

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 662**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/115** (2006.01)

**A23L 33/19** (2006.01)

**A23L 33/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2020 PCT/EP2020/070613**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2021 WO21013862**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2020 E 20742735 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024 EP 4003061**

54 Título: **Composición nutricional que comprende grasa láctea e inmunoglobulina**

30 Prioridad:

**23.07.2019 EP 19187688**

**20.05.2020 EP 20175745**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.10.2024**

73 Titular/es:

**FRIESLANDCAMPINA NEDERLAND B.V. (100.0%)  
Stationsplein 4  
3818 LE Amersfoort, NL**

72 Inventor/es:

**VAN NEERVEN, RUPRECHT JULES JOOST**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 983 662 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 que comprende grasa láctea e inmunoglobulina

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La invención dada a conocer en el presente documento se refiere al campo de las composiciones nutricionales. Más en particular, la invención se refiere a una composición nutricional que comprende grasa láctea de rumiante e inmunoglobulina de rumiante.

10

**ANTECEDENTES**

Las composiciones nutricionales para lactantes pretenden asemejarse a la leche humana tanto como sea posible, ya que la leche humana se considera en general la fuente ideal de nutrición para lactantes de hasta al menos 6 meses de edad. Aunque las fórmulas infantiles han mejorado cada vez más a lo largo del tiempo, hay todavía diferencias importantes entre la leche humana y las fórmulas infantiles.

15

Se han aplicado combinaciones de grasa láctea y grasa vegetal en productos de nutrición para los primeros años, porque estas son necesarias para obtener la composición de ácidos grasos correcta de las fórmulas de nutrición para los primeros años. Sin embargo, los productos de nutrición para los primeros años con grasa vegetal como única fuente de grasa son más comunes.

20

El tracto intestinal contiene la interfaz más grande del cuerpo entre una persona y su entorno externo. Impide la fuga de componentes alimenticios y microbianos al interior de los tejidos, lo que puede dar lugar a inflamación y reacciones adversas a alimento (alergia e intolerancia alimentarias). La complejidad de su función es obvia cuando se piensa que al mismo tiempo el intestino tiene que servir para dos funciones opuestas; la permeabilidad selectiva de nutrientes necesarios desde la luz intestinal a la circulación y al medio interno en general y, por otro lado, la prevención de la penetración de entidades nocivas incluyendo microorganismos, antígenos lumenales, alérgenos alimenticios y factores proinflamatorios lumenales. La última función se conoce como función de barrera.

25

30

La función de barrera del intestino comprende cuatro líneas de defensa principales: 1) La barrera biológica, que está constituida por la flora intestinal normal (microbiota intestinal) responsable de la resistencia a la colonización; 2) La barrera inmune, que está compuesta por el tejido linfoide asociado con el intestino (GALT), células T efectoras y reguladoras, células B (plasmáticas) productoras de IgA, células linfoides innatas del grupo 3, y macrófagos residentes y células dendríticas en la lámina propia; 3) La barrera mecánica, que consiste en la capa mucosa y las células epiteliales intestinales de revestimiento cerrado. Las células epiteliales entran en el contacto más estrecho posible en la parte más apical de las membranas celulares laterales ("puntos de beso") mediante estructuras específicas denominadas "uniones estrechas" (TJ), que interconectan las células y restringen el paso de iones, moléculas y células a través del espacio paracelular, y 4) además de la barrera física de mucosidad y la capa epitelial, existe una barrera química que consiste en secreciones digestivas, péptidos antimicrobianos y otros productos celulares derivados de las células epiteliales y células inmunitarias en la mucosa subyacente (citocinas, mediadores inflamatorios, etc.).

35

40

Las personas ancianas tienen un número aumentado de infecciones y quejas intestinales. Esto está ligado a menudo a una función de barrera disminuida en las personas mayores. Sin embargo, en combinación con enfermedad crónica, por ejemplo, diabetes tipo 2, o COPD, la función de barrera intestinal está comprometida en las personas ancianas (Valentini *et al.*, 2014). Esto puede explicar en parte la molestia y las infecciones del tracto GI aumentadas observadas en las personas ancianas (Hall *et al.*, 2005; Man *et al.*, 2014).

45

De hecho, un funcionamiento disminuido de la función de barrera intestinal - independiente de las senescencia - se ha observado para trastornos intestinales como infección intestinal y diarrea, celiaquía, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome del intestino irritable, alergia (alimentaria), pero también para trastornos extraintestinales como artritis, obesidad y diabetes tipo 1 y 2 (Bischoff 2011; 2014; Turner 2009). La vinculación entre la función de barrera intestinal y enfermedades crónicas está ligada al menos en parte a la composición de la microbiota y la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) disminuida. Se conoce ampliamente que los SCFA potencian la función de barrera en las células epiteliales (D'Souza *et al* 2017; Bach Knudsen 2018). Los SCFA son ácidos grasos con colas alifáticas cortas que consisten en de 1 a 6 átomos de carbono. Se producen cuando fibra dietética, polisacáridos no de almidón, como GOS, se fermentan en el colon.

55

Se conoce el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) como receptor para dioxina, y se ha usado para examinar tales componentes en alimentos. Este receptor puede desempeñar un papel en la función de barrera intestinal y la vigilancia inmune en el intestino (Li 2011). Los ratones deficientes en AhR tienen una función de barrera deteriorada y se produce una traslocación potenciada de bacterias intestinales (Li 2011). Los ligandos para AhR son normalmente metabolitos de triptófano derivados de microbiota o componentes encontrados en algunas verduras tales como coliflor y brócoli. Se ha descrito que algunos ligandos de AhR están presentes también en la leche materna.

60

65

Recientemente, la activación de AhR que conduce a producción de IL-22 se vinculó también a la prevención de la diabetes tipo 2 (Natividad 2018).

5 En (pre)diabetes, se han observado disminuciones en varias bacterias intestinales que producen ácidos grasos de cadena corta (SCFA), principalmente butirato. Además, la composición de la microbiota se ha vinculado a una mayor glucemia en las personas ancianas, así como a síndrome metabólico (Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

10 La mayoría de la leche disponible comercialmente de rumiantes es leche bovina. La leche bovina contiene muchos componentes que tienen propiedades inmunomoduladoras y antimicrobianas. Las inmunoglobulinas bovinas (blg), en particular IgG bovina (blgG), se han estudiado desde la década de 1970 por sus potenciales efectos sobre la inmunidad y la infección en humanos.

15 La leche bovina, el calostro y el suero contienen tres tipos de inmunoglobulinas: inmunoglobulina G (IgG), IgA e IgM.

En la leche bovina, la IgG es el isotipo principal presente, especialmente en calostro, seguido de IgA e IgM. La IgA está presente en la leche y el calostro como IgA secretoria (slgA). En la leche madura, la IgG es el isotipo dominante, mientras que slgA e IgM están presentes a niveles aproximadamente 5-10 veces menores. La concentración de IgG en la leche madura es de alrededor de 200-700 µg/ml. En el calostro, los niveles de IgG son mucho mayores, alcanzando hasta 50-100 mg/ml en los primeros días tras el nacimiento.

20 Las inmunoglobulinas bovinas como IgG pueden unirse a muchas bacterias y virus, incluyendo patógenos humanos, ofreciendo de ese modo prevención frente a la transferencia bacteriana y la fuga de componentes bacterianos a través del epitelio intestinal, modulando la expresión de proteínas de unión estrecha epiteliales, e inhibe la inflamación intestinal.

25 El papel potencialmente mitigador de la blgG en respuestas inflamatorias intestinales asociadas con una función de barrera intestinal disminuida y los efectos de las inmunoglobulinas y el calostro se han abordado en modelos humanos y animales para enterocolitis necrotizante (NEC), síndrome del intestino irritable (IBS), enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), daño intestinal inducido por fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y endotoxemia perioperatoria.

30 Las inmunoglobulinas pueden aislarse o concentrarse a partir de lecha o calostro usando métodos conocidos en la técnica (documento EP2280999, documento WO 94/13148, documento WO 01/03515 o de Heino *et al.*, Functional properties of native and cheese whey protein concentrate powders, International Journal of Dairy Technology, vol. 60, n.º 4, nov. de 2007, págs. 277-285).

35 El documento US2013/0011415 se refiere a anticuerpos específicos de antígenos derivados de la leche para generar una respuesta inmune adaptativa, métodos de preparación y usos de los mismos. Da a conocer un método para potenciar y/o inducir una respuesta inmune adaptativa en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo que lo necesite un anticuerpo específico de antígeno obtenido a partir de la leche, producto lácteo, calostro o producto de calostro de un rumiante.

40 El documento US2014/0296179 da a conocer un método y una composición para el tratamiento y/o la prevención de una infección, comprendiendo dicho método administrar por vía oral una composición a un mamífero, comprendiendo dicha composición un oligosacárido indigestible que contiene galactosa e inmunoglobulina de la leche o el calostro de vacas hiperinmunizadas. Da a conocer además un método de reducción de la incidencia de episodios de infección del tracto respiratorio que comprende administrar a un mamífero lactante que lo necesite una composición de fórmula infantil líquida que comprende: (a) 0,5-10 gramos de transgalacto-oligosacárido por 100 gramos en peso seco de la composición; y (b) 0,5-10 gramos de fructo-polisacárido por 100 gramos en peso seco de la composición.

45 Cuando se produce una fórmula infantil u otro producto lácteo, la legislación requiere el calentamiento de la fórmula por motivos de seguridad, provocando de ese modo una desnaturalización de las inmunoglobulinas presentes en la formulación porque las inmunoglobulinas son sensibles al calor. Empiezan a desnaturalizarse a temperaturas de alrededor de 70°C o más. Se conoce que a pH ácido (< 5,0) la susceptibilidad hacia la desnaturalización es incluso mayor.

50 Con el fin de usarse como ingrediente activo, profiláctico, en productos alimenticios para humanos, una cantidad significativa de inmunoglobulinas bovinas tiene que consumirse en su forma intacta y tiene que ser capaz de sobrevivir al paso a través del estómago al intestino delgado, o incluso a través de todo el tracto gastrointestinal (GI).

55 Sorprendentemente, se ha encontrado que la grasa láctea bovina difiere de la grasa vegetal porque comprende otros ligandos que pueden activar el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) de manera más potente. (La activación de) El receptor Ahr está asociado inversamente con infección intestinal y diarrea, enfermedad intestinal, síndrome del intestino irritable, celiacía, así como alergia alimentaria y enfermedades no comunicables tal como diabetes tipo

2. Para fomentar la función de barrera intestinal se proporciona una composición nutricional que comprende grasa láctea e inmunoglobulinas de rumiante, que contiene preferiblemente también uno o más de oligosacáridos, prebióticos o probióticos de leche humana. Una composición de este tipo proporciona un soporte doble o incluso triple para la función de barrera intestinal: los componentes de activación de AhR presentes en la grasa láctea fomentan la producción y excreción de péptidos antimicrobianos al interior de la luz intestinal b) proporcionando inmunoglobulinas bovinas funcionalmente intactas, como IgG, previene la infección y la aparición de inflamación y daño tisular como resultado de una infección y/o fuga de componentes bacterianos al interior de la mucosa y opcionalmente c) aumentando la producción de ácidos grasos de cadena corta mediante la microbiota administrando prebióticos u oligosacáridos no digeribles. Las preparaciones con IgG bovina contienen preferiblemente también otras proteínas lácteas bioactivas que pueden influir en la función de barrera, por ejemplo, lactoferrina o TGF-β.

La composición de la invención es particularmente útil para lactantes y niños jóvenes ya que son susceptibles de desarrollar infecciones en el tracto gastrointestinal. Una buena función de barrera intestinal es de importancia clave para protegerles frente a una infección. La composición de la invención es también particularmente útil para personas ancianas con intestino reducido, salud intestinal comprometida u otras molestias relacionadas con el intestino como infecciones o trastornos inflamatorios. Adicionalmente, o alternativamente, la composición de la invención puede usarse para aliviar los efectos de la diabetes tipo 2.

### SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se refiere al contenido de las reivindicaciones.

Por consiguiente, en un primer aspecto la invención se refiere a una composición nutricional sintética que comprende

- i. grasa láctea de rumiante, siendo la grasa láctea capaz de activar el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en un ensayo de actividad de AhR tal como se define en el ejemplo 1; y
- ii. una inmunoglobulina de rumiante en una cantidad de entre 115 µg y 50 mg por gramo de composición seca;

caracterizada porque al menos el 30% de la inmunoglobulina de rumiante no está desnaturalizado y siendo la cantidad de grasa láctea de entre 10 y 60 g de grasa por 100 gramos de fórmula, siendo la cantidad de grasa de rumiante de entre el 5 y el 90% en peso según se determina con respecto a la cantidad total de grasa, y no exponiéndose la grasa láctea de rumiante a un pH < 5,0.

