



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 912**

51 Int. Cl.:  
**A23L 1/29** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)  
**A23L 1/308** (2006.01)  
**A23L 1/305** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06841578 .5**  
96 Fecha de presentación : **21.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1976397**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2008**

54 Título: **Fórmula infantil inmunológica.**

30 Prioridad: **28.12.2005 EP 05113022**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.10.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.10.2010**

73 Titular/es: **LABORATORIOS ORDESA, S.L**  
**Carretera del Prat, 9-11**  
**08830 Sant Boi Llobregat, Barcelona, ES**

72 Inventor/es: **Rivero Urgell, Montserrat;**  
**Chifré Petit, Ricard;**  
**Rodríguez-Palmero Seuma, María y**  
**Campoy Folgoso, Cristina**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 346 912 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

Fórmula infantil inmunológica.

5 La presente invención se refiere a fórmulas infantiles mejoradas. Más específicamente, la invención se refiere a fórmulas infantiles que contienen un producto derivado del calostro, un componente prebiótico seleccionado del grupo que consiste en galactooligosacáridos, inulina y una mezcla de los mismos, y una cantidad complementaria de lactoferrina.

10 **Estado de la técnica**

La composición de leche humana sirve como una referencia valiosa para mejorar las fórmulas nutricionales. Se sabe que además de nutrientes esenciales, la leche humana contiene varios tipos de factores bioactivos, incluyendo factores de crecimiento, enzimas, factores antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, inmunoglobulinas, oligosacáridos, transportadores y hormonas peptídicas y no peptídicas. Muchos de estos factores aparecen en altas concentraciones en el calostro y pueden desempeñar múltiples papeles funcionales.

20 No obstante, muchos constituyentes en la leche humana son bioactivos y muestran sinergias entre ellos. Un objetivo buscado por las fórmulas infantiles es el conseguir que la actividad de los diferentes componentes presentes en la fórmula infantiles sea similar a la actividad de estos en la leche humana.

Actualmente existe un gran interés en el papel de los prebióticos como promotores de la flora bifidogénica en niños, puesto que proporcionan nutrientes para todas las bacterias del colon, contribuyendo por lo tanto a un aumento beneficioso del pH y de la flora bacteriana.

25 El documento EP 1125507 se refiere a nuevos productos de inulina y composiciones de los mismos, que consisten en una mezcla de un componente de inulina fácilmente fermentable y un componente de inulina difícilmente fermentable en una proporción en peso específica, que modula la composición de la flora bacteriana en el intestino grueso de los seres humanos y mamíferos y que modula el patrón de fermentación de la inulina en seres humanos y mamíferos.

30 El documento EP 303201 se refiere a un método para producir una leche procesada que contiene galactooligosacáridos que comprende incubar una leche animal con una  $\beta$ -galactosidasa.

35 El documento US-A-2005/0079244 describe un producto alimenticio que comprende calostro, un probiótico y un prebiótico.

El documento WO 02/47612 se refiere a composiciones de complementos dietéticos que contienen cantidades eficaces de calostro, lactoferrina, pectina y  $\beta$ -glucano, para promover y mantener el sistema inmune.

40 Chin Med J 2004,117(6): 927-931 se refiere a la complementación de una fórmula de leche con galactooligosacáridos (GOS) para mejorar la microflora intestinal y la fermentación en recién nacidos a término.

45 La solicitud WO 99/64022 se refiere a composiciones nutritivas que comprenden suero de leche, selenio, fructooligosacáridos (FOS), y calostro para la creación y mantenimiento de una flora intestinal sana y para la potenciación del sistema inmune.

50 La solicitud WO 05/003329 se refiere a nuevas cepas de *Bifidobacterium bifidum* que producen una nueva actividad enzimática galactosidasa capaz de convertir la lactosa en una nueva mezcla de galactooligosacáridos. Se refiere al uso de una cepa bifidobacteriana para producir una nueva composición de galactooligosacáridos que sea capaz de promover el crecimiento de bifidobacterias en el intestino. También se refiere a una nueva composición de los productos de galactooligosacáridos.

55 Moro *et al.* (J Pediatr Gastroenterol Nutr 2002; 34: 291-295) han ensayado una mezcla sinérgica de galactooligosacáridos neutros y fructooligosacáridos de cadena larga. Después de 28 días de alimentación, los recién nacidos a término alimentados con una fórmula complementada con la mezcla GOS/FOS a una concentración de 0,4 g/100 ml o 0,8 g/100 ml, respectivamente, presentaban un efecto estimulante dependiente de la dosis sobre el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en el intestino. Esta combinación también dio como resultado un aumento de la frecuencia de las deposiciones y una reducción de la consistencia de las heces, más próxima a los niños alimentados con leche materna de referencia.

60 El documento EP 1237419B1 se refiere a una fórmula infantil que comprende un componente proteico que tiene un contenido de fósforo de menos de 0,75 g P/100 g de proteína; y un componente lipídico que puede digerir fácilmente un niño, que comprende triglicéridos de ácidos grasos en los que los restos de ácido palmítico componen más del 10% (p/p) de todos los restos de ácidos grasos presentes en los triglicéridos, estando al menos al 30% de los restos de ácido palmítico en los triglicéridos en la posición Sn2 de los triglicéridos. La fórmula infantil también puede comprender un componente prebiótico, por ejemplo, galactooligosacáridos. De acuerdo con este documento, el problema a resolver por la fórmula infantil descrita en la presente memoria es la superación de las alteraciones no deseadas en la flora intestinal natural y/o en la flora intestinal no natural, que no se resuelve mediante las fórmulas convencionales.

Por tanto, existe una necesidad de nuevas fórmulas infantiles alternativas dirigidas a proporcionar al bebé o niño pequeño una mejora de la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune. La mejora del sistema inmune es deseable no sólo para los bebés de los primeros cuatro a seis meses de vida sino también para niños de edades superiores a los cuatro meses.

5

### Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a composiciones nutricionales de acuerdo con la reivindicación 1. La composición nutricional de la invención proporciona una mejora de la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune, como se demuestra por la determinación y el análisis de algunos parámetros bioquímicos en relación con la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune. La composición nutricional de la invención puede usarse en la preparación de una fórmula infantil inmunológica.

10

Un segundo aspecto de la invención se refiere a fórmulas infantiles que proporcionan una mejora de la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune, que comprende las composiciones nutricionales de la invención.

15

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de las composiciones nutricionales de la invención en la preparación de una fórmula infantil para mejorar la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune.

20

Este y otros objetos de la presente invención se describirán adicionalmente en la sección de descripción detallada siguiente.

### Descripción detallada de la invención

25

Para los fines de la presente invención, la expresión “fórmula infantil” se refiere a productos alimenticios destinados a un uso nutricional particular por niños durante los primeros cuatro a seis meses de vida y a satisfacer de por sí las necesidades nutricionales de esta categoría de personas, también para un uso nutricional por bebés prematuros, así como por niños de edades superiores a cuatro meses, y que constituyen el principal elemento líquido en una dieta progresivamente diversificada de esta categoría de personas (también denominadas “fórmulas de continuación”, como se conocen por los expertos en la materia). Por lo tanto, como se ha definido anteriormente, la expresión “fórmula infantil”, como se usa en la presente invención, se refiere a fórmulas para recién nacidos prematuros, a término y de continuación, como se conocen por los expertos en la materia.

