

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 190**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/00** (2006.01)  
**A23L 33/21** (2006.01)  
**A23L 33/135** (2006.01)  
**A61K 31/702** (2006.01)  
**A61K 31/733** (2006.01)  
**A61K 35/745** (2015.01)  
**A61P 1/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2017 PCT/EP2017/067019**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.02.2018 WO18024440**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2017 E 17736937 (8)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3493686**

54 Título: **Composiciones nutritivas y fórmulas infantiles que comprenden una mezcla de oligosacáridos y, opcionalmente, *Bifidobacterium lactis* para prevenir, tratar o reducir la gravedad de la diarrea asociada a no rotavirus**

30 Prioridad:

**04.08.2016 EP 16182797**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.12.2024**

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)**  
**Entre-deux-Villes**  
**1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**BERGER, BERNARD y**  
**BRUESSOW, HARALD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 992 190 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

Composiciones nutritivas y fórmulas infantiles que comprenden una mezcla de oligosacáridos y, opcionalmente, *Bifidobacterium lactis* para prevenir, tratar o reducir la gravedad de la diarrea asociada a no rotavirus

5 Campo de la invención

10 La presente invención se relaciona con composiciones nutritivas para lactantes y niños pequeños y sus efectos sobre la salud de los lactantes. En particular, se refiere a una fórmula infantil que comprende una mezcla específica de oligosacáridos probióticos para prevenir, tratar o reducir la gravedad o el riesgo de diarrea y, especialmente, diarrea asociada a no rotavirus. En un aspecto adicional, la composición comprende, además, un probiótico *Bifidobacterium animalis ssp lactis*.

15 Antecedentes de la invención

20 Cuando las madres no pueden amamantar a sus hijos, la fórmula infantil proporciona una alternativa adecuada a la lactancia natural con leche materna humana. Las composiciones nutritivas para lactantes y niños pequeños se comercializan, frecuentemente, como polvos que se reconstituyen con agua o, en algunos casos como composiciones líquidas concentradas o listas para beber. Dichas composiciones están destinadas a cubrir la mayor parte o todas las necesidades nutricionales de los lactantes o niños pequeños.

25 Sin embargo, se sabe que la leche materna humana representa el patrón de oro en términos de nutrición de los lactantes. Los fabricantes de fórmulas infantiles han realizado muchos intentos para inducir efectos nutricionales en la salud casi iguales o similares a los beneficios de la leche materna humana.

30 La leche materna se recomienda para todos los lactantes. Sin embargo, en algunos casos, la lactancia materna es inadecuada o fracasa por razones médicas o la madre decide no amamantar. Las fórmulas infantiles se han desarrollado para estas situaciones. También se han desarrollado fortificantes para enriquecer la leche materna o la fórmula infantil con ingredientes específicos.

35 Sin embargo, en muchos casos los estudios han demostrado que las fórmulas infantiles no inducen los mismos efectos en el organismo que la leche materna humana. Por ejemplo, los lactantes alimentados con fórmulas infantiles y los lactantes alimentados con leche materna humana (HBM, por sus siglas en inglés) pueden presentar una microbiota intestinal (tracto intestinal) diferente.

La infancia, especialmente, las primeras semanas, 3 meses, 6 meses o 12 meses de vida es crítica para el establecimiento de una microbiota intestinal equilibrada.

40 Se conoce que la modulación de la microbiota intestinal durante la infancia puede tener prospectivamente una gran influencia en el futuro estado de salud del organismo. Por ejemplo, la flora intestinal puede influir en el desarrollo de la obesidad en etapas posteriores de la vida, en el desarrollo de un sistema inmunitario fuerte en etapas posteriores de la vida o en el crecimiento normal.

45 De manera similar, una flora intestinal saludable es un indicador de la salud de un lactante y la microbiota intestinal alterada puede ser un indicador (y/o una causa) de eventos de salud anormales tales como diarrea, absorción deficiente de nutrientes, cólicos, alteración del sueño, y alteración del crecimiento y el desarrollo.

50 Se conoce que el modo de nacimiento puede afectar a la microbiota intestinal inicial de los lactantes: se ha demostrado que los lactantes nacidos por operación cesárea (sección-C) tienen una microbiota intestinal diferente en comparación con los lactantes que nacen por parto vaginal.

55 Se sabe que, entre otros ingredientes, los carbohidratos no digeribles (prebióticos) en particular pueden afectar a la promoción de una microbiota particular. Por ejemplo, se ha demostrado que ciertos galactooligosacáridos (GOS) y/o ciertos fructooligosacáridos (FOS) pueden promover el crecimiento y la prevalencia de bifidobacterias en el intestino, especialmente en lactantes.

60 La microbiota intestinal y su evolución durante el desarrollo del lactante es, sin embargo, un delicado equilibrio entre la presencia y la prevalencia (cantidad) de muchas poblaciones de bacterias intestinales. Algunas bacterias intestinales se clasifican como "generalmente positivas" mientras que otras son "generalmente negativas" (o patógenas) en cuanto a su efecto sobre la salud general del lactante.

65 Ciertas especies de bacterias "generalmente positivas", tales como las bifidobacterias, pueden estar poco representadas en lactantes alimentados con fórmulas infantiles convencionales, en comparación con los lactantes alimentados con leche materna. De manera similar, algunas poblaciones de bacterias se consideran patógenas y deben permanecer con baja prevalencia en la microbiota intestinal.

Verdaderamente los lactantes alimentados con fórmulas infantiles pueden no beneficiarse de la flora intestinal (microbiota intestinal) natural y bien equilibrada de los lactantes alimentados exclusiva o predominantemente con leche materna humana. En efecto, tal microbiota natural observada en lactantes alimentados con leche materna está bien controlada a lo largo del tiempo (evolución con el paso del tiempo) y es muy compleja. Diversos taxones de microorganismos coexisten en el microambiente altamente complejo del intestino/tracto intestinal, cada uno de ellos en proporciones definidas secuencialmente. Las dimensiones cuantitativas y cualitativas deben considerarse cuando se define la microbiota de los lactantes o niños pequeños. Además, la variación de la microbiota intestinal a lo largo del tiempo aumenta la complejidad.

Una flora intestinal sana es un indicador de la salud de un lactante y una microbiota intestinal alterada puede ser un indicador (y/o una causa) de eventos de salud anormales tales como diarrea, absorción deficiente de nutrientes, cólicos, alteración del sueño y/o alteración del crecimiento y el desarrollo.

La diarrea, también deletreada diarrea, es una afección que consiste en tener al menos tres evacuaciones intestinales sueltas o líquidas cada día. Frecuentemente, dura algunos días y puede provocar deshidratación debido a la pérdida de líquidos. Los signos de deshidratación comienzan, frecuentemente, con la pérdida de la elasticidad normal de la piel y cambios en la personalidad. Esto puede progresar a una disminución de la micción, pérdida de color de la piel, un ritmo cardíaco acelerado y una disminución en la capacidad de respuesta a medida que se vuelve más grave. La diarrea implica, además, una disbiosis de la microbiota intestinal global que precede y sigue al evento o eventos de diarrea. La diarrea es una de las causas principales de mortalidad infantil, y se encuentra entre las cuatro principales causas de pérdida de años de vida en el África subsahariana y el sur de Asia. Se estima que la proporción de muertes atribuidas a la diarrea entre niños menores de 5 años es aproximadamente 15 % en todo el mundo. La causa más común es una infección intestinal debido a un virus, bacteria o parásito; una afección conocida como gastroenteritis. La diarrea inducida por o relacionada con rotavirus es una de las causas principales de diarrea. *Escherichia coli* es, después del rotavirus, un patógeno principal de la diarrea en niños de países en desarrollo. Además, la supervivencia conlleva riesgos. Los casos frecuentes de diarrea antes de los 2 años se vinculan con un déficit de crecimiento promedio posterior de 3,6 cm, una frecuencia cardíaca elevada después del ejercicio, una pérdida de 10 puntos de CI y aproximadamente una demora de un año en el inicio de la escolarización. Por lo tanto, es importante reducir los episodios de diarrea, pero, además, mejorar la velocidad de recuperación y la convalecencia después de ellos.

Este tipo de infecciones entéricas son generalmente afecciones autolimitadas, pero la terapia no específica puede proporcionar alivio a algunos pacientes, y la terapia específica puede acortar la duración de la enfermedad y erradicar la excreción fecal del organismo. En el cuidado de pacientes con diarrea y deshidratación, las principales consideraciones terapéuticas incluyen la terapia con líquidos y electrolitos, la manipulación de la dieta (pero la restauración de la alimentación es importante para reducir los defectos nutricionales), la terapia no específica con compuestos antidiarreicos (para reducir los síntomas) y la terapia específica con agentes antimicrobianos (generalmente, solo en caso de disentería).

Sin embargo, estas soluciones existentes no son muy apropiadas para lactantes y niños pequeños debido a su corta edad y fragilidad, especialmente, el uso de compuestos antidiarreicos no está aprobado para niños menores de 2 años.

Los antibióticos tampoco son apropiados debido a la corta edad de los lactantes y niños pequeños, pero, además, debido a que la *E. coli* es resistente a muchos antibióticos (Jiang ZD, *et al.* Prevalence of enteric pathogens among international travelers with diarrhea acquired in Kenya (Mombasa), India (Goa), or Jamaica (Montego Bay). *J Infect Dis.* 2002;185(4):497-502).

Por lo tanto, se han desarrollado terapias alternativas.

Se investigó la terapia con fagos contra la diarrea por *E. coli* (Brüssow H. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16000704>). Los cócteles de fagos contra muchas infecciones bacterianas, incluida la diarrea por *E. coli*, se venden en farmacias rusas, pero su eficacia no se ha documentado en informes científicos detallados. Ni el cóctel de colifagos de tipo T4 ni el cóctel de colifagos ruso comercial tuvieron ningún impacto en los criterios cuantitativos de diarrea en un ensayo clínico piloto con niños en su mayoría infectados por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, por sus siglas en inglés). El pico de ETEC fecal fue de corta duración, de bajo amarre y solo la mitad de los aislamientos fecales de *E. coli* fueron sensibles al fago.

Se ha investigado, especialmente, el uso de probióticos. Por ejemplo, la cepa ST11 de *Lactobacillus paracasei* mejora el resultado de la diarrea por no rotavirus en niños de Bangladesh, pero no tiene ningún efecto sobre la diarrea por rotavirus, A. Sarker, *Pediatrics* 2005. Los probióticos no constituyen la solución más adecuada para tratar o prevenir la diarrea en toda su extensión, ya que solo pueden aumentar los taxones específicos de microbiota. De hecho, se considera que los probióticos son preparaciones microbianas viables que promueven la salud del individuo mediante la preservación de la microflora natural en el intestino. Se considera que estos se adhieren a la mucosa del intestino, colonizan el tracto intestinal y, además, previenen la adhesión de microorganismos dañinos a este. Un requisito previo crucial para su acción reside en que tienen que llegar a la mucosa del intestino en una forma adecuada y viable y no destruirse en la parte superior del tracto gastrointestinal, especialmente, por la influencia del pH bajo que prevalece

en el estómago. Otra dificultad es que la microbiota intestinal es muy diversificada y compleja, y las bacterias tienen diversas interacciones en su interior.

5 Además, se han explorado otros ingredientes como los carbohidratos no digeribles (prebióticos). Especialmente, se ha informado que los oligosacáridos de leche humana (HMO, por sus siglas en inglés) reducen la duración de la diarrea por rotavirus en cerdos alimentados con fórmula (Li et al ISME J 2014 y un estudio de la Universidad de Illinois de 2015).

10 Además, se ha estudiado la sialilactosa para un posible efecto protector contra la diarrea. A. Weiss y T. Hennem han descrito "The role of milk sialyllactose in intestinal bacterial colonization" (Adv Nutr. mayo de 2012; 3(3): 483S–488S; Publicado en línea el 4 de mayo de 2012. doi: 10.3945/an.111.001651).

15 El documento WO200440032639A1 describe la combinación de fructooligosacáridos (FOS, por sus siglas en inglés) / oligofructosa (FOS, por sus siglas en inglés) y probióticos específicos y sialilactosa que son útiles en la erradicación de microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal de los pacientes.

Además, se ha descrito el calostro bovino como un tratamiento natural para la diarrea y otras dolencias gastrointestinales.

20 *La reseña "European Journal of Clinical Nutrition (2003) 57, 1351–1369. doi:10.1038/sj.ejcn.1601704", proporciona una visión general sobre el papel y el efecto del ácido sialílico en la nutrición humana.*

25 El documento WQ2012160080A1 de Berrocal *et al.*, describe una mezcla de oligosacáridos y algunos de sus efectos sin vincularlos a ningún efecto beneficioso particular tal como la diarrea y, especialmente, la diarrea asociada a no rotavirus.

30 En la publicación *Nutrients* 2011, 3, 228-244; doi:10.3390/nu3020228, D. Bergner *et al.*, la sialilactosa se acopló a dipalmitoilfosfatidiletanolamina (PE, por sus siglas en inglés) mediante aminación reductiva y el producto (SLPE) se purificó mediante HPLC y se probó contra la diarrea asociada a rotavirus en los lechones.

35 Algunas de estas sustancias pueden funcionar como receptores señuelo solubles en el intestino, protegiendo al neonato de los patógenos entéricos (Newburg *et al.*, Human milk glycans protect infants against enteric pathogens". Annual Review of Nutrition 2005;25:37-58) y, además, estas pueden interactuar directamente con las células epiteliales intestinales para producir cambios que pueden interferir con las interacciones huésped-microbio (Bode *et al.*, 2012).

El documento US 2009/0041736 A1 describe preparados que comprenden un probiótico y una mezcla prebiótica específicamente diseñada para mejorar la eficiencia y la eficacia del probiótico.

40 El documento US 2011/0064707 A1 está dirigido a la administración a lactantes, sin hermanos, de bacterias probióticas capaces de promover una microflora intestinal bifidogénica temprana.

45 El documento WO 2017/021479 A1 es un documento conforme al Art. 54(3) EPC y describe preparados para lactantes que comprenden un probiótico específico para inducir una microbiota intestinal cercana a la de los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna humana.

Si bien se han hecho muchos intentos, permanece la necesidad de prevenir y/o reducir la gravedad o la duración de la diarrea, especialmente, en lactantes o en niños pequeños.

50 Existe la necesidad específica de identificar los compuestos naturalmente presentes en los ingredientes nutritivos convencionales (tal como la leche bovina), y asociarlos en una mezcla capaz de suministrar un beneficio de salud particular contra la diarrea y, especialmente, la diarrea asociada a no rotavirus.

55 La mayoría de estos estudios proporcionan soluciones que no abordan el tratamiento o la prevención de afecciones diarreicas por no rotavirus y todos los síntomas asociados. Estas pueden actuar sobre la microbiota solo al modular taxones específicos de microbiota, p. ej., dan lugar a un mayor número de bifidobacterias o un menor número de clostridios.