La invención se refiere además al uso de una composición de este tipo en una fórmula para prematuros, una fórmula para lactantes, una fórmula de continuación o fórmula para niños jóvenes, o alternativamente en una formulación para adultos o ancianos. El uso de una composición de este tipo se da a conocer para tratar una cualquiera o más de las indicaciones seleccionadas del grupo que consiste en función de barrera intestinal disminuida, enterocolitis necrotizante (NEC), síndrome del intestino irritable (IBS), enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), daño intestinal inducido por fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y endotoxemia perioperatoria, o para tratar diabetes tipo 2. De manera similar, una composición de este tipo se da a conocer para el uso en el tratamiento de una cualquiera o más de las indicaciones seleccionadas del grupo que consiste en función de barrera intestinal disminuida, enterocolitis necrotizante (NEC), síndrome del intestino irritable (IBS), enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), daño intestinal inducido por fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y endotoxemia perioperatoria; o para tratar diabetes tipo 2.

### DEFINICIONES

El término "tratamiento", en relación con una enfermedad o trastorno dado, incluye, pero no se limita a, inhibir la enfermedad o trastorno, por ejemplo, detener el desarrollo de la enfermedad o trastorno; aliviar la enfermedad o trastorno, por ejemplo, provocar la regresión de la enfermedad o trastorno; o aliviar un estado provocado por o que resulta de la enfermedad o trastorno, por ejemplo, aliviar, prevenir o tratar síntomas de la enfermedad o trastorno.

El término "prevención" en relación con una enfermedad o trastorno dado significa prevenir la aparición del desarrollo de enfermedad si ninguno se había producido, prevenir que la enfermedad o trastorno ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto al trastorno o enfermedad, pero todavía no se le ha diagnosticado como que tiene el trastorno o enfermedad, y/o prevenir el desarrollo de enfermedad/trastorno adicional si ya está presente.

También se entiende que esta invención no se limita a las realizaciones y métodos específicos descritos en el presente documento, ya que componentes y/o condiciones específicos pueden, naturalmente, variar. Además, la terminología usada en el presente documento se usa solo con el propósito de describir realizaciones particulares de la presente invención y no se pretende que esté limitada de modo alguno.

También tiene que indicarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, la forma singular “un”, “una” y “el/la” comprende los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, se pretende que la referencia a un componente en singular comprenda una pluralidad de componentes.

5 Se entenderá que dentro de esta divulgación, cualquier referencia a un peso, relación en peso y similares se refiere a la materia seca, en particular la materia seca de la composición, a menos que se especifique lo contrario.

10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen generalmente el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “que comprende”, que es sinónimo de “que incluye” o “que contiene”, es de extremos abiertos y no excluye un(os) elemento(s), un(os) ingrediente(s) o etapa(s) de método no citado(s), adicional(es), mientras que el término “que consiste en” es un término cerrado, que excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente adicional que no se cite explícitamente.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “que consiste esencialmente en” es un término parcialmente abierto, que no excluye un(os) elemento(s), una(s) etapa(s) o un(os) ingrediente(s) no citado(s), adicional(es), siempre que esto(s) elemento(s), etapa(s) o ingrediente(s) adicional(es) no afecte(n) materialmente a las propiedades básicas y novedosas de la invención.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “que comprende” (o “comprende(n)”) incluye por tanto el término “que consiste en” (“consiste(n) en”), así como el término “que consiste esencialmente en” (“consiste(n) esencialmente en”). Por consiguiente, el término “que comprende” (o “comprende(n)”) se pretende, en la presente solicitud, que abarque más particularmente el término “que consiste en” (“consiste(n) en”) y el término “que consiste esencialmente en” (“consiste(n) esencialmente en”).

30 A lo largo de esta solicitud, cuando se haga referencia a publicaciones, las divulgaciones de estas publicaciones en sus totalidades se incorporan por la presente mediante referencia a esta solicitud para describir de manera más completa el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

35 El término “sujeto” tal como se usa en el presente documento se refiere a un humano. El término “sujeto” se refiere al sexo tanto masculino como femenino a menos que se indique específicamente un sexo. El sujeto humano puede ser un lactante, un menor, un adolescente, un adulto o un sujeto anciano.

40 Tal como se usa en el presente documento, “administrar una composición a una persona” comprende alimentar una persona tal como un niño, bebé o lactante, también incluye que la persona coma o beba la composición. La vía de administración preferida es administración oral.

Se usan las abreviaturas usuales para diferentes unidades, por ejemplo, “mg” se usa para indicar miligramo, mientras que “µg” indica microgramo.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “composición nutricional sintética” o una “composición sintética” se refiere a una composición nutricional producida por los hombres. Un “composición sintética” se prepara artificialmente y significa preferiblemente una composición que comprende al menos un compuesto que se produce *ex vivo* química y/o biológicamente, por ejemplo, por medio de reacción química, reacción enzimática; o un producto que se aísla o se concentra a partir de una mezcla de productos. La concentración se define como un aumento en el % en peso del producto, basado en la materia seca, con respecto a la composición total en la que está. Una composición sintética no es idéntica a una composición que se produce de manera natural, es decir no es leche producida por un rumiante tal como leche de vaca, leche de cabra o leche de oveja. Además, en algunas realizaciones, las composiciones sintéticas pueden comprender uno o más componentes nutricional o farmacéuticamente activos que no afecten adversamente a la eficacia de los compuestos mencionados anteriormente. Algunas realizaciones no limitativas de una composición sintética de la invención se describen también más adelante.

55 La actividad biológica de una proteína depende no solo del orden de los aminoácidos (estructura primaria), sino también de la manera en la que está plegada (estructura 3D). Una “no desnaturalizada”, o una proteína “funcionalmente activa” tal como se usa en el presente documento, significa que la proteína no está desnaturalizada o no está plegada, por ejemplo, como resultado de tratamiento térmico, y que puede detectarse mediante métodos que discriminan entre inmunoglobulinas desnaturalizadas e intactas, tal como ensayos ELISA que pueden discriminar entre IgG en leche en polvo UHT pasteurizada (que no se detecta), e IgG en leche cruda (que se detecta). Puede mostrarse que una inmunoglobulina de rumiante, funcionalmente intacta, no desnaturalizada, se une a bacterias o virus patógenos tal como se describe por den Hartog *et al* (Den Hartog *et al* 2014). Esto distingue estas inmunoglobulinas de inmunoglobulinas desnaturalizadas que no pueden unirse a sus respectivos antígenos y no pueden tener actividad funcional (Ohnuki 2005). Tal como se usa en el presente documento, se dice que una

inmunoglobulina es "biológicamente activa", puede igualmente denominarse como que la inmunoglobulina está intacta, o está funcionalmente intacta, en otras palabras no estando desnaturalizada la inmunoglobulina.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La invención se refiere al contenido de las reivindicaciones.  
En un primer aspecto, la invención proporciona una composición nutricional sintética que comprende:

- 10 i. grasa láctea de rumiante, siendo la grasa láctea capaz de activar el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en un ensayo de actividad de AhR tal como se define en el ejemplo 1; y
- ii. una inmunoglobulina de rumiante en una cantidad de entre 115 µg y 50 mg por gramo de composición

15 seca;  
caracterizada porque al menos el 30% de la inmunoglobulina de rumiante no está desnaturalizada, y siendo la cantidad de grasa láctea de entre 10 y 60 g de grasa por 100 gramos de fórmula, siendo la cantidad de grasa de rumiante de entre el 5 y el 90% en peso según se determina con respecto a la cantidad total de grasa, y no estando expuesta la grasa láctea de rumiante a un pH < 5,0. Preferiblemente, al menos el 40% de la inmunoglobulina de rumiante no está desnaturalizada, más preferiblemente al menos el 50%, por ejemplo, el 60%, de manera particularmente preferible, al menos el 70% no está desnaturalizado, lo más preferiblemente al menos el 80% no está desnaturalizado.

20 El término "grasa láctea de rumiante" tal como se usa a este respecto se refiere a una fuente de grasa láctea de leche de rumiantes, preferiblemente grasa láctea bovina. La fuente de grasa láctea puede en principio ser cualquier fuente de grasa láctea de rumiante disponible, tal como leche entera, nata, grasa láctea anhidra (AMF) o fracciones de grasa láctea que resultan de fraccionamiento seco, extracción de CO<sub>2</sub> crítico u otros métodos de fraccionamiento conocidos en la técnica. Sin embargo, se encontró particularmente adecuado usar leche entera y/o nata como fuente de grasa láctea. Preferiblemente, la grasa láctea de rumiante es grasa láctea bovina y la grasa se selecciona del grupo que consiste en leche entera, nata y grasa láctea anhidra (AMF). Más preferiblemente, el bovino es una vaca. En una realización, la grasa láctea es leche entera o nata bovina. En una realización, la grasa láctea de rumiante es bovina leche entera, en otra realización, la grasa láctea de rumiante es nata bovina, en todavía otra realización, la grasa láctea de rumiante es AMF bovina. La leche de rumiante usada para obtener la grasa láctea de rumiante, y la grasa láctea de rumiante no deben exponerse a altas temperaturas o pH ácido (pH < 5,0), ya que esto reducirá la capacidad de activar el receptor AhR. En este contexto, una temperatura por encima de 80°C se considera una alta temperatura, preferiblemente la temperatura no supera los 75°C, más preferiblemente no supera los 74°C, de manera particularmente preferible no supera los 72°C, lo más preferiblemente no supera los 69°C. Igualmente, el tiempo durante el que la leche o grasa láctea se expone a una temperatura elevada debe ser tan corto como sea posible. Como tal, pueden aplicarse técnicas convencionales para producir diferentes fuentes de grasa láctea como leche entera, nata, grasa láctea anhidra (AMF) o fracciones de grasa láctea que resultan de fraccionamiento seco, extracción de CO<sub>2</sub> crítico u otros métodos de fraccionamiento. Si es necesaria una etapa de pasteurización, por ejemplo, para cumplir requisitos legales, esta es posible, pero una exposición innecesaria a altas temperaturas debe evitarse y por tanto la grasa láctea o fuente de grasa láctea debe mantenerse a temperaturas por debajo de 22°C, preferiblemente por debajo de 10°C, más preferiblemente por debajo de 5°C, tanto como sea posible. Alternativamente, la grasa láctea de rumiante puede obtenerse de leche fresca.

25 Se entiende que las combinaciones de temperatura y tiempo para tratar la grasa láctea o para tratar la leche de la que se deriva la grasa láctea, o cualquier otro componente de la composición de la invención, debe someterse a condiciones de pasteurización legales si se requiere en la aplicación del producto de la invención, por ejemplo, tal como se define en el Reglamento (CE) n.º 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo del 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios. Por ejemplo, las condiciones de pasteurización legales incluyen un tratamiento que implica una temperatura de al menos 60°C durante al menos 30 minutos o que implica una temperatura mayor durante un tiempo más corto, tal como al menos 72°C durante al menos 15 segundos o cualquier otra combinación de condiciones de tiempo-temperatura que dé como resultado un efecto equivalente, por ejemplo, como puede mostrarse mediante una prueba de fosfatasa negativa inmediatamente tras tal tratamiento. Tales pruebas y técnicas de pasteurización se conocen ampliamente en la técnica. Si el componente de grasa láctea aún no está combinado con el componente de Ig, pueden ser posibles temperaturas por encima de 80°C durante un periodo limitado (segundos) para cumplir los requisitos regulatorios. Las condiciones adecuadas pueden determinarse fácilmente usando el un ensayo AhR por ejemplo, un bioensayo de gen indicador PAH CALUX® basado en AhR tal como se da a conocer en el ejemplo 1.

30 Procesos para preparar un polvo, por ejemplo, leche entera en polvo, se conocen en la técnica, por ejemplo, secado por pulverización o secado por congelación, por ejemplo, tal como se describe en Dairy Science and Technology 2<sup>nd</sup> Edition (P. Walstra, J.T.M. Wouters y T.J. Geurts, CRC Press Taylor&Francis 2006, capítulo 20). Tales procesos son flexibles y pueden usarse a temperaturas por debajo o por encima de 80°C.

La composición de la invención puede prepararse mezclando la fracción de leche y la fracción de inmunoglobulina en un estado líquido o seco. Si se mezcla en un estado líquido, entonces puede secarse usando métodos conocidos en la técnica. La grasa láctea de rumiante (por ejemplo, bovina) puede aplicarse en composiciones nutricionales en las que entre el 5% y el 100% del contenido de grasa total en la composición está hecho de grasa láctea bovina, preferiblemente entre el 10% y el 90% de la grasa en la composición está constituido por grasa láctea, más preferiblemente del 20 al 80% de toda la grasa en la composición es grasa láctea bovina, lo más preferiblemente del 20 al 60% de toda la grasa en la composición nutricional es grasa láctea bovina. En otra realización, la cantidad de grasa láctea bovina en la composición de la invención es de entre el 45 y el 55% de la cantidad total de grasa (es decir de toda la grasa) en la composición.

