efectos antipatógenos, etc. Asimismo, en las primeras 3 h se forma la máxima cantidad de AGCC, como es el caso con los oligosacáridos de leche humana (datos no mostrados). Una fermentación rápida al principio del colon es importante debido a los efectos antipatógenos.

Tabla 2: cinética de la formación de AGCC (mmol) AGCC (blanco corregido)

	Intervalo de tiempo (horas)		
Prebióticos	0-3 h	3-24 h	24-48 h

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

Ejemplo 2

5 Estudio clínico con TOS/inulina: un aumento relativo del acetato y una reducción relativa del butirato no se correlacionan con un aumento de las bifidobacterias. Los TOS y la inulina tienen un efecto sinérgico.

2.1 Materiales y métodos

10 [0091] Se seleccionaron 63 mujeres embarazadas que habían decidido dar el pecho y 57 que decidieron que no durante su último trimestre de embarazo. Participaron lactantes con peso de nacimiento normal, ninguna anomalía congénita, enfermedad congénita o enfermedad gastrointestinal dentro de los 3 días después del parto. El estudio fue aprobado por el comité ético del centro médico de St. Radboud, Nijmegen, Países Bajos. Se obtuvo el consentimiento informado escrito de los padres antes de la participación en el estudio.

15 [0092] A los lactantes de madres que habían decidido no dar el pecho se les asignó de forma aleatoria y doble ciega uno de dos grupos de fórmula (OSF, SF). El grupo de fórmula estándar (SF; n = 19 recibió una fórmula para lactantes regular, no suplementada (Nutrilon I, Nutricia, Países Bajos). Los datos composicionales principales de la fórmula estándar con dilución estándar de 131 g/l se proporcionan en la tabla 3. El grupo de fórmula prebiótica (OSF; n = 19) recibió la misma fórmula para lactantes estándar suplementada con una mezcla de 6 g/l de transgalactooligosacáridos (TOS; Vivinal GOS, Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Países Bajos) e inulina (PF; RaftilineHP, Orafiti active food ingredient, Tienen, Bélgica). La mezcla comprendía un 90 % de TOS y un 10 % de inulina (polifruktosa). Las fórmulas del estudio se administraron *ad libitum* durante el periodo del estudio. Las madres que habían decidido dar el pecho fueron estimuladas para continuar con la lactancia durante el curso del estudio y contaron con el apoyo de un asesor de lactancia lo necesitaron. Al terminar la lactancia, sus lactantes recibieron una de dos fórmulas. La adhesión al tratamiento se evaluó contando el número de latas de fórmula sin usar durante cada visita y comparando la cantidad de fórmula consumida con la toma de alimento registrada.

Tabla 3: composición de la fórmula estándar por litro

Energía	kcal	670
Proteína	g	14
Relación caseína/suero de leche		40/60
Grasa	g	35
Carbohidratos totales	g	75
Lactosa	g	75
Minerales		
Calcio	mg	540
Fósforo	mg	270
Magnesio	mg	50
Sodio	mg	190
Potasio	mg	680
Cloruro	mg	430
Hierro	mg	5
Zinc	mg	5

30 Questionarios

[0093] Se recogen datos demográficos, clínicos y antropométricos de la madre antes del parto. La información acerca del parto se obtuvo de las madres el día 5 después del parto. La información acerca de la toma de alimento de los lactantes, la tolerancia a la fórmula, características de las deposiciones, la salud y las antropometrías se

obtuvo a partir de cuestionarios en los días 5, 10 y 28 después del parto y a partir de ahí una vez cada 4 semanas hasta el final del estudio.

Muestras fecales

[0094] Se pidió a los padres que tomaran muestras fecales de sus lactantes, los días 5, 10 y 28 después del parto y a partir de ahí una vez cada 4 semanas. El progenitor tomó las muestras del pañal, lo antes posible después de la defecación, las colocó en contenedores para heces (Greiner Labortechnik, Países Bajos) y las almacenó inmediatamente a -20 °C y los investigadores las transportaron en un congelador portátil al laboratorio.

Preparación de las muestras fecales:

[0095] Para la determinación de AGCC, se descongeló 1 gramo de las muestras en agua helada diluida 10x en MilliQ y homogeneizada durante 10 minutos usando un stomacher (IUL Instruments, Barcelona, España). Se mezclaron 350 µl de heces homogeneizadas con 200 µl de ácido fórmico al 5 % (v/v), 100 µl de ácido 2-etilbutírico de 1,25 g/l (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos) y 350 µl de MilliQ. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 14 000 r.p.m. para eliminar las partículas grandes y el sobrenadante se almacenó a -20 °C. Para el análisis FISH (hibridación fluorescente *in situ*) y las mediciones de ácido láctico, las muestras se descongelaron en agua helada, diluida 10x (p/v) en tampón fosfato salino, pH 7,4 (PBS) y se homogeneizaron durante 10 minutos usando un stomacher. Las heces homogeneizadas se almacenaron a -20 °C.

