

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 985**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/135** (2006.01)

**A61K 35/745** (2015.01)

**A23L 33/00** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/702** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2016 PCT/EP2016/068611**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17021479**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2016 E 16747524 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.05.2021 EP 3331383**

54 Título: **Composiciones nutritivas y fórmulas infantiles que comprenden *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* y, opcionalmente, una mezcla de oligosacáridos para inducir una microbiota intestinal cercana a la de bebés alimentados por lactancia materna**

30 Prioridad:

**04.08.2015 EP 15179741**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.11.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GARCIA-RODENAS, CLARA LUCIA;  
BERGER, BERNARD y  
REZZONICO, ENEA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 879 985 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

5 Composiciones nutritivas y fórmulas infantiles que comprenden *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* y, opcionalmente, una mezcla de oligosacáridos para inducir una microbiota intestinal cercana a la de bebés alimentados por lactancia materna

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a composiciones nutritivas para bebés y niños pequeños y sus efectos en la salud en bebés. En particular, se refiere a una fórmula infantil que comprende un probiótico específico para inducir una microbiota intestinal que es cercana a la de un bebé alimentado exclusivamente con leche materna humana (HBM, forma siglada de *human breast milk*).

15 Antecedentes de la invención

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

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

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

35 Sin embargo, en muchos casos los estudios demostraron que las fórmulas infantiles no inducen efectos idénticos en el organismo en comparación con la leche materna humana. Por ejemplo, los bebés alimentados con fórmulas infantiles y los bebés alimentados con leche materna humana (HBM) pueden presentar una microbiota intestinal (del intestino) diferente.

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

40 Se sabe que la modulación de la microbiota intestinal durante la infancia puede tener prospectivamente una gran influencia en el futuro estado de salud de los organismos. Por ejemplo, la flora intestinal puede tener influencia en el desarrollo de la obesidad más adelante en la vida, en el desarrollo de un sistema inmunitario fuerte más adelante en la vida o en el crecimiento normal.

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

50 Se sabe que la forma de nacimiento puede afectar la microbiota intestinal inicial de los bebés: se ha demostrado que los bebés nacidos por operación cesárea (cesárea) tienen una microbiota intestinal diferente en comparación con los bebés que nacen por parto vaginal.

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

60 La microbiota intestinal y su evolución durante el desarrollo del bebé es, sin embargo, un equilibrio fino 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) respecto a su efecto sobre la salud general del bebe.

65 Ciertas especies de bacterias "generalmente positivas", tales como las bifidobacterias, pueden estar infrarrepresentadas en bebés alimentados con fórmula infantil convencionales, en comparación con los bebés alimentados por lactancia materna. De manera similar, algunas poblaciones de bacterias se consideran patógenas y deben permanecer con baja prevalencia en la microbiota intestinal.