Como se muestra en los ejemplos, la grasa láctea tiene ligandos distintos a grasa vegetal para activar AhR. Así, en una realización, la composición de la invención comprende preferiblemente una mezcla de grasa vegetal y láctea de rumiante. La cantidad de grasa láctea de rumiante está por debajo del 90% en peso en comparación con la cantidad total de grasa, por ejemplo, por debajo del 80% en peso, preferiblemente por debajo del 65%, más preferiblemente por debajo del 50% en peso. La cantidad de grasa láctea de rumiante es de al menos el 5% en peso en comparación con la cantidad total de grasa en la composición, por ejemplo, al menos el 10% en peso, preferiblemente al menos el 20% en peso, más preferiblemente al menos el 30% en peso, de manera particularmente preferida la cantidad de grasa láctea es de al menos el 40% en peso en comparación con la cantidad total de grasa en la composición. La cantidad de grasa en la composición depende de la población diana. Puede ser de entre 5 y 50 gramos por 100 gramos de composición seca. Preferiblemente, es de entre 10 y 40 gramos por 100 gramos de composición seca, más preferiblemente entre 15 y 35 gramos. De manera particularmente preferible, la cantidad total de grasa es de entre 10 y 40 gramos por 100 gramos de composición seca y la cantidad de grasa de rumiante es de entre el 10 y el 90% en peso de grasa total. Incluso más preferiblemente, la cantidad total de grasa es de entre 10 y 40 gramos por 100 gramos de composición seca y la cantidad de grasa de rumiante es de entre el 20 y el 80% en peso de grasa total.

La cantidad de inmunoglobulina es de entre 115 µg y 50 mg por gramo de composición seca; y la cantidad de grasa láctea es de entre 10 y 60 g de grasa por 100 gramos de fórmula, siendo la cantidad de grasa de rumiante de entre el 5 y el 90% en peso según se determina con respecto a la cantidad total de grasa.

La actividad biológica de la inmunoglobulina puede someterse a prueba usando métodos conocidos en la técnica. En una realización, la actividad biológica de la inmunoglobulina se determina en un ensayo ELISA que discrimina entre inmunoglobulinas nativas y desnaturalizadas. Tales métodos están disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, <https://www.bethyl.com/> en la subpágina product/E10-118/Bovine+IgG+ELISA+Quantitation+Set y <https://www.bethyl.com/> en la subpágina product/E11-118/Bovine+IgG+ELISA+Kit), y tales métodos se han descrito previamente en el documento WO2008127105A1 y el documento WO2011087364A1. Las inmunoglobulinas de rumiante son normalmente sensibles al calor y la inactivación por calor da como resultado la pérdida de detección en ELISA (por ejemplo, Li *et al* 2006, J Agric Food Chem, 54 págs. 739-746; Godden *et al*, 2006 J. Dairy Sci, 89 págs. 3476-3483; Ohnuki *et al*, 2005, Animal Science Journal 76 págs. 283-290).

En otra realización, la actividad biológica de la inmunoglobulina puede someterse a prueba detectando la unión de la inmunoglobulina a un alérgeno o patógeno humano. Esto se ha descrito, por ejemplo, en detalle en Den Hartog *et al* 2014, Ohnuki 2005, y en el documento WO2008127105A1. Se conoce que la unión de inmunoglobulinas a alérgenos o patógenos humanos se reduce o desaparece tras la desnaturalización de estas proteínas, por ejemplo, mediante altas temperaturas.

Las inmunoglobulinas (Ig) son sensibles al calor. Así, con el fin de mantenerse biológicamente activas, las fracciones de leche que comprenden Ig preferiblemente no se expone a unas temperaturas por encima de 80°C, preferiblemente la temperatura no supera los 75°C, más preferiblemente no supera los 74°C, de manera particularmente preferible no supera los 72°C, lo más preferiblemente no supera los 69°C. Igualmente, el tiempo durante el que la leche o grasa láctea se expone a una temperatura elevada debe ser tan corto como sea posible. Tal como se indicó anteriormente, la fracción de Ig o la leche a partir de la que se derivan las Ig, o cualquier otro componente de la composición de la invención, puede someterse a condiciones de pasteurización legales si se requiere en la aplicación del producto de la invención.

La invención tal como se da a conocer en el presente documento se refiere a grasa láctea de rumiante e inmunoglobulinas de rumiante (también denominadas anticuerpos). Preferiblemente, dicho rumiante es una vaca, preferiblemente un miembro del género *Bos*, más preferiblemente el rumiante es de las especies *Gayal*, *Bos frontalis* (gauro doméstico), *Bos mutus* (yak) o *Bos taurus* (ganado doméstico). En otra realización, el rumiante es una cabra o una oveja, preferiblemente un miembro de la subfamilia *Caprinae*, más preferiblemente un miembro de los géneros *Ovis* o *Capra*. Del género *Ovis*, se prefiere la especie *Ovis aries* (oveja doméstica). Del género *Capra*, se prefiere la especie *Capra aegagrus hircus* (la cabra domesticada). En otra realización, dicho rumiante es un camello, un burro, un búfalo, un caballo o una llama. El rumiante más preferido es una vaca.

En una realización, la inmunoglobulina en la composición de la invención se selecciona de una o más del grupo que consiste en IgG, IgA, IgM, sIgA, siendo preferiblemente la inmunoglobulina IgG, siendo más preferiblemente IgG1

como IgG1 la más abundante en leche bovina. En otra realización, la inmunoglobulina es IgA o sIgA. (s)IgA está presente en altos niveles en leche materna humana.

En bovinos, el calostro es la primera leche producida por una vaca justo antes y poco (hasta 4 días) tras dar luz a un ternero. El calostro contiene niveles muy altos de inmunoglobulinas bovinas, hasta 50-100 mg/ml (frente alrededor de 1 mg/ml para la leche normal). IgG1 es el isotipo de inmunoglobulina predominante en el calostro bovino y en la leche. Las inmunoglobulinas en el calostro se absorben en la sangre por parte de los terneros para protegerles frente a la infección. Los niveles de inmunoglobulina en el calostro son aproximadamente 50-100 veces mayores que en la leche normal. Otra fuente rica de inmunoglobulinas es el suero, por ejemplo, recogido cuando se sacrifican los rumiantes.

La grasa láctea tal como se usa en la presente invención es grasa láctea que activa el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en un ensayo de actividad de AhR. Tales ensayos indicadores se conocen en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 1 y en Pieterse *et al* 2013 (Pieterse *et al*, 2013, Environ Sci Technol. 47(20) págs. 11651-9. doi: 10.1021/es403810w). Puede accederse a tales ensayos, por ejemplo, a través de BioDetection Systems BV, Ámsterdam, Países Bajos, alternativamente, tales kits de ensayo de receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) humano están disponibles de Indigo Biosciences, PA, EE. UU. (<https://indigobiosciences.com/> en indigo-kits-services/aryl-hydrocarbon-receptor/). La activación del receptor de hidrocarburos de arilo se determina usando un ensayo Calux, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 1 (véase más adelante).

La composición nutricional de la invención comprende 115 µg - 50 mg de anticuerpo de rumiante (es decir inmunoglobulina) por gramo de composición nutricional. Las cantidades se indican como anticuerpo de rumiante en peso por composición nutricional en peso en total (incluyendo así el anticuerpo de rumiante). La composición nutricional comprende preferiblemente 200 µg-20 mg de anticuerpos de rumiante por gramo de composición nutricional, más preferiblemente 0,2-5 mg de anticuerpos de rumiante por gramo de composición nutricional. Los intervalos son para el peso seco de la composición.

Las composiciones nutricionales acuosas tienen normalmente una menor cantidad de anticuerpo de rumiante por cantidad de composición líquida. La denominada "fórmula líquida" está hecha normalmente a partir de composición nutricional seca disolviendo polvo en agua. La relación es normalmente de 16,5 gramos de polvo en 90 ml de agua para obtener una fórmula líquida de 100 ml.

Las composiciones nutricionales acuosas de la invención comprenden así 0,16 µg/ml – 8,3 mg/ml de anticuerpos de rumiante. Las cantidades se indican como anticuerpo de rumiante en peso por ml de la composición nutricional en total (incluyendo así el anticuerpo de rumiante). La composición nutricional acuosa comprende preferiblemente 33 µg/ml - 3,3 mg/ml de anticuerpos de rumiante, preferiblemente 33 µg/ml – 0,8 mg/ml de anticuerpos de rumiante en la composición nutricional reconstituida. La cantidad de anticuerpo en la composición reconstituida se refiere a la cantidad total de anticuerpo de rumiante en la composición tras haberse mezclado con un líquido similar al agua de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con la composición. A la hora de determinar el contenido de anticuerpo, se dice que una composición es acuosa cuando contiene al menos el 75% de agua con respecto al peso de la composición total (p/p). Esto es independiente del uso de agentes gelificantes o la viscosidad de la composición.

Según la presente invención, un producto seco o un producto en un estado seco comprende al menos el 70% en peso de materia seca, más preferiblemente al menos el 73% en peso de materia seca, o el 75% en peso de materia seca, más preferiblemente al menos el 77% en peso de materia seca, o el 80% en peso de materia seca, más preferiblemente al menos el 82% en peso de materia seca o el 85% en peso de materia seca, más preferiblemente al menos el 87% en peso de materia seca, o el 90% en peso de materia seca, y lo más preferiblemente al menos el 92% en peso de materia seca o el 95% en peso de materia seca o incluso más del 98% en peso de materia seca. En una realización, la composición sintética de la invención es un producto seco.

La cantidad de inmunoglobulina en la composición nutricional de la invención es de entre 115 µg y 50 mg por gramo de composición seca; y la cantidad de grasa láctea es de entre el 5 y el 90% en peso de la cantidad total de grasa en la composición.

La composición puede contener también uno o más ingredientes prebióticos conocidos en la técnica. Ejemplos de prebióticos adecuados son fructo- y/o galacto-oligosacáridos, con cadenas cortas o largas, inulina, oligosacáridos que contienen fucosa, beta-glicanos, harina de algarroba, gomas, pectinas, sialiloligosacáridos, sialil-lactosa, galactanos con cadenas cortas o largas, glucosaminogalactanos y otros nucleótidos y oligosacáridos que contienen glucosamina. En una realización preferida, la composición de la invención comprende sialil-lactosa y GOS. Opcionalmente, la composición puede comprender además oligosacáridos de leche humana y/u oligosacáridos no digeribles para inducir una microbiota que produce ácidos grasos de cadena corta (SCFA). Estos SCFA son importantes para fomentar la función de barrera y también para prevenir la inflamación (relacionada con infección) en la mucosa intestinal. Así, en otra realización, la composición de la invención comprende además uno o más oligosacáridos seleccionados del grupo que consiste en oligosacáridos de leche humana (HMO) y oligosacáridos no digeribles. En una realización, la cantidad de HMO es de entre 0,01 y 5,0 gramos por 100 gramos de composición

(peso seco), preferiblemente entre 0,1 y 4,0 gramos por 100 gramos de composición. En otra realización, la cantidad de oligosacárido no digestible es de entre 0,1 y 25 gramos por 100 gramos de composición seca, preferiblemente entre 1 y 20 gramos, más preferiblemente entre 2 y 15 gramos. En aún otra realización, la cantidad de HMO es de entre 0,01 y 5,0 gramos por 100 gramos de composición y la cantidad de oligosacárido no digestible es de entre 0,1 y 25 gramos por 100 gramos de composición seca.

Los oligosacáridos de leche humana (HMO) son un constituyente clave de la leche humana. Son un grupo estructural y biológicamente diverso de carbohidratos indigestibles complejos. Hasta la fecha, se han identificado más de 200 oligosacáridos diferentes, variando en tamaño desde 3 hasta 22 unidades de monosacárido. Los HMO más comunes son los oligosacáridos fucosilados y no fucosilados neutros. La cantidad y la estructura de estos HMO difieren significativamente entre las mujeres y dependen del estado de grupo sanguíneo secretor y de Lewis (L. Bode, J. Nutr. 136: 2127-2130, 2006). Se ha encontrado que los HMO fucosilados son el componente más prominente (~77%), mientras que los HMO sialilados representaban aproximadamente el 16% de la abundancia total de HMO. Los HMO fucosilados son moléculas neutras, mientras que los HMO sialilados son ácidos. En una realización, la composición de la invención comprende uno o más HMO.