30

La expresión “composición nutricional” como se usa en el presente documento se refiere a una composición diseñada para bebés, niños pequeños, niños, adultos, que preferiblemente contiene suficientes proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales y electrolitos para servir potencialmente como la única fuente de nutrición cuando se proporciona en cantidad suficiente.

35

Debe entenderse que los bebés pueden alimentarse únicamente con fórmulas infantiles, o que la fórmula infantil puede usarse como complemento de la leche humana.

40

El calostro es un líquido lechoso poco espeso secretado por la glándula mamaria de los mamíferos de 24-36 h después del parto. Es una combinación única de nutrientes beneficiosos incluyendo anticuerpos protectores, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales. Los componentes inmunológicos del calostro incluyen IgG, IgM e IgA. Estos componentes confieren una inmunidad pasiva al neonato y protección frente a infecciones durante el periodo inicial después del parto. El calostro también contiene lactoferrina natural en una cantidad de aproximadamente 9,2 mg/g.

45

El calostro suministra varios tipos de factores promotores del crecimiento; algunos de ellos son el factor de crecimiento epidérmico que induce la síntesis de células epidérmicas, el factor de crecimiento transformante que induce la síntesis de colágeno, la cicatrización de heridas y la resorción ósea; y el factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1) que induce proliferación de células epiteliales y es necesario para el crecimiento y la reparación de tejido sano. El calostro también contiene proteína rica en prolina (PRP) que induce el crecimiento y la diferenciación de linfocitos B en reposo, que es esencial para desarrollo de la respuesta inmune. Los linfocitos B se dice que están “en reposo” durante su fase inactiva, es decir, mientras no están respondiendo a una estimulación por un antígeno. Además, se entiende que la PRP contribuye a la maduración de timocitos, originados a partir del timo, un órgano crucial para el desarrollo temprano del sistema inmune. Se entiende además que PRP contribuye a la generación de células T supresoras y células T auxiliares, lo que demuestra que la PRP puede tener un efecto estimulante o supresor sobre la respuesta inmune [K. Staroscik *et al.*, Immunol., 20 (12): 1277-82 (1983)].

55

Por lo tanto, una de las actividades biológicas del calostro está relacionada con la activación y regulación del sistema inmune. Se ha demostrado que los calostros humanos activan el sistema inmune estimulando la secreción de citocinas tales como IL-1, IL-3 e IL-6 por células mononucleares de sangre periférica *in vitro*, de tal forma que esta activación es importante cuando es necesario el sistema inmune.

60

La fórmula infantil de la invención comprende un producto derivado de calostro. Preferentemente procede de animales bovinos. Sin embargo, el animal u origen no es limitante y otras fuentes de calostro incluyen fuentes ovinas o caprinas. El producto derivado de calostro puede estar en cualquier forma, tal como líquida, en polvo y/o secada por congelación. La expresión “producto derivado de calostro”, de acuerdo con la intención de la presente invención,

65

## ES 2 346 912 T3

se refiere a fracciones de calostro que se obtienen como resultado de la eliminación de cierto contenido del calostro, o que se obtienen como resultado de la modificación de la composición del calostro por tratamiento enzimático o químico del calostro. De acuerdo con la invención, el producto derivado de calostro usado es una fracción de calostro enriquecida en proteínas de suero de leche. De acuerdo con una realización preferida, el producto derivado de calostro comprende entre 30-90 g/100 g de proteínas de suero de leche. En una realización más preferida, el producto derivado de calostro comprende entre 75-90 g/100 g de proteínas de suero de leche.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la fórmula infantil presenta un contenido de proteína total con una proporción de proteína de suero de leche respecto a caseína de entre 50:50 y 80:20. En otra realización preferida, la proporción de proteína de suero de leche respecto a caseína es de 60:40, aún más preferiblemente de 70:30.

La cantidad del producto derivado de calostro en la fórmula es de hasta 1,37 g/100 ml del producto derivado de calostro.

En una realización preferida, el producto derivado de calostro usado en la fórmula infantil de la invención se prepara por medio de la hidrólisis enzimática de las proteínas de caseína presentes en la leche, seguida de la separación y eliminación de las proteínas de caseína y grasas; después, el producto resultante se somete a microfiltración y por último se seca por congelación.

Por otro lado, una estrategia para la manipulación dietética de la microflora intestinal es el uso de un prebiótico, que se define como un ingrediente alimentario no digestible que afecta beneficiosamente al hospedador estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o de un número limitado de bacterias en el colon, dando como resultado de este modo una mejora en la salud del hospedador.

Uno de los componentes que pueden usarse como prebióticos son los Galactooligosacáridos (GOS) que están representados generalmente por una fórmula general Gal-(Gal) $n$ -Glc, en la que Gal representa un resto de galactosa, Glc representa un resto de glucosa y  $n$  representa un número entero que represente el número de unidades de galactosa unidas a la unidad de glucosa terminal. El número de unidades de sacárido (unidades de galactosa y glucosa) en una molécula, es decir, los valores  $n+2$  en la fórmula anterior, se denominan comúnmente grado de polimerización (DP).

Los GOS son uno de los componentes principales de los oligosacáridos de la leche materna, y también son conocidos como un factor acelerante de la proliferación de bifidobacterias, que es una de las enterobacterias útiles en los intestinos de los seres humanos. La galactosa es un componente principal de algunos lípidos cerebrales muy importantes incluyendo la mielina y se ha sugerido que los oligosacáridos derivados de galactosa pueden desempeñar un papel en el desarrollo cerebral neonatal (Kunz C. *et. al.* 1999, Br J Nutr; 82: 391-399).

Los GOS pueden producirse a partir de lactosa por la actividad transglucosilante de la beta-galactosidasa. Los beta-galactooligosacáridos consisten en un número de restos galactosilo unidos por enlaces beta-1,6 unidos a una unidad de glucosa terminal por medio de un enlace beta-1,4. Otro tipo de galactooligosacáridos se aísla de semillas de soja. Estos alfa-galacto-oligosacáridos (oligosacáridos de galactosil-sacarosa) incluyen rafinosa, estaquiosa y verbascosa y consisten en restos de galactosa unidos por enlaces alfa-1,6 al resto de glucosa de la sacarosa. Los efectos fisiológicos de estos oligosacáridos parecen ser similares a los de los oligómeros de galactosa unidos por enlaces beta. La composición de galactooligosacáridos puede variar en la longitud de cadena y en el tipo de enlace entre las unidades de monómeros. Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el componente prebiótico es un galactooligosacárido.

La inulina es una fibra dietética que está compuesta por una mezcla de oligómeros y polímeros de fructosa. La inulina es un carbohidrato que aparece en muchas plantas y que puede producirse por ciertas bacterias. La inulina de origen vegetal consiste en una composición polidispersa de cadenas de oligo- y polisacáridos que están compuestas por unidades de fructosa unidas entre sí por medio de enlaces fructosil-fructosa  $\beta(2-1)$  y que en su mayor parte terminan en una unidad de glucosa. La inulina de origen vegetal está habitualmente compuesta por cadenas lineales, pero también puede contener algunas cadenas ramificadas. La inulina puede representarse generalmente, dependiendo de la unidad de carbohidrato terminal, por la fórmula general GF $n$  y F $m$ , en la que G representa una unidad de glucosa, F representa una unidad de fructosa,  $n$  es un número entero que representa el número de unidades de fructosa unidas a la unidad de glucosa terminal y  $m$  es un número entero que representa el número de unidades de fructosa unidas entre sí en la cadena de carbohidratos. El número de unidades de sacárido (unidades de fructosa y glucosa) en una molécula, es decir, los valores  $n+1$  y  $m$  en la fórmula anterior, se denominan comúnmente grado de polimerización (DP).