Hibridación fluorescente *in situ*

[0096] El análisis FISH se llevó a cabo tal y como se ha descrito (angendijk *et al*, 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61:3069-3075.) con algunas ligeras modificaciones. Se aplicaron muestras fijas de paraformaldehído a portaobjetos de vidrio recubiertos de gelatina (portaobjetos recubiertos de PTFE de 8 pocillos [1 cm²/pocillo], CBN labsuppliers, Drachten, Países Bajos) y se secaron con aire. Las muestras secas se deshidrataron en etanol 96 % durante 10 minutos. Se precalentó el tampón de hibridación (20 mM de Tris-HCl; 0,9 M de NaCl; 0,1 % de SDS [pH 7,1]) con sonda específica de *Bifidobacterium* Bif164mod marcada con 10 ng/l Cy3 (5'-CAT GYA CCG TTA CCA CCC) y se añadió a las muestras secas. Bif 164 mod es una versión modificada de la sonda S-G-Bif-a-0164-a-A-18 (Langendijk *et al*, 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61:3069-3075.). Los portaobjetos se incubaron durante toda la noche en una cámara húmeda oscura a 50 °C. Después de la hibridación, los portaobjetos se lavaron durante 30 minutos en 50 ml de tampón de lavado precalentado (20 mM de Tris-HCl, 0,9 M de NaCl [pH 7,2]) y se enjuagaron brevemente en MilliQ. Para marcar todas las bacterias, las muestras se incubaron con 0,25 ng/l de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después del marcaje con DAPI, los portaobjetos se enjuagaron brevemente en MilliQ, se secaron, se montaron con Vectashield (laboratorios de Vector, Burlingame, CA, EE. UU.) y se cubrieron con un cubreobjetos. Los portaobjetos se analizaron automáticamente usando un microscopio de epifluorescencia Olympus AX70 con software de análisis de imagen automatizado (Análisis 3.2, Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Alemania). El porcentaje de bifidobacterias por muestra se determinó analizando 25 posiciones microscópicas elegidas de forma aleatoria. En cada posición, el porcentaje de bifidobacterias se determinó contando todas las células con un set de filtro DAPI (SP 100, Chroma Technology Corp., Brattleboro, EE. UU.) y contando todas las bifidobacterias usando un set de filtro Cy3 41007, Chroma Technology, Brattleboro, EE. UU.).

Análisis de ácidos grasos de cadena corta

[0097] Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), ácidos acéticos, propiónicos, n-butíricos isobutíricos y n-valéricos se determinaron de forma cuantitativa mediante cromatógrafo de gas (GC) Varian 3800 (Varian Inc., Walnut Creek, EE. UU.) equipado con un detector de ionización de llamas. Se inyectaron 0,5 µl de la muestra a 80 °C en la columna (Stabilwax, 15 x 0,53 mm, grosor de película de 1,00 µm, Restek Co., EE. UU.) usando helio como un gas portador (3,0 psi). Después de la inyección de la muestra, se calentó el horno a 160 °C a una velocidad de 16 °C/min, seguido de calentamiento a 220 °C a una velocidad de 20 °C/min y finalmente se mantuvo a una temperatura de 220 °C durante 1,5 minutos. La temperatura del inyector y del detector fue de 200 °C. Se utilizó ácido 2-etilbutírico como un estándar interno.

Análisis del lactato

[0098] Las heces homogeneizadas se descongelaron en hielo y se centrifugaron durante 5 minutos y 14 000 r.p.m., 100 µl de sobrenadante se calentaron durante 10 minutos a 100 °C para inactivar todas las enzimas. El lactato se determinó enzimáticamente, usando un kit de detección de ácido de L-lactato con D- y L-lactato-deshidrogenasa (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Solo se determinó el lactato en aquellas muestras fecales que eran lo suficientemente grandes.

Análisis del pH

[0099] Después del almacenamiento a -20 °C, las muestras fecales se descongelaron y el pH se midió directamente en las heces a temperatura ambiente usando un phmetro Handylab (Scott Glas, Maguncia, Alemania) equipado con un electrodo de pH Inlab 423 (Mettler-Toledo, Columbo, EE. UU.)

5 Análisis de datos

[0100] Antes del estudio, los cálculos de potencia mostraron que para detectar una diferencia en el porcentaje de bifidobacterias entre el grupo de fórmula de intervención y el grupo de fórmula estándar del 30 % con una desviación estándar del 25 %, deberían incluirse 13 lactantes por grupo. Dado que se previó un abandono del 30 % en los grupos de fórmula, se incluyeron en el estudio más lactantes de los calculados. Se utilizó el paquete estadístico SPSS (versión 11/0) para el análisis estadístico de los resultados. La normalidad de todos los valores se verificó mediante inspección visual de los gráficos de probabilidad normal. Se evaluó la significación de las diferencias en el porcentaje de bifidobacterias, pH, cantidades relativas de AGCC y lactato entre los grupos mediante análisis de varianza. En caso de una diferencia significativa ($p < 0,05$), se compararon los grupos usando la prueba *post hoc* Bonferroni. Dado que no es posible asignar de forma doble ciega la alimentación con leche materna y alimentación con biberón y para asegurar una adecuada aleatorización, no se llevó a cabo ningún análisis estadístico para comparar la alimentación con leche materna con cualquiera de los grupos de alimentación con fórmula. Los datos del grupo alimentado con leche materna solo se proporcionan cuando el lactante era alimentado únicamente con leche materna en ese momento.