Los HMO de la leche humana se componen de diversos monosacáridos, concretamente glucosa, galactosa, fucosa, N-acetilglucosamina y ácidos siálicos (ácido N-acetilneuramínico). El azúcar fucosa es una molécula inusual porque tiene la configuración L, mientras que las otras moléculas de azúcar en el cuerpo tienen la configuración D. La estructura de los HMO es una unidad de lactosa que puede alargarse en el extremo no reductor con uno o más residuos galactosa y/o N-acetilglucosamina (estructura de núcleo). La estructura de núcleo de HMO puede decorarse con uno o más residuos fucosa (es decir HMO fucosilado) y con una o más unidades ácido siálico (es decir HMO sialilado). Un HMO puede estar también fucosilado y sialilado. En una realización, el HMO en la composición de la invención se selecciona de uno o más del grupo que consiste en HMO de núcleo, HMO sialilado y HMO fucosilado. En la leche humana, el HMO más abundante es 2'-fucosil-lactosa (un trisacárido neutro que se compone de unidades L-fucosa, D-galactosa y D-glucosa, ligado  $\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$ ; n.º CAS 41263-94-9), con una concentración de aproximadamente 2 g/l (Adams *et al*; 2018, Nutrafoods págs. 169 - 173). HMO preferidos son 3'-sialil-lactosa (3'SL); 6'-sialil-lactosa (6'SL); 2'-fucosil-lactosa (2'FL); 3-fucosil-lactosa (3FL); lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (LNnT) y disialil-lacto-N-tetraosa (DSLNT); estos son HMO preferidos. Las composiciones nutricionales particularmente preferidas incluyen al menos 2'FL. En aún otra realización, la composición de la invención comprende al menos 0,05 gramos de 6SL por 100 gramos de composición (peso seco). En una realización, la composición de la invención comprende al menos 0,05 gramos de LNT por 100 gramos de composición (peso seco). Todavía en otra realización, la composición de la invención comprende al menos 0,05 gramos de LNnT por 100 gramos de composición (peso seco). Los HMO pueden obtenerse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los HMO pueden purificarse a partir de leche humana. Los HMO individuales pueden separarse adicionalmente usando métodos conocidos en la técnica, tales como electroforesis capilar, HPLC (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada; HPAEC-PAD) y cromatografía en capa fina. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense n.º 2009/0098240. Alternativamente, pueden usarse métodos enzimáticos para sintetizar HMO. Otro método para fabricar HMO es por medio de biosíntesis en bacterias modificadas mediante ingeniería. Por ejemplo, un método de preparación de 2'-FL se da a conocer en el documento WO 2012/112777. Alternativamente, 2'-FL está disponible comercialmente.

En una realización, la cantidad de HMO en la composición de la invención es de entre 0,01 y 5,0 gramos por 100 gramos, preferiblemente entre 0,1-2 gramos por 100 gramos de composición (seca) o en otra realización, cuando la composición es un líquido, la cantidad de HMO es de entre 0,01 y 5,0 gramos por 100 ml, preferiblemente entre 0,1-2 gramos por ml de composición.

En otras realizaciones, la composición de la invención comprende uno o más sialiloligosacáridos, preferiblemente los sialiloligosacáridos se seleccionan de uno o más del grupo que consiste en disialil-lacto-N-tetraosa, 3'-sialil-lactosa, 6'-sialil-lactosa, 3'-sialil-lactosamina, 6'-sialil-lactosamina, 3'-sialil-3-fucosil-lactosa, sialil-lacto-N-tetraosa a, sialil-lacto-N-tetraosa b, sialil-lacto-N-tetraosa c, disialil-lactosa, 3'-sialil-Lewis A, 3'-sialil-Lewis X, disialil-lacto-N-hexaosa I, disialil-lacto-N-hexaosa II, sialil-Lea-tetra, sialil-lacto-N-neotetraosa c y disialil-lacto-N-fucopentaosa II. Los sialiloligosacáridos pueden separarse de la leche, suero de leche o huevo, o producirse a partir de componentes derivados a partir de los mismos.

En otra realización del método según la invención, la composición comprende del 0,25 al 20% en peso de oligosacáridos no digestibles basado en el peso seco de la composición, seleccionándose preferiblemente los oligosacáridos no digestibles de uno o más de galacto-oligosacáridos (GOS) y fructo-oligosacáridos (FOS), siendo más preferiblemente los oligosacáridos no digestibles galacto-oligosacáridos. En otras realizaciones, la cantidad mínima de oligosacáridos no digestibles es de al menos el 1% en peso basado en el peso seco de la composición, tal como al menos el 5% en peso. En aún otra realización, la cantidad máxima de oligosacárido no digestible es del 25% en peso basado en el peso seco de la composición, preferiblemente menos del 20% en peso, más preferiblemente menos del 15% en peso. Los constituyentes principales en GOS son oligosacáridos que comprenden una o más unidades beta-galactosa con una glucosa terminal en el extremo reductor. Las unidades galactosa están ligadas predominantemente en un enlace beta-1-4 o beta-1-6, aunque también pueden producirse

enlaces beta-1-2 y beta-1-3. En una realización preferida, la composición de la invención comprende galacto-oligosacáridos y los galacto-oligosacáridos comprenden 2'-galactosil-lactosa (Gal $\beta$ 1-2Gal $\beta$ 1-4Glc) y 3'-galactosil-lactosa (Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc). En otra realización preferida, la composición de la invención comprende galacto-oligosacáridos y los galacto-oligosacáridos comprenden 3'-galactosil-lactosa (Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc) y 6'-galactosil-lactosa (Gal $\beta$ 1-6Gal $\beta$ 1-4Glc). Preferiblemente, la cantidad de oligosacárido no digestible es de entre 0,1 y 25 gramos por 100 gramos de composición seca.

Ciertas cepas de bacterias han atraído una atención considerable porque se ha encontrado que presentan propiedades valiosas para el hombre si se ingieren. En particular, se ha encontrado que cepas específicas de los géneros *Lactobacilli* y *Bifidobacteria* son capaces de colonizar la mucosa intestinal, reducir la capacidad de bacterias patógenas de adherirse al epitelio intestinal, tener efectos inmunomoduladores y ayudar en el mantenimiento del bienestar. Tales bacterias se denominan en ocasiones probióticos.

Aunque se conoce poco sobre las especies individuales de bacterias responsables de estas actividades beneficiosas, en general se acepta que las bifidobacterias y los lactobacilos constituyen componentes importantes de la microflora intestinal beneficiosa. Las bifidobacterias y los lactobacilos son abundantes en los intestinos de niños alimentados con el pecho pero no alimentados con biberón, y se reconocen ampliamente como bacterias comensales beneficiosas. Su presencia se correlaciona con menores infecciones de tracto gastrointestinal y de las vías aéreas, y muchas especies de *Lactobacilli* y *Bifidobacteria* se han usado hasta la fecha como bacterias probióticas. El crecimiento de estas bacterias se fomenta mediante carbohidratos indigestibles complejos (oligosacáridos de leche humana y oligosacáridos prebióticos) que están presentes en la leche materna. Los oligosacáridos prebióticos están ahora bien establecidos como ingrediente para fórmulas infantiles para fomentar el crecimiento de bifidobacterias en el intestino de lactantes.

Se han llevado a cabo estudios extensos para identificar nuevas cepas probióticas. Por ejemplo, el documento EP 0 199 535, el documento EP 0 768 375, el documento WO 97/00078, el documento EP 0 577 903 y el documento WO 00/53200 dan a conocer cepas específicas de *Lactobacilli* y *Bifidobacteria* y sus efectos beneficiosos.

En una realización, el probiótico comprende bacterias del género *Faecalibacterium*, preferiblemente comprende *Faecalibacterium prausnitzii*.

Se ha propuesto añadir probióticos a fórmulas infantiles favorecer que tenga lugar la colonización del intestino y para fomentar la colonización con las bacterias "buenas" - especies de *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* - en vez de las bacterias nocivas - patógenos tales como *Clostridia*, etc. Así, en aún otra realización, la composición de la invención comprende un probiótico, es decir una o más bacterias probióticas. Preferiblemente, el probiótico es una cepa de *Lactobacillus*, una cepa de *Bifidobacterium*, una cepa de *Streptococcus*, una cepa de *Lactococcus*, una cepa de *Leuconostoc*, una cepa de *Enterobacteriaceae* o una cepa de *Enterococcus*. Más preferiblemente, el probiótico es una cepa de *Lactobacillus* o una cepa de *Bifidobacterium*.

En una realización, la cepa de *Lactobacillus* es una especie *Lactobacillus rhamnosus* o *Lactobacillus paracasei*. En otra realización, la cepa de *Bifidobacterium* es una especie *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* o *Bifidobacterium animalis*.

En aún otra realización, los probióticos preferidos se seleccionan de uno o más del grupo que consiste en *Bifidobacterium lactis* (vendido en primer lugar por Christian Hansen company), *Streptococcus thermophilus* (por ejemplo, tal como se proporciona bajo el nombre TH4 por Chr. Hansen, Dinamarca), *Lactobacillus paracasei rhamnosus* GG (ATCC 53103) (por ejemplo, tal como se proporciona por Valio Oy, Finlandia) y *Bifidobacterium longum* BB536 (por ejemplo, tal como se proporciona por Morinaga Milk Industry Co. Ltd, Japón).

Todavía en otra realización, la composición de la invención comprende al menos dos probióticos diferentes.

Los probióticos en la composición de la invención están presentes preferiblemente en una cantidad de  $10^6$  a  $10^9$  ufc/gramos de producto seco, preferiblemente de  $10^6$  a  $10^8$  ufc/g de producto seco e incluso más preferiblemente de  $10^7$  a  $5 \cdot 10^7$  ufc/gramos de producto seco.

Los prebióticos tienen varias ventajas con respecto a los probióticos; principalmente el hecho de que no estén vivos significa que pueden procesarse en una gama mucho más amplia de alimentos que lo que pueden los probióticos frágiles. Además, los prebióticos no comparten el problema de la supervivencia de los probióticos tras la ingestión por parte del consumidor. Dado que los prebióticos estimulan el crecimiento de bacterias que ya están presentes en el intestino, pueden verse como ingredientes o aditivos más "naturales" que los probióticos, que necesitan la administración de bacterias extrañas.

La composición nutricional de la presente invención puede comprender además lactoferrina, preferiblemente lactoferrina bovina. La lactoferrina es una proteína de transporte de hierro encontrada en la leche humana con actividad antimicrobiana. El término "lactoferrina" tal como se usa en el presente documento incluye tanto lactoferrina desnaturada como fragmentos biológicamente activos, grandes, de lactoferrina (por ejemplo, fragmentos de

lactoferrina) como lactoferrina no desnaturalizada o natural. La lactoferrina es una glicoproteína que pertenece a la familia de los transportadores de hierro o de la transferrina. Se encuentran en la leche bovina y de otros mamíferos como componente proteico menor de proteínas del suero de la leche. La lactoferrina contiene 703 aminoácidos, tiene un peso molecular de 80 kilodaltons y se encuentra también en la leche humana. Las concentraciones de lactoferrina en la composición de la presente invención son preferiblemente de al menos aproximadamente 10 mg/l, preferiblemente al menos aproximadamente 50 mg/l. En una realización, la cantidad de lactoferrina bovina en la composición de la invención es de desde 10 mg/l hasta 2000 mg/l, preferiblemente desde 50 mg/l hasta 2000 mg/l, más preferiblemente desde 100 hasta 1500 mg/l. La leche humana, en comparación, contiene generalmente desde aproximadamente 1390 hasta aproximadamente 1940 mg/l de lactoferrina. Las cantidades en mg/l tal como se usan en combinación con la lactoferrina se refieren a la cantidad de lactoferrina por litro de producto listo para consumir. Las fuentes adecuadas de lactoferrina para su uso en el presente documento incluyen aislados, concentrados o extractos de leche o productos lácteos de mamífero, incluyendo leche humana y bovina. La leche bovina es una fuente de lactoferrina preferida para su uso en el presente documento, incluyendo concentrados de proteína del suero de la leche enriquecidos tal como se describen en el presente documento. Las fuentes individuales de lactoferrina adecuadas para su uso en el presente documento incluyen Lactoferrin FD (lactoferrina al 80%), disponible de FrieslandCampina Ingredients, Países Bajos.

La composición nutricional de la invención, también denominada composición de la invención, es particularmente adecuada para sujetos humanos de 0 a 36 meses de edad, en particular lactantes (una persona de 0-12 meses de edad según el CODEX Alimentarius (CODEX STAN 72-1981), denominado adicionalmente CODEX) y niños jóvenes hasta la edad de 36 meses. Las composiciones nutricionales para lactantes se denominan comúnmente fórmula infantil. Cuando se usa como fórmula infantil, la composición tal como se usa en las diversas realizaciones de la invención debe contener los ingredientes en las cantidades prescritas por el CODEX y, se es necesario, tal como prescriban regulaciones adicionales de países individuales. Alternativamente, requisitos para fórmula para lactantes y niños jóvenes se han descrito en el Reglamento delegado (UE) 2016/127 del 25 de septiembre de 2015 que complementa el Reglamento (UE) n.º 609/2013 y la Directiva de la Comisión 2006/141/CE. Un ejemplo de una lista de ingredientes de una fórmula infantil que cumple los requisitos de la UE, de China y del Codex puede encontrarse, por ejemplo, en [www.frieslandcampinaingredients.com/ en app/uploads/2019/04/PDS\\_ELN\\_Essential@-Start-IF-110.pdf](http://www.frieslandcampinaingredients.com/app/uploads/2019/04/PDS_ELN_Essential@-Start-IF-110.pdf).

Por consiguiente, en una realización preferida, la composición nutricional según la invención para lactantes comprende grasa láctea e inmunoglobulina de rumiante tal como se definió en otra parte en el presente documento y comprende además proteína, carbohidratos, vitaminas, minerales y elementos traza y las otras sustancias de acuerdo con las especificaciones prescritas por el CODEX y, se es necesario, por regulaciones nacionales adicionales.