60 Sin embargo, actualmente no hay ninguna solución disponible para tratar o prevenir la diarrea por no rotavirus al acercar la microbiota intestinal global (es decir, la microbiota general/total) a la normal. Ninguna solución existente parece tener en cuenta la función microbiana intestinal.

65 Por lo tanto, existe la necesidad de que en los lactantes o niños pequeños se reduzca los riesgos de diarrea y/o diarrea por no rotavirus y/o se mejore la recuperación al acortar la duración de la diarrea (y diarrea por no rotavirus) y/o al reducir los síntomas y consecuencias de la diarrea (y diarrea por no rotavirus), especialmente, al actuar sobre la disbiosis de la microbiota intestinal global antes, durante y/o después de los eventos de diarrea (o diarrea por no rotavirus) en dichos lactantes o niños pequeños.

- 5 Existe la necesidad de compensar la microbiota intestinal general anormal observada en lactantes o niños pequeños en caso de diarrea o diarrea por no rotavirus. Existe la necesidad de reequilibrar tal microbiota intestinal general, en términos de composición y función.
- 10 Existe la necesidad de mejorar un buen equilibrio en la microbiota intestinal general de los lactantes, especialmente mediante la regulación negativa o la represión del crecimiento de bacterias patógenas, durante las primeras semanas de vida cuando se establece tal equilibrio.
- 15 Existe la necesidad de composiciones nutritivas para lactantes o niños pequeños que proporcionen una microbiota intestinal global y una huella metabólica más cercana a las obtenidas en situaciones normales (es decir, situación saludable, sin diarrea) y/o para lactantes alimentados por lactancia materna.
- 20 Existe la necesidad de proporcionar a dichos lactantes o niños pequeños la mejor nutrición que permita el desarrollo de una microbiota intestinal global cercana a la que no tiene la diarrea por no rotavirus y/o cercana a la de los lactantes alimentados por lactancia materna, en la que dicho desarrollo sea a corto plazo (es decir, durante la intervención nutricional) y/o a largo plazo (es decir, después de la intervención nutricional).
- 25 Existe la necesidad de composiciones nutritivas para lactantes o niños pequeños que proporcionen una composición de microbiota que no sea permisiva para el desarrollo de diarrea o diarrea por no rotavirus y/o que promueva una recuperación más rápida de la diarrea/diarrea por no rotavirus.
- 30 Existe la necesidad de suministrar tales beneficios para la salud a los lactantes o los niños pequeños de una manera que no induzca efectos secundarios y/o que sea fácil de administrar y bien aceptada por los padres o los profesionales de la salud.
- 35 Existe la necesidad, para los lactantes alimentados con fórmulas infantiles, de promover y/o inducir una microbiota que evolucione de manera similar a la microbiota de los lactantes alimentados por lactancia materna y, por lo tanto, influya positivamente en los eventos de diarrea.
- 40 Además, existe la necesidad, para los lactantes alimentados con fórmulas infantiles, de proporcionarles la mejor nutrición que permita el desarrollo de una microbiota cercana a la microbiota de los lactantes alimentados por lactancia materna, a corto plazo durante la intervención nutritiva y/o a largo plazo, después de la intervención nutritiva.
- 45 Existe la necesidad de compensar la microbiota subnormal observada en los lactantes que no se alimentan por lactancia materna. Existe la necesidad de equilibrar nuevamente tal microbiota.
- 50 Existe la necesidad, para los lactantes alimentados con fórmulas infantiles, de inducir y/o promover el desarrollo de familias bacterianas específicas, género o especies o cepas en sus intestinos, tal como para obtener una microbiota cercana a la microbiota de los lactantes alimentados por lactancia materna que es naturalmente mejor para prevenir o tratar la diarrea, especialmente, la diarrea asociada a no rotavirus.
- 55 Existe la necesidad de regular negativamente el desarrollo y crecimiento de bacterias patógenas o "bacterias negativas" en el intestino de los lactantes y niños pequeños, mientras que se promueve, además, preferentemente, las bacterias positivas saludables.
- 60 Existe la necesidad de afectar selectivamente o reducir el crecimiento de bacterias patógenas en el intestino de lactantes y niños pequeños al mismo tiempo que se promueve o al menos no impacten el crecimiento de las bacterias intestinales positivas.
- 65 Existe la necesidad de mejorar un buen equilibrio en la microbiota intestinal general de los lactantes, especialmente mediante la regulación negativa o la represión del crecimiento de bacterias patógenas, durante las primeras semanas de vida cuando se establece tal equilibrio.
- Breve descripción de la invención
- 60 La invención se relaciona con una composición nutritiva para lactantes y niños pequeños para su uso tal como se define en la reivindicación 1. La composición puede comprender, además, un probiótico *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis*. Los lactantes o niños pequeños tienen entre 0 y 36 meses, preferentemente, entre 0 y 12 meses de edad, con mayor preferencia, entre 0 y 6 meses de edad. La composición de la invención se utiliza para tratar, prevenir o reducir el riesgo, y/o la gravedad y/o la aparición de diarrea asociada a no rotavirus.
- 65

Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra la proporción de heces de varias consistencias en diferentes grupos (grupo "T": El grupo de prueba que recibe la composición de la invención, grupo alimentado por lactancia materna "B", grupo de control "C" alimentado convencionalmente no de acuerdo con la invención).

Figura 2: muestra el promedio ponderado de la distancia UniFrac entre los grupos alimentados con fórmula T y C y el grupo B alimentado por lactancia materna. Grupo T: con probiótico *B. lactis*; Grupo C: control sin probiótico *B. lactis*. Mientras más cerca es la distancia al cero, más cercano al grupo B alimentado por lactancia materna.

Figura 3: diagramas de cajas del análisis de la diversidad alfa en tres puntos de tiempo para los tres grupos de alimentación. Valor de P: \*, <0,05; \*\*, <0,01; \*\*\*, <0,001 (grupo T: con probiótico *B. lactis*; grupo C: control sin probiótico *B. lactis*; grupo B: alimentado por lactancia materna)

Figura 4: recuentos equivalentes de bacterias medidos por qPCR en las heces de los lactantes que reciben la fórmula especificada (C=control; T=fórmula de prueba con probiótico *B. lactis*) o quienes fueron amamantados (grupo B), en el momento de la inclusión (<2 sem) y en seis (6 sem) y doce (12 sem) semanas de edad. Los resultados del qPCR se dan como la media + SEM de las células bacterianas por g de heces. La línea de puntos, límite de detección. Las barras de error, desviación estándar.

Figura 5: proporción de lactantes en los tres grupos de alimentación especificada en la parte inferior que muestra las heces con el color definido en la abscisa a <2 sem (valores iniciales) y 12 sem de edad (panel derecho). (grupo T: con probiótico *B. lactis*; grupo C: control sin probiótico *B. lactis*; grupo B: alimentado por lactancia materna).

Figura 6: recuentos de bifidobacteria (log ufc de bifidobacteria por g de heces) en lactantes a 3, 10, 28 y 84 días, en cada grupo evaluado (fórmula de prueba/parto vaginal; fórmula de prueba/parto por cesárea; fórmula de control/parto vaginal; fórmula de control/parto por cesárea).

Descripción de la invención

Definiciones:

Como se usa en la presente descripción, los siguientes términos tienen los siguientes significados.

El término "lactante" significa un niño menor de 12 meses de edad.

La expresión "niño pequeño" significa un niño de entre uno y tres años de edad, conocido, además, como "niño en la etapa de aprender a caminar".

Un "lactante o niño pequeño nacido por cesárea" significa un lactante que nació por cesárea. Significa que el lactante no nació por parto vaginal

Un "pretérmino" o "prematuro" significa un lactante o niño pequeño que no nació a término. Generalmente, se refiere a un lactante nacido antes de finalizar las 37 semanas de gestación.

La expresión "composición nutritiva" significa una composición que nutre al sujeto. Esta composición nutritiva es, usualmente, para tomarse por vía enteral, oral, parenteral o intravenosamente, y usualmente incluye una fuente de lípidos o grasas y una fuente de proteínas. Preferentemente, una composición nutritiva es para uso oral.

La expresión "composición nutritiva hipoalérgica" significa una composición nutritiva que no es probable que cause reacciones alérgicas.

La expresión "composición sintética" significa una mezcla obtenida por medios químicos y/o biológicos, que puede ser químicamente idéntica a la mezcla que existe naturalmente en las leches de los mamíferos.

La expresión "fórmula infantil" significa un alimento destinado para usos nutricionales particulares por los lactantes durante los primeros cuatro a seis meses de vida y que satisface por sí mismo los requerimientos nutricionales de esta categoría de persona (Artículo 1.2 de la Directiva de la Comisión Europea 91/321/EEC del 14 de mayo de 1991 sobre fórmula infantil y fórmula de seguimiento).

La expresión "fórmula infantil de inicio" significa un alimento destinado para usos nutricionales particulares por los lactantes durante los primeros cuatro meses de vida.

La expresión "fórmula de seguimiento" significa un alimento destinado para usos nutricionales particulares por los lactantes mayores de cuatro meses y que constituye el principal elemento líquido en la dieta de esta categoría de persona que se diversifica progresivamente.

## ES 2 992 190 T3

La expresión "alimento para bebé" significa un producto alimenticio destinado para usos nutricionales particulares por los lactantes durante los primeros años de vida.

5 La expresión "fortificante" se refiere a composiciones nutritivas adecuadas, líquidas o sólidas, para mezclar con leche materna o fórmula infantil.

El término "periodo de destete" significa el periodo durante el cual la leche materna se sustituye por otro alimento en la dieta de un lactante.

10 La "leche materna" debe entenderse como la leche materna o el calostro de la madre (=Leche Materna Humana=HBM).

El término "oligofructosa", como se usa en la presente descripción, se refiere a oligómeros de fructosa. Estos pueden ser de cadena larga o de cadena corta, en dependencia del grado de polimerización de la oligofructosa (cantidad de monómeros). Preferentemente, la oligofructosa de la invención es una oligofructosa de cadena corta, con la máxima preferencia, esta tiene un grado de polimerización de 2 a 10, por ejemplo, un grado de polimerización de 2 a 8.

15 El término "palmitato sn-2", como se usa en la presente descripción, se refiere al ácido palmítico en la posición sn-2 del triglicérido al que se une.

20 El término "triglicérido de alto contenido en palmitato sn-2" se refiere a un triglicérido (TG) que contiene más de 30 % del ácido palmítico en la posición sn-2. Por ejemplo, un ingrediente con palmitato sn-2 alto disponible comercialmente vendido por Lipid Nutrition es Betapol™ B-55. Este es una mezcla de triglicéridos derivados a partir de aceite vegetal en el que al menos 54 % del ácido palmítico está en la posición sn-2 de la molécula de glicerol.

25 El término "Alfa-lactoalbúmina" se refiere a una proteína del suero de la leche, de alta calidad, de fácil digestión que comprende 20-25 % del total de las proteínas de la leche materna humana (HBM) y es la proteína principal encontrada en HBM. La estructura de alfa-lactoalbúmina comprende 123 aminoácidos y 4 puentes disulfuro y la proteína tiene un peso molecular de 14.2 K Daltons. La alfa-lactoalbúmina es ideal para fórmulas infantiles con menor contenido de proteínas debido a su contenido alto de aminoácidos esenciales, particularmente, triptófano.

30 El término "prebiótico" significa carbohidratos no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de bacterias saludables tal como bifidobacterias en el colon de los humanos (*Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J Nutr. 1995;125:1401-12*).

35 El término "probiótico" significa preparaciones de células microbianas o de componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar del huésped. (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. *et al. "Probiotics: how should they be defined" Trends Food Sci. Technol. 1999;10 107-10*). Las células microbianas son, generalmente, bacterias o levaduras.

40 El término "ufc" debe entenderse como unidad formadora de colonias.

45 El término diarrea "asociada a no rotavirus" (denominada, además, igualmente, "diarrea relacionada con no rotavirus" o "diarrea causada por no rotavirus") indica diarrea y/o heces muy blandas/semilíquidas/líquidas no causadas/asociadas/relacionadas con la infección del sujeto por un rotavirus (familia reoviridae, subfamilia Sedoreovirinae, género Rotavirus). La diarrea asociada a no rotavirus se asocia, frecuentemente, a la gastroenteritis asociada a no rotavirus y la invención puede extenderse a la gastroenteritis asociada a no rotavirus.

50 La lactancia materna exclusiva/lactantes o niños pequeños alimentados exclusivamente por lactancia materna: tiene el significado común de lactantes para los que la gran mayoría de los nutrientes y/o de energía se origina a partir de la leche materna humana (la "gran mayoría" puede ser al menos 90 % o al menos 95 %, o al menos 99 %).

55 Los lactantes/niños pequeños alimentados predominantemente con fórmulas infantiles: tiene el significado común y se refiere a lactantes o niños pequeños en los que las fuentes de nutrientes y/o de energía se originan predominantemente a partir de las fórmulas infantiles sintéticas, leche de seguimiento o leches de crecimiento. Predominantemente se refiere al menos 50 % de esos nutrientes y/ de energía, o al menos 75 %.

Todos los porcentajes son en peso a menos que se indique de cualquier otra manera.

60 La invención ahora se describirá en mayor detalle. Se señala que los diversos aspectos, características, ejemplos y realizaciones descritos en la presente solicitud pueden ser compatibles y/o combinarse entre sí.

65 Además, en el contexto de la invención, los términos "que comprende" o "comprende" no excluyen otros elementos posibles. La composición de la presente invención, que incluye las distintas realizaciones descritas en la presente descripción, puede comprender, consistir en o consistir esencialmente en los elementos esenciales y las limitaciones descritos en la presente descripción, así como cualquier ingrediente, componente o limitación adicional u opcional

descritos en la presente descripción o de cualquier otra manera en la presente descripción en función de las necesidades.

#### Descripción detallada de la invención

5 Típicamente, una fórmula infantil en una forma líquida lista para consumir (por ejemplo, reconstituida a partir de un polvo) proporciona 60-70 kcal/100 ml. Típicamente, la fórmula infantil comprende por 100 Kcal: aproximadamente 1,8-4,5 g de proteína; aproximadamente 3,3-6,0 g de grasa (lípidos); aproximadamente 300-1200 mg de ácido linoleico; aproximadamente 9-14 g de carbohidratos seleccionados a partir del grupo que consiste en lactosa, sacarosa, glucosa, jarabe de glucosa, almidón, maltodextrinas y maltosa, y combinaciones de estos; y vitaminas y minerales esenciales. La lactosa puede ser el carbohidrato predominante en una fórmula infantil. Por ejemplo, una fórmula infantil líquida puede contener aproximadamente 67 kcal/100 ml. En algunas realizaciones, la fórmula infantil puede comprender aproximadamente 1,8-3,3 g de proteína por 100 Kcal. La fórmula infantil puede estar en la forma de un polvo que puede reconstituirse en un líquido listo para consumir mediante la adición de una cantidad de agua que produce, por ejemplo, un líquido que tiene aproximadamente 67 kcal/100 ml.