20 2.2 Resultados

[0101] En total, se incluyeron 120 lactantes del grupo -pro. 57 lactantes comenzaron la alimentación con fórmula directamente después del nacimiento y se dividieron equitativamente entre los grupos de fórmula. De los 63 lactantes que fueron alimentados con leche materna directamente después del nacimiento, 24 cambiaron a alimentación con fórmula antes de la edad de 16 semanas y 5 lactantes abandonaron el proceso. Las características de los sujetos del estudio se muestran en la tabla 4. En los grupos de fórmula, 9 lactantes abandonaron el estudio en las primeras 16 semanas después del nacimiento (4 en el grupo de SF, 5 en el grupo de OSF). Las razones para abandonar incluían: cólicos, sospecha de alergia a la leche de vaca, estreñimiento y problemas prácticos.

Tabla 4 - características de los objetos de estudio

		Fórmula estándar, SF N = 19	Fórmula prebiótica, OSF N = 19	Leche materna, BF N = 63
Sexo	Masculino	5	12	33
	Femenino	14	7	30
Lugar de nacimiento	En casa	7	8	40
	Hospital	12	11	23
Modo de parto	Vaginal	14	16	59
	Cesárea	5	3	4
Peso en el nacimiento		3600±501	3318±602	3651±601

35 Bifidobacterias fecales

[0102] Los porcentajes de bifidobacterias en las heces a los 5 días, 10 días, 4, 8, 12 y 16 semanas de edad de los grupos de alimentación se muestran en la tabla 5 y las cantidades en la tabla 5. El grupo de OSF tiende a tener un mayor % de bifidobacterias que el grupo de SF a partir del recuento bacteriano total en todas las edades, pero las diferencias no fueron estadísticamente diferentes. De forma imprevista, el porcentaje de bifidobacterias en los bebés alimentados con leche materna también fue relativamente bajo y estuvo en la línea de los grupos alimentados con fórmula.

[0103] Los datos preliminares también muestran un aumento en los lactobacilos en los grupos BF y OSF, pero las cantidades de lactobacilos en la flora fecal son al menos un orden de magnitud inferiores a las de las bifidobacterias, el patrón general cambia muy poco.

Resultados del pH

[0104] Los valores de pH medidos en las heces de los lactantes alimentados con fórmula se muestran en la tabla 6. El pH más bajo se halló en los lactantes alimentados con leche materna. El pH fecal de las heces de los lactantes alimentados con la fórmula OSF fue inferior al del grupo de SF ($p < 0,045$ en todas las edades excepto día 5).

Resultados de AGCC

[0105] La cantidad total de AGCC en las heces se muestra en tabla 5 más adelante.

[0106] El porcentaje de AGCC diferente del AGCC total se muestra en la tabla 6. No hay diferencias estadísticamente significativas halladas en la concentración de AGCC total entre los grupos de fórmula. Asimismo, la cantidad de AGCC es comparable a la de los otros grupos de alimentación. Sin embargo, ya después de 10 días, se pueden observar diferencias en los perfiles de AGCC entre lactantes alimentados con OSF o leche materna en comparación con los lactantes alimentados con fórmula estándar. Los lactantes alimentados con la fórmula que contiene GOS y polifruktosa y alimentados con leche materna tienen mayores porcentajes de acetato y menores porcentajes de propionato, butirato, iC4-6 AGCC en comparación con los lactantes alimentados con fórmula estándar.

Resultados del lactato

[0107] Las concentraciones de lactato (mmol/kg de heces) de todos los grupos se muestran en la tabla 5. Ya a los 5 días de edad, la fórmula OS (no sign.) y los grupos de leche materna tienen mayores cantidades de lactato en comparación con el grupo de fórmula estándar. La cantidad relativa de lactato (como un porcentaje de la suma de AGCC y lactato) es la mayor en los bebés alimentados con leche materna y la más baja en los bebés alimentados con fórmula estándar. Los bebés alimentados con una fórmula que contiene TOS/inulina tienen una cantidad relativa intermedia de acetato. El porcentaje de lactato en los bebés alimentados con OSF a las 16 semanas (con respecto a los ácidos totales) difiere significativamente del de los bebés alimentados con SF.

Tabla 5 - Concentración de lactato y AGCC total (mmol/kg de heces) y bifidobacterias (*1,1013/kg de heces) pH entre el nacimiento y las 16 semanas de edad. Media ± SEM. Salvo por el pH, no se hallaron diferencias estadísticamente.