La composición de la invención es adecuada para sujetos humanos, por ejemplo, un niño joven (una persona de 12-36 meses de edad, - también denominado niño pequeño) y la composición es una "fórmula de continuación para niños jóvenes" (FUF-YC), - una fórmula de este tipo puede denominarse también "leches de crecimiento", "fórmulas de crecimiento" o "leche para niños pequeños", o alternativamente puede denominarse "fórmula para niños jóvenes". Una fórmula de este tipo comprende el lípido, la proteína y los carbohidratos digestibles descritos anteriormente, y puede comprender además vitaminas, minerales y elementos traza y las otras sustancias de acuerdo con las especificaciones prescritas por el CODEX STANDARD FOR FOLLOW-UP FORMULA (CODEX STAN 156-1987) y, si es necesario, por regulaciones nacionales adicionales. Por consiguiente, la composición tal como se usa en los diversos aspectos de la invención se selecciona de una o más del grupo que consiste en una fórmula para lactantes, una fórmula de continuación y fórmula para niños jóvenes, preferiblemente la composición es una fórmula infantil o una fórmula de continuación, más preferiblemente una fórmula para lactantes.

Los lactantes prematuros tienen más problemas con un intestino inmaduro con fugas y/o el cierre de la barrera intestinal. Por tanto, la composición de la invención que ofrece activación del receptor Ahr e inmunoglobulina puede ser particularmente relevante para lactantes prematuros, ya que esta composición soporta una buena función de barrera intestinal, preferiblemente cuando la composición comprende adicionalmente uno o más HMO. Así, en aún otra realización, la composición nutricional de la invención es una fórmula para prematuros, es decir una fórmula diseñada para bebés prematuros, es decir bebés nacidos tras un embarazo de no más de 37 semanas.

La composición de la invención puede estar en cualquier forma adecuada en la técnica, por ejemplo, en una realización, es un líquido listo para usar, o preferiblemente, en otra realización, está en forma de polvo, más preferiblemente, un polvo que flota libremente.

La composición de la invención puede ser una premezcla, por ejemplo, una premezcla que puede usarse como base para una fórmula como una fórmula para lactantes, fórmula de continuación, fórmula para niños jóvenes o fórmula para prematuros. En aún otra realización, la composición nutricional de la invención es una premezcla de ingredientes, preferiblemente una premezcla nutritiva para los primeros años.

En aún otra realización, la composición de la invención comprende

- i. entre 10 y 60 g de grasa por 100 gramos de fórmula, siendo la cantidad de grasa de rumiante de entre el 5 y el 90% en peso según se determina con respecto a la cantidad total de grasa;
- ii. entre 115 µg - 50 mg de inmunoglobulina de rumiante por gramo de composición (peso seco);
- iii. entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>9</sup> ufc de probiótico por gramos de producto seco;
- iv. entre 0,1 y 25 gramos de oligosacárido no digestible por 100 gramos de fórmula (peso seco);
- v. entre 0,01 y 5,0 gramos de HMO por 100 gramos de producto seco;
- vi. entre 0,1 y 20 mg de lactoferrina por gramo de producto seco.

Otros ingredientes en la composición pueden, por ejemplo, seleccionarse de lactosa, carbohidratos, vitaminas, minerales, etc. Todavía en otra realización, esta composición está libre de probióticos, en otras palabras la composición comprende los puntos i., ii., iv., v. y vi.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de la composición nutricional de la invención en una fórmula para prematuros, una fórmula para lactantes, una fórmula de continuación o fórmula para niños jóvenes.

Se da a conocer el uso de la composición nutricional de la invención para tratar una cualquiera o más de las indicaciones seleccionadas del grupo que consiste en función de barrera intestinal disminuida, enterocolitis necrotizante (NEC), síndrome del intestino irritable (IBS), enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), daño intestinal inducido por fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y endotoxemia perioperatoria.

Se da a conocer el uso de la composición nutricional de la invención para tratar a un sujeto que sufre diabetes tipo 2 (T2D).

El tratamiento de una enfermedad o indicación incluye la administración de la composición de la invención para prevenir que una persona sufra dicha enfermedad o indicación y/o para reducir los síntomas de una enfermedad.

La composición de la invención puede usarse también en formulaciones para adultos o ancianos, es decir productos alimenticios para personas maduras, personas ancianas o adultos. En particular en el tratamiento de o la prevención de diabetes tipo 2, IBS o IBD. Las formulaciones para adultos o personas ancianas pueden estar en forma de premezclas que pueden combinarse con otro alimento, por ejemplo, con productos lácteos o yogur. Alternativamente, puede ser un producto listo para comer tal como una pastilla, cápsula, una barra, por ejemplo, una barra de cereales o una barra de chocolate; una golosina. Alternativamente, en otra realización, el producto alimenticio es líquido.

El producto de la invención puede usarse para soportar la función de barrera intestinal en un humano siendo, por ejemplo, para la prevención o el tratamiento de diarrea o infecciones intestinales. Dicho uso puede estar relacionado con fórmulas nutritivas para los primeros años para soportar la función de barrera en el tracto gastrointestinal de lactantes prematuros, lactantes y niños muy jóvenes (0-3 años), pero también puede estar relacionado con el uso de fórmulas nutritivas para humanos >3 años de edad para la prevención y el tratamiento de trastornos relacionados con la función de barrera intestinal tales como enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome del intestino irritable, así como enfermedades crónicas relacionadas con la función de barrera intestinal, tal como la diabetes tipo 2.

La composición nutricional de la invención puede usarse también de una manera no terapéutica para reducir los síntomas asociados con seleccionadas del grupo que consiste en función de barrera intestinal disminuida, enterocolitis necrotizante (NEC), síndrome del intestino irritable (IBS), enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), daño intestinal inducido por fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y endotoxemia perioperatoria. En otra realización, podría usarse de una manera no terapéutica para reducir los síntomas asociados con diabetes tipo 2.

### Leyenda de las Figuras

En la Figura 1 A-C se muestra el análisis PAH CALUX de patrones con adiciones conocidas (A. patrón PCB126, B. patrón mezcla PAH, C. patrón I3C standard) tras el fraccionamiento en una columna de sílice desactivada.

En la Figura 2 se muestra la actividad PAH CALUX fraccionada tal como se determina en 3 productos de leche bovina y 1 grasa vegetal (A. patrón PCB126, B. patrón mezcla de PAH, C. patrón I3C).

La actividad PAH CALUX total (suma de la actividad PAH en la fracción 1, 2 y 3) se muestra en la Figura 3. La fracción 1 se muestra a la izquierda, la fracción 2 es la segunda desde la izquierda, la fracción 3 es la segunda desde la derecha y la suma de toda la actividad en un producto se muestra a la derecha.

La unión a ligando de AhR y la actividad PAH CALUX posterior en AMF y nata es principalmente un resultado de la unión de ligandos de AhR "normal" inestables metabólicos, mientras que la unión a ligando de AhR observada y la actividad PAH CALUX posterior en FN01 es principalmente el resultado de la presencia de ligandos de AhR "naturales" inestables metabólicos tal como derivados de indol y metabolitos de triptófano. En yogur, solo se observó una actividad PAH CALUX menor

### Ejemplos

Se produjeron nata láctea y grasa láctea anhidra (AMF) por FrieslandCampina Netherlands. La nata láctea tenía un % de grasa del 41,7% en peso. La nata láctea y la AMF se produjeron usando métodos conocidos en la técnica.

Se obtuvo yogur del supermercado (Campina Boerenland volle yoghurt, FrieslandCampina, Países Bajos).

FN01 es una mezcla de grasas vegetales, obtenida de Loders Croklaan, Wormerveer, Países Bajos.

Las inmunoglobulinas se administran como concentrado de proteínas (WPC), concentrado de proteínas séricas de la leche y/o leche bovina tratada mínimamente con calor, que contiene una mezcla de los todos isotipos de inmunoglobulina presentes (FrieslandCampina Netherlands).

#### Ejemplo 1: Demostración de la activación de AhR mediante grasa láctea

Se estudió la presencia de ligandos de AhR en grasa láctea, nata, yogur y FN01, una combinación de grasa vegetal, usando los bioensayos de gen indicador PAH CALUX® a base de AhR (BioDetection Systems BV, Ámsterdam, Países Bajos ("BDS").

El bioensayo PAH CALUX® es un bioensayo de transactivación de receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) que comprende la línea celular de hepatoma de rata H411E modificada genéticamente, que incorpora el gen de la luciferasa de la luciérnaga acoplado a elementos de respuesta a dioxina (DRE) como gen indicador para la presencia de compuestos capaces de unirse al receptor Ah. El bioensayo PAH CALUX® detecta ligandos de AhR estables metabólicos (ligandos de AhR tóxicos tales como dioxinas, furanos y PCB similares a dioxina), ligandos de AhR inestables metabólicos (hidrocarburos poliaromáticos (PAH) y ligandos de receptor Ah naturales, metabolizables, tales como derivados de indol, metabolitos de triptófano y quercetina).

Se usaron diversas técnicas de limpieza y separación para distinguir entre ligandos de receptor Ah tóxico, no metabolizable, (dioxinas (dibenzodioxinas policloradas o PCDD), furanos (dibenzofuranos policlorados o PCDF) y bifenilos policlorados similares a dioxina (dIPCB)), ligandos de receptor Ah xenobióticos, metabolizables, (hidrocarburos poliaromáticos (PAH)) y ligandos de receptor Ah naturales, metabolizables, (por ejemplo, derivados de indol, metabolitos de triptófano, quercetina).

Las células PAH CALUX® que están expuestas a compuestos de interés no solo expresan proteínas que están asociadas en circunstancias normales a los genes regulados por DRE activados por receptor Ah, sino también luciferasa. Mediante la adición del sustrato apropiado para luciferasa, se emite luz. La cantidad de luz producida es proporcional a la cantidad de unión a receptor específico de ligando, que está marcado como referencia frente a los compuestos de referencia relevantes (B[a]P para el bioensayo PAH CALUX®).

Para obtener ligandos de AhR a partir de productos de leche bovina (leche, yogur, nata) y grasa vegetal (FN01), las muestras se extrajeron con hexano/DEE, 97/3 v/v. Tras la extracción, la grasa extraíble se retiró usando una columna de alúmina desactivada al 8% (elución 210 ml de pentano), tras lo cual se separaron ligandos de AhR estables metabólicos (PCDD/F, dIPCB), ligandos de AhR inestables metabólicos (PAH) y ligandos de AhR inestables metabólicos naturales (por ejemplo, derivados de indol) en una columna de sílice desactivada al 1,5%. Tras la elución (1: 15 ml de hexano; 2: 10 ml de hexano/DEE (85/15 v/v); 3: 25 ml de DEE), se recogieron 3 fracciones (fracción 1: PCDD/F, PCB, pesticidas apolares; fracción 2: PAH, pesticidas polares; fracción 3: indoles, etc.). La eficiencia de extracción y de separación de la limpieza en columna de alúmina desactivada/sílice desactivada combinada se evaluó usando muestras con adiciones conocidas que contenían patrones PCB-126, PAH, indol-3-carbinol (I3C), ácido 3-indol-acético (3IAA) y triptamina (TTAM). Las fracciones recogidas se evaporaron y volvieron a disolverse en DMSO.

Se prepararon diluciones en serie de los extractos limpiados/separados en DMSO y se analizaron para la señalización del receptor Ah en el bioensayo PAH CALUX®. Resumiendo, se sembraron células PAH CALUX® en placas de 96 pocillos. Tras 24 horas, las células se expusieron durante 4 horas a diluciones en serie de los extractos de DMSO finales por triplicado y entonces se lisaron para medir las actividades luciferasa. En cada placa de 96 pocillos, también se analizó una curva de calibración completa para cada respectivo bioensayo. Los resultados del análisis se interpolaron en la curva de calibración para la determinación de la actividad de receptor Ah. La actividad de receptor Ah final se expresa como pg de B(a)P equivalentes por gramo de grasa procesada.

Para someter a prueba la eficiencia del fraccionamiento con sílice desactivada, se separaron patrones con adiciones conocidas (PCB-126, mezcla PAH, mezcla I3C/3IAA/TTAM) en la columna de sílice desactivada. Se recogieron tres fracciones y se sometieron a prueba para la actividad PAH CALUX. En la figura 1 se facilitan los resultados del análisis PAH CALUX tras el fraccionamiento de patrones con adiciones conocidas (PCB-126, mezcla PAH, indol-3-carbinol (I3C)) en una columna de sílice desactivada al 1,5%. Los resultados indican que la columna de sílice desactivada aplicada separa el ligando de AhR "natural" de referencia I3C de los ligandos de AhR "tóxicos" estables metabólicos (PCB126) y los ligandos de AhR "normales" inestables metabólicos (mezcla PAH). Los ligandos de AhR "naturales" inestables metabólicos se eluyeron en la fracción 3, mientras que los ligandos de AhR "normales" inestables metabólicos se recogen en la fracción 2. Se encontró que el ligando de AhR "tóxico" estable metabólico PCB-126 se había eluido en ambas fracciones 1 y 2, lo que indica un fraccionamiento incompleto.