Una fórmula infantil puede comprender, además, nucleótidos seleccionados a partir de citidina 5'-monofosfato (CMP), uridina 5'-monofosfato (UMP), adenosina 5'-monofosfato (AMP), guanosina 5'-monofosfato (GMP) e inosina 5'-monofosfato (IMP), y mezclas de estos. La fórmula infantil puede comprender, además, luteína, zeaxantina, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, sialilactosa, y/o fucosilactosa. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, tales como ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA) pueden incluirse en las fórmulas infantiles. La fórmula infantil puede incluir, además, aminoácidos libres. La fórmula infantil puede incluir, además, otros ingredientes bien conocidos en la técnica.

25 En una realización, la fórmula infantil de esta invención comprende aproximadamente 5-6 g por 100 kcal de grasa (triglicéridos), con al menos un 8 % en peso de esta grasa, que consiste en ácido palmítico en la posición *sn*-2 de un triglicérido. En algunas realizaciones, aproximadamente 8,0-11,5 %, aproximadamente 8,5-11,0 % o aproximadamente 9,0-10,0 % en peso de la grasa es ácido palmítico en la posición *sn*-2 de un triglicérido.

30 En algunas realizaciones, el ácido palmítico comprende de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 %, tal como de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 %, del contenido total de los ácidos grasos en la fórmula, por peso, y al menos de aproximadamente 30 %, por ejemplo, de aproximadamente 35 a aproximadamente 43 % del contenido total de ácido palmítico está en la posición *sn*-2.

35 En algunas realizaciones, la fórmula infantil comprende, además, al menos un ácido graso omega 6 y al menos un ácido graso omega 3 en una relación de aproximadamente 6 a aproximadamente 1. En una realización, al menos uno de los ácidos grasos omega 6 comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 % en peso del total de los ácidos grasos y al menos un ácido graso omega 3 comprende de aproximadamente 1,2 % a aproximadamente 3,6 % del total de los ácidos grasos. En algunas realizaciones, la fórmula infantil comprende al menos un ácido graso omega 6 presente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 % del peso total y al menos un ácido graso omega 3 presente de aproximadamente 0,3 % a aproximadamente 0,6 % del peso total.

45 En la fórmula infantil de esta invención la grasa comprende una variedad de triglicéridos que se encuentran, típicamente, en la leche y/o fórmula infantil. Los residuos de ácidos grasos más comunes en los triglicéridos son los ácidos palmítico y oleico. Además de los residuos de ácidos grasos palmítico y oleico que están presentes incluyen, pero no se limitan a, ácido linoleico, ácido alfa linolénico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido docosahexaenoico, y ácido araquidónico. Estudios clínicos recientes en lactantes demuestran que las fórmulas nutritivas que contienen al menos un ácido graso omega 6 y al menos un ácido graso omega 3 en una relación de aproximadamente 6 a aproximadamente 1 aumentan la acumulación de DHA en los eritrocitos y plasma. Una relación equilibrada de aproximadamente 6:1 de ácido graso omega 6 a ácido graso omega 3 puede proporcionar, además, beneficios para la salud a largo plazo que incluyen la protección contra la enfermedad cardiovascular. Tal equilibrio se logrará mediante la formulación de la presente invención con fuentes grasas de aceite vegetal que tienen contenido de ácido graso omega 6, tales como, por ejemplo, aceite de soja y aceite de girasol, y el contenido de ácido graso omega 3, por ejemplo, de semilla de colza, canola, semilla de linaza, chía, perla o nueces. Una mezcla única de grasa con 5 aceites diferentes se utilizará para lograr la mezcla de grasa modificada.

50 En una realización, la fórmula infantil de esta invención comprende de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 2,2 g de proteína total por 100 kcal, por ejemplo, de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 2,1 g o de aproximadamente 1,9 a aproximadamente 2,1 g de proteína por 100 kcal, en donde de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,4 g/100 kcal de proteína es alfa-lactoalbúmina. La fórmula infantil de esta invención puede estar en la forma de un líquido listo para consumir, o puede ser un concentrado líquido o una fórmula en polvo que puede reconstituirse en un líquido listo para consumir mediante la adición de una cantidad de agua que produce un líquido que tiene aproximadamente 67 kcal/100 ml. La fórmula infantil de esta invención incluye todos los ingredientes que son requeridos por la ley en los EE. UU. o UE, que incluye, pero no se limita a ciertas vitaminas, minerales, y aminoácidos esenciales. Esta puede incluir, además, nucleótidos, tales como CMP, UMP, AMP, IMP y GMP, luteína, zeaxantina, y otros ingredientes conocidos en la técnica.

## Oligosacáridos

La composición nutritiva de la invención comprende oligosacáridos tal como se definen a continuación. En el presente documento, la mezcla de oligosacáridos se refiere como "oligosacáridos" o "mezcla de oligosacáridos". Tal oligosacárido(s) puede ser, por ejemplo, polifruktosa, fructooligosacáridos (FOS), fructooligosacáridos de cadena larga, fructooligosacáridos de cadena corta (por ejemplo, con un grado de polimerización (DP) entre 2 y 8), inulina, galactooligosacáridos, oligosacáridos sialilados, oligosacáridos fucosilados, oligosacáridos N-acetilados, y mezcla de estos.

## Mezcla de oligosacáridos:

En una realización, los oligosacáridos de la invención están presentes en la composición en una cantidad entre 0,5 y 10 g/100 kcal, preferentemente, entre 1 y 5 g/100 kcal, con la máxima preferencia, entre 2 y 4 g/100 kcal. En algunas realizaciones específicas, la composición nutritiva puede comprender la mezcla de oligosacáridos en una cantidad de 0,5 a 3,1 g/100 kcal, o en una cantidad de 0,6 a 3,1 g/100 kcal, o en una cantidad de 0,6 a 2,0 g/100 kcal, o en una cantidad de 0,7 a 2,0 g/100 kcal, o en una cantidad de 0,8 a 1,8 g/100 kcal, o en una cantidad de 0,9 a 1,7 g/100 kcal, o en una cantidad de 1,0 a 1,5 g/100 kcal o en una cantidad de 1,0 a 1,6 g/100 kcal.

En una realización, los oligosacáridos están presentes en la composición en una cantidad de al menos 0,5 % en peso, 1 % en peso, al menos 5 % en peso o al menos 10 % en peso. En una realización, los oligosacáridos están presentes en la composición en una cantidad entre 0,5 % en peso y 10 % en peso, o entre 1 % en peso y 5 % en peso.

En un aspecto de la invención, la composición nutritiva comprende la mezcla de oligosacáridos en una cantidad de 1 % o 2,5 % a 15 % en peso. Alternativamente, la composición nutritiva comprende la mezcla de oligosacáridos en una cantidad de 3 a 15 % en peso, o en una cantidad de 3 a 10 % en peso, o en una cantidad de 3,5 a 9,5 % en peso o en una cantidad de 4 a 9 % en peso o en una cantidad de 4,5 a 8,5 % en peso, o en una cantidad de 5,0 a 7,5 % en peso o en una cantidad de 5 a 8 % en peso.

La mezcla de oligosacáridos de la invención comprende oligosacárido(s) N-acetilado(s), y galactooligosacárido(s) (GOS) y oligosacárido(s) sialilado(s). De acuerdo con la presente invención, la composición comprende

- Oligosacáridos N-acetilados entre 0,001 a 1 % en peso, preferentemente, entre 0,003 % en peso y 0,3 % en peso
- Galactooligosacáridos entre 1 y 10 % en peso, preferentemente, entre 3 y 6 % en peso, y
- Oligosacáridos sialilados entre 0,005 y 1 % en peso, preferentemente, entre 0,01 y 0,4 % en peso

## Oligosacárido N-acetilado:

El oligosacárido N-acetilado es un oligosacárido que tiene un residuo N-acetilado. Los oligosacáridos N-acetilados adecuados de la mezcla de oligosacáridos de la composición nutritiva de acuerdo con la presente invención incluyen GalNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc y Gal $\beta$ 1,6GalNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, pero, además, cualquier mezcla de estos. Los oligosacáridos N-acetilados pueden prepararse mediante la acción de glucosaminidasa y/o galactoaminidasa sobre N-acetil-glucosa y/o N-acetil galactosa. Igualmente, para este propósito pueden usarse N-acetil-galactosil transferasas y/o N-acetil-glicosil transferasas. Los oligosacáridos N-acetilados pueden producirse, además, mediante tecnología de fermentación con el uso de enzimas respectivas (recombinantes o naturales) y/o fermentación microbiana. En el último caso, los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o pueden diseñarse para producir sustratos y enzimas respectivos. Pueden usarse cultivos microbianos simples y/o cultivos mezclados. La formación de los oligosacáridos N-acetilados puede iniciarse por sustratos aceptores que comienzan a partir de cualquier grado de polimerización (DP), de DP = 1 en adelante. Otra opción es la conversión química de ceto-hexosa (fructosa) ya sea libre o unida a un oligosacárido (p. ej., lactulosa) en N-acetilhexosamina o en un oligosacárido que contiene N-acetilhexosamina como se describe en Wrodnigg, T.M, Dtutz, A.E, *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. 1999: 38: 827-828.

El galactooligosacárido es un oligosacárido que comprende dos o más moléculas de galactosa que no tienen carga y no tienen residuo N-acetilo.

Las expresiones "galactooligosacárido" y "GOS" pueden usarse indistintamente. Estas se refieren a un oligosacárido que comprende dos o más moléculas de galactosa que no tienen carga ni residuo N-acetilo (es decir, que son oligosacáridos neutros). En una realización particular, dichas dos o más moléculas de galactosa se unen por un enlace  $\beta$ -1,2,  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 o  $\beta$ -1,6. En otra realización, "galactooligosacárido" y "GOS" incluyen, además, oligosacáridos que comprenden una molécula de galactosa y una molécula de glucosa (es decir, disacáridos) que se unen por un enlace  $\beta$ -1,2,  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,6. Los galactooligosacáridos adecuados de la mezcla de oligosacáridos de la composición nutritiva de acuerdo con la presente invención incluyen Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Glc, Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc y Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc, pero, además, cualquier mezcla de estos. Los galactooligosacáridos sintetizados tales como Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc y

Galβ1,4Galβ1,4Galβ1,4Glc y mezclas de estos están disponibles comercialmente bajo las marcas Vivinal® y Elix'or®. Otros proveedores de oligosacáridos son Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH y Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Alternativamente, las glicosiltransferasas específicas, tales como las galactosiltransferasas, pueden usarse para producir oligosacáridos neutros.

El oligosacárido sialilado es un oligosacárido que tiene un residuo de ácido siálico con carga asociada. Los oligosacáridos sialilados adecuados de la mezcla de oligosacáridos de la composición nutritiva de acuerdo con la presente invención incluyen sialilactosa, α2,3-sialilactosa (3SL), α2,6-sialilactosa (6SL), NeuAcα2-3Galβ1-4Glc, NeuAcα2-6Galβ1-4Glc, NeuAcα2,3Galβ1,4Glc y NeuAcα2,6Galβ1,4Glc, pero, además, cualquier mezcla de estos.

El(los) oligosacárido(s) sialilado(s) puede(n) seleccionarse del grupo que comprende 3' sialilactosa (3-SL), 6' sialilactosa (6-SL), y cualquier combinación de estas. En algunas realizaciones de la invención la composición comprende 3-SL y 6-SL. En algunas realizaciones particulares, la relación entre 3'-sialilactosa (3-SL) y 6'-sialilactosa (6-SL) puede estar en el intervalo entre 5:1 y 1:10, o de 3:1 y 1:1, o de 1:1 a 1:10. En algunas realizaciones específicas, el oligosacárido sialilado de la composición es 6'sialilactosa (6-SL).

Estos oligosacáridos sialilados pueden aislarse mediante tecnología cromatográfica o de filtración a partir de una fuente natural, tal como las leches de animales. Alternativamente, ellos pueden producirse, además, por biotecnología mediante el uso de sialiltransferasas específicas ya sea por la tecnología de fermentación basada en enzimas (enzimas recombinantes o naturales) o por la tecnología de fermentación microbiana. En el último caso, los microbios pueden expresar sus enzimas naturales y sustratos o pueden diseñarse para producir los sustratos y enzimas respectivos. Pueden usarse cultivos microbianos simples y/o cultivos mezclados. La formación de los sialil oligosacáridos puede iniciarse por sustratos aceptores que comienzan a partir de cualquier grado de polimerización (DP), de DP = 1 en adelante. Alternativamente, las sialilactosas pueden producirse por síntesis química a partir de lactosa y ácido N'-acetilneuramínico libre (ácido siálico). Las sialilactosas también están comercialmente disponibles en, por ejemplo, Kyowa Hakko Kogyo de Japón.

Fuente de prebióticos/oligosacáridos:

Los oligosacáridos pueden aislarse de cualquier fuente. Preferentemente, los oligosacáridos se aíslan, se purifican o se concentran a partir de leche bovina. Alternativamente, todos o algunos de los oligosacáridos se producen en su totalidad o en parte mediante bioingeniería.

Pueden usarse tecnologías convencionales para fraccionar y enriquecer fracciones de leche bovina en oligosacáridos derivados de leche bovina (tales tecnologías convencionales incluyen filtración en columna, filtración por resina, nanofiltración, tratamiento enzimático especialmente con beta-galactosidasa, precipitación de proteínas, cristalización y separación de lactosa etc., ...). Algunas fracciones de leche bovina enriquecidas en oligosacáridos se encuentran comercialmente disponibles o se han descrito (por ejemplo, en el documento EP2526784 A1, cuyo proceso puede usarse para proporcionar la mezcla de oligosacáridos usada por la presente invención).

Realizaciones específicas:

La composición nutritiva de la presente invención puede comprender al menos 0,01 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), al menos 2,0 % en peso de galactooligosacárido(s) y al menos 0,02 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).

En algunas realizaciones, la composición nutritiva de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos 0,01 % en peso, o al menos 0,02 % en peso, o al menos 0,03 % en peso, o al menos 0,04 % en peso, o al menos 0,05 % en peso, o al menos 0,06 % en peso o al menos 0,07 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s). En algunas realizaciones, esta puede comprender de 0,01 a 0,07 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s) tal como de 0,01 a 0,05 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s) o de 0,01 a 0,03 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s).