La inulina, que es una fibra dietética natural, ha demostrado tener efectos deseables sobre la salud en los seres humanos y muchos animales vertebrados, tales como, por ejemplo, efectos prebióticos beneficiosos, en vista de los cuales la inulina ya se usa ampliamente en alimentos y bebidas para mejorar el funcionamiento del sistema digestivo, incluyendo la estimulación del crecimiento, metabolismo y actividad de bifidobacterias, a tiempo que reducen los de bacterias intestinales menos deseables. También se ha descrito que la inulina tiene efectos beneficiosos sobre el metabolismo de lípidos y que tiene efectos profilácticos y terapéuticos, por ejemplo, sobre la génesis y desarrollo del cáncer de mama (documento EP 692252) y del cáncer de colon en seres humanos y mamíferos no bovinos (documento EP 879600).

## ES 2 346 912 T3

Las moléculas de inulina con un bajo grado de polimerización, habitualmente definido como un (DP) < 10, se denominan en la presente memoria inulina de cadena corta. La inulina con un (DP)  $\geq$  20 se denomina en la presente memoria inulina de cadena larga mientras que la inulina con un (DP) de 10 a < 20 se denomina en la presente memoria inulina de cadena media. A menos que se especifique otra cosa, el término inulina usado en la presente memoria se refiere a inulina lineal así como ramificada e incluye molécula de inulina con un (DP) < 20, así como moléculas de inulina con un (DP) > 20.

El producto de inulina de la invención consiste en una mezcla de un componente de inulina fácilmente fermentable y un componente de inulina difícilmente fermentable en una proporción en peso específica que varía de 10/90 a 70/30. En un producto de inulina preferido de la invención, dicha proporción en peso varía preferiblemente de 20/80 a 65/35, más preferiblemente de 35/65 a 65/35 y aún más preferiblemente de 40/60 a 45/55, típicamente aproximadamente 50/50.

Por inulina fácilmente fermentable se entiende en la presente memoria productos de tipo inulina lineal así como ramificada que se fermentan completamente o casi completamente en la parte proximal (la parte ascendente) del intestino grueso de seres humanos y mamíferos. La inulina fácilmente fermentable es inulina de cadena corta (es decir, inulina con un (DP) < 10) e inulina de agave (es decir, una inulina ramificada). Por inulina difícilmente fermentable se entiende en la presente memoria productos de tipo inulina lineal así como ramificada cuya fermentación difícilmente comienza en la parte proximal del intestino grueso y que se fermentan principalmente, aunque a una velocidad lenta, en la parte distal (la parte transversal y/o la parte ascendente) del intestino grueso de seres humanos y mamíferos. La inulina difícilmente fermentable es inulina de cadena larga, es decir, inulina lineal así como ramificada con un (DP)  $\geq$  20, y tiene una forma cristalográfica particular o una forma de aspecto físico particular que no permite una fermentación sencilla y significativa en la parte proximal del intestino grueso de seres humanos y mamíferos.

La inulina se usa como fuente de energía en el tracto intestinal principalmente por bacterias del género *Bifidobacterium*. Cuando la inulina se administra en la dieta, las bifidobacterias aumentan significativamente, convirtiéndose en las bacterias predominantes en la población intestinal y los clostridios, que son una medida de microorganismos potencialmente patógenos, se reducen significativamente. Las bifidobacterias son bacterias intestinales humanas que proporcionan efectos beneficiosos sobre la salud gastrointestinal. Otros grupos importantes de bacterias en la población mixta en los intestinos, tales como *Fusobacteria*, *Lactobacillus* y bacterias aerobias, no se ven afectadas significativamente por la administración de inulina.

El producto de inulina de la invención tiene el potencial de modificar y modular rápidamente y significativamente la composición de la flora bacteriana en el intestino grueso, en la parte proximal así como en la parte distal del intestino grueso. Por consiguiente, una realización referida de la invención se refiere a una fórmula infantil que comprende inulina como componente prebiótico. Se prefieren particularmente las fórmulas en las que el componente prebiótico consiste en una mezcla de un componente de inulina fácilmente fermentable y una inulina difícilmente fermentable como se ha descrito anteriormente.

La cantidad de uno o más componentes prebióticos usados dependerá generalmente del componente prebiótico específico usado, así como de la cantidad de fórmula a suministrar al niño al día, por ejemplo, como una o más, y preferiblemente cuatro o más, alimentaciones al día. En una realización preferida de la invención, la fórmula infantil comprende hasta 1,2 g/100 ml del componente prebiótico; más preferiblemente, la fórmula infantil comprende hasta 0,8 g/100 ml del componente prebiótico.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la fórmula infantil comprende también otros componentes que están implicados en la mejora de la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune.

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos y se clasifican basándose en la longitud y en las características de saturación de la cadena de carbono. Los ácidos grasos de cadena corta tienen de 2 a aproximadamente 6 carbonos y típicamente están saturados. Los ácidos grasos de cadena media tienen de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 carbonos y también están típicamente saturados. Los ácidos grasos de cadena larga tienen de 16 a 24 o más carbonos y también pueden estar saturados o insaturados. En ácidos grasos de mayor longitud de cadena, pueden existir uno o más puntos de insaturación, dando origen a los términos “monoinsaturado” y “poliinsaturado”, respectivamente. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) que tienen 20 o más carbonos son de interés particular en la presente invención.

Los AGPI-CL se clasifican de acuerdo con el número y posición de dobles enlaces en los ácidos grasos de acuerdo con una nomenclatura bien entendida por el bioquímico. Hay dos series o familias de AGPI-CL, dependiendo de la posición del doble enlace más próximo al extremo metilo del ácido graso: la serie n-3 contiene un doble enlace en el tercer carbono, mientras que la serie n-6 no tiene dobles enlaces hasta el sexto carbono. Por tanto, el ácido araquidónico (AA) tiene una longitud de cadena de 20 carbonos y 4 dobles enlaces comenzando en el sexto carbono. Como resultado, se denomina “20:4 n-6”. De forma similar, el ácido docosahexaenoico (DHA) tiene una longitud de cadena de 22 carbonos con 6 dobles enlaces, comenzando con el tercer carbono del extremo metilo y por tanto se denomina “22:6 n-3”. Las rutas biosintéticas para el AA (serie n-6) y DHA (serie n-3) desde sus precursores C 18 respectivos son diferentes, pero comparten las etapas de elongación y de saturación y se comprenden bien. Por tanto, otros AGPI-CL importantes son los ácidos grasos C18 que son precursores en estas rutas biosintéticas, por ejemplo, linoleico, (18:2 n-6),  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3) y estearidónico (18:4 n-3) en la ruta n-3.