**Tabla 1** fuentes de grasa

Código de producto	Producto	Grasa procesada (g)
AMF	grasa láctea anhidra (bovina)	0,2001
Nata	nata (bovina)	0,2059
Yogur	yogur (bovino)	0,1384
FN01	grasa vegetal	0,203

En la tabla 1 se facilita la cantidad de grasa extraíble obtenida y procesada adicionalmente para determinar la actividad PAH CALUX de los ligandos de AhR en los 3 productos lácteos recibidos y la grasa vegetal FN01. Para la determinación de ligandos de receptor Ah "metabólicamente estables", "tóxicos", "metabólicamente inestables", "similares a PAH" y "metabólicamente inestables, naturales", la grasa se retira usando unas columnas de alúmina desactivada tras lo cual el extracto limpiado se fraccionó usando sílice desactivada. Las 3 fracciones finales obtenidas para cada una de las 4 muestras fraccionadas se disolvieron en DMSO. Se usaron diluciones en serie de las fracciones limpiadas finales en DMSO para exponer células PAH CALUX durante 4 horas. En la tabla 2 se resumen los resultados del análisis PAH CALUX de los productos lácteos fraccionados y grasa vegetal. En la figura 2 se facilita una representación gráfica de los resultados del análisis PAH CALUX fraccionado de las diversas muestras sometidas a prueba. Ninguna de las muestras mostró actividad PAH CALUX en la fracción 1, lo que indica la ausencia de ligandos de AhR "tóxicos" tal como PCDD/F y dPCB. Por el contrario, la fracción 2 (ligandos de AhR metabolizables "normales" tales como PAH) de los extractos fraccionados de AMF y nata mostraron una alta actividad PAH CALUX, mientras que los extractos de yogur y de FN01 solo mostraron niveles menores de actividad PAH y actividad PAH CALUX en la fracción 3, lo que indica la presencia de ligando de AhR metabolizable "natural", tal como derivados de indol y metabolitos de triptófano, lo que se observó en todas las muestras. Sin embargo, la actividad en la fracción del extracto de FN01 era considerablemente mayor en comparación con la actividad observada en los otros tres extractos de muestra fraccionados.

**Tabla 2** Resultados del análisis PAH CALUX de los diversos productos lácteos recibidos para el análisis tras la extracción, limpieza y fraccionamiento.

Código de producto	Producto procesado (g de vet.)	Fracción	Actividad PAH CALUX (ng de B(a)P eq./g de grasa)
AMF	0,2001	F1 - PCB	<LOQ
		F2 - PAH	880
		F3 - Indoles/Naturales	22
Nata	0,2059	F1 - PCB	<LOQ
		F2 - PAH	910
		F3 - Indoles/Naturales	5,4
Yogur	0,1384	F1 - PCB	<LOQ
		F2 - PAH	1,7
		F3 - Indoles/Naturales	14
FN01	0,2030	F1 - PCB	<LOQ
		F2 - PAH	8,7
		F3 - Indoles/Naturales	170

En este ejemplo se muestra que la extracción de ligandos de AhR a partir de productos de leche bovina y grasa vegetal seguida de la separación posterior de "tóxicos" estables metabólicos, PAH inestables metabólicos y ligandos de AhR "naturales" inestables metabólicos presentes en los extractos de muestra, indica claramente la presencia de niveles mucho mayores y diferentes tipos de ligandos de AhR en AMF, nata en comparación con FN01 y yogur tal como se determina usando los bioensayos de gen indicador PAH CALUX®. En AMF y nata, la actividad PAH CALUX era principalmente un resultado de la presencia de ligandos de AhR "normales" inestables metabólicos tales como PAH. Por el contrario, la actividad PAH CAUX en FN01 estaba provocada principalmente por la presencia de ligandos de AhR "naturales" inestables metabólicos tales como derivados de indol y metabolitos de triptófano.

**Ejemplo 2**

A) Estudio en humanos: prevención de la disfunción de barrera mediante la composición nutricional tras la exposición a AINE

5 B) O usando ETEC como modelo, usar la composición, medir la función de barrera con marcadores relevantes

Preparación de producto de prueba de polvo de base

10 Se estandarizaron leche entera fresca y leche desnatada en la relación de proteína/grasa y proporciona las Ig activas. A este se le añade una premezcla de minerales, una premezcla de vitaminas y lactosa. El producto se trata con calor durante 30 s a 75°C, se evaporan en un MVR a 60°C, se homogeneiza (120/30 bar) y se seca por pulverización.

Preparación de producto de referencia de polvo de base

15 Una premezcla de minerales, una premezcla de vitaminas + lactosa se mezclan con leche desnatada. El producto se calienta hasta 80°C, se mantiene durante 2 minutos a esta temperatura y entonces se calienta durante 5 s a 100°C e un DSI seguido de evaporación en un MVR a 68°C. Una combinación de grasas vegetales se inyecta tras la evaporación, seguido de homogeneización (120/30 bar) y secado de pulverización.

Composición de polvo de base (g/100 g)	Prueba	Referencia
Proteína [Nx6,25]	19,5	18,8
Grasa	16,6	21,6
Cantidad de grasa láctea en grasa	16,4	0,3
Lactosa	55,4	51,2
Minerales	4,3	4,2
Otros	2,2	2,2

Recetas de combinación (g/100g)	Prueba	Referencia
Producto de prueba de polvo de base	77,1	
Producto de referencia de polvo de base		83,0
Poder de galacto-oligosacáridos (GOS)	4,4	4,4
Jarabe de glucosa	5,5	9,7
Polvo de combinación de grasas	10,0	0
2'-Fucosil-lactosa	0,5	0,5
Lactoferrina	0,52	0,52
Nucleótidos, elementos traza	1,16	1,16
Aceite/minerales/vitaminas	0,81	0,76

Tras la reconstitución de 15 g de polvo con 90 ml de agua la composición comprende:

	Prueba	Referencia
IG total [mg/100 g]	28	29
IG activa [mg/100 g]	21	0
Grasa láctea [g/100 g]	12,6	0,2
Grasa láctea/grasa total	70%	1%

25 **Ejemplo 2A Prevención de la disfunción de barrera intestinal mediante AINE**

30 Para evaluar los efectos de la composición nutricional de la invención sobre la función de barrera intestinal, se realiza un estudio cruzado en voluntarios adultos. A los voluntarios (siete adultos sanos) se les da la composición nutricional durante un periodo de 1 semana antes de ingerir indometacina durante 5 días esencialmente tal como se describe en (Playford *et al* 1999 Gut vol. 44 págs. 653-8).

La permeabilidad de la barrera intestinal se evalúa evaluando la relación de lactulosa/ramnosa en orina tal como sigue.

35 Tras un ayuno durante la noche, los sujetos vaciaron sus vejigas y entonces bebieron una solución de azúcar estandarizada que contenía 5 g de lactulosa, 2 g de manitol y 1 g de ramnosa en un total de 450 ml de agua (osmolalidad calculada 69 osmol/kg de agua). A los sujetos se les permitió una ingesta ilimitada de fluido tras la primera hora de la prueba para garantizar una producción de orina adecuada. La orina se recogió y se juntó a lo largo de las siguientes 5 h y se registró el volumen total. La relación de lactulosa/ramnosa se usó como índice de lesión intestinal.

40

Tras una evaluación de permeabilidad de referencia inicial y la recogida de una muestra fecal de referencia, los voluntarios recibieron, en orden aleatorio, la composición nutricional (por ejemplo, 18,75 gramos de polvo disueltos en 125 ml, dos veces al día) o composición control durante 7 días. Durante los últimos 5 días de cada brazo de estudio, también toman indometacina 50 mg, tds. Al final del periodo de prueba intestinal volvió a evaluarse la permeabilidad y se recoge otra muestra fecal. Se deja un periodo "de lavado" de 2 semanas entre las dos fases del estudio. Tras esto, los voluntarios experimentan el mismo procedimiento, pero consumen la otra composición, así que todos los individuos se someten tanto a la composición nutricional de la invención como a la composición control.

Las muestras fecales se usan para medir marcadores de función de barrera intestinal tal como se miden en agua fecal obtenida de las muestras fecales.

Se preparan extractos de agua fecal añadiendo 3,6 ml of PBS y 40 µl de inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos P8340) a 0,4 gramos de heces, sometiendo a vórtex al menos 30 segundos y centrifugando a 3000x g durante 10 minutos a 4°C. Los extractos fecales se almacenan a -80°C hasta la medición.

Para evaluar la función de barrera intestinal fecal se miden calprotectina (S100A8/S100A9 humana), alfa-1-antitripsina (SERPIN-A1 humana) y zonulina en los extractos de agua fecal mediante ELISA según las instrucciones del fabricante (calprotectina y alfa-1-antitripsina: R&D systems, zonulina: Alere).

En el brazo de control, se espera que 5 días de ingesta de indometacina provoquen un aumento en las relaciones de lactulosa/ramnosa. La administración conjunta de la composición nutricional de la invención dará como resultado una menor o ningún aumento.

#### **Ejemplo 2B : Efecto en el modelo de exposición de ETEC**

El efecto de la composición nutricional de la invención puede estudiarse también en un modelo de infección ETEC experimental en voluntarios humanos adultos tal como se describe en, por ejemplo, ten Bruggencate 2016.

Se reclutan adultos sanos, de 18-55 años, para el estudio y se excluyeron los individuos que usaron antibióticos, fármacos inmunosupresores, antiácidos, laxantes o fármacos antidiarreicos en los últimos 3 meses antes del estudio, con enfermedad subyacente actual o previa del tracto gastrointestinal, o con intolerancia a la lactosa.

La permeabilidad de la barrera intestinal se evalúa evaluando la relación de lactulosa/ramnosa en orina tal como sigue. Tras un ayuno durante la noche, los sujetos vacían sus vejigas y entonces beben una solución de azúcar estandarizada que contiene 5 g de lactulosa, 2 g de manitol y 1 g de ramnosa en un total de 450 ml de agua (osmolalidad calculada 69 osmol/kg de agua). A los sujetos se les permite una ingesta ilimitada de fluido tras la primera hora de la prueba para garantizar una producción de orina adecuada. La orina se recoge y se junta a lo largo de las siguientes 5 h y se registra el volumen total. La relación de lactulosa/ramnosa se usa como índice de lesión intestinal, una combinación que se ha recomendado para evaluar la enteropatía.

Tras pasar este primer examen, se obtiene una muestra de sangre no de ayunas. Se preparan sueros y se analizan para IgG específica frente al epítipo inmunogénico específico del antígeno de factor de colonización II (CFaII) de *E. coli* diarreagénica. Además, se obtiene una muestra fecal fresca y se analiza para *E. coli* diarreagénica mediante qPCR. Los individuos con títulos de inmunoglobulina detectables frente a CFaII, inducidos mediante infecciones de ETEC previas, o recuentos de *E. coli* diarreagénica fecal detectable, se excluyen de la participación en el estudio debido a la resistencia probable a la cepa de *E. coli* administrada en el presente estudio. El estudio tiene 2 desenlaces primarios: excreción de *E. coli* diarreagénica fecal y rendimiento fecal. En base a pruebas estadísticas de 2 lados para datos no pareados,  $a = 0,05$  (probabilidad de error de tipo I) y  $b = 0,20$  (probabilidad de error de tipo II), y para compensar los abandonos, deben incluirse 30 participantes por grupo. Los participantes se estratifican según la edad, el género, los lactobacilos fecales y los títulos de inmunoglobulina detectables frente a CFaII (determinados en el examen) y se asignaron aleatoriamente al grupo de MFGM o control. La estratificación y aleatorización se realiza por una persona no ciega no implicada en el estudio. El código de aleatorización de cada participante se mantiene en sobres sellados y el código se rompió tras acabar todos los análisis de laboratorio y estadísticos.

Se realizó un estudio aleatorizado, controlado por placebo, doble ciego, de intervención paralela de 4 semanas. Se instruye a los participantes a mantener su patrón usual de actividad física y su dieta habitual a lo largo de todo el estudio, pero a abstenerse de productos lácteos y de productos que contengan pre- y probióticos. Los participantes reciben una lista de productos lácteos y productos ricos en pre- o probióticos en su diario sujeto a papel. Los alimentos lácteos no se incluyen en la dieta porque contribuyen sustancialmente a las ingestas de calcio diario total. Los productos lácteos se reemplazan proporcionando a los participantes bebidas con bajo contenido en calcio. Durante todo el estudio, los participantes consumen dos veces al día una bebida de leche de soja de 250 ml (por ejemplo, Alpro- Soya Bio Nature). Las bebidas se consumen por la mañana (125 ml) y por la tarde (125 ml) durante el desayuno y la cena.