		Lactato	AGCC	pH	Bifidobacterias
5 días	SF	13,5±7,7	54,7±12,6	5,93±0,15	0,58±0,49
	OSF	10,7±4,3	56,5±7,7	5,49±0,15	1,20±2,24
	BF	13,3±2,8	48,7±4,4	5,27±0,07	0,47±0,39
10 días	SF	4,6±3,0	62,0±7,9	6,88±0,15	0,96±0,83
	OSF	9,7±3,6	62,3±7,2	5,95±0,20	1,10±0,99
	BF	15,1±3,2	54,7±4,9	5,35±0,07	0,48±0,61
4 semanas	SF	2,6±1,4	68,3±10,3	6,77±0,21	0,97±0,96
	OSF	9,9±3,4	83,1±8,8	5,88±0,18*	1,20±0,55
	BF	22,8±4,4	59,8±4,8	5,45±0,12	0,56±0,64
8 semanas	SF	7,6±6,8	76,5±13,2	6,80±0,20	0,89±0,56
	OSF	24,4±5,3	76,0±8,4	5,68±0,18*	1,00±0,52
	BF	30,9±5,3	62,8±5,4	5,27±0,15	0,58±0,59
12 semanas	SF	14,1±9,4	73,9±11,9	6,88±0,20	0,91±0,80
	OSF	18,4±7,0	76,1±12,1	5,60±0,18*	1,30±0,99
	BF	42,1±7,1	60,4±4,9	5,29±0,17	1,40±1,38
16 semanas	SF	1,7±1,2	68,6±14,0	7,09±0,15	1,00±0,80
	OSF	18,5±5,7	67,7±11,7	5,60±0,20*	1,30±0,76
	BF	45,1±9,0	59,2±6,9	5,68±0,24	0,89±0,78

Tabla 6 - cantidades relativas de AGCC (% de AGCC total), lactato (% de ácidos totales), % de bifidobacterias entre el nacimiento y las 16 semanas de edad.

Día semana /		Acetato	Propionato	Butirato	Suma iC4-C5	% de bifidobacterias	lactato
5d	SF	84,3±3,4	12,9±3,2	1,7±0,5	1,1±0,4	45±3,6	13,8±18,5
	OSF	85,8±5,1	12,0±4,7	0,5±0,5	1,7±0,7	50±8,6	8,7±13,3
	BF	89,5±1,8	7,0±1,5	1,6±0,4	2,0±0,4	54±4,1	12,5±14,0
10d	SF	70,9±2,0	21,3±2,6	4,6±1,1	3,2±0,5	65±6,0	4,3±10,8
	OSF	84±2,4*	13,5±2,3	1,4±0,4*	1,1±0,4	61±6,3	8,2±9,8
	BF	89,3±1,9	5,8±1,3	2,3±0,3	2,6±0,4	42±4,1	13,4±13,8
4s	SF	71,8±2,8	17,8±3,3	5,0±1,1	5,5±2,6	52±5,4	6,9±16,4
	OSF	77,7±2,2	15,4±2,0	5,8±2,2	1,1±0,3	71±4,5	8,4±10,7
	BF	91,0±1,8	4,3±1,2	2,6±0,6	2,1±0,4	47±5,4	19,6±17,0
8s	SF	74,6±2,9	16,4±2,0	6,1±1,2	2,9±0,7	50±6,3	3,5±9,9
	OSF	83,5±2,7	11,4±2,1	3,7±1,2	1,4±0,4	64±4,1	17,7±15,2

Día semana /		Acetato	Propionato	Butirato	Suma iC4-C5	% de bifidobacterias	lactato
	BF	91,2±1,6	5,4±1,4	1,9±0,5	1,6±0,3	41±4,5	21,7±13,4
12s	SF	73,9±2,9	17,8±3,3	5,0±1,1	3,2±0,5	56±5,4	5,4±11,9
	OSF	86,5±2,1	11,2±1,8	1,2±0,3*	1,0±0,4	60±5,0	13,6±13,2
	BF	86,1±3,3	7,5±2,2	3,0±0,7	3,5±0,8	59±4,5	30,2±16,3
16s	SF	69,9±3,9	19,6±2,7	5,6±0,9	4,9±0,8	52±6,3	0,6±0,9
	OSF	82,2±5,3	14,3±4,9	2,1±0,5*	1,5±0,4*	69±7,7	16,4±12,0*
	BF	89,7±2,7	6,4±2,1	1,6±0,4	2,2±0,5	47±6,3	35,6±20,4

P < 0,05 en comparación con SF; SF = fórmula estándar alimentada, OSF = SF suplementada con GOS + inulina; BF = alimentado con leche materna.

[0108] Lo anterior demuestra que, en las heces de los lactantes alimentados con esta combinación de GOS y polifruktosa se baja el pH, que se forma más lactato y que se forma un patrón de ácido (acetato y lactato) que es más similar al de los bebés alimentados con leche materna y que este efecto no se puede atribuir al aumento cuantitativo de las bifidobacterias.

Ejemplo 3 - efectos beneficiosos del lactato y una mezcla de AGCC en la expresión de Muc-2, PGE1 y PGE2.

3.1 Material y métodos

[0109] Se analizó el efecto del lactato y una mezcla de AGCC tal y como se describe en Willemsen, LEM, Koetsier MA, van Deventer SJH, van Tol EAF (2003), Gut 52:1442-1447, con las modificaciones siguientes: se evaluó lactato y una mezcla de acetato/propionato/butirato 90/5/5. Para los experimentos de producción mucosidad, se usó un cocultivo de células CCD18 y T84, mientras que para los experimentos de producción de PGE1 y PGE2 se usó un monocultivo de células CCD18.

3.2 Resultados

[0110] AGCC, en una mezcla de 90/5/5 (acetato/propionato/butirato) y dosis de L-lactato inducen dependientemente la expresión de MUC-2 en un cocultivo de células CCD18 y T84 tal y como se puede observar en la figura 4A. Asimismo, la concentración de PGE1 y PGE2 aumenta en las células CCD18 tal y como se puede observar en la figura 4B. En concentraciones más altas de los ácidos orgánicos añadidos, el aumento alcanza una significancia estadísticamente.