## ES 2 346 912 T3

Numerosos estudios muestran que consumos adecuados de AGPI omega 3 son esenciales para el crecimiento y el desarrollo normal del cerebro infantil. Está bien establecido que los AGPI-CL omega 3 reducen la producción de citocinas proinflamatorias. Por otro lado, un exceso de AGPI-CL omega 6 en sangre periférica respecto a los niveles de ácidos grasos omega 3 promueve la sobreproducción de citocinas proinflamatorias.

5 Como componentes estructurales de membranas, el AA y el DHA influyen en las características funcionales de determinados tejidos, particularmente tejidos neurales. El AA es el precursor principal para la síntesis de eicosanoides, sustancias reguladoras celulares poderosas y mediadores de la inflamación que incluyen prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Los eicosanoides están implicados en la agregación plaquetaria, la proliferación de células T, la migración de linfocitos, la vasoconstricción y la dilatación y la producción de varias sustancias inmunes e inflamatorias. En la presencia de ácido eicosapentanoico (EPA), también se producen eicosanoides derivados de la familia omega-3 y estos atenúan o inhiben la acción de los eicosanoides derivados de AA. Los derivados del EPA también tienen una actividad biológica más débil que los del AA. La competición de los ácidos grasos omega-3 por las mismas enzimas de síntesis de eicosanoides puede reducir la producción de eicosanoides omega-6. Por tanto, la presencia de EPA puede moderar la producción y actividad de eicosanoides derivados de AA. Se cree que la predominancia de eicosanoides derivados de ácidos grasos omega-6 contribuye al desarrollo y al deterioro de varias enfermedades crónicas, incluyendo cardiopatías.

20 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la fórmula infantil comprende además uno o más ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (AGPI), incluyendo, pero sin limitación, ácido linoleico, ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido oleico, ácido araquidónico (AA) y ácido docosahexaenoico (DHA). De acuerdo con una realización preferida de la invención, la fórmula infantil comprende hasta el 0,4% de ácido docosahexaenoico y hasta el 0,6% de ácido araquidónico del total de ácidos grasos presentes en la fórmula.

25 Otro compuesto de especial interés en la presente invención, que está implicado en la mejora de la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune es la lactoferrina.

30 La lactoferrina es una glicoproteína que pertenece a la familia de transportadores de hierro o transferrina. Se aisló originariamente a partir de leche bovina, en la que se encuentra como un componente proteico minoritario de proteínas de suero de leche. Debido a sus propiedades de unión a hierro, se cree que la lactoferrina desempeña un papel en la captación de hierro por la mucosa intestinal del neonato lactante. Es decir, parece ser la fuente de hierro para bebés alimentados de leche materna. También parece tener actividades antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatoria, antioxidante e inmunomoduladora.

35 La actividad antibacteriana posible de la lactoferrina complementaria podría explicarse, en parte, por su capacidad para unir fuertemente hierro. El hierro es esencial para mantener el crecimiento de bacterias patógenas. La lactoferrina también puede inhibir la unión de bacterias a la pared intestinal. Un producto de degradación de la lactoferrina es el péptido lactoferrina. La lactoferrina, clasificada como péptido bioactivo, también puede tener actividad antibacteriana, así como antiviral. La actividad antiviral posible de la lactoferrina complementaria puede deberse a su inhibición de la fusión de virus-célula y de la entrada viral en las células.

40 La lactoferrina que se emplea en la invención puede proceder de cualquier mamífero; preferiblemente, la lactoferrina es de origen humano o bovino. La lactoferrina de otros rumiantes (por ejemplo ovejas y cabras) también se prefiere. No obstante, también pueden usarse en la presente memoria otras lactoferrinas (por ejemplo, producidas con técnicas de ADN recombinante o producidas en una célula procariota).

45 La composición de la invención contiene una cantidad complementaria de lactoferrina, es decir, se añade adicionalmente a la composición y complementa la que se incluye en el calostro. Para los fines de la presente invención, la expresión "lactoferrina complementaria" se refiere a una cantidad adicional de lactoferrina distinta de la que está presente en el calostro, que se añade a la composición nutricional. Son más preferidas las composiciones que comprenden hasta 100 mg/100 ml de lactoferrina complementaria.

50 A parte de los componentes mencionados anteriormente, la composición de la invención puede contener además cualquier componente o ingrediente para una fórmula infantil conocido de por sí, en cantidades habituales (por ejemplo, como las prescritas por las directrices nacionales e internacionales) y dependiendo de (las propiedades de) la fórmula final deseada. Dichos componentes adicionales pueden incluir, pero sin limitación, uno o cualquier combinación de los siguientes:

- 60 • uno o más de los compuestos siguientes: taurina, colina, carnitina, inositol, biotina;
- uno o más triglicéridos de cadena media;
- uno o más carbohidratos, incluyendo, pero sin limitación, lactosa, dextrinomaltoza, glucosa y/o galactosa;
- 65 • uno o más nucleótidos y/o análogos de nucleótidos;
- uno o más aminoácidos (añadidos) incluyendo, pero sin limitación triptófano y/o metionina;

## ES 2 346 912 T3

- una o más vitaminas (añadidas), incluyendo, pero sin limitación, vitamina K, vitamina B1, vitamina B2, vitamina A, vitamina E, vitamina D, vitamina C, niacina, ácido pantoténico. Además, a parte de las cantidades habituales de estas u otras vitaminas, la fórmula nutricional de la invención puede contener cantidades adicionales de - por ejemplo - ácido fólico, vitamina B12 y/o vitamina B6;

- uno o más probióticos, tales como de los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacteria*;

- uno o más minerales y/o oligoelementos

De acuerdo con una realización más preferida, las cantidades de los componentes serán generalmente las siguientes:

- a) hasta 1,37 g/100 ml de un producto derivado de calostro;
- b) hasta 1,2 g/100 ml de un componente prebiótico seleccionado del grupo que consiste en GOS, inulina y mezclas de los mismos, en el cual la inulina es una mezcla de un componente de inulina fácilmente fermentable y un componente de inulina difícilmente fermentable en una proporción en peso específica que varía de 10/90 a 70/30; y opcionalmente uno o más de los componentes siguientes:
- c) hasta el 0,4% de DHA y hasta el 0,6% de AA del total de ácidos grasos presentes en la fórmula;
- d) de hasta 100 mg/100 ml de lactoferrina complementaria.

Más preferiblemente, la composición nutricional y/o fórmula infantil de acuerdo con la presente invención comprende:

- a) hasta 1,37 g/100 ml de un producto derivado de calostro;
  - b) hasta 1,2 g/100 ml de un componente prebiótico seleccionado del grupo que consiste en galactooligosacáridos, inulina y mezclas de los mismos, en el cual la inulina es una mezcla de un componente de inulina fácilmente fermentable y un componente de inulina difícilmente fermentable en una proporción en peso específica que varía de 10/90 a 70/30;
  - c) hasta el 0,4% de ácido docosahexaenoico y hasta el 0,6% de ácido araquidónico del total de ácidos grasos presentes en la fórmula;
- y opcionalmente d) de hasta 100 mg/100 ml de lactoferrina complementaria.

Son más preferidos aquellos en los que el componente prebiótico presente en la fórmula infantil comprende hasta 1,2 g/ml de GOS.