Cuatro días antes de la exposición a *E. coli* diarreagénica y 24 horas tras la exposición a *E. coli* diarreagénica, se evalúa la permeabilidad de la barrera intestinal evaluando la relación de lactulosa/ramnosa en orina tal como se describió anteriormente.

5 Dos días antes y 2 d tras la exposición a *E. coli* diarreagénica, los participantes notifican cuantitativamente toda la comida y las bebidas consumidas en un diario de nutrición en línea. Se anota el peso de la comida y las bebidas consumidas. Si se desconoce, las cantidades consumidas se expresan mediante medidas domésticas (por ejemplo, una taza, una rodaja). Se calculan las ingestas de energía diaria media y de macronutrientes en cada periodo, por ejemplo, usando una tabla de composición alimentaria computerizada [NEVO versión en línea 2011/3.0; RIVM (National Institute for Public Health and the Environment)].

15 Se pide a los participantes que mezclen 18,75 gramos de una fórmula según la invención o una composición nutricional tratada con alto calor como en el ejemplo 2A (producto de referencia) que contenía la misma cantidad de calorías, proteína y azúcares (grupo control) dos veces al día en 125 ml de su bebida de leche de soja durante todo el estudio.

20 Tras un periodo de adaptación de 2 semanas a los productos de intervención, los participantes ayunan durante al menos 4 h antes de la exposición oral con una cepa de *E. coli* diarreagénica oral viva, pero atenuada, tal como se describió previamente (Bovee-Oudenhoven 2003; Ouwehand 2014). La cepa de *E. coli* usada (E1392/75-2A) es una variante positiva para CFAll lábil al calor/estable al calor (LT/ST) de una cepa LT'/ST' O6:H16 previamente enterotoxigénica. Antes (el día 21) y después (los días 1, 2, 3, 4 y 14) de la exposición a *E. coli* diarreagénica, se aísla ADN de muestras fecales húmedas homogeneizadas, y se cuantifica la *E. coli* diarreagénica mediante qPCR tal como es describió previamente (Ten Bruggencate *et al*, 2015).

25 Antes (los días 21 y 22) y después (los días 1, 2, 3, 4 y 14) de la exposición a *E. coli* diarreagénica, se recogen muestras fecales de 24 h. Las muestras fecales se congelan a 22°C inmediatamente tras la defecación y se transportan al laboratorio en condiciones congeladas, se pesan y se homogeneizan; se almacenan alícuotas a 22°C para análisis posteriores. La diarrea se determina mediante la excreción en peso húmedo fecal total diaria (rendimiento fecal total) y mediante el porcentaje de peso seco fecal tal como se determina tras el secado por congelación (consistencia fecal).

35 Durante todo el estudio, los participantes notifican diariamente información sobre la consistencia de las heces usando la escala de heces de Bristol (Heaton *et al*, 1991) y sobre la frecuencia de las heces en un diario en línea. Además, en el diario en línea, los participantes registran diariamente los síntomas según la escala de clasificación de síntomas gastrointestinales validada (GSRS) (Svedlund *et al*, 1988). La GSRS es un instrumento específico de enfermedad de 15 puntos combinados en 5 conjuntos de síntomas: reflujo, dolor abdominal, indigestión, diarrea y estreñimiento. El dominio "diarrea" consiste en el paso aumentado de heces, heces sueltas y urgencia intestinal. La GSRS tiene una escala de tipo Likert graduada en 7 puntos, en la que 1 = ninguna molestia, 2 = molestia menor, 3 = molestia leve, 4 = molestia moderada, 5 = molestia moderadamente grave, 6 = molestia grave, 7 = molestia muy grave.

45 Se toman muestras de sangre (10 ml) por personal cualificado de un hospital local en un punto de tiempo antes (día 24) y en 2 puntos de tiempo después (días 3 y 14) de la exposición a *E. coli* diarreagénica. Se preparan sueros mediante centrifugación a baja velocidad (20 min a 3000 g a 10°C) y se almacenan a 28°C. Las concentraciones de CFAll frente a IgG específica en sueros se determinan mediante ELISA directa tal como se describe en otra parte (Bovee-Oudenhoven *et al* 2003).

50 Se preparan extractos acuosos fecales añadiendo 3,6 ml de PBS y 40 µl de inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos P8340) a 0,4 gramos de heces, sometiendo a vórtex al menos 30 segundos y centrifugando a 3000x g durante 10 minutos a 4°C. Los extractores fecales se almacenan a -80°C hasta la medición.

55 Para evaluar la función de barrera intestinal se miden calprotectina (S100A8/S100A9 humana), alfa-1-antitripsina (SERPIN-A1 humana) y zonulina fecales en los extractos de agua fecal mediante ELISA según las instrucciones de los fabricantes (calprotectina y alfa-1-antitripsina: R&D systems, zonulina: Alere).

60 En este estudio, la composición nutricional de la invención reduce los síntomas de diarrea tras la exposición de ETEC tal como se evidencia mediante una frecuencia disminuida de heces, heces sueltas, puntuación de síntomas gastrointestinales, y una mejora de la barrera intestinal tal como se evidencia mediante la reducción de los marcadores de función de barrera en los extractos de agua fecal y mediante la relación de lactosa/ramnosa en orina.

### Ejemplo 3: Formulación de fórmula infantil y leche de crecimiento

65 En la tabla 3 se muestra un ejemplo de una fórmula infantil y una leche de crecimiento. La dosificación de la fórmula infantil es de aproximadamente 13 g/100 ml, la dosificación de la leche de crecimiento es de 15 g/100 ml.

El experto en la técnica entenderá que las cantidades exactas de todos los ingredientes pueden ajustarse para diferentes grupos de edad o para cumplir requisitos regulatorios.

**Tabla 3** Composición de fórmula infantil y de fórmula de crecimiento

5

Ingrediente		Fórmula infantil	Leche de crecimiento
leche microfiltrada en cerámica (CMF) (líquida)	kg de sólidos/100 kg	3-4	14-18
concentrado de proteína sérica de la leche	kg de sólidos/100 kg	14-16	17-21
nata	kg de sólidos/100 kg	14-16	9-12
lactosa	kg/100 kg	40-44	33-35
combinación de grasas vegetales	kg/100 kg	12-15	8-12
aceite/minerales/vitaminas	kg/100 kg	2-4	1-3
galacto-oligosacáridos	kg/100 kg	4-5	4-6
nucleótidos, elementos traza	kg/100 kg	1,1-1,9	0,5-2
concentrado de proteína del suero de la leche	kg/100 kg	1,5-5	2-4
Lactoferrina	kg/100 kg	0,1-0,5	0,1-0,5
HMO	kg/100 kg	0,1-0,5	0,1-0,6
IG total	kg/100 kg	0,05 – 0,5	0,05 – 0,5
IG activa	kg/100 kg	0,02 – 0,4	0,02 – 0,4

Se entiende que la receta para la formulación infantil puede usarse igualmente para una fórmula de continuación. La fórmula infantil o fórmula de continuación puede transformarse en polvo usando técnicas conocidas en la técnica, siempre que la composición no se someta a temperaturas por encima de los 80°C.

10

En una realización, la invención se refiere a una composición tal como se especifica en la tabla 3. En otra realización, la invención se refiere a una composición tal como se especifica en la tabla 3, habiéndose reemplazado los galacto-oligosacáridos por uno o más de otros oligosacáridos no digestibles.

## 15 REFERENCIAS

Bach Knudsen KE, Lærke HN, Hedemann MS, Nielsen TS, Ingerslev AK, Gundelund Nielsen DS, Theil PK, Purup S, Hald S, Schioldan AG, Marco ML, Gregersen S, Hermansen K13. Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation. *Nutrients*. 13 de octubre de 2018;10(10). pii: E1499. doi: 10.3390/nu10101499.

20

Bischoff, S. C. (2011). "Gut health": a new objective in medicine? *BMC Medicine*, 9(1), 24. <http://doi.org/10.1186/1741-7015-9-24>

Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.-D., Serino, M., ... Wells, J. (2014). Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, 14(1), 189. <http://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7>

25

Bovee-Oudenhoven IM, Lettink-Wissink ML, Van Doesburg W, Witteman BJ, Van Der Meer R. Diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* infection of humans is inhibited by dietary calcium. *Gastroenterology* 2003;125:469-76.

30

- D'Souza *et al*: Differing roles of short chain fatty acids and GPR43 agonism in the regulation of intestinal barrier function and immune responses. Publicación/Revista: PLOS One Publication fecha:2017 volume/edición: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180190> páginas: 1-22
- 5 den Hartog G, Jacobino S, Bont L, Cox L, Ulfman LH, Leusen JHW, van Neerven RJJ. Specificity and Effector Functions of Human RSV-Specific IgG from Bovine milk. PLoS One (2014) 9:e112047. doi:10.1371/journal.pone.0112047
- 10 Hall, K. E., Proctor, D. D., Fisher, L., y Rose, S. (2005). American Gastroenterological Association future trends committee report: Effects of aging of the population on gastroenterology practice, education, and research. Gastroenterology, 129(4), 1305-1338. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.06.013>
- 15 Heaton KW, Ghosh S, Braddon FE. How bad are the symptoms and bowel dysfunction of patients with the irritable bowel syndrome? A prospective, controlled study with emphasis on stool form. Gut 1991; 32:73-9.
- Li *et al* Exogenous stimuli Maintain Intraepithelial Lymphocytes via aryl Hydrocarbon Receptor Activation Publicación/Revista: Cell Publication fecha: 2011 volume/edición: 147 páginas: 629-640.
- 20 Godden S, McMartin S, Feirtag J, Stabel J, Bey R, Goyal S, Metzger L, Fetrow J, Wells S, Chester-Jones H. Heat-treatment of bovine colostrum. II: effects of heating duration on pathogen viability and immunoglobulin G. J Dairy Sci. Septiembre de 2006;89(9):3476-83.
- 25 Li SQ, Zhang HQ, Balasubramaniam VM, Lee YZ, Bomser JA, Schwartz SJ, Dunne CP. Comparison of effects of high-pressure processing and heat treatment on immunoactivity of bovine milk immunoglobulin G in enriched soymilk under equivalent microbial inactivation levels. J Agric Food Chem. 8 de febrero de 2006;54(3):739-46.
- Man, A. L., Gicheva, N., y Nicoletti, C. (2014). The impact de ageing on the intestinal epithelial barrier and immune system. Cellular Immunology, 289(1-2), 112-118. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.04.001>
- 30 Natividad JM, Agus A, Planchais J, Lamas B, Jarry AC, Martin R, Michel ML, Chong-Nguyen C, Roussel R, Straube M, Jegou S, McQuitty C, Le Gall M, da Costa G, Lecornet E, Michaudel C, Modoux M, Glodt J, Bridonneau C, Sovran B, Dupraz L, Bado A, Richard ML, Langella P, Hansel B, Launay JM, Xavier RJ, Duboc H, Sokol H. Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. Cell Metab. 6 de noviembre de 2018;28(5):737-749.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.07.001.
- 35 Ohnuki H. y Otani H. Antigen-binding and protein G-binding abilities of immunoglobulina G in hyperimmunized cow's milk treated under various conditions 2005. 76: 283-290
- 40 Ouwehand AC, Ten Bruggencate SJ, Schonewille AJ, Alhoniemi E, Forssten SD, Bovee-Oudenhoven IM. Lactobacillus acidophilus supplementation in human subjects and their resistance to enterotoxigenic Escherichia coli infection. Br J Nutr 2014; 111:465-73.
- 45 Playford RJ, Floyd DN, Macdonald CE, Cainan DP, Adenekan RO, Johnson W, Goodlad R a, Marchbank T. Bovine colostrum is a health food supplement which prevents NSAID induced gut damage. Gut (1999) 44:653-8
- Svedlund J, Sjodin I, Dotevall G. GSRS-a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. Dig Dis Sci 1988;33:129-34.
- 50 Ten Bruggencate SJ, Girard SA, Floris-Vollenbroek EG, Bhardwaj R, Tompkins TA. The effect of a multi-strain probiotic on the resistance toward Escherichia coli challenge in a randomized, placebo-controlled, double-blind intervention study. Eur J Clin Nutr 2015;69(3):385-91.
- 55 Ten Bruggencate SJ, Frederiksen PD, Pedersen SM, Floris-Vollenbroek EG, Lucas-van de Bos E, van Hoffen E, y Wejse PL Resistance to Diarrheagenic Escherichia coli in Healthy Adults in a Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Study.. J Nutr 2016;146:249-55.)
- Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nature Reviews Immunology, 9(11), 799-809. <http://doi.org/10.1038/nri2653>
- 60 Valentini, L., Ramminger, S., Haas, V., Postrach, E., Werich, M., Fischer, A., Schulzke, J.-D. (2014). Small intestinal permeability in older adults. Physiological Reports, 2(4), e00281. <http://doi.org/10.14814/phy2.281>
- 65 Wang, J., Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., .... Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. Nature, 490(7418), 55-60. <http://doi.org/10.1038/nature11450>

Zhang, X., Shen, D., Fang, Z., Jie, Z., Qiu, X., Zhang, C., ... Ji, L. (2013). Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. PLoS ONE, 8(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0071108>.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición nutricional sintética que comprende:
  - 5 i. grasa láctea de rumiante, siendo la grasa láctea capaz de activar el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en un ensayo de actividad de AhR tal como se define en el ejemplo 1; y
  - ii. una inmunoglobulina de rumiante en una cantidad de entre 115 µg y 50 mg por gramo de composición seca;
 caracterizada porque al menos el 30% de la inmunoglobulina de rumiante no está desnaturalizada;
   
y siendo la cantidad de grasa láctea de entre 10 y 60 g de grasa por 100 gramos de fórmula,
   
10 siendo la cantidad de grasa de rumiante de entre el 5 y el 90% en peso según se determina con respecto a la cantidad total de grasa, y no exponiéndose la grasa láctea de rumiante a un pH < 5,0.
  