Ejemplo 4: efecto del lactato en la contracción de colon

4.1 Material y métodos

[0111] Se alojaron ratas Wistar macho (CKP/Harlan, Wageningen/Horst, Países Bajos) en condiciones de temperatura controlada y ciclo de luz y se les proporcionó libre acceso a gránulos alimenticios y agua. Los animales fueron anestesiados mediante una mezcla de N₂O, O₂ e isoflurano, se abrió el abdomen y el colon se retiró inmediatamente. El tejido se colocó en tampón Krebs-Henseleit de pH 7,4 (composición en mM: 118,0 de NaCl; 4,75 de KCl; 1,18 de MgSO₄; 2,5 de CaCl₂; 10 de glucosa; 1,17 de KH₂PO₄ y 24,9 de NaHCO₃).

[0112] El colon se cortó en una porción distal y una proximal y se enjuagó con tampón Krebs-Henseleit mientras se extraía suavemente mediante presión el contenido fecal. Para aproximarse lo máximo posible a las condiciones *in vivo*, se unieron segmentos de 1 cm completamente intactos longitudinalmente a un transductor de fuerza isométrico (F30 tipo 372, HSE, Alemania) en 20 ml de baños de órganos con camisa de agua (37 °C) (Schuler, HSE, Alemania) con tampón Krebs-Henseleit gaseado continuamente con 95 % de O₂-5 % de CO₂. Los segmentos se estiraron gradualmente hasta una tensión de reposo de 1 g y se dejaron equilibrar durante 45 minutos con lavados intermitentes. Las tensiones de los segmentos en reposo y en respuesta a diferentes estímulos se amplificaron mediante un módulo de amplificador del transductor (HSE, Alemania) y se registraron en un registrador de varios inscriptores (Rikadenki, HSE, Alemania).

[0113] Los segmentos se incubaron con 40 mM de KCl durante 5 minutos y se midieron las respuestas contráctiles. Se lavó el KCl mediante tres lavados consecutivos con intervalos de 5 minutos. A continuación, los segmentos se incubaron con concentraciones en aumento hasta 100 mM de acetato o L-lactato de sodio. Las soluciones de ácido fueron recién preparadas en agua destilada. Se añadió NaOH al acetato para obtener un pH neutro. Al final de la incubación con un ácido graso, se añadieron 40 mM de KCl para determinar si la respuesta contráctil al KCl se veía influida por el ácido graso. Antes de una nueva incubación, se dejó que los segmentos se equilibraran durante 45 minutos en tampón Krebs-Henseleit fresco con lavados intermitentes.

[0114] El protocolo experimental consistía en dos secciones proximales y dos secciones distales del colon. Para el análisis de datos (n = 3), el nivel de contracción inducido por los estímulos se definió como la tensión en g

después de 5 minutos de incubación. Los datos obtenidos a partir de segmentos idénticos (proximales o distales) se usaron para calcular un valor medio y cada segmento sirvió como su propia muestra de control.

4.2 Resultados

- 5 [0115] Como se puede observar en la figura 5, el acetato sódico y, especialmente, el L-lactato de sodio reducen la tensión de las contracciones tónicas. Los efectos de relajación son mayores en la parte distal del colon que en la parte proximal del colon.
- 10 [0116] Asimismo, el número de contracciones espontáneas, las contracciones fásicas, se reduce en la parte proximal del colon tras la adición del acetato sódico y L-lactato de sodio, mientras que no se observa ningún efecto en la parte distal del colon.
- 15 [0117] Sin embargo, en la parte proximal del colon, las contracciones tónicas como una respuesta al KCl, son comparables en presencia o ausencia de 25 mM de acetato de sodio o L-lactato de sodio. En concentraciones más altas, se observa una relajación significativa incluso después de la adición de KCl.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para usar en el tratamiento o la prevención de alergias, eczemas o enfermedades atópicas que comprende galactooligosacáridos y polifruktosa, donde la polifruktosa es inulina con un grado medio de polimerización por encima de 20, la composición es una composición alimenticia que comprende proteína, lípidos y carbohidratos diferentes de los galactooligosacáridos y la polifruktosa y donde la proteína está parcialmente o extensivamente hidrolizada.
- 10 2. Composición para usar según la reivindicación 1, donde la cantidad de galactooligosacáridos: inulina tiene una relación de 5:95 a 95:5, preferiblemente de 90:10 a 45:55.
3. Composición para usar según la reivindicación 1 o 2, donde el galactooligosacárido es transgalactooligosacárido.
- 15 4. Composición para usar según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición es una nutrición para lactantes.
5. Composición para usar según la reivindicación 4, donde la composición es una fórmula para lactantes o una fórmula de continuación.
- 20 6. Composición para usar según la reivindicación 5, donde la composición comprende al menos 4 g/l de una mezcla de galactooligosacáridos y polifruktosa.