Las fórmulas infantil de interés particular de acuerdo con la presente invención son las que comprenden 0,8 g/100 ml de GOS. Las fórmulas infantiles que comprenden la cantidad mencionada anteriormente de GOS, son de interés particular y están destinadas a un uso nutricional particular por bebés durante los primeros cuatro a seis meses de vida, es decir, fórmulas para recién nacidos “prematuros” y “a término”.

Otras fórmulas infantiles de interés particular de acuerdo con la presente invención son las que comprenden 0,44 g/100 ml de GOS. Las fórmulas infantiles que comprenden la cantidad mencionada anteriormente de GOS son de interés particular y están destinadas a un uso nutricional particular por niños con edades por encima de los cuatro meses, es decir “fórmulas de continuación”.

La fórmula infantil de la invención puede prepararse generalmente por la mezcla/combinación de los diferentes componentes/ingredientes en las cantidades mencionadas en la presente memoria. Esto puede realizarse generalmente de una forma conocida de por sí usando un equipo de mezcla y/o procesamiento bien conocido. La fórmula infantil también puede calentarse/esterilizarse (por ejemplo, por tratamiento UHT) y después se produce preferiblemente en forma de polvo, por ejemplo, por evaporación o secado por pulverización; y se envasa asépticamente, por ejemplo, en un recipiente adecuado tal como una lata, una caja, una bolsa, un matraz o un sobrecito. Un método preferido para preparar la fórmula infantil de la invención se analizará en más detalle a continuación.

En resumen, el método de procesamiento comprende pasteurizar la leche a 75°C durante 20 segundos, enfriar la leche y desnatarla. Después, la leche desnatada se somete a un tratamiento de calentamiento/esterilización por tratamiento UHT y se concentra del 9% al 23% de extracto seco. Después, la leche concentrada desnatada se filtra y se calienta hasta 70°C; después se añade a un tanque de un tamaño apropiado con agitación y se calentamiento y se añade el resto de los ingredientes. Después, los ingredientes mezclados se filtran y se esterilizan. El producto resultante se homogeneiza y se enfría. La fórmula se concentra hasta el 50-52% de extracto seco.

## ES 2 346 912 T3

La dosificación diaria eficaz de la composición de esta invención dependerá del tamaño del individuo (ser humano o animal) que se trate, de la afección que se trate, de la edad del individuo y otros factores bien conocidos por el médico o veterinario que lo atienda. La dosificación diaria óptima puede determinarse fácilmente mediante unas pocas observaciones simples. Como se usa la expresión en la presente memoria, la “dosificación eficaz” se refiere a esa dosificación que provocará aproximadamente el resultado deseado, es decir, aumento de la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune.

Por toda la descripción y las reivindicaciones, la palabra “comprende”, y variaciones de las palabras, tales como “que comprende” no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas.

Las composiciones pueden prepararse por métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia y pueden proporcionarse en una amplia diversidad de formas adecuadas para el método de administración seleccionado. Por lo tanto, la fórmula nutricional de la invención puede tener la forma de líquido o polvo que puede reconstituirse con agua para producir una formulación lista para usar. También puede tener la forma de una comida que se use para llevar o producto similar evidente para un experto en la materia.

De acuerdo con una realización de la invención, las composiciones pueden formularse como una fórmula infantil de menos de 4-6 meses de edad, o como una fórmula infantil de más de 4-6 meses de edad.

Preferiblemente, la fórmula infantil de la invención tiene una osmolaridad de entre 200 y 400 mOsm/l. Se prefieren aquellas en las que la osmolaridad está entre 230 y 300 mOsm/l. Son más preferidas aquellas en las que la osmolaridad está entre 250 y 290 mOsm/l.

El valor energético de la fórmula infantil de acuerdo con la presente invención es preferiblemente de aproximadamente 500 kcal/l a aproximadamente 1500 kcal/l; más preferiblemente, de aproximadamente 600 a aproximadamente 800 kcal/l. Son más preferidas aquellas en las que la densidad energética de la fórmula infantil es de aproximadamente 680 kcal/l a aproximadamente 750 kcal/l.

Se harán evidentes objetos, ventajas y características adicionales de la invención para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención. Los Ejemplos 1 y 2 son de referencia y no están de acuerdo con la invención.

### 35 Breve descripción de los dibujos

Fig. 1.- Imagen digital de un gel bidimensional. Los geles comprenden intervalos de  $pI$  (punto isoeléctrico) de 3 a 10 y masas moleculares de 150 a 15 kDa.

Fig. 2.- Resultados del estudio de ratas de 14 días. La ID significa de ID de grupo. El control significa el control a los 14 días y Exp. significa experimental a 14 días. La mancha marcada está presente 1,95 veces más en sueros de ratas de 14 días alimentadas con la fórmula infantil de la invención en comparación con el grupo de control, con un valor de confianza de la varianza superior al 95%.

### 45 Descripción detallada de realizaciones particulares

Ejemplo 1

#### 50 Preparación de una fórmula infantil en forma de polvo

Una fórmula infantil en forma de una fórmula para recién nacidos a término destinada a un uso nutricional particular por bebés durante los primeros cuatro a seis meses de vida, en forma de polvo se preparó usando la fórmula siguiente:

60

65

ES 2 346 912 T3

INGREDIENTES	UNIDADES	100 g POLVO
Proteína de suero de leche	g	6,6
Caseína	g	4,4
Producto derivado de calostro	mg	118,8
Grasas (enriquecidas en AGPI-CL)	g	26,0
Lactosa	g	36,5
Dextrinomaltsa	g	13,5
Glucosa	g	1,6
Galactosa	g	0,9
GOS	g	5,7
Colina	mg	51,0
Taurina	mg	32,0
Inositol	mg	25,0
L-Carnitina	mg	17,0
Sodio	mg	175,0
Potasio	mg	535,0
Cloruro	mg	290,0
Calcio	mg	420,0
Fósforo	mg	230,0
Hierro	mg	7,0
Magnesio	mg	42,0
Zinc	mg	7,0
Cobre	mcg	300,0
Yodo	mcg	70,0
Manganeso	mcg	50,0
Selenio	mcg	14,0
Vitamina A	mcg	640,0
Vitamina D	mcg	10,3
Vitamina E	mg	25,0
Vitamina K	mcg	42,0
Vitamina B1	mcg	520,0
Vitamina B2	mcg	620,0
Vitamina B6	mcg	825,0
Vitamina B12	mcg	2,0
Vitamina C	mg	60,0
Ácido fólico	mcg	60,0
Fosfato cálcico	mg	3,2
Nicotinamida	mg	6,0
Biotina	mcg	16,0
5' Monofosfato de citidina	mg	7,9
5' Monofosfato de uridina	mg	5,3
5' Monofosfato de adenosina	mg	2,7
5' Monofosfato de guanosina	mg	1,6
5' Monofosfato de inosina	mg	1,6

## ES 2 346 912 T3

### Ejemplo 2

#### *Preparación de Fórmula infantil de continuación en forma de polvo*

- 5 Una fórmula infantil en forma de polvo destinada a un uso nutricional particular por niños de edades por encima de los cuatro meses se preparó usando la fórmula siguiente:

INGREDIENTES	UNIDADES	100 g POLVO
Proteína de suero de leche	g	6,1
Caseína	g	6,1
Producto derivado de calostro	mg	119,0
Grasas (enriquecidas en AGPI-CL)	g	22,0
Lactosa	g	35,35
Dextrinomaltosa	g	22,00
Glucosa	g	0,80
Galactosa	g	0,05
GOS	g	3,0
Colina	mg	50,0
Taurina	mg	33,0
Inositol	mg	25,0
L-Carnitina	mg	16,0
Sodio	mg	290,0
Potasio	mg	780,0
Cloruro	mg	555,0
Calcio	mg	615,0
Fósforo	mg	415,0
Hierro	mg	8,0
Magnesio	mg	60,0
Zinc	mg	10,0
Cobre	mcg	450,0
Yodo	mcg	85,0
Manganeso	mcg	80,0
Selenio	mcg	14,0
Vitamina A	mcg	620,0
Vitamina D	mcg	12,0
Vitamina E	mg	24,0
Vitamina K	mcg	42,0
Vitamina B1	mcg	550,0
Vitamina B2	mcg	880,0
Vitamina B6	mcg	820,0

## ES 2 346 912 T3

INGREDIENTES	UNIDADES	100 g POLVO
Vitamina B12	mcg	2,0
Vitamina C	mg	60,0
Ácido fólico	mcg	105,0
Fosfato cálcico	mg	3,2
Nicotinamida	mg	10,0
Biotina	mcg	16,0
5' Monofosfato de citidina	mg	7,8
5' Monofosfato de uridina	mg	5
5' Monofosfato de adenosina	mg	2,6
5' Monofosfato de guanosina	mg	1,5
5' Monofosfato de inosina	mg	1,5
<i>B. Infantis</i>	----	1x10 <sup>7</sup> UFC/g de leche ----
<i>L. Casei rhamnosus</i>	----	1x10 <sup>7</sup> UFC/g de leche ----

### Ejemplo 3

#### *Preparación de una fórmula infantil en forma de polvo complementada con lactoferrina*

Una fórmula infantil en forma de una fórmula para recién nacidos a término destinada para un uso nutricional particular por bebés durante los primeros cuatro a seis meses de vida, en forma de polvo se preparó usando la fórmula siguiente:

INGREDIENTES	UNIDADES	100 g POLVO
Proteína de suero de leche	g	6,35
Caseína	g	4,4
Producto derivado de calostro	mg	118,8
Lactoferrina complementaria	mg	350,0
Grasas (enriquecidas en AGPI-CL)	g	26,0
Lactosa	g	36,5
Dextrinomaltosa	g	13,5
Glucosa	g	1,6
Galactosa	g	0,9
GOS	g	5,7
Colina	mg	51,0
Taurina	mg	32,0
Inositol	mg	25,0
L-Carnitina	mg	17,0

ES 2 346 912 T3

	INGREDIENTES	UNIDADES	100 g POLVO
5	Sodio	mg	175,0
	Potasio	mg	535,0
	Cloruro	mg	290,0
10	Calcio	mg	420,0
	Fósforo	mg	230,0
	Hierro	mg	7,0
15	Magnesio	mg	42,0
	Zinc	mg	7,0
	Cobre	mcg	300,0
20	Yodo	mcg	70,0
	Manganeso	mcg	50,0
	Selenio	mcg	14,0
25	Vitamina A	mcg	640,0
	Vitamina D	mcg	10,3
	Vitamina E	mg	25,0
30	Vitamina K	mcg	42,0
	Vitamina B1	mcg	520,0
	Vitamina B2	mcg	620,0
35	Vitamina B6	mcg	825,0
	Vitamina B12	mcg	2,0
	Vitamina C	mg	60,0
40	Ácido fólico	mcg	60,0
	Fosfato cálcico.	mg	3,2
45	Nicotinamida	mg	6,0
	Biotina	mcg	16,0
	5' Monofosfato de citidina	mg	7,9
50	5' Monofosfato de uridina	mg	5,3
	5' Monofosfato de adenosina	mg	2,7
	5' Monofosfato de guanosina	mg	1,6
55	5' Monofosfato de inosina	mg	1,6

60 Ejemplo 4

*Preparación de "fórmula de continuación" en forma de polvo, complementada con lactoferrina*

65 Una fórmula infantil en forma de polvo destinada a un uso nutricional particular por niños de edades por encima de los cuatro meses se preparó usando la fórmula siguiente:

## ES 2 346 912 T3

INGREDIENTES	UNIDADES	100 g POLVO
5 Proteína de suero de leche	g	6,0
Caseína	g	6,0
Producto derivado de calostro	g	119,0
10 Lactoferrina complementaria	mg	350,0
Grasas (enriquecidas en AGPI-CL)	mg	22,0
Lactosa	g	35,35
15 Dextrinomaltosa	g	22,00
Glucosa	g	0,80
Galactosa	g	0,05
20 GOS	g	3,0
Colina	mg	50,0
Taurina	mg	33,0
25 Inositol	mg	25,0
L-Carnitina	mg	16,0
Sodio	mg	290,0
30 Potasio	mg	780,0
Cloruro	mg	555,0
Calcio	mg	615,0
35 Fósforo	mg	415,0
Hierro	mg	8,0
Magnesio	mg	60,0
40 Zinc	mg	10,0
Cobre	mcg	450,0
Yodo	mcg	85,0
45 Manganeseo	mcg	80,0
Selenio	mcg	14,0
50 Vitamina A	mcg	620,0
Vitamina D	mcg	12,0
Vitamina E	mg	24,0
55 Vitamina K	mcg	42,0
Vitamina B1	mcg	550,0
Vitamina B2	mcg	880,0
60 Vitamina B6	mcg	820,0
Vitamina B12	mcg	2,0
Vitamina C	mg	60,0
65 Ácido fólico	mg	105,0

## ES 2 346 912 T3

INGREDIENTES	UNIDADES	100 g POLVO
Fosfato cálcico	mcg	3,2
Nicotinamida	mg	10,0
Biotina	mcg	16,0
5' Monofosfato de citidina	mg	7,8
5' Monofosfato de uridina	mg	5
5' Monofosfato de adenosina	mg	2,6
5' Monofosfato de guanosina	mg	1,5
5' Monofosfato de inosina	mg	1,5
<i>B. Infantis</i>	----	$1 \times 10^7$ UFC/g de leche ----
<i>L. casei rhamnosus</i>	----	$1 \times 10^7$ UFC/g de leche ----

### Ejemplo 5

#### *Estudio de la recuperación clínica de recién nacidos a término después de acontecimientos de infección*

Los efectos de la fórmula infantil de acuerdo con la presente invención sobre la recuperación clínica de niños a término después de acontecimientos de infección se ensayó en un ensayo clínico multicéntrico, prospectivo, aleatorizado, controlado que implicaba a 108 niños a término de menos de 12 meses de edad.

Los niños se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos:

1. CONTROL (niños a término alimentados con una fórmula infantil común)
2. GOS (niños a término alimentados con una fórmula infantil complementada con 0,8 g/100 ml de GOS)
3. CAL-GOS (niños a término alimentados con una fórmula infantil complementada con 0,8 g/100 ml de GOS más 16,6 mg/100 ml de un producto derivado de calostro como se define en la presente invención).

Después de un suministro prolongado de las fórmulas, se observó una reducción estadísticamente significativa en el tiempo de la presencia de síntomas digestivos asociados con infección (tales como diarreas y vómitos) en el grupo de CAL-GOS. En cual la duración media de los procesos diarreicos de 9 días en el grupo de CONTROL, 4,8 en el grupo GOS y 3,2 días en el grupo de CAL-GOS ( $p < 0,05$ ).