Además, la composición nutritiva puede comprender al menos 2 % en peso, o al menos 3 % en peso, o al menos 4 % en peso, o al menos 5 % en peso, o al menos 5,5 % en peso, o al menos 6 % en peso o al menos 7 % en peso o al menos 8 % en peso de galactooligosacárido(s). En algunas realizaciones, esta puede comprender de 5 a 8 % en peso de galactooligosacárido(s) tal como de 5,75 a 7 % en peso de galactooligosacárido(s) o de 5,85 a 6,5 % en peso de galactooligosacárido(s). Un ejemplo particular es una cantidad de 5,95 % en peso de oligosacárido(s).

Finalmente, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,02 % en peso, o al menos 0,03 % en peso, o al menos 0,04 % en peso, o al menos 0,05 % en peso, o al menos 0,06 % en peso, o al menos 0,07 % en peso, o al menos 0,08 % en peso o al menos 0,09 % en peso de oligosacáridos sialilados. En algunas realizaciones, esta puede comprender de 0,02 a 0,09 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s) tal como de 0,02 a 0,08 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s), o de 0,02 a 0,07 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s) o de 0,003 a 0,07 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).

En una realización particular, la composición nutritiva de acuerdo con la presente invención puede comprender de

0,01 a 0,07 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), de 2,0 a 8,0 % en peso de galactooligosacárido(s) y de 0,02 a 0,09 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).

5 Aun en otra realización particular, la composición nutritiva de acuerdo con la presente invención puede comprender de 0,01 a 0,03 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), 5,95 % en peso de galactooligosacárido(s) y de 0,02 a 0,09 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).

10 En otra realización, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,0015 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s), al menos 0,70 g/100 kcal de galactooligosacárido(s) y al menos 0,0045 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s).

15 En algunas realizaciones específicas, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,0015 g/100 kcal, o al menos 0,002 g/100 kcal, o al menos 0,0025 g/100 kcal, o al menos 0,003 g/100 kcal, o al menos 0,0035 g/100 kcal, o al menos 0,004 g/100 kcal, o al menos 0,0045 g/100 kcal o al menos 0,005 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s). En algunas realizaciones, la composición nutritiva puede comprender de 0,0015 a 0,005 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s), tal como de 0,0015 a 0,045 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s) o de 0,002 a 0,0045 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s).

20 Además, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,70 g/100 kcal, o al menos 0,74 g/100 kcal, o al menos 0,8 g/100 kcal, o al menos 0,85 g/100 kcal, o al menos 0,90 g/100 kcal, o al menos 0,95 g/100 kcal, o al menos 1,0 g/100 kcal, o al menos 1,05 g/100 kcal, o al menos 1,10 g/100 kcal, o al menos 1,20 g/100 kcal o al menos 1,50 de galactooligosacárido(s). En algunas realizaciones, esta puede comprender de 0,70 a 1,5 g/100 kcal de galactooligosacárido(s), tal como de 0,70 a 1,20 g/100 kcal de galactooligosacárido(s) o de 0,74 a 1,2 g/100 kcal de galactooligosacárido(s).

25 Finalmente, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,0045 g/100 kcal, o al menos 0,005 g/100 kcal, o al menos 0,0055 g/100 kcal, o al menos 0,006 g/100 kcal, o al menos 0,0065 g/100 kcal, o al menos 0,007 g/100 kcal, o al menos 0,0075 g/100 kcal, o al menos 0,008 g/100 kcal o al menos 0,0085 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s). En algunas realizaciones, esta puede comprender de 0,0045 a 0,0085 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s), tal como de 0,0045 a 0,008 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s) o de 0,0045 a 0,0075 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s). En una realización particular, la composición nutritiva puede comprender de 0,0015 a 0,005 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s), de 0,70 a 1,5 g/100 kcal de galacto-oligosacárido(s) y de 0,0045 a 0,0085 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s).

35 En otra realización particular, la composición nutritiva puede comprender de 0,0015 a 0,0045 g/100 kcal de N-acetil-oligosacárido(s), de 0,74 a 1,2 g/100 kcal de galacto-oligosacárido(s) y de 0,0045 a 0,0075 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s).

40 En una realización preferida particular, la mezcla de oligosacáridos de la composición nutritiva de acuerdo con la invención comprende de 0,1 a 4,0 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), de 92,0 a 98,5 % en peso del(de los) galactooligosacárido(s) y de 0,3 a 4,0 % en peso del(de los) oligosacárido(s) sialilado(s).

45 En un aspecto de la invención, la composición nutritiva comprende la mezcla de oligosacáridos en una cantidad de 2,5 a 15 % en peso. Alternativamente, la composición nutritiva comprende la mezcla de oligosacáridos en una cantidad de 3 a 15 % en peso, o en una cantidad de 3 a 10 % en peso, o en una cantidad de 3,5 a 9,5 % en peso o en una cantidad de 4 a 9 % en peso o en una cantidad de 4,5 a 8,5 % en peso, o en una cantidad de 5,0 a 7,5 % en peso o en una cantidad de 5 a 8 % en peso.

50 En algunas realizaciones específicas, la composición nutritiva puede comprender la mezcla de oligosacáridos en una cantidad de 0,5 a 3,1 g/100 kcal, o en una cantidad de 0,6 a 3,1 g/100 kcal, o en una cantidad de 0,6 a 2,0 g/100 kcal, o en una cantidad de 0,7 a 2,0 g/100 kcal, o en una cantidad de 0,8 a 1,8 g/100 kcal, o en una cantidad de 0,9 a 1,7 g/100 kcal, o en una cantidad de 1,0 a 1,5 g/100 kcal o en una cantidad de 1,0 a 1,6 g/100 kcal.

55 La composición nutritiva de la presente invención puede comprender al menos 0,01 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), al menos 2,0 % en peso de galactooligosacárido(s) y al menos 0,02 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).

60 En algunas realizaciones, la composición nutritiva de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos 0,01 % en peso, o al menos 0,02 % en peso, o al menos 0,03 % en peso, o al menos 0,04 % en peso, o al menos 0,05 % en peso, o al menos 0,06 % en peso o al menos 0,07 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s). En algunas realizaciones, esta puede comprender de 0,01 a 0,07 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s) tal como de 0,01 a 0,05 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s) o de 0,01 a 0,03 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s).

65 Además, la composición nutritiva puede comprender al menos 2 % en peso, o al menos 3 % en peso, o al menos 4 % en peso, o al menos 5 % en peso, o al menos 5,5 % en peso, o al menos 6 % en peso o al menos 7 % en peso o al menos 8 % en peso de galactooligosacárido(s). En algunas realizaciones, esta puede comprender de 5 a 8 % en peso

de galactooligosacárido(s) tal como de 5,75 a 7 % en peso de galactooligosacárido(s) o de 5,85 a 6,5 % en peso de galactooligosacárido(s). Un ejemplo particular es una cantidad de 5,95 % en peso de oligosacárido(s).

5 Finalmente, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,02 % en peso, o al menos 0,03 % en peso, o al menos 0,04 % en peso, o al menos 0,05 % en peso, o al menos 0,06 % en peso, o al menos 0,07 % en peso, o al menos 0,08 % en peso o al menos 0,09 % en peso de oligosacáridos sialilados. En algunas realizaciones, esta puede comprender de 0,02 a 0,09 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s) tal como de 0,02 a 0,08 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s), o de 0,02 a 0,07 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s) o de 0,003 a 0,07 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).

10 En una realización particular, la composición nutritiva de acuerdo con la presente invención puede comprender de 0,01 a 0,07 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), de 2,0 a 8,0 % en peso de galactooligosacárido(s) y de 0,02 a 0,09 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).

15 Aun en otra realización particular, la composición nutritiva de acuerdo con la presente invención puede comprender de 0,01 a 0,03 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), 5,95 % en peso de galactooligosacárido(s) y de 0,02 a 0,09 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).

20 En otra realización, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,0015 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s), al menos 0,70 g/100 kcal de galactooligosacárido(s) y al menos 0,0045 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s).

25 En algunas realizaciones específicas, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,0015 g/100 kcal, o al menos 0,002 g/100 kcal, o al menos 0,0025 g/100 kcal, o al menos 0,003 g/100 kcal, o al menos 0,0035 g/100 kcal, o al menos 0,004 g/100 kcal, o al menos 0,0045 g/100 kcal o al menos 0,005 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s). En algunas realizaciones, la composición nutritiva puede comprender de 0,0015 a 0,005 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s), tal como de 0,0015 a 0,045 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s) o de 0,002 a 0,0045 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s).

30 Además, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,70 g/100 kcal, o al menos 0,74 g/100 kcal, o al menos 0,8 g/100 kcal, o al menos 0,85 g/100 kcal, o al menos 0,90 g/100 kcal, o al menos 0,95 g/100 kcal, o al menos 1,0 g/100 kcal, o al menos 1,05 g/100 kcal, o al menos 1,10 g/100 kcal, o al menos 1,20 g/100 kcal o al menos 1,50 g/100 kcal de galactooligosacárido(s). En algunas realizaciones, esta puede comprender de 0,70 a 1,5 g/100 kcal de galactooligosacárido(s), tal como de 0,70 a 1,20 g/100 kcal de galactooligosacárido(s) o de 0,74 a 1,2 g/100 kcal de galactooligosacárido(s).

35 Oligosacáridos/BMOS:

40 En una realización de la invención, la composición comprende "oligosacáridos de leche bovina" (abreviado en la presente descripción "BMOS" o "mezcla BMOS") que es una mezcla (fracción de leche bovina enriquecida en ciertos oligosacáridos) que comprende:

45 La BMOS proporciona (en la composición final, tal como una fórmula infantil, sobre una base en peso seco) aproximadamente:

Oligosacáridos N-acetilados:	de 0,006 a 0,24 % en peso
Galacto-oligosacáridos:	de 5,52 a 5,91 % en peso
Oligosacáridos sialilados:	de 0,018 a 0,24 % en peso

El GOS puede ser de una fuente comercial "Vivinal GOS" de Friesland Campina (NL).

50 En varias realizaciones, el GOS comprende menos de 30, 20, 10, 8, 6, 5 o 4 unidades de galactosa.

En una realización particular, la composición nutritiva comprende de 2,5 a 15,0 % en peso de la mezcla de BMOS.

55 En otra realización, la composición nutritiva comprende al menos 0,01 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), al menos 2,0 % en peso de galactooligosacárido(s) y al menos 0,02 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).

En una realización, la composición comprende al menos un oligosacárido N-acetilado, y al menos un galactooligosacárido, y al menos un oligosacárido sialilado.

60 En una realización, la mezcla BMOS comprende de 0,1 a 4,0 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), de 92,0 a 98,5 % en peso de galactooligosacárido(s) y de 0,3 a 4,0 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).

En una realización, la mezcla BMOS se deriva de leche animal, tal como leche de vaca, o leche de búfalo.

La composición nutritiva puede comprender al menos 0,0045 g/100 kcal, o al menos 0,005 g/100 kcal, o al menos 0,0055 g/100 kcal, o al menos 0,006 g/100 kcal, o al menos 0,0065 g/100 kcal, o al menos 0,007 g/100 kcal, o al menos 0,0075 g/100 kcal, o al menos 0,008 g/100 kcal o al menos 0,0085 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s). En algunas realizaciones, esta puede comprender de 0,0045 a 0,0085 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s), tal como de 0,0045 a 0,008 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s) o de 0,0045 a 0,0075 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s).

En una realización particular, la composición nutritiva puede comprender de 0,0015 a 0,005 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s), de 0,70 a 1,5 g/100 kcal de galacto-oligosacárido(s) y de 0,0045 a 0,0085 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s).

En otra realización particular, la composición nutritiva puede comprender de 0,0015 a 0,0045 g/100 kcal de N-acetil-oligosacárido(s), de 0,74 a 1,2 g/100 kcal de galacto-oligosacárido(s) y de 0,0045 a 0,0075 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s).

En una realización preferida particular, la mezcla de oligosacáridos de la composición nutritiva de acuerdo con la invención comprende de 0,1 a 4,0 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), de 92,0 a 98,5 % en peso del(de los) galactooligosacárido(s) y de 0,3 a 4,0 % en peso del(de los) oligosacárido(s) sialilado(s).

Los documentos WO2006087391 y WO2012160080 proporcionan algunos ejemplos de producción de mezclas BMOS.

Otros oligosacáridos/oligofructosa (OF)

La fórmula infantil de esta invención puede comprender al menos aproximadamente 0,4 g o al menos 0,7 g de oligofructosa por 100 kcal de la composición. En algunas realizaciones, esta contiene de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,9 g, de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,7 g, de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,5 g, de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 0,8 g, o de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 0,9 g, de oligofructosa por 100 kcal.

En algunas realizaciones, la oligofructosa tiene un grado de polimerización de 2 a 10. En algunas realizaciones, al menos 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de la oligofructosa tiene un grado de polimerización de 2 a 8 (o entre 2 y 8). En una realización, el FOS es un fructooligosacárido de cadena larga (cadena de 10 más o 15 o más unidades de fructosa), tal como inulina.

En una realización, la composición de la invención comprende

- al menos 3 g/l o al menos 5 g/l de oligofructosa (OF) cuando la composición es una composición líquida lista para beber o
- una cantidad suficiente de oligosacárido para obtener, respectivamente, al menos 3 g/l o 5 g/l de oligofructosa en la composición reconstituida cuando dicha composición nutritiva es un polvo o una composición concentrada.

En algunas realizaciones, la composición nutritiva de la invención comprende al menos 0,4 g de OF/100 kcal de la composición o al menos 0,7 g, o al menos 0,75 g, o al menos 0,8 g o al menos 0,9 g de OF/100 kcal de la composición.

Generalmente, se admite, en vista de los resultados ilustrados por los ejemplos, que una alta cantidad de oligofructosa confiere un efecto más fuerte. Un límite superior para un efecto beneficioso de oligofructosa puede, sin embargo, existir cuando comienzan los efectos secundarios desventajosos. Tal límite superior puede ser, por ejemplo, 2,2 g/100 kcal, 2,0 g/100 kcal, 1,8 g/100 kcal, 1,5 g/100 kcal o 1,2 g/100 kcal. Preferentemente, la composición de la invención comprende 5 g de OF/l o 0,75 o 0,9 g de OF/100 kcal de la composición o al menos tales cantidades.

Otros prebióticos:

La composición de la invención puede comprender dichos oligosacáridos no digeribles o adicionales (p. ej., prebióticos). Estos están, usualmente, en una cantidad entre 0,3 y 10 % en peso de la composición.

Los prebióticos son, usualmente, no digeribles en el sentido de que no se rompen y se absorben en el estómago o el intestino delgado y así permanecen intactos cuando pasan al colon, en donde se fermentan selectivamente por las bacterias beneficiosas. Los ejemplos de prebióticos incluyen ciertos oligosacáridos, tales fructooligosacáridos (FOS) y/o galactooligosacáridos (GOS) adicionales. Puede usarse una combinación de prebióticos, tal como GOS 90 % con fructooligosacáridos de cadena corta 10 %. Otra combinación de prebióticos es fructooligosacáridos de cadena corta 70 % e inulina 30 % (=FOS de cadena larga). Ambos, así como también la oligofructosa (OF), se encuentran disponibles comercialmente, particularmente, a partir de la compañía BENEOL (Beneo GmbH, Maximilianstrasse, 68165, Mannheim, Alemania).