2. La composición nutricional según la reivindicación 1, en la que la grasa láctea de rumiante no se expone a una
   
15 temperatura por encima de 80°C.
  
3. La composición nutricional según la reivindicación 1 o 2, en la que la grasa láctea de rumiante es grasa láctea
   
bovina y la grasa se selecciona del grupo que consiste en leche entera, nata y grasa láctea anhidra (AMF); siendo
   
preferiblemente el bovino una vaca.
  
- 20 4. La composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición está en un estado seco que comprende al menos el 70% en peso de materia seca, preferiblemente al menos el 80% en peso de materia seca, más preferiblemente al menos 90% en peso de materia seca, lo más preferiblemente al menos 92% en peso de materia seca.
  
- 25 5. La composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la inmunoglobulina se selecciona de una o más del grupo que consiste en IgG, IgA, IgM, sIgA, siendo preferiblemente la inmunoglobulina IgG.
  
- 30 6. La composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la actividad biológica de la inmunoglobulina se determina en un ensayo ELISA que discrimina entre inmunoglobulina nativa y desnaturalizada.
  
- 35 7. La composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la grasa láctea activa el receptor de hidrocarburos de arilo en un ensayo Calux.
  
- 40 8. La composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o más oligosacáridos seleccionados del grupo que consiste en oligosacáridos de leche humana (HMO) y oligosacáridos no digestibles; siendo preferiblemente la cantidad de HMO de entre 0,01 y 5,0 gramos por 100 gramos de composición y/o siendo la cantidad de oligosacárido no digestible de entre 0,1 y 25 gramos por 100 gramos de composición seca.
  
9. La composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un
   
probiótico.
  
- 45 10. La composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además lactoferrina, preferiblemente lactoferrina bovina.
  
- 50 11. La composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende
  - i. entre 10 y 60 g de grasa por 100 gramos de fórmula, siendo la cantidad de grasa de rumiante de entre el 5 y el 90% en peso según se determina con respecto a la cantidad total de grasa;
  - ii. entre 115 µg - 50 mg de inmunoglobulina de rumiante por gramo de composición (peso seco);
  - iii. entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>9</sup> ufc de probiótico por gramos de producto seco;
  - iv. entre 0,1 y 25 gramos de oligosacárido no digestible por 100 gramos de fórmula (peso seco);
  - v. entre 0,01 y 5,0 gramos de HMO por 100 gramos de producto seco;
  - 55 vi. entre 0,1 y 20 mg de lactoferrina por gramo de producto seco.
  
12. La composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es una
   
premezcla de ingredientes, preferiblemente una premezcla nutritiva para los primeros años.
  
- 60 13. La composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se selecciona de una o más del grupo que consiste en una fórmula para lactantes, una fórmula de continuación y fórmula para niños jóvenes.
  
- 65 14. La composición nutricional según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la composición es una fórmula para prematuros o una fórmula para adultos o ancianos.

15. Uso de la composición nutricional según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en una fórmula para prematuros, una fórmula para lactantes, una fórmula de continuación o fórmula para niños jóvenes.

Figura 1 A

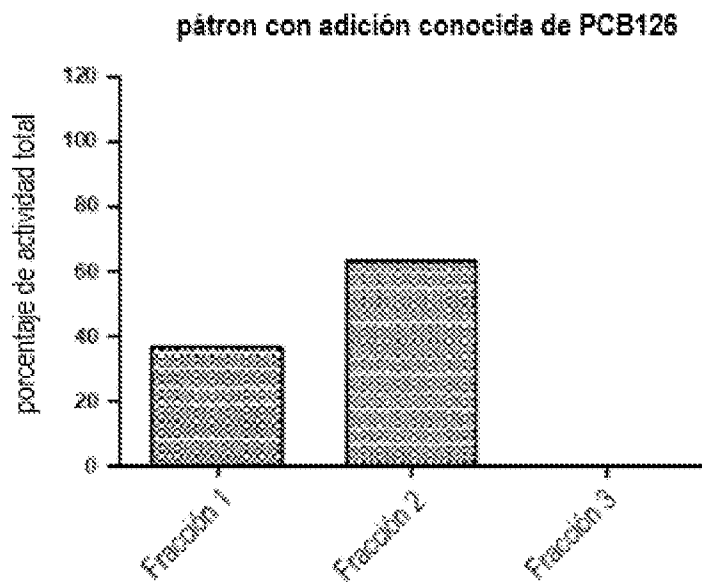


Figura 1 B

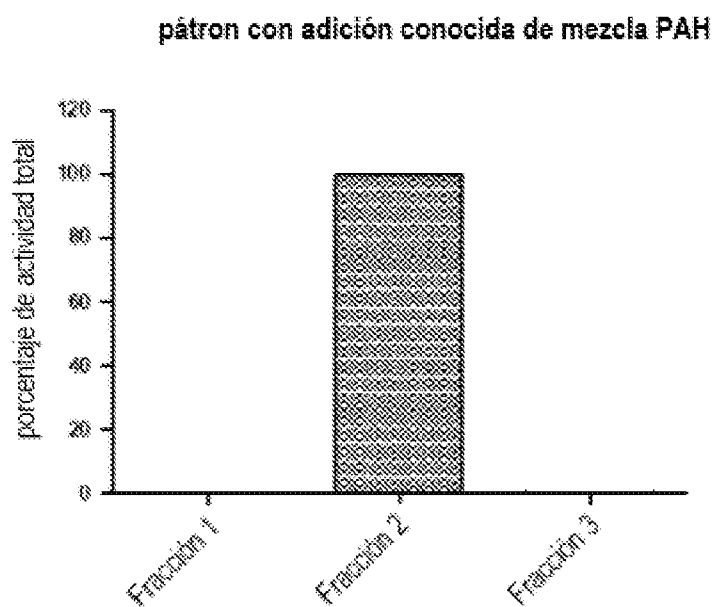


Figura 1 C

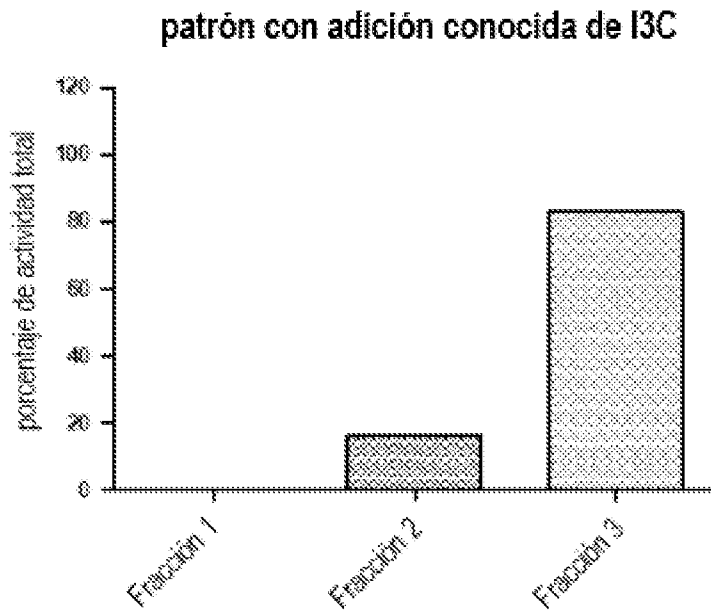


Figura 2A

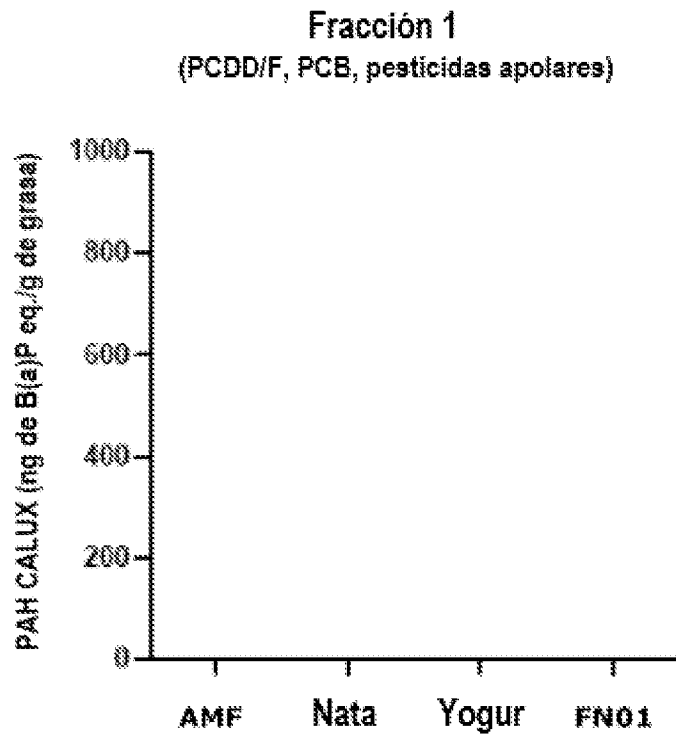


Figura 2B

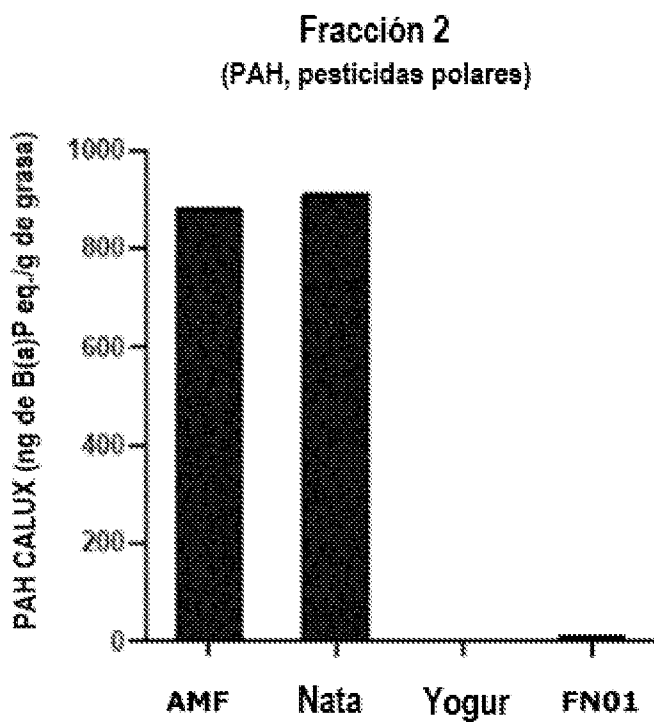


Figura 2C

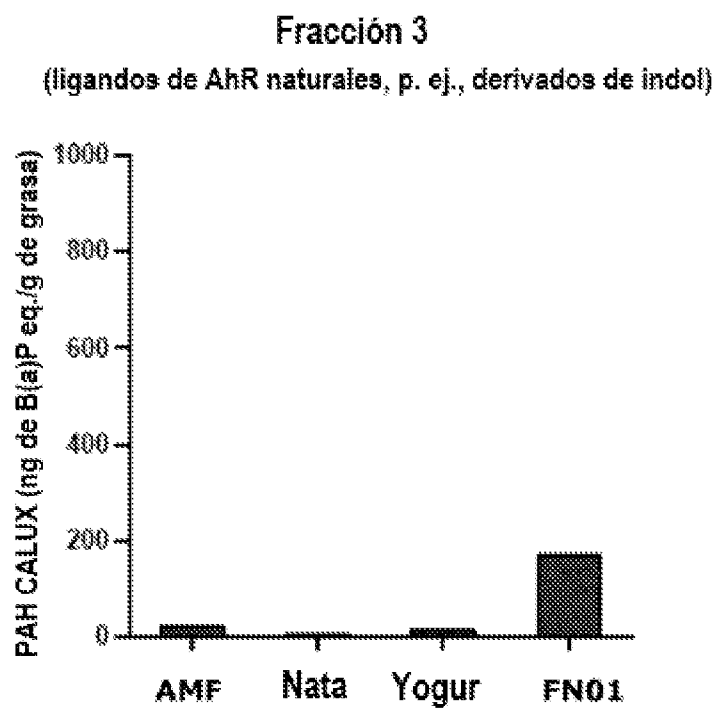


Figura 3