Además, en el grupo de CAL-GOS el tiempo necesario para restaurar el apetito ( $p = 0,0001$ ) era inferior al de otros grupos ( $p = 0,001$ ), siendo de 11 días para el grupo de CONTROL, de 5,5 días para el grupo GOS y de 3,9 días para el grupo de CAL-GOS. Además, la recuperación ponderal ( $p = 0,0001$ ) del niño era más temprana en el grupo de CAL-GOS con respecto a los otros grupos.

Por lo tanto, la fórmula infantil complementada con un producto derivado de calostro y GOS de acuerdo con la presente invención demostró presentar una mayor eficacia para obtener una recuperación rápida y completa del niño en un periodo de tiempo menor con respecto a la leche que contenía solamente GOS y ésta con respecto a la leche de control.

### Ejemplo 6

#### *Análisis de los parámetros bioquímicos en relación con la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune*

Los efectos de las fórmulas del Ejemplo 1 y 2 se ensayaron en un estudio que implicaba niños a término y se compararon con los efectos de un producto comercial convencional que no contenía un producto derivado de calostro como se define en la presente invención y que no contenía GOS. Después de un suministro prolongado de las fórmulas, se analizaron varios parámetros bioquímicos en relación con la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune.

La determinación bioquímica de interleucinas (tales como TNF e IL-8), inmunoglobulinas (tales como IgA<sub>2</sub>, IgG, IgM), neopterin, ácidos grasos esenciales, macrófagos y linfocitos se realizó para evaluar la incidencia de las fórmulas infantil en estudios sobre el aumento y mejora de todos los parámetros de inmunidad examinados. Se ha demostrado anteriormente que todos estos parámetros e índices de inmunidad están asociados con diversas funciones eficaces del

sistema inmune humano y reacciones de defensa sistémica corporales generales. Los resultados muestran que todos los niños alimentados con la fórmula infantil de la presente invención tenían un perfil mejorado en su sistema inmune, como demuestran los parámetros bioquímicos analizados, en comparación con el producto comercial convencional que no contiene un producto derivado de calostro como se define en la presente invención y GOS.

5

#### Ejemplo 7

##### *Efecto sobre el perfil de proteínas séricas en ratas neonatas*

10 El objetivo del presente ensayo era determinar las variaciones de concentración en plasma de proteínas séricas en ratas neonatas alimentadas con la fórmula infantil de la invención en comparación con las alimentadas con una fórmula convencional.

15 Se usaron ratas recién nacidas en el experimento y se separaron en dos grupos, cada uno de los cuales se alimentaba con leche materna y una fórmula infantil:

A) CONTROL: n = 10 fórmula infantil convencional sin calostro ni GOS.

20 B) Fórmula infantil del ejemplo 3: n = 10

20

La mitad de los animales de cada grupo se sacrificaron a los 5 días del nacimiento y la otra mitad a los 14 días, usando anestesia con isoflurano más punción cardiaca para la extracción de sangre. Se obtuvieron sueros de cada una de las muestras de sangre correspondientes y se sometieron a control de hemólisis para evitar la contaminación por hemoglobina de glóbulos rojos. Cada uno de los sueros se sometió a un procedimiento de reducción del contenido de albúmina en suero por medio de cromatografía de afinidad, con una resina que contenía anticuerpos anti-albúmina (Montage Albumin Deplete Kit, Millipore). La albúmina representa el 70% de las proteínas séricas y su presencia predominante haría difícil el análisis de otras proteínas minoritarias.

25

Se separaron las proteínas de todas las muestras de suero por medio de electroforesis bidimensional. La visualización de las proteínas en los geles se obtuvo por medio de tinción de plata compatible con espectrometría de masas (Shevchenko y col., Anal. Chem. 1996 68(5); 850-858) (véase la Fig. 1). Las manchas en cada uno de los geles se detectaron automáticamente con un programa informático específico (Image Master Platinum v5.0, GE Healthcare) que también identificaba las manchas correspondientes a las proteínas cuya expresión es diferente entre suero de grupos de animales diferentes.

35

Las proteínas con expresión diferencial entre grupos se resuspendieron y sometieron a hidrólisis enzimática con tripsina. Los péptidos de esta digestión se analizaron por espectrometría de masa MALDI-TOF y los datos obtenidos se compararon con los presentes en las bases de datos comerciales (Prospector and Mascot). Este análisis permitió identificar las proteínas correspondientes en cada mancha analizada. Además, para aquellas proteínas cuya función está relacionada con el sistema inmune, se realizó una Transferencia de Western (separación por electroforesis y cuantificación con anticuerpos específicos).

40

##### *Resultados*

45 A los 5 días del nacimiento, los sueros de ratas alimentadas con la fórmula infantil de la invención, mostraban cambios en la expresión de diferentes proteínas. Algunas de esas proteínas, como el precursor de la proteína C3 del complemento y antitripsina, que están directamente relacionadas con la respuesta inmune, estaban en una mayor cantidad que en el suero de ratas alimentadas con la fórmula convencional. Los resultados son los mismos independientemente de que se obtengan por geles bidimensionales o que se obtengan por Transferencia de Western.

50

El análisis de expresión diferencial de proteínas de suero de ratas alimentadas con ambas fórmulas durante 14 días permitió identificar una proteína que se expresaba de forma diferencial entre ambos grupos. Esta proteína se identificó como la proteína precursora de alfa-1-macroglobulina y estaba presente 1,95 más veces en suero de animales alimentados con la fórmula infantil de la invención en comparación con el suero de animales alimentados con la fórmula convencional. Las diferencias con respecto a la expresión de proteína en sangre eran estadísticamente significativas (t Student:  $p < 0.05$ ) (Véase la Fig. 2).

55

Por lo tanto, los animales alimentados para la fórmula infantil de la invención durante 14 días, mostraban un nivel aumentado de proteína precursora de alfa-1-macroglobulina con respecto a los animales alimentados con la fórmula convencional. Las funciones descritas para la alfa-1-macroglobulina indican que un aumento en las concentraciones plasmáticas de esta proteína puede señalar a una competencia inmunológica aumentada o mejorada en estos animales. La alfa-1-macroglobulina es una proteína plasmática de cuatro subunidades con un peso molecular de 720 kDa con actividad inhibidora de proteasas y que pertenece a la superfamilia de las macroglobulinas, elementos del sistema inmunológico que están muy evolutivamente conservados. La alfa-1-macroglobulina en roedores es la proteína ortóloga (equivalente en funciones) a la alfa-2-macroglobulina humana. La actividad antiproteasa como primera barrera para bloquear proteasas producidas por organismos patógenos. La unión de la alfa-2-macroglobulina a proteasas liberadas en procesos inflamatorios produce complejos proteicos que reconocen receptores específicos de macrófagos para facilitar su fagocitosis y degradación intracelular. La alfa-2-macroglobulina no sólo es capaz de unirse a proteasas, sino

65

## ES 2 346 912 T3

también a antígenos para presentarlos a macrófagos y otras células y estimular la producción de anticuerpos. La alfa-2-macroglobulina también se une específicamente a varias citocinas (TNF-alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-8, factor de crecimiento de fibroblastos básico [bFGF], factor de crecimiento derivado de plaquetas [PDGF], factor de crecimiento nervioso beta [beta-NGF] y TGF-beta).