## Probióticos

La composición de la invención comprende *Bifidobacterium animalis spp. lactis* (*B. lactis*) que es un probiótico.

5 En una realización, el probiótico *B. lactis* es "BB12"<sup>TM</sup> comercial disponible de CHR. Hansen, Dinamarca En una realización, el probiótico es *Bifidobacterium animalis spp. lactis* (*B. lactis*) probiótico es CNCM I-3446.

10 La dosificación de probióticos puede ser, por ejemplo, entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>12</sup> ufc por gramo de composición, preferentemente, en una cantidad suficiente para suministrar un efecto sinérgico con los oligosacáridos (p. ej., BMOS) de la composición y, preferentemente, entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>8</sup> ufc/g de la composición.

## Proteínas/Alfa-lactoalbúmina

15 La composición de la invención comprende una fuente de proteína. Tal fuente de proteína puede, por ejemplo, suministrar entre 1,6 g y 3 g de proteína/100 kcal. En una realización, destinada para lactantes prematuros, tales cantidades pueden ser entre 2,4 y 4 g/100 kcal o más que 3,6 g/100 kcal. En una realización, la cantidad puede ser menor que 2.0 g por 100 kcal, p. ej., en una cantidad menor que 1,8 g por 100 kcal.

20 El tipo de proteína no se considera el elemento crítico más alto de la presente invención, siempre que se alcancen los requerimientos mínimos para el contenido de aminoácidos esenciales y se asegure un crecimiento satisfactorio. Sin embargo, proteínas particulares pueden proporcionar un sustrato más adecuado para la microbiota. Por consiguiente, pueden usarse fuentes de proteínas basadas en suero de leche, caseína y mezclas de estos, así como fuentes de proteínas basadas en soya. En lo que se refiere a las proteínas del suero de leche, la fuente de proteína puede basarse en suero de leche ácido o suero de leche dulce, o mezclas de estos, y puede incluir alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina en cualquier proporción deseada.

25 Preferentemente, la fuente de proteína es suero predominantemente (más del 50 % de las proteínas vienen de proteínas del suero). En una realización, las proteínas de la composición son proteínas intactas o en su mayor parte (más del 90 %) proteínas intactas.

30 Las proteínas pueden estar intactas o hidrolizadas o pueden ser una mezcla de proteínas intactas e hidrolizadas. Por el término "intactas" se entiende que la mayor parte de las proteínas están intactas, es decir, la estructura molecular no se altera, por ejemplo, al menos 80 % de las proteínas no se alteran, tal como al menos 85 % de las proteínas no se alteran, preferentemente, al menos 90 % de las proteínas no se alteran, aún con mayor preferencia, al menos 95 % de las proteínas no se alteran, tal como al menos 98 % de las proteínas no se alteran. En una realización particular, el 100 % de las proteínas no se alteran.

35 El término "hidrolizada" significa, en el contexto de la presente invención, una proteína que se hidrolizó o se degradó en sus aminoácidos componentes.

40 Las proteínas pueden hidrolizarse completamente, ampliamente o parcialmente. Puede ser deseable suministrar proteínas parcialmente hidrolizadas (grado de hidrólisis entre 2 y 20 %), por ejemplo, para lactantes que se cree están en riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca. Si se requieren proteínas hidrolizadas, el proceso de hidrólisis puede llevarse a cabo como se desee y como se conoce en la técnica. Por ejemplo, los hidrolizados de proteínas del suero de leche pueden prepararse por la hidrólisis enzimática de la fracción del suero de leche en una o más etapas. Si la fracción del suero de la leche usada como materia prima está sustancialmente libre de lactosa, se encuentra que la proteína sufre mucho menos bloqueo de la lisina durante el proceso de hidrólisis. Esto hace posible la reducción del grado de bloqueo de la lisina de aproximadamente 15 % en peso de lisina total a menos de aproximadamente 10 % en peso de lisina; por ejemplo, aproximadamente 7 % en peso de lisina, lo que mejora enormemente la calidad nutritiva de la fuente de proteína.

50 En una realización preferida, las proteínas de la composición son hidrolizadas, hidrolizadas completamente, hidrolizadas ampliamente, o hidrolizadas parcialmente. El grado de hidrólisis (DH) de la proteína puede ser entre 8 y 40, o entre 20 y 60 o entre 20 y 80 o más que 10, 20, 40, 60, 80 90. Se comprende que las proteínas hidrolizadas pueden tener diversos efectos sobre la alergia: las proteínas hidrolizadas pueden ser menos alergénicas, por lo tanto, desencadenan menos reacciones alérgicas inmunitarias. Las proteínas hidrolizadas, especialmente los péptidos pequeños (de menos de 20, 10 o 5 aminoácidos), pueden inducir tolerancia oral, por lo que influyen en el futuro estado alérgico del sujeto. Se entiende que las proteínas hidrolizadas pueden combinarse ventajosamente con el (los) oligosacárido(s) fucosilado(s) de la presente invención al proporcionar un efecto dual, posiblemente un efecto sinérgico al actuar al menos en 2 niveles diferentes en el establecimiento de los síntomas alérgicos o el estado alérgico.

60 En una realización de la invención, al menos 70 % de las proteínas se hidrolizan, preferentemente, al menos 80 % de las proteínas se hidrolizan, tal como al menos 85 % de las proteínas se hidrolizan, aún con mayor preferencia, al menos 90 % de las proteínas se hidrolizan, tal como al menos 95 % de las proteínas se hidrolizan, particularmente, al menos 98 % de las proteínas se hidrolizan. En una realización particular, el 100 % de las proteínas se hidrolizan.

65 En una realización, las proteínas hidrolizadas son la única fuente de proteína (es decir, el 100 % o al menos el 90 %

de las proteínas son hidrolizadas).

En una realización, las proteínas hidrolizadas son la fuente principal de proteínas (es decir, al menos 50 %, preferentemente, 60 % de las proteínas son hidrolizadas).

En una realización, la composición nutritiva de la invención comprende alfa-lactoalbúmina en una cantidad de al menos 0,2, o 0,3 o 0,4 g/100 kcal o al menos 1,7 g, o 2,0, o 2,3 o 2,6 g/l. Se cree que la presencia de alfa-lactoalbúmina en una cierta cantidad mejora el efecto de la oligofructosa al proporcionar, por ejemplo, un sustrato nutricional adecuado para la microbiota.

Puede contemplarse que las proteínas hidrolizadas son más fáciles de digerir y, por lo tanto, se combinan de manera sinérgica con el establecimiento de una microbiota intestinal que es cercana a la microbiota de los lactantes alimentados por lactancia materna, especialmente para lactantes frágiles.

Matriz preferida de la composición nutritiva:

La composición de acuerdo con la invención puede ser una composición nutritiva sintética. Esta puede ser una fórmula infantil, una fórmula infantil de inicio, una fórmula de seguimiento, una fórmula para lactantes pretérmino o un fortificante tal como un fortificante para la leche humana, o un suplemento. Preferentemente, la composición de la invención es una fórmula infantil, o un fortificante o un complemento destinado para los primeros 4 o 6 meses de edad. La composición de la invención puede ser una fórmula infantil convencional comercial a la que se añade la mezcla particular del oligosacárido de la reivindicación 1.

Grasa/alto contenido de palmitato sn-2:

En una realización, la composición nutritiva comprende triglicéridos con alto contenido en palmitato sn-2, preferentemente, triglicéridos que tienen más de 33 % del ácido palmítico en la posición sn-2.

En una realización, la composición nutritiva de la presente invención comprende aproximadamente 5-6 g por 100 kcal de grasa (triglicéridos), con al menos aproximadamente 8 % en peso de esta grasa que consiste en ácido palmítico en la posición sn-2 de un triglicérido. De acuerdo con la presente invención, al menos 8 %, preferiblemente al menos 9,6 % de la grasa es palmitato sn-2.

En algunas realizaciones, aproximadamente 8,0-11,5 % en peso, aproximadamente 8,5-11,0 % o aproximadamente 9,0-10,0 % en peso de la grasa es ácido palmítico en la posición sn-2 de un triglicérido.

En algunas realizaciones, el ácido palmítico comprende de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 %, tal como de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 %, del contenido total de los ácidos grasos en la fórmula, por peso, y al menos de aproximadamente 30 %, por ejemplo, de aproximadamente 35 a aproximadamente 43 % del contenido total de ácido palmítico está en la posición sn-2.

En algunas realizaciones, la composición nutritiva comprende, además, al menos un ácido graso omega 6 y al menos un ácido graso omega 3 en una relación de aproximadamente 6 a aproximadamente 1. En una realización, al menos uno de los ácidos grasos omega 6 comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 % en peso del total de los ácidos grasos y al menos un ácido graso omega 3 comprende de aproximadamente 1,2 % a aproximadamente 3,6 % del total de los ácidos grasos. En algunas realizaciones, la fórmula infantil comprende al menos un ácido graso omega 6 presente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 % del peso total y al menos un ácido graso omega 3 presente de aproximadamente 0,3 % a aproximadamente 0,6 % del peso total.

En la composición nutritiva de esta invención la grasa comprende una variedad de triglicéridos que se encuentran, típicamente, en la leche y/o en composiciones nutritivas. Los residuos de ácidos grasos más comunes en los triglicéridos son los ácidos palmítico y oleico. Además de los residuos de ácidos grasos palmítico y oleico que están presentes incluyen, pero no se limitan a, ácido linoleico, ácido alfa linolénico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido docosahexaenoico, y ácido araquidónico.

Una composición disponible comercialmente vendida por Lipid Nutrition es Betapol™ B-55, que es una mezcla de triglicéridos derivados de aceite vegetal en la que al menos 54 % del ácido palmítico está en la posición sn-2 de la molécula de glicerol. En una realización, el contenido de grasa de la composición de la invención es de aproximadamente 40-50 % Betapol™ B-55 en peso, por ejemplo, de aproximadamente 43 % a aproximadamente 45 % en peso. Los expertos en la técnica apreciarán que el porcentaje de grasa con alto contenido en sn-2 usado y la cantidad total de palmitato sn-2 en la fórmula pueden variar, y que puede usarse un aceite diferente con alto contenido en palmitato sn-2 sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Aunque alimentar a un lactante con una fórmula que contiene un alto porcentaje de palmitato sn-2 contribuye a producir heces más blandas y el crecimiento de bifidobacterias en el colon, la combinación de un alto contenido en palmitato sn-2 con oligofructosa proporciona una suavidad superior en las heces al mismo tiempo que induce un equilibrio óptimo

de la microbiota intestinal y potencia la regulación negativa o la reducción de la carga de bacterias patógenas en el colon de los lactantes alimentados con fórmula.

Efecto en la salud

5 La composición de la invención tiene el efecto positivo para la salud y se utiliza para reducir el riesgo, o la gravedad, o la frecuencia o la aparición de diarrea asociada a no rotavirus.

10 En una realización, la composición de la invención reduce el riesgo de diarrea asociada a no rotavirus. Esto puede abarcar la comparación entre 2 grupos de sujetos (p. ej., lactantes), un grupo que recibe la composición de la invención como fórmula infantil (preferentemente, como la única fuente de nutrición/energía), el otro grupo que recibe una fórmula infantil convencional (que no comprende la composición de la invención) y la medición de la frecuencia o la aparición de diarrea asociada a no rotavirus durante un periodo de tiempo prolongado (tal como 1 semana, 1 mes, 4 o 6 meses). Los sujetos que reciben la composición de la invención pueden tener una menor frecuencia de aparición de diarrea asociada a no rotavirus o una menor gravedad de tal aparición. Esto indica un "efecto protector" de la composición de la invención, es decir, una reducción del riesgo.

20 En una realización, la composición de la invención reduce la gravedad de la diarrea asociada a no rotavirus. Tal gravedad puede indicarse por una menor duración de los episodios diarreicos, por heces más sólidas/heces menos líquidas, menos dolor, menos fiebre, menos síntomas de gastroenteritis (siempre mediante la comparación de un grupo que recibe la composición de la invención con un grupo que no recibe la composición de la invención).

25 En una realización, la composición de la invención reduce la aparición de diarrea asociada a no rotavirus. La aparición o la frecuencia de aparición indica episodios diarreicos menos frecuentes (siempre mediante la comparación de un grupo que recibe la composición de la invención con un grupo que no recibe la composición de la invención).

30 En realizaciones de la invención, el efecto positivo en la salud anterior de la invención se observa en lactantes entre 0 y 6 meses, 0 y 12 meses, o 0 y 36 meses. La duración de la alimentación de los lactantes puede ser de 1, 2, 3, 6, 12 meses, preferentemente, los primeros 1, 2, 3, 6, 12 meses de vida de los lactantes.

La composición de la invención puede tener un efecto positivo en la microbiota de los sujetos lactantes o niños pequeños. Tal efecto positivo puede comprender la regulación negativa, la disminución o la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas y/o la regulación positiva, el aumento o la promoción del crecimiento de bacterias beneficiosas.

35 En una realización, el efecto en la salud de la composición de la invención comprende promover o inducir una microbiota intestinal que está más cercana a la microbiota de los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota de los lactantes alimentados predominantemente con una composición nutritiva convencional (o fórmula infantil) que no comprende dicho probiótico. Tal efecto es en lactantes o niños pequeños entre 0 y 36 meses, opcionalmente entre 0 y 12 meses de edad.

40 El efecto en la salud puede observarse después de unos días o semanas del uso de la composición – por ejemplo, después de 4 semanas o 6 semanas u 8 semanas de uso. Sin embargo, este puede tomar 4, 6, 8 semanas antes de observar la microbiota inducida.

45 En ese contexto, el efecto en la salud puede acercar la microbiota de los lactantes o niños pequeños a la microbiota de los lactantes o niños pequeños alimentados (exclusivamente) por lactancia materna. Esto se observa, especialmente, cuando se comparan lactantes o niños pequeños que no reciben la composición de la invención.

50 La microbiota inducida es específica alrededor de 2 dimensiones: cuantitativamente la flora intestinal comprende más bacterias beneficiosas y menos bacterias no beneficiosas o perjudiciales. Cualitativamente la variedad de taxones bacterianos se asemeja más a una microbiota de lactantes alimentados por lactancia materna.

55 La composición de la invención puede proporcionar efectos positivos para la salud, cuantitativa y cualitativamente, mediante la regulación negativa, la disminución y/o la inhibición del crecimiento de poblaciones de bacterias patógenas, y/o mediante la inducción de más bacterias beneficiosas. Tal tracto intestinal/microbiota intestinal saludable en última instancia se asocia a una absorción de nutrientes adecuada, crecimiento adecuado, menos cólico, menos infección, y la mejor salud del intestino.