Fig 1

Patrón de formación de AGCC

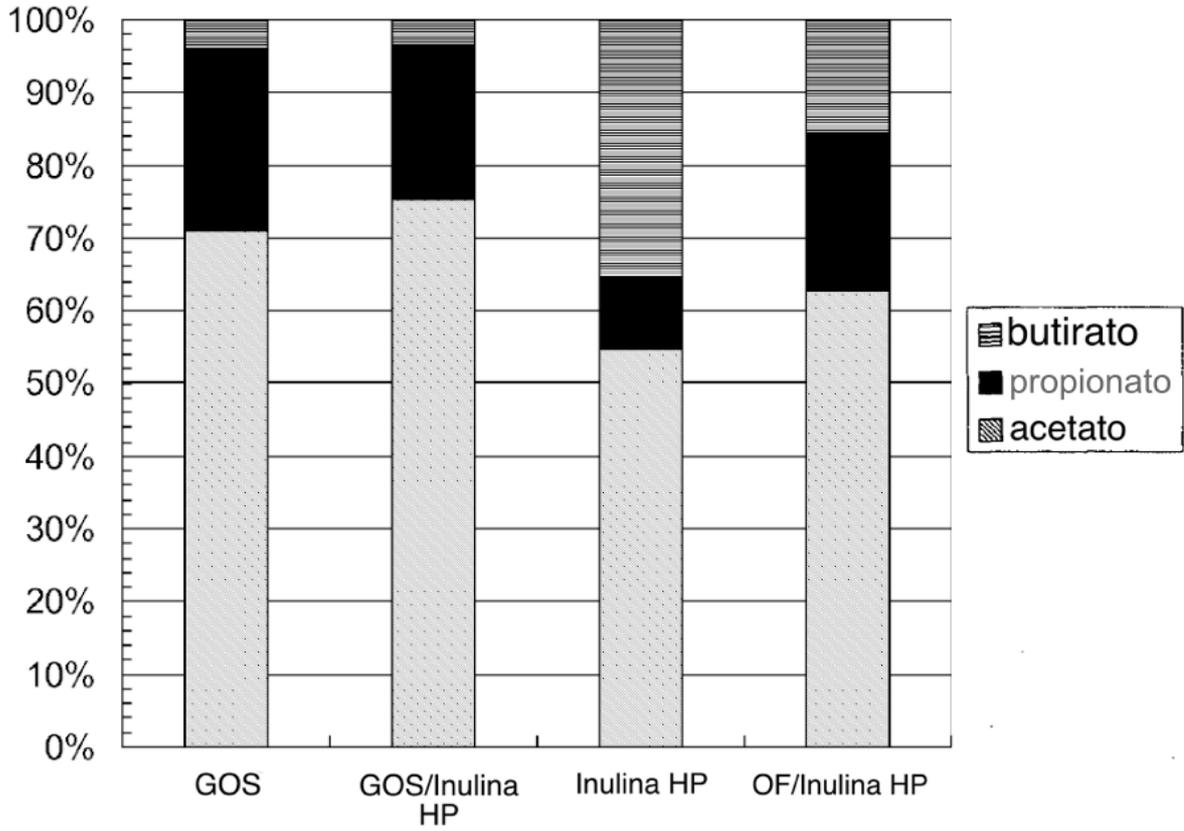


Fig 2