5

### Referencias citadas en la descripción

10 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.*

### Documentos de patentes citados en la descripción

- 15     • EP 1125507 A [0005]                     • WO 05003329 A [0011]  
       • EP 303201 A [0006]                     • EP 1237419 B1 [0013]  
20     • US 20050079244 A [0007]                 • EP 692252 A [0034]  
       • WO 0247612 A [0008]                 • EP 879600 A [0034]  
       • WO 9964022 A [0010]

### 25 Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- *Chin Med J*, 2004, vol. 117 (6), 927-931 [0009]  
       • *Moro et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002, vol. 34, 291-295 [0012]  
30     • *K. Staroscik et al. Immunol.*, 1983, vol. 20 (12), 1277-82 [0023]  
       • *Kunz C. Br J Nutr*, 1999, vol. 82, 391-399 [0031]  
35     • *Shevchenko. Anal. Chem.*, 1996, vol. 68 (5), 850-858 [0083].

40

45

50

55

60

65

# ES 2 346 912 T3

## REIVINDICACIONES

5 1. Composición nutricional que proporciona una mejora en la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune que comprende:

10 un producto derivado del calostro en una cantidad de hasta 1,37 g/100 ml, en cual el producto derivado de calostro es una fracción de calostro enriquecida en proteína de suero que resulta de la eliminación de parte de contenido del calostro, o que resulta de la modificación de la composición del calostro mediante tratamiento enzimático o químico del calostro;

15 un componente prebiótico seleccionado del grupo que consiste en galactooligosacáridos, inulina y mezclas de los mismos, en el cual la inulina es una mezcla de un componente de inulina fácilmente fermentable y un componente de inulina difícilmente fermentable en una proporción en peso específica que varía de 10/90 a 70/30,

20 en la que la inulina fácilmente fermentable es una inulina de cadena corta lineal o ramificada con un grado de polimerización (DP) < 10 o inulina de agave y la inulina difícilmente fermentable es una inulina de cadena larga lineal o ramificada con un DP ≥ 20; y una cantidad complementaria de lactoferrina.

25 2. Composición nutricional de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el producto derivado de calostro comprende entre 30-90 g/100 g de proteína de suero.

30 3. Composición nutricional de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el producto derivado de calostro comprende entre 75-90 g/100 g de proteína de suero.

35 4. Composición nutricional de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 -3, que comprende hasta 100 mg/100 ml de lactoferrina complementaria.

40 5. Composición nutricional de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende hasta 1,2 g/100 ml del componente prebiótico.

45 6. Composición nutricional de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende hasta 0,8 g/100 ml del componente prebiótico.

50 7. Composición nutricional de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el componente prebiótico comprende al menos un galactooligosacárido.

55 8. Composición nutricional de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el componente prebiótico comprende al menos una inulina, en la que la inulina es una mezcla de un componente de inulina fácilmente fermentable y un componente de inulina difícilmente fermentable en una proporción en peso específica que varía de 10/90 a 70/30.

60 9. Composición nutricional de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la composición comprende además uno o más ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados.

65 10. Composición nutricional de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el ácido graso de cadena larga poliinsaturado comprende hasta el 0,4% de ácido docosahexaenoico y hasta el 0,6% de ácido araquidónico del total de ácidos grasos presentes en la fórmula.

70 11. Composición nutricional de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

a) hasta 1,37 g/100 ml de un producto derivado de calostro;

75 b) hasta 1,2 g/100 ml de un componente prebiótico seleccionado del grupo que consiste en galactooligosacáridos, inulina y mezclas de los mismos, en el cual la inulina es una mezcla de un componente de inulina fácilmente fermentable y un componente de inulina difícilmente fermentable en una proporción en peso específica que varía de 10/90 a 70/30;

80 c) hasta el 0,4% de ácido docosahexaenoico y hasta el 0,6% de ácido araquidónico del total de ácidos grasos presentes en la fórmula; y

d) hasta 100 mg/100 ml de lactoferrina complementaria.

85 12. Composición nutricional de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además probióticos, nucleótidos, minerales, vitaminas o mezclas de los mismos.

## ES 2 346 912 T3

13. Composición nutricional de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, que comprende hasta 1,2 g/100 ml de galactooligosacáridos.

5 14. Fórmula infantil que proporciona una mejora de la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune que comprende la composición nutricional de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13.

15. Uso de la composición nutricional de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la preparación de una fórmula infantil para mejorar la regulación y estimulación del desarrollo del sistema inmune.

10

15

20

25

30

35

40

45

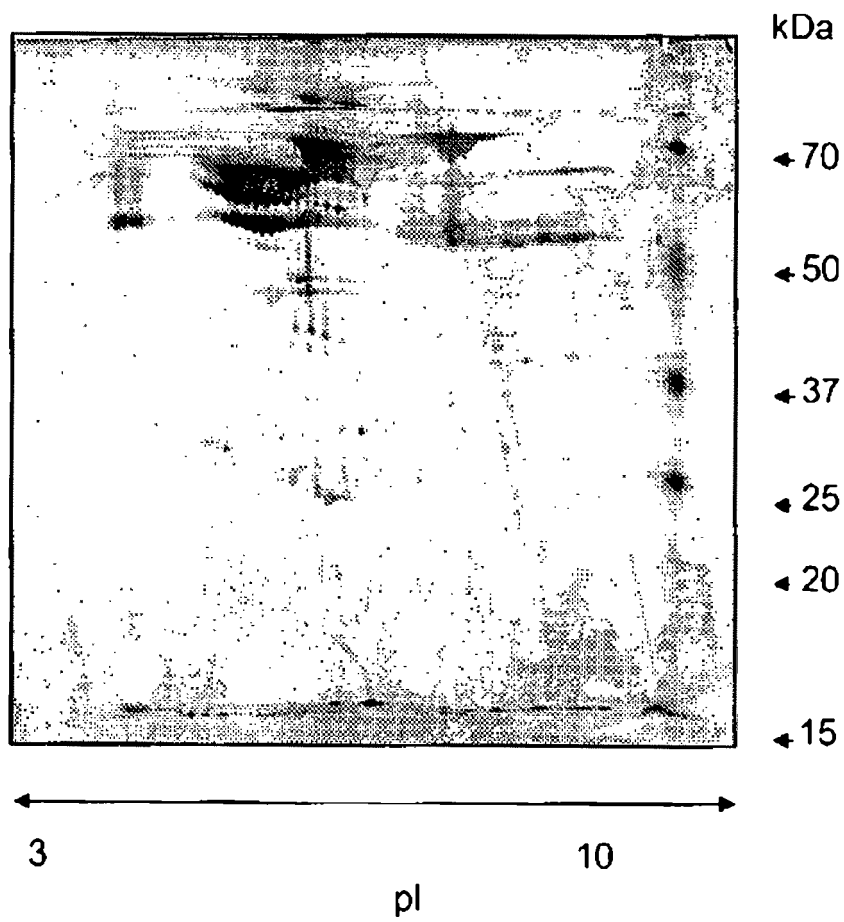
50

55

60

65

**FIG. 1**



**FIG. 2**