60 El efecto en la salud inducido por la composición de la invención puede, en una realización, caracterizarse por comprender una regulación positiva de las poblaciones de *B. animalis* y/o *Bifidobacterium*, y/o *B. Longum* y/o *Lactobacillus*, y/o una regulación negativa de las poblaciones de *Coprobacillus* y/o *Streptococcus*.

65 El efecto de la invención puede ser preventivo (por ejemplo, al reducir el riesgo de diarrea relacionada con no rotavirus y, posiblemente, además, evitar el desequilibrio de la microbiota intestinal, evitar las infecciones intestinales, mantener una microbiota intestinal saludable, inducir una microbiota intestinal saludable) o curativo (por ejemplo, al reducir la gravedad de la diarrea relacionada con no rotavirus y, posiblemente, además, restablecer una microbiota intestinal

saludable cuando esta se altera, ayudar a eliminar o disminuir poblaciones patógenas en el tracto intestinal/intestino, inducir una microbiota saludable después del deterioro debido a, por ejemplo, la diarrea).

5 El efecto en la salud relacionado con el lactante puede medirse al medir la frecuencia o la gravedad de los episodios diarreicos y al compararlo con los grupos de referencia (que no reciben la composición de la invención).

10 El efecto en la salud relacionado con el lactante puede medirse, además, mediante varios métodos como se ilustra en el ejemplo más abajo. Sin embargo, en una realización el efecto en la microbiota se mide mediante la distribución promedio de las distancias UniFrac (ver más abajo).

15 En una realización, el efecto en la salud "promover o inducir una microbiota intestinal que está más cercana a la microbiota de los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna humana" se caracteriza, además, por promover o inducir una microflora intestinal que tiene una distancia filogenética con respecto a la microbiota de los lactantes alimentados por lactancia materna menor que 0,3 unidades (medido por el método UniFrac), preferentemente, menor que 0,25 unidades.

20 La diarrea asociada a no rotavirus está acompañada por un aumento en la población de bacterias *Streptococcus* y *E. coli*, así como por una disminución en las poblaciones de bifidobacterias (Jin et al, *BMC Microbiology*, 2013, 13:141 y Shields *et al*, *Infect. Dis. Clin. Pract.* 2012;20:357-358). Los inventores han evidenciado que la composición de la invención tiene un efecto contrario (aumento de bifidobacterias; disminución de poblaciones de *E. Coli* y *Streptococcus*). Esto hace, sorprendentemente, que la composición de la invención sea una composición de elección para reducir el riesgo, y/o la gravedad y/o la aparición de diarrea asociada a no rotavirus.

25 Lactantes objetivo

De acuerdo con la presente invención, la composición nutricional es para uso en lactantes y niños que son niños pretérmino, lactantes nacidos pequeños para la edad gestacional o nacidos por cesárea, lactantes hospitalizados o lactantes tratados, o que se tratan con antibióticos.

30 En una realización, los lactantes objetivo son lactantes que ya sufren (que han sufrido al menos una vez, al menos dos veces, preferentemente, en los últimos 2 o 6 meses) de gastroenteritis y/o diarrea asociada a no rotavirus.

35 En una realización, los lactantes o niños pequeños son nacidos a término. En una realización, los lactantes o niños pequeños nacen prematuros (pretérmino). En una realización, los lactantes o niños pequeños nacen pequeños para la edad gestacional. En una realización, los lactantes o niños pequeños nacen por parto vaginal. En una realización, los lactantes o niños pequeños nacen por cesárea. Se prevé que la composición de la invención es incluso más beneficiosa para lactantes nacidos con la microbiota intestinal posiblemente afectada o lactantes frágiles (tales como los lactantes nacidos prematuramente y/o lactantes nacidos por cesárea). Se prevé, además, que la composición de la invención es incluso más beneficiosa para los lactantes que presentan trastornos intestinales (tales como diarreas, infecciones o cólicos) después del nacimiento, por ejemplo, durante las primeras 4 semanas después del nacimiento.

40 En realizaciones de la invención, los lactantes son nacidos prematuramente o pequeños para la edad gestacional o nacidos por cesárea, o presentan una microbiota intestinal desequilibrada o anormal o sufren de infección intestinal; opcionalmente, dichas condiciones anteriores se solucionan por la composición de la invención cuando los lactantes son de 0-6 meses de edad. Sin estar supeditado a la teoría, se cree que los lactantes más pequeños se benefician de la invención aún más, especialmente cuando los lactantes tienen (o están en riesgo de tener) una "microbiota intestinal desequilibrada" y/o tienen un estado de salud frágil (como se ilustra por las condiciones mencionadas anteriormente).

45 En tales lactantes o niños pequeños, es de particular interés la adquisición de una microbiota intestinal que sea cercana a la microbiota intestinal de los lactantes alimentados por lactancia materna (preferentemente, exclusivamente lactantes alimentados por lactancia materna). Verdaderamente esto les proporciona un buen número de elementos de salud que pueden ser beneficiosos, especialmente para esos lactantes frágiles.

50 En una realización, los lactantes y niños pequeños son de 0-6 meses, o de 0-12 meses y de acuerdo con la presente invención son de 0-36 meses de edad. Se prevé que la composición de la invención puede ser incluso más beneficiosa para lactantes justo después del nacimiento (de 0-4 semanas o de 0-8 semanas) cuando su tracto intestinal puede ser más frágil.

55 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar ciertas realizaciones y características de la presente invención, pero no deben interpretarse como limitantes para el alcance de esta invención.

60 Régimen de alimentación propuesto

65 En una realización, la composición de la invención es un alimento para el lactante o niño pequeño (o destinada para alimentar o instrucciones para alimentar) durante 2, 4, 8, 12 semanas o durante al menos 2, 4, 8, 12 semanas. En realizaciones preferidas, este se alimenta (o se propone para alimentar o instrucciones para alimentarse) durante las

## ES 2 992 190 T3

primeras 4, 8 o 12 semanas de la vida del lactante. Se cree que el inicio temprano (en el momento del nacimiento o cerca del nacimiento) se prefiere para inducir el efecto pretendido.

- 5 Se espera que la salud sea más prominente o se establezca más rápido cuando la composición de la invención se usa como fuente exclusiva de nutrición. En una realización, el efecto en la salud se observa siempre y cuando la composición de la invención se usa para cubrir 50 % o más, o 75 % o más, de las necesidades nutricionales (p. ej., las necesidades de energía) de los lactantes o niños pequeños objetivos.

### Ejemplo 1:

10

La Tabla 1 proporciona ejemplos de la composición de la invención.

Tabla 1:

Por litro	Unidades	Fórmula de control	Fórmula "sn2"	Fórmula sn2+3 g/l OF	Fórmula sn2 + 5 g/l OF
Energía	% en Kcal	670	670	670	670
Proteína	g	13,4	13,4	13,4	13,4
Grasa	g	36	36	36	36
%C16 en sn-2	% grasa total	2,6	9,6	9,6	9,6
Carbohidratos	g	73	73	73	73
Oligofructosa	g	0	0	3	5
Vitamina A (RE)	mcg	660	660	660	660
Vitamina D	mcg	10,6	10,6	10,6	10,6
Vitamina E (TE)	mg	7,4	7,4	7,4	7,4
Vitamina K	mcg	67	67	67	67
Vitamina B <sub>1</sub>	mcg	1000	1000	1000	1000
Vitamina B <sub>2</sub>	mcg	1100	1100	1100	1100
Vitamina B <sub>6</sub>	mcg	550	550	550	550
Vitamina B <sub>12</sub>	mcg	1,8	1,8	1,8	1,8
Niacina	mcg	5000	5000	5000	5000
Ácido fólico	mcg	107	107	107	107
Ácido pantoténico	mcg	3500	3500	3500	3500
Biotina	mcg	20	20	20	20
Vitamina C	mg	90	90	90	90
Colina	mg	100	100	100	100
Inositol	mg	45	45	45	45
Taurina	mg	47	47	47	47
Luteína	mcg	25	25	25	25
Carotenos	mcg	210	210	210	210
Calcio	mg	420	420	420	420
Fósforo	mg	240	240	240	240
Magnesio	mg	45	45	45	45
Hierro	mg	8	8	8	8
Zinc	mg	6	6	6	6
Manganeso	mcg	50	50	50	50
Cobre	mcg	333	333	333	333
Yodo	mcg	100	100	100	100
Sodio	mg	160	160	160	160
Potasio	mg	650	650	650	650

(continuación)

Por litro	Unidades	Control formula	"sn2" formula	sn2+3 g/l OF formula	sn2 + 5 g/l OF formula
Cloruro	mg	433	433	433	433
Selenio	mcg	14	14	14	14
Fluoruro	mcg	25	25	25	25
Nucleótidos	mg	26	26	26	26
CMP	mg	13	13	13	13
UMP	mg	5,0	5,0	5,0	5,0
AMP	mg	4,0	4,0	4,0	4,0
GMP	mg	2,0	2,0	2,0	2,0
IMP	mg	2,0	2,0	2,0	2,0

Las composiciones anteriores en la tabla 1 contienen adicionalmente la mezcla de oligosacáridos de la reivindicación 1 (conocida, además, como "BMOS" como se describió anteriormente), es decir,

5

- de 0,0015 a 0,005 g/100 kcal de oligosacárido(s) N-acetilado(s), y
- de 0,70 a 1,5 g/100 kcal de galactooligosacárido(s), y
- de 0,0045 a 0,0085 g/100 kcal de oligosacárido(s) sialilado(s).

10 En un ejemplo adicional, las mezclas de oligosacáridos del ejemplo anterior comprenden:

- de 0,1 a 4,0 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), y
- de 92,0 a 98,5 % en peso de galactooligosacárido(s), y
- de 0,3 a 4,0 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).

15

En ejemplos adicionales, las composiciones ejemplificadas anteriormente comprenden, además, respectivamente, el probiótico *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* (BB12™ o, alternativamente, CNCM I-3446) en una cantidad de 10<sup>6</sup> (fórmula de control), 10<sup>8</sup> (fórmula sn2), 10<sup>9</sup> (fórmula sn2 + 3 g de OF), 10<sup>10</sup> (fórmula Sn2 5 g de OF) ufc/g de composición.

20

Los ejemplos adicionales de la composición de una composición nutritiva para usar de acuerdo con la presente invención se proporcionan más abajo en la Tabla 2. Estas composiciones se proporcionan a manera de ilustración solamente. La fuente de proteínas es una mezcla de 60 % de MSWP28 y 40 % de caseína.

25

TABLA 2

Nutriente	por 100 kcal	por litro
Energía(kcal)	100	670
Proteína (g)	1,83	12,3
Grasa (g)	5,3	35,7
Ácido linoleico (g)	0,79	5,3
Ácido α-linolénico (mg)	101	675
Lactosa (g)	11,2	74,7
Oligosacáridos prebióticos		
BMOS (g) (como se describió anteriormente)	1,1	7,5
Opcionalmente: GOS (g)	0,64	4,3
Minerales (g)	0,37	2,5
Na (mg)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Mn (µg)	8	50
Se (µg)	2	13

(continuación)

Nutriente	por 100 kcal	por litro
Vitamina A (µg RE)	105	700
Vitamina D (µg)	1,5	10
Vitamina E (mg TE)	0,8	5,4
Vitamina K1 (µg)	8	54
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,47
Vitamina B2 (mg)	0,15	1,0
Niacina (mg)	1	6,7
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,50
Ácido fólico (µg)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 (µg)	0,3	2
Biotina (µg)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (µg)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
<i>Probiótico (opcional): Bifidobacterium lactis NCC2818 (CNCM I-3446),</i>	1 x 10 <sup>7</sup> cfu/g of powder	

Ejemplo 2: Estudio clínico

5 *Estudio de intervención nutritiva.* A una edad promedio de 5 días, 115 lactantes saludables a término se incluyeron en un estudio de intervención nutritiva. Los lactantes de las madres que decidieron no amamantarlos se asignaron aleatoriamente ya sea para la fórmula infantil de inicio (fórmula de control C, n=37, 1,8 g de proteína/100 kcal; relación proteína de suero/caseína 70:30) o la misma fórmula suplementada con un prebiótico (BMOS) a una concentración de oligosacárido total de 5,7 ± 1,0 g/100 g de fórmula en polvo (8 g/l en la fórmula reconstituida) y un probiótico (*B. lactis* cepa CNCM-I-3446 con 1x10<sup>7</sup> ufc/g de la fórmula en polvo; 1,4x10<sup>7</sup> ufc/l fórmula reconstituida) (Fórmula de prueba T, n=39) para un periodo de alimentación de 12 semanas. Los lactantes de las madres que decidieron amamantarlos exclusivamente se incluyeron en el grupo alimentado por lactancia materna (grupo B, n=39), que sirvió como grupo de referencia fisiológica. El "BMOS" usado en el estudio es como se definió en la presente invención.

15 *Características de las heces.* En el análisis según el protocolo, el número de deposiciones se redujo de 4,9 a 2,4 deposiciones/día durante el periodo de observación, con ninguna diferencia entre los grupos (p>0,4).

20 Durante el estudio de alimentación, los lactantes del grupo T, pero no del grupo C mostraron una proporción de heces amarillentas versus verdosas equivalente a los lactantes del grupo B (Figura 5). La semejanza del color es un indicador de que tienen una microbiota similar/cercana.

25 Consistencia de las heces: la Figura 1 muestra la consistencia de las heces observadas para los diferentes grupos de sujetos (B: grupo alimentado por lactancia materna, C: control y T: prueba) a <2 semanas, 6 semanas y 12 semanas. Los resultados se muestran para las poblaciones de prueba totales y muestran que la composición de la invención (grupo "T") induce un patrón de consistencia de las heces que está más cerca del grupo "B" (alimentado por lactancia materna) que del grupo de control "C". A las 6 semanas, los lactantes en los grupos T y B mostraron un pH de las heces similar, mientras que los lactantes de C mostraron un pH de las heces significativamente más alto (los datos no se muestran). Los lactantes de los grupos T y C no difirieron en "regurgitación", vómito, llanto, cólicos, flatulencia e irritabilidad (los datos no se muestran). Al estar más cerca del grupo alimentado por lactancia materna (B), el grupo de prueba (T) que del grupo de control, se interpreta que los lactantes alimentados con la composición de la invención son menos susceptibles a la diarrea relacionada con no rotavirus (los infectados por un rotavirus exhibirían en cualquier caso heces altamente líquidas).