- De hecho, los bebés alimentados con fórmulas infantiles pueden no beneficiarse de la flora intestinal (microbiota intestinal) natural bien equilibrada de los bebés alimentados exclusivamente o predominantemente con leche materna humana. De hecho, tal microbiota natural observada en bebés alimentados por lactancia materna está bien controlada a lo largo del tiempo (evolución a lo largo del tiempo) y es muy compleja. En el microambiente altamente complejo del intestino/tracto intestinal coexisten muchos taxones de microorganismos, cada uno de ellos en proporciones definidas secuencialmente. A la hora de definir la microbiota de los bebés o los niños pequeños hay que tener en cuenta dimensiones cuantitativas y cualitativas. Además, la variación de la microbiota intestinal a lo largo del tiempo se añade a la complejidad.
- El documento WO 2009/144137 A1 describe el uso de bacterias probióticas en la fabricación de un medicamento o composición nutritiva terapéutica para estimular el desarrollo de una microbiota intestinal bifidogénica temprana en bebés sin hermanos.
- El documento EP1974743 A1 describe el uso de bacterias probióticas en la fabricación de un medicamento o composición nutritiva terapéutica para estimular el desarrollo de una microbiota intestinal bifidogénica temprana en bebés nacidos por cesárea. Si bien muchos estudios han identificado modos para estimular el crecimiento y la prevalencia de bacterias positivas específicas en el intestino de los bebés, se conoce poco sobre los modos de inducir una microbiota que se asemeje a la de los bebés alimentados por lactancia materna.
- Existe una necesidad, para los bebés alimentados con fórmula infantil, de estimular y/o inducir una microbiota general que sea cercana a la microbiota de los bebés alimentados por lactancia materna. Existe una necesidad, para los bebés alimentados con fórmula infantil, de estimular y/o inducir a lo largo del tiempo una microbiota que evolucione de manera similar a la microbiota de los bebés alimentados por lactancia materna.
- Además, existe una necesidad, para los bebés alimentados con fórmula infantil, de proporcionarles la mejor nutrición que permita el desarrollo de una microbiota cercana a la microbiota de los bebés alimentados por lactancia materna, a corto plazo durante la intervención nutricional y/o a largo plazo, después de la intervención nutricional.
- Existe una necesidad, para los bebés alimentados con fórmula infantil, de inducir un estado de salud óptimo a corto plazo o a largo plazo a través de una nutrición que induce y/o estimula el desarrollo de una microbiota cercana/similar a la microbiota de los bebés alimentados por lactancia materna; tal estado de salud incluye un óptimo crecimiento a lo largo del tiempo, y un óptimo desarrollo del sistema inmunitario, así como la prevención de trastornos metabólicos.
- Existe una necesidad de compensar la microbiota subnormal observada en los bebés no alimentados por lactancia materna. Existe una necesidad de reequilibrar tal microbiota.
- Existe una necesidad, para los bebés alimentados con fórmula infantil, de inducir y/o estimular el desarrollo de familias, género o especies o cepas bacterianas específicas en su intestino, como para obtener una microbiota cercana a la microbiota de los bebés alimentados por lactancia materna.
- Existe una necesidad, para los bebés alimentados con fórmula infantil, de reprimir y/o regular negativamente 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 bebés alimentados por lactancia materna.
- Existe una necesidad de regular a la baja el desarrollo y crecimiento de las bacterias patógenas o "bacterias negativas" en el intestino de los bebés y niños pequeños.
- Existe una necesidad de afectar o reducir selectivamente el crecimiento de bacterias patógenas en el intestino de bebés y niños pequeños al mismo tiempo que se estimula o, al menos, no se afecta, el crecimiento de bacterias intestinales positivas.
- Existe una necesidad de potenciar un buen equilibrio en la microbiota intestinal general de los bebés, especialmente mediante la regulación a la baja o la represión del crecimiento de bacterias patógenas, durante las primeras semanas de vida cuando se está estableciendo tal equilibrio.
- Existe una necesidad de potenciar tal buen equilibrio por medios bien tolerados de "impacto suave" que tienen pocos o no tienen efectos secundarios.
- Sumario de la invención
- La presente invención se refiere a una composición nutritiva para bebés o niños pequeños que comprende un probiótico de *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* para su uso en el estímulo o la inducción de una microbiota intestinal que esté más cercana a la microbiota de los bebés alimentados exclusivamente con leche materna humana en comparación con la microbiota de bebés alimentados predominantemente con una composición nutritiva convencional que no comprenda dicho probiótico en bebés o niños pequeños entre 0 y 36 meses, opcionalmente entre 0 y 12 meses de edad, caracterizada porque dicho "estímulo o inducción de una microbiota intestinal que está más cercana a la

microbiota de los bebés alimentados exclusivamente con leche materna humana" se caracteriza además por estimular o inducir una microflora intestinal que tiene una distancia filogenética con la microbiota de bebés alimentados por lactancia materna de menos de 0,3 unidades (medidas por el método Unifrac), preferentemente de menos de 0,25 unidades, caracterizado por que dicha *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* probiótica es CNCM 1-3446.