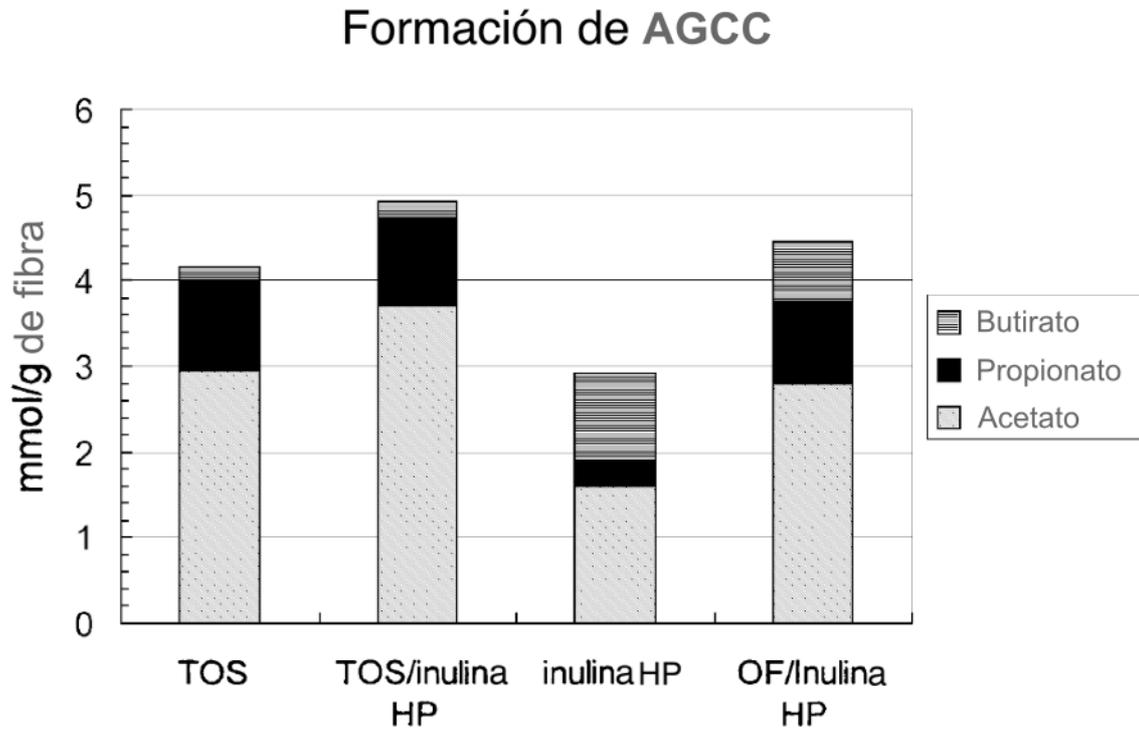
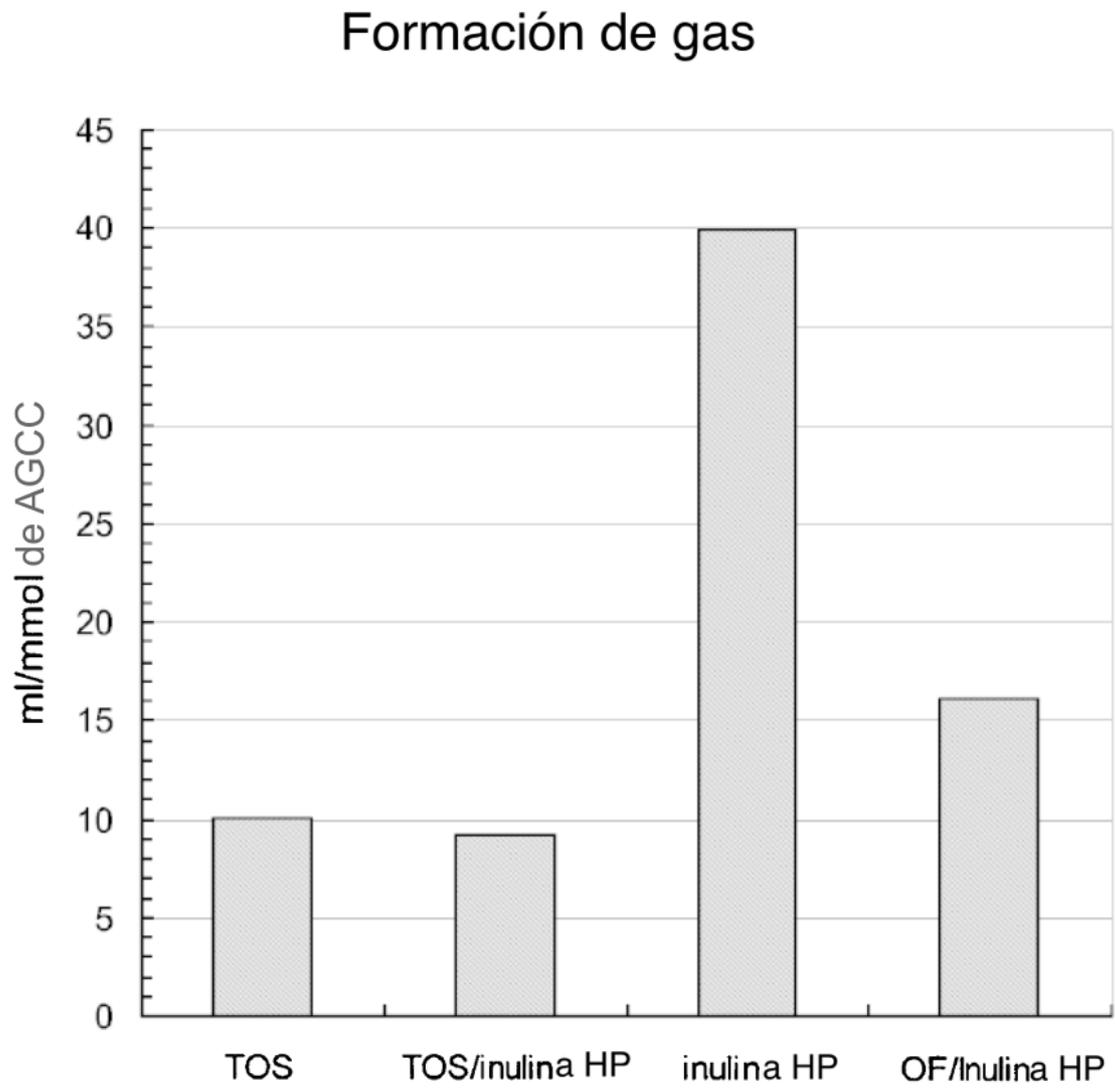