35 *Análisis microbiológico de las heces: PCR cuantitativo en tiempo real.* Se recolectaron muestras de heces de los lactantes antes de la primera aplicación del producto, y a las 6 y 12 semanas de edad cuando se asignó el régimen de alimentación. En el análisis según el protocolo, las heces de 18 a 23 lactantes estuvieron disponibles por grupos y puntos de tiempo. Se recolectaron muestras de heces para cada punto de tiempo, se refrigeraron a 4 °C durante un

máximo de 10 horas después de la defecación y se mantuvieron congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se realizó el análisis de microbiota. El ADN total se extrajo mediante el uso del mini estuche para ADN en materia fecal QIAamp (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante, excepto por la adición de una serie de etapas de ruptura mecánica ( $11 \times 45\text{ s}$ ) mediante el uso de un aparato FastPrep y tubos Lysing Matrix B (MP Biochemicals). Usamos los cebadores del gen 16S del ARNr que permite la diferenciación taxonómica. Los recuentos totales de bifidobacterias aumentaron en todos los tres grupos de inclusión y 6 semanas de edad, después de lo cual esto se mantuvo constante hasta las 12 semanas (Figura 4A). En comparación con los lactantes en el grupo C, los lactantes en el grupo T mostraron un aumento más pronunciado en el título de *Bifidobacterium* por 0,8 log. En el grupo T, el título fecal final de bifidobacterias fue de  $0,8 \times 10^{10}$  bacterias/g heces significativamente mayor que en los grupos C y B. Los *bacteroides* y lactobacilos mostraron un número 10 veces más alto y 10 veces más bajo, respectivamente, en los lactantes del grupo C en comparación con el grupo T (los datos no se muestran y Figura 4B).

Para lograr mayor resolución en el género *Bifidobacterium*, usamos un conjunto de cebadores de qPCR basado en el gen *groEL* que permite la detección de 12 especies *Bifidobacterium B. bifidum*, y *B. longum* (Figuras 4C y 4D).

*Composición de la microbiota: Índice de diversidad.* El análisis de la microbiota se complementó mediante la pirosecuenciación del gen 16S del ARNr. Las regiones variables V1 hasta V3 de 16S se amplificaron por PCR y se secuenciaron en el secuenciador Roche 454 GS-FLX-Titanium Sequencer. Los datos sin procesar de la secuencia se analizaron mediante el uso de Mothur v.1.33.0 (Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn y C. F. Weber (2009). "Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities." *Applied and Environmental Microbiology* 75(23): 7537-7541.) y QIIME v.1.8 (Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K. *et al.* (2010b) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7: 335-336). Se realizó la selección de los OTU de novo con el 97 % de identidad y la asignación taxonómica de las secuencias representativas de OTU usó el Clasificador RDP sobre la base de datos de referencia Greengenes v.13.8. Las mismas secuencias se alinearon mediante el uso de PyNast sobre el núcleo de alineación de referencia de Greengenes. Después, el alineamiento múltiple resultante se filtró y se usó para elaborar un árbol filogenético con FastTree. Después del filtrado de calidad, las distancias filogenéticas entre todas las muestras se calcularon como distancia UniFrac. Después del análisis y exclusión de sujetos con conjuntos de datos incompletos, obtuvimos las composiciones de la microbiota fecal para todos los tres puntos de tiempo de al menos 13 lactantes por grupo. La Figura 3 compara la  $\alpha$ -diversidad de los tres grupos en el inicio, y después de 6 y 12 semanas de alimentación (calculado con Calypso en <http://bioinfo.qimr.edu.au/calypso>). Al inicio los tres grupos de alimentación no diferían significativamente en la diversidad microbiana (índice de Shannon). A las 6 semanas de edad, los lactantes en el grupo C mostraron un mayor índice de diversidad, debido a un aumento tanto en la riqueza como en la homogeneidad en comparación con los lactantes en el grupo T y el grupo B. A las 12 semanas de edad, el grupo C pero no el grupo T, difiere del grupo B con respecto a la diversidad y riqueza. La distancia UniFrac ponderada (que toma en cuenta la distancia filogenética entre los OTU) se calculó entre las muestras mediante el uso de QIIME. Después, dentro de cada grupo se analizó la distribución de las distancias de cada muestra y se compararon con las muestras del grupo alimentado por lactancia materna. La significación estadística se determina por medio de la prueba U de Mann-Whitney (Figura 2). La composición de la microbiota global de los lactantes alimentados con la fórmula con *B. lactis* y BMOS (T) fue diferente con respecto al grupo alimentado con la fórmula de control (C) y, filogenéticamente, más cercanamente relacionado con el grupo alimentado por lactancia materna (B).

En conjunto, este ejemplo demuestra que la mezcla particular de oligosacáridos, como se usa en la invención, promueve el crecimiento *in vivo* de *Bifidobacterium* y, además, puede disminuir el crecimiento de *Streptococcus y/o E. coli*, mientras que induce un patrón de las heces cercano a los lactantes alimentados por lactancia materna.

La diarrea asociada a no rotavirus está acompañada por un aumento en la población de bacterias *Streptococcus* y *E. coli*, así como por una disminución en las poblaciones de bifidobacterias (Jin *et al*, *BMC Microbiology*, 2013, 13:141 y Shields *et al*, *Infect. Dis. Clin. Pract.* 2012;20:357-358). Los inventores han evidenciado que la composición de la invención tiene un efecto contrario (aumento de bifidobacterias; disminución de poblaciones de *E. Coli* y *Streptococcus*). Esto hace, sorprendentemente, que la composición de la invención sea una composición de elección para reducir el riesgo, y/o la gravedad y/o la aparición de diarrea asociada a no rotavirus.

Ejemplo 4: Estudio clínico adicional (No de acuerdo con la presente invención)

*Intervención nutricional; estudio aleatorizado doble ciego y controlado.*

Un estudio multicéntrico, aleatorizado, controlado, doble ciego conducido en Sudáfrica evaluó el efecto de una fórmula suplementada con un prebiótico, una mezcla de oligosacáridos derivados de la leche bovina (BMOS) generados a partir del permeado de suero de leche (que contiene galactooligosacáridos y oligosacáridos de la leche, tal como 3'- y 6'-sialilactosa), y el probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) de la cepa CNCM I-3446, en los niveles de *Bifidobacteria* en el intestino de los lactantes nacidos por parto vaginal o a través de una cesárea en las primeras etapas de la vida. Adicionalmente, se evaluó la seguridad de la nueva formulación. El "BMOS" usado en el estudio es como se definió en la presente invención.

En este estudio multicéntrico un total de 430 lactantes saludables, a término, nacidos de madres VIH positivas que decidieron alimentar a sus hijos exclusivamente con fórmula y comenzaron desde el nacimiento ( $\leq 3$  días de edad), se aleatorizaron en 4 grupos paralelos. Un total de 421 lactantes quienes ingirieron cualquier fórmula se incluyeron en el conjunto de análisis completo (FAS).

Los dos primeros grupos consistieron en lactantes nacidos por cesárea asignados a la fórmula de prueba (n=92) (un IF de inicio con BMOS con un total de OS de  $5,8 \pm 1,0$  g/100 g de fórmula en polvo (8 g/l en la fórmula reconstituida) + *B. lactis* ( $1 \times 10^7$  ufc/g)) o un IF de control (n=101), los segundos dos grupos consistieron en lactantes nacidos por parto vaginal aleatorizados para las mismas fórmulas de prueba (n=115) o control (n=113) a partir de la inclusión a los 6 meses.

El resultado de eficacia primaria fue el recuento de bifidobacteria fecal a los 10 días y el resultado de seguridad primaria fue la ganancia de peso diaria (g/día) entre 10 días y 4 meses.

A los 10 días, entre los lactantes nacidos por cesárea, los recuentos de bifidobacteria fecal fueron significativamente más altos en el grupo de la fórmula de prueba que en el grupo de la fórmula de control (mediana [intervalo] log: 9,41 [6,30 - 10,94] ufc/g vs. 6,30 [6,30 - 10,51] ufc/g, prueba de Wilcoxon,  $p = 0,002$ ), pero no entre aquellos que nacieron por parto vaginal (mediana [intervalo] log: 10,06 [5,93 - 10,77] ufc/g vs. 9,85 [6,15 - 10,79] ufc/g,  $p = 0,126$ ). El límite inferior del intervalo de confianza del 95 % de 2 lados de la diferencia en la ganancia de peso diaria promedio entre la fórmula de prueba y la fórmula de control estuvo sobre los -3 g/día en ambos lactantes, los nacidos por parto vaginal y por cesárea, lo que indica que el crecimiento en los lactantes alimentados con la fórmula de prueba no fue inferior con respecto al crecimiento de los lactantes alimentados con la fórmula de control.

A los 10 días y a las 4 semanas, el pH fecal de los lactantes alimentados con la fórmula de prueba fue significativamente menor que en aquellos alimentados con la fórmula de control, independientemente del modo de nacimiento: para parto vaginal: 4,93 vs. 5,59  $p < 0,001$  (10 días) y 5,01 vs. 5,71  $p < 0,001$  (4 semanas), para los nacidos por cesárea 5,14 vs. 5,65  $p = 0,009$  (10 días), 5,06 vs. 5,75  $p < 0,001$  (4 semanas). A los 3 meses, este efecto de acidificación solo persistía entre los lactantes nacidos por cesárea. La fórmula infantil suplementada con el probiótico BMOS y el prebiótico *B. lactis* induce un fuerte efecto bifidogénico en ambos modos de partos, pero corrige más explícitamente el bajo nivel de Bifidobacterium encontrado en los lactantes nacidos por cesárea. La IF suplementada disminuyó el pH fecal y mejoró la microbiota fecal tanto en los lactantes nacidos por parto normal como por cesárea.

Resultados detallados: (véase, además, la figura 6)

En la población FAS, los recuentos de Bifidobacterium a los 28 días y a los 3 meses (días 84) fueron, además, significativamente más altos en el grupo de la fórmula de prueba en comparación con el grupo control en los lactantes nacidos por cesárea (cuadrados en la Figura 6). Después, a los 28 días, la mediana [intervalo] log del recuento de bifidobacteria fueron 10,15 [6,30-10,96] ufc/g y 9,00 [6,30-10,77] ufc/g en los grupos con la fórmula de prueba y control, respectivamente (prueba no paramétrica de Wilcoxon,  $p = 0,001$ ). A los 84 días, la mediana [intervalo] log del recuento de bifidobacteria fueron 10,40 [6,50-10,79] ufc/g y 9,67 [6,30-10,50] ufc/g en los grupos con la fórmula de prueba y control, respectivamente (prueba no paramétrica de Wilcoxon,  $p < 0,001$ ).

Entre los lactantes nacidos por parto vaginal (triángulos en la Figura 6), el grupo de la fórmula de prueba aumentó, además, significativamente los recuentos de Bifidobacterium a los 28 y 84 días en comparación con el grupo de la fórmula de control. A los 28 días, la mediana [intervalo] log del recuento de bifidobacteria fueron 10,25 [6,75-10,98] ufc/g y 9,66 [6,30-10,31] ufc/g en los grupos con la fórmula de prueba y control, respectivamente (prueba no paramétrica de Wilcoxon,  $p < 0,001$ ). A los 84 días, la mediana [intervalo] log del recuento de bifidobacteria fueron 10,45 [8,22-10,96] ufc/g y 9,95 [6,30-10,17] ufc/g en los grupos con la fórmula de prueba y control, respectivamente (prueba no paramétrica de Wilcoxon,  $p < 0,001$ ).

Los recuentos de bacterias totales a los 3 y 10 días no fueron significativamente diferentes entre los grupos de la fórmula de prueba y control entre los lactantes con ambos modos de nacimiento (los datos no se muestran). Sin embargo, a las 4 semanas, los recuentos de bacterias totales fueron mayores en el grupo de la fórmula de prueba en ambos grupos de nacimiento, y a los 3 meses estos fueron más altos en el grupo de la fórmula de prueba solamente en los lactantes que nacieron por parto vaginal (los datos no se muestran).

Una mayor proporción de los lactantes en los grupos de la fórmula de prueba tuvieron especies detectables de bifidobacteria en comparación con los grupos de la fórmula de control hasta 4 semanas (los datos no se muestran). Las especies *Lactobacillus* se detectaron en una mayor proporción de lactantes a las 4 semanas y a los 3 meses en los lactantes nacidos por cesárea y parto vaginal, respectivamente, en los grupos de fórmula de prueba en comparación al control. A los 10 días, 4 semanas, y 3 meses se detectó *B. lactis* en una proporción significativamente mayor de lactantes en los grupos de la fórmula de prueba en comparación con aquellos en los grupos de la fórmula de control (los datos no se muestran). Las especies *E. coli* y *Staphylococcus*, *Enterobacteria*, y *Klebsiella* se detectaron en una proporción significativamente mayor de lactantes en el grupo de la fórmula de control en comparación con el grupo de la fórmula de prueba (los datos no se muestran).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición nutritiva para lactantes o niños pequeños, comprendiendo dicha composición al menos un oligosacárido N-acetilado, y al menos un galactooligosacárido, y al menos un oligosacárido sialilado, en la siguiente cantidad:
- Oligosacáridos N-acetilados entre 0,001 y 1 % en peso, preferentemente, entre 0,003 % en peso y 0,3 % en peso
  - Galactooligosacáridos entre 1 y 10 % en peso, preferentemente, entre 3 y 6 % en peso
  - Oligosacáridos sialilados entre 0,005 y 1 % en peso, preferentemente, entre 0,01 y 0,4 % en peso
- 10 todos calculados como % en peso de la composición, para su uso en la prevención y/o el tratamiento y/o la reducción de la gravedad y/o el riesgo y/o la aparición de diarrea asociada a no rotavirus en lactantes o niños pequeños entre 0 y 36 meses, opcionalmente, entre 0 y 12 meses de edad o entre 0 y 6 meses de edad
- 15 caracterizada por que dichos lactantes son lactantes pretérmino, lactantes nacidos pequeños para la edad gestacional, lactantes nacidos por cesárea, lactantes hospitalizados o lactantes tratados o que se tratan con antibióticos, caracterizada por que dicha composición comprende grasa y al menos el 8 %, preferiblemente al menos el 9,6 % de dicha grasa es palmitato de sn2.
- 20 2. La composición nutritiva para el uso de la reivindicación 1 que comprende, además, un probiótico *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis*, opcionalmente, CNCM-I-3446, opcionalmente, en una cantidad de entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>12</sup> ufc por gramo de composición, preferentemente, entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>8</sup> ufc/g de composición.
- 25 3. La composición nutritiva para el uso de la reivindicación 2, para su uso en la promoción o inducción de una microbiota intestinal que esté más cercana a la microbiota de los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota de los lactantes alimentados predominantemente con una composición nutritiva convencional que no comprende el probiótico, en lactantes o niños pequeños entre 0 y 36 meses, opcionalmente, entre 0 y 12 meses de edad.
- 30 4. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que los lactantes son lactantes que padecen gastroenteritis y/o diarrea asociada a no rotavirus.
- 35 5. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la composición comprende oligofruktosa, preferentemente el al menos 90 %, 99 % o 100 % de la oligofruktosa tiene un grado de polimerización entre 2 y 8.
- 40 6. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la composición comprende triglicéridos que tienen más de 33 % del ácido palmítico en la posición sn2.
- 45 7. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la composición es una fórmula infantil o una fórmula de seguimiento.
8. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la composición comprende proteínas alfa-lactoalbúmina en una cantidad de al menos 0,3 g/100 kcal o 2,3 g/l de composición.
- 50 9. La composición para el uso de la reivindicación 3, caracterizada por que la promoción o inducción de una microbiota intestinal que está más cercana a la de lactantes alimentados exclusivamente con leche materna humana se caracteriza, además, porque comprende una regulación positiva de la población de *B. animalis* y/o *Bifidobacterium*, y/o *B. Longum* y/o *Lactobacillus*, y/o una regulación negativa de las poblaciones de *Coprobacillus* y/o *Streptococcus*.
- 55 10. La composición para el uso de la reivindicación 3 o 9, caracterizada por que la "promoción o inducción de una microbiota intestinal que está más cercana a la microbiota de los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna humana" se caracteriza, además, por la promoción o inducción de una microflora intestinal que tiene una distancia filogenética con respecto a la microbiota de los lactantes alimentados por lactancia materna menor que 0,3 unidades (medidas por el método UniFrac), preferentemente, menor que 0,25 unidades.
- 60 11. La composición para el uso de la reivindicación 3, 9 o 10, caracterizada por que la promoción y/o inducción de una microbiota intestinal que está más cercana a la de los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna humana puede medirse en las heces de los lactantes, opcionalmente, puede medirse a o después de 1, 4, 6 u 8 semanas de edad, y, opcionalmente, después de 1, 4, 6 u 8 semanas de alimentación con la composición nutritiva.
- 65 12. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la composición es para la alimentación o destinada para la alimentación durante las primeras 1, 2, 4, 8 o 12 semanas de vida.

13. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 9, 10, u 11, caracterizada por que la promoción y/o inducción de una microbiota intestinal que está más cercana a la de los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna humana se caracteriza, además, por la promoción y/o inducción de un crecimiento saludable, un sistema inmunitario saludable y/o una función intestinal saludable, especialmente en etapas posteriores de la vida.

5

Figura 1

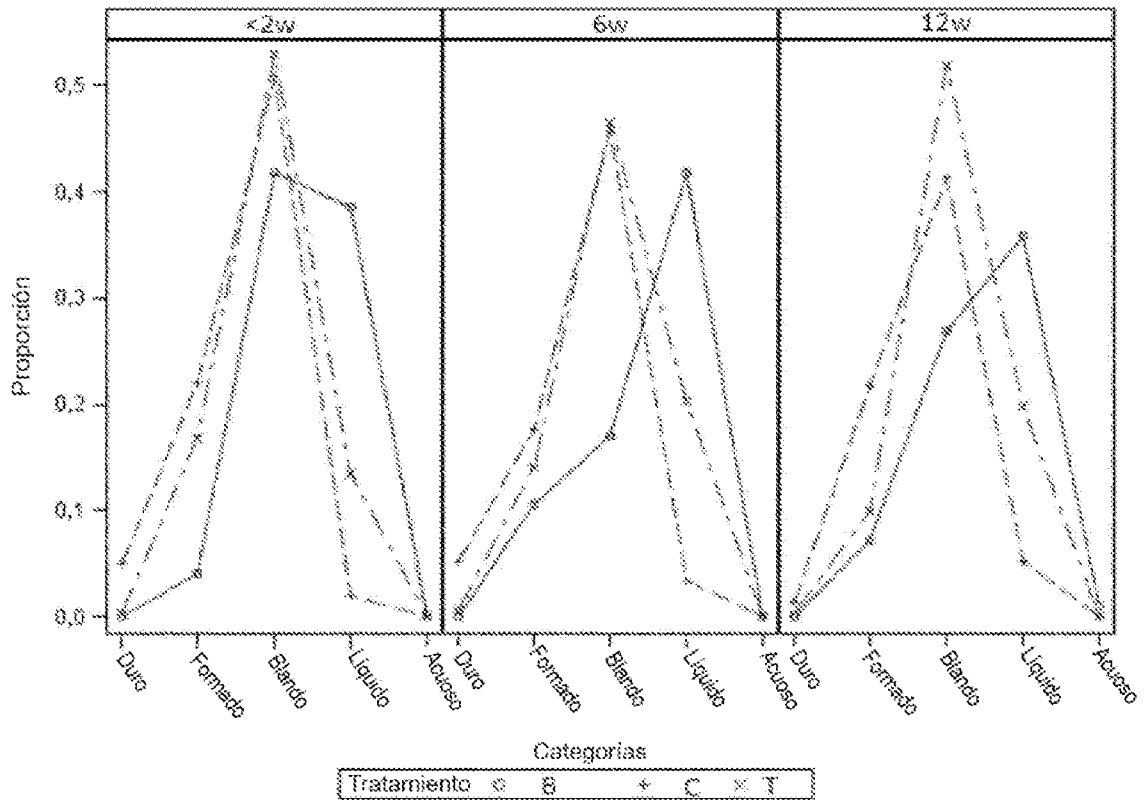


Figura 2

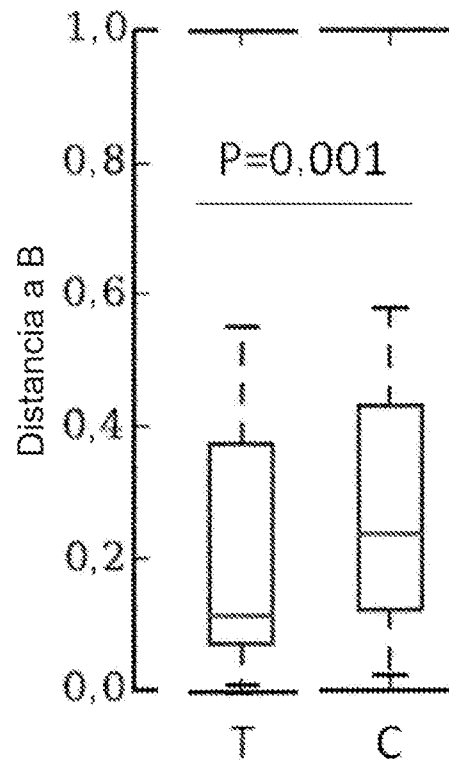


Figura 3

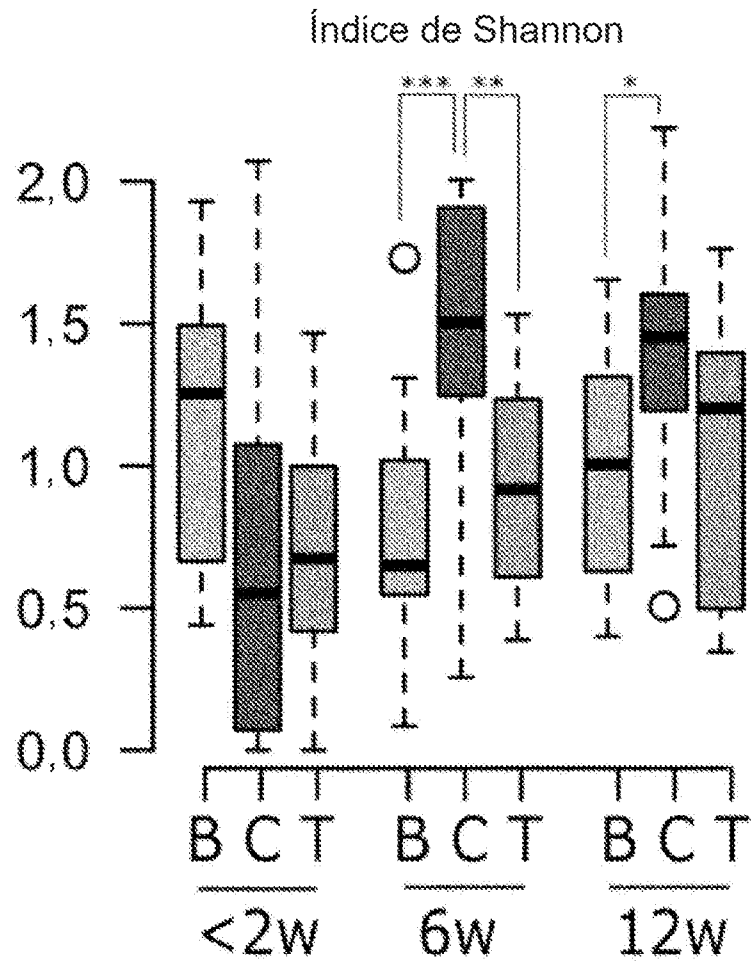


Figura 4

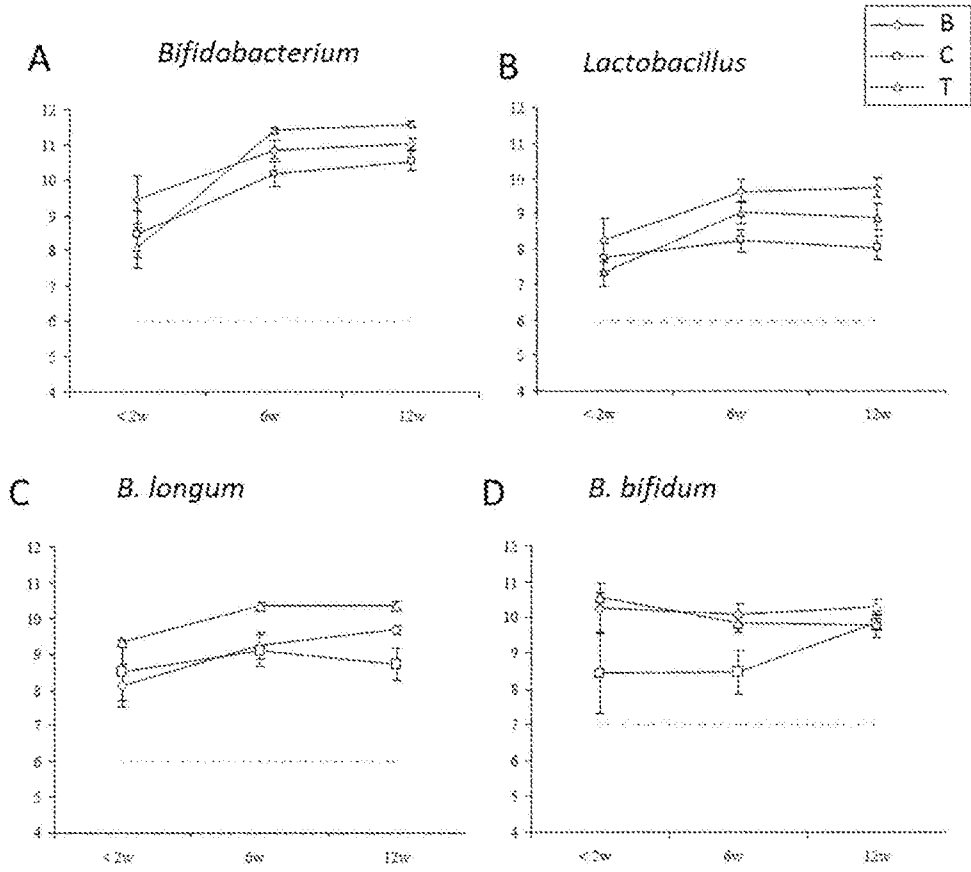


Figura 5

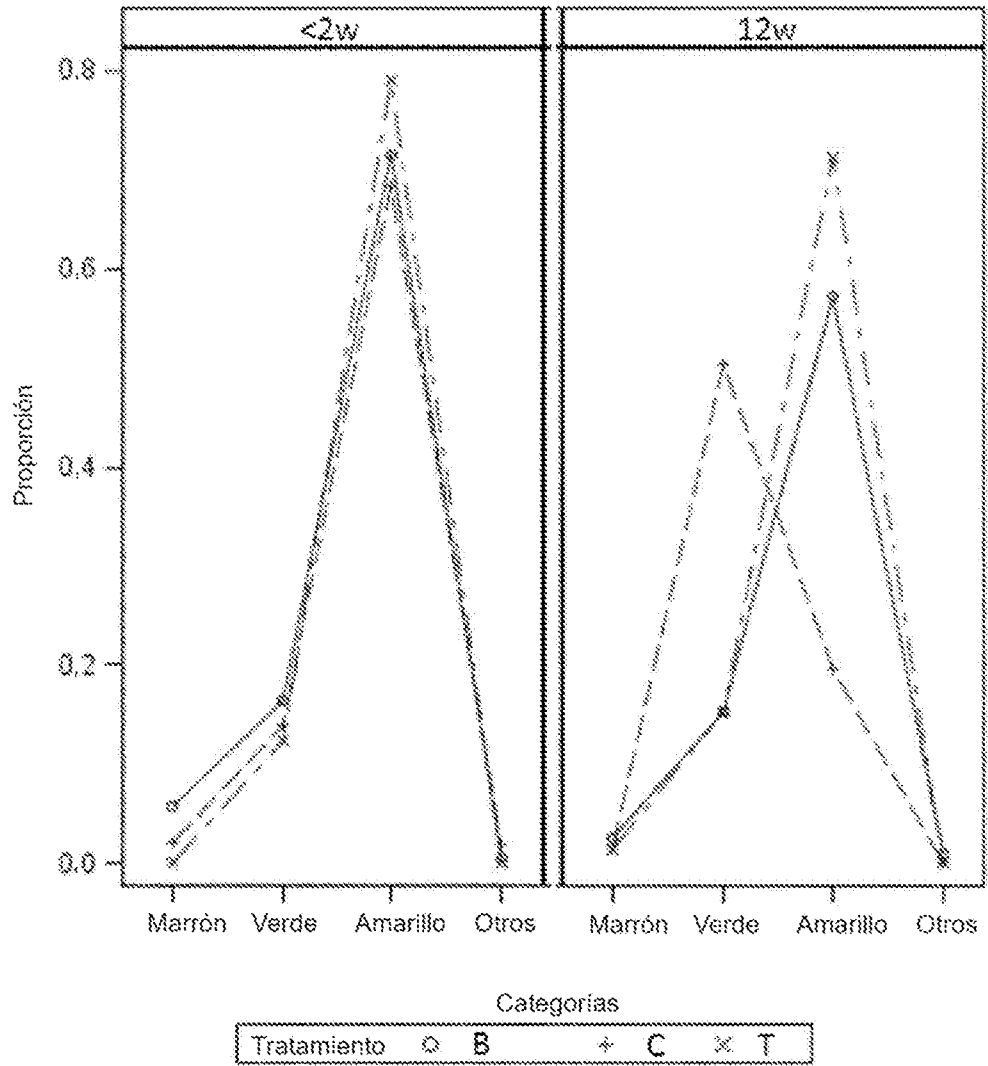


Figura 6