Fig 3

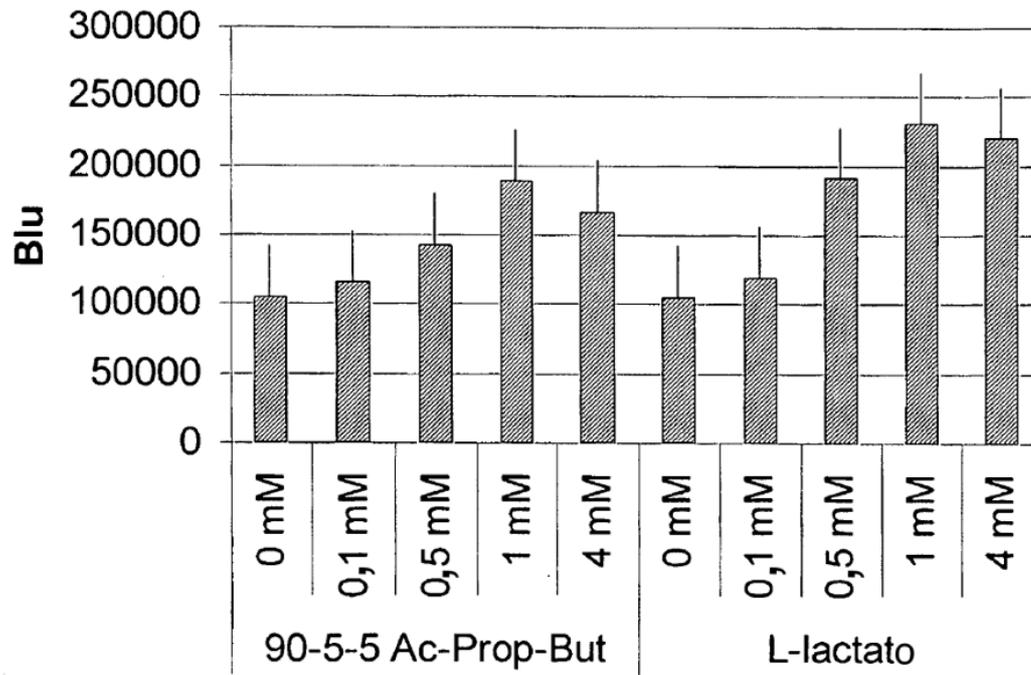
*Fig 4a***A: Expresión de mucosidad**

Fig 4b

B: Síntesis de PGE

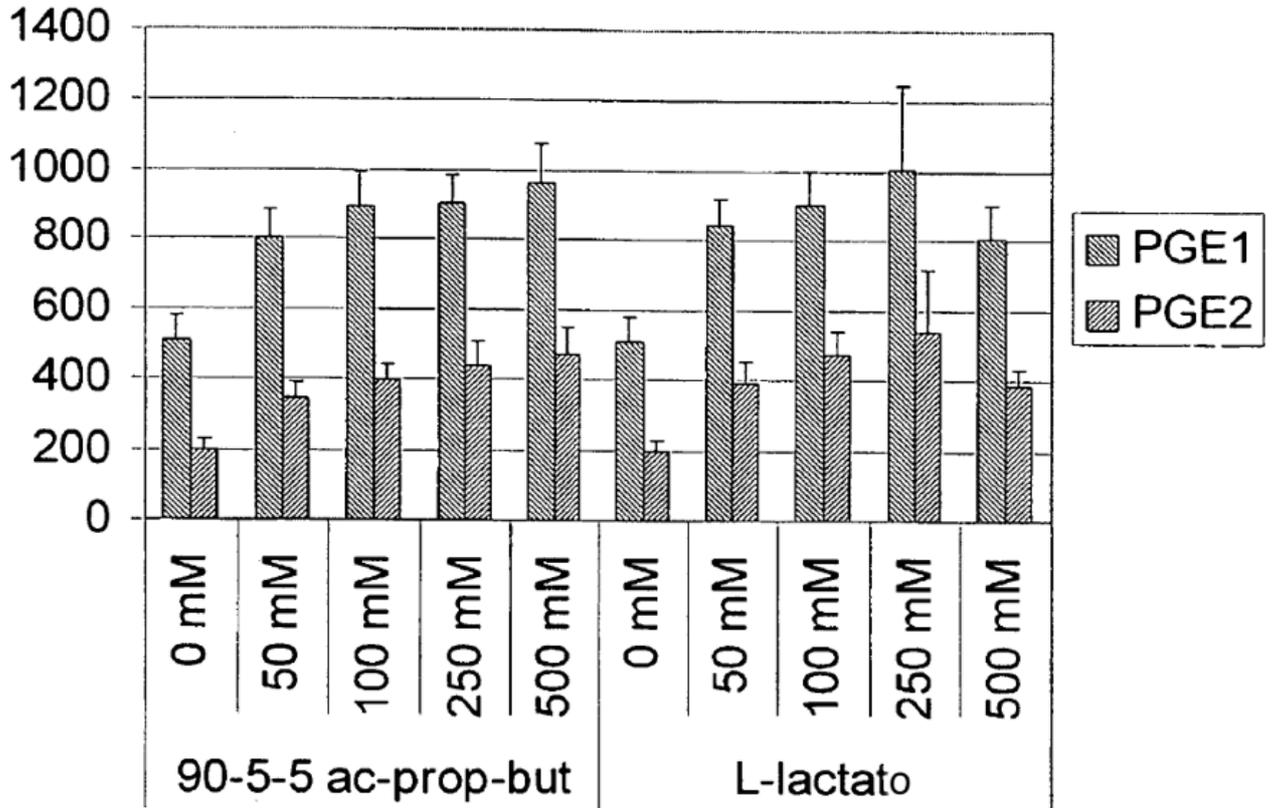


Fig 5