- 5 Breve descripción de las figuras
- Figura 1: muestra la distancia Unifrac ponderada promedio entre los grupos alimentados con fórmula (V= fórmula de control; O= fórmula de *B. lactis*) y el grupo alimentado por lactancia materna. Cuanto más se acerque la distancia a cero, más cercano al grupo alimentado por lactancia materna.
- 10
- Figura 2: muestra la distancia Unifrac ponderada promedio entre los grupos alimentados con fórmula T y C y el grupo B alimentado por lactancia materna. Grupo T: con probiótico de *B. lactis*; Grupo C: control sin probiótico de *B. lactis*. Cuanto más se acerque la distancia a cero, más cercano al grupo B alimentado por lactancia materna.
- 15
- Figura 3: Diagramas de caja 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 de *B. lactis*; grupo C: control sin probiótico de *B. lactis*; grupo B: alimentado por lactancia materna)
- 20
- Figura 4: Recuentos equivalentes de bacterias medidos por qPCR en las deposiciones de bebés que reciben la fórmula especificada (C=control; T=fórmula de prueba con probiótico de *B. lactis*) o quienes fueron amamantados (grupo B), en el momento de la inclusión en el estudio (<2 sem) y a las seis (6 sem) y doce (12 sem) semanas de edad. Los resultados de la qPCR se proporcionan como las medias + etm de células bacterianas por g de heces. Línea de puntos, límite de detección. Barras de error, desviación típica.
- 25
- Figura 5: Proporción de bebés en los tres grupos de alimentación especificados en la parte inferior que muestran heces con el color definido en la abscisa a <2 sem (valores iniciales) y 12 sem de edad (panel derecho). (grupo T: con probiótico de *B. lactis*; grupo C: control sin probiótico de *B. lactis*; grupo B: alimentado por lactancia materna)
- 30
- Figura 6: Recuentos de bifidobacterias (log de UFC de bifidobacterias por g de deposiciones) en bebés a los 3, 10, 28 y 84 días, en cada grupo analizado (fórmula de prueba/parto vaginal; fórmula de prueba/parto por cesárea; fórmula de control/parto vaginal; fórmula de control/parto por cesárea).
- 35 Descripción de la invención
- Definiciones:
- Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados.
- 40 El término "bebé" se refiere a un niño menor de 12 meses de edad.
- La expresión "niño pequeño" se refiere a un niño de entre uno y tres años de edad, también conocido como "niño en la etapa de aprender a caminar".
- 45 Un "bebé o niño pequeño nacido por cesárea" significa un bebé que nació por operación cesárea. Significa que el bebé no nació por parto vaginal
- Un "pretérmino" o "prematuro" significa un bebé o niño pequeño que no nació a término. Generalmente, se refiere a un bebé nacido antes de finalizar las 37 semanas de gestación.
- 50 La expresión "composición nutritiva" significa una composición que nutre al sujeto. Esta composición nutritiva habitualmente es para tomarse por vía enteral, oral, parenteral o intravenosa, y habitualmente incluye una fuente de lípidos o grasas y una fuente de proteína. Preferentemente, una composición nutritiva es para uso oral.
- 55 La expresión "composición nutritiva hipoalérgica" significa una composición nutritiva que no es probable que provoque reacciones alérgicas.
- La expresión "composición sintética" significa una mezcla obtenida por medios químicos y/o biológicos, que puede ser químicamente idéntica a la mezcla de origen natural en las leches de los mamíferos.
- 60 La expresión "fórmula infantil" significa un alimento destinado a usos nutricionales particulares por parte de bebés durante los primeros cuatro a seis meses de vida y que satisface por sí mismo los requisitos 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 fórmulas infantiles y fórmulas de continuación).
- 65 La expresión "fórmula infantil de inicio" significa un alimento destinado a usos nutricionales particulares por parte de bebés durante los primeros cuatro meses de vida.

- 5 La expresión "fórmula de continuación" significa un alimento destinado a usos nutricionales particulares por parte de bebés mayores de cuatro meses y que constituye el principal elemento líquido en la alimentación que se diversifica progresivamente de esta categoría de persona.
- 10 La expresión "alimento infantil" significa un alimento destinado a usos nutricionales particulares por parte de bebés durante los primeros años de vida.
- 15 La expresión "fortificante" se refiere a composiciones nutritivas líquidas o sólidas adecuadas para mezclar con leche materna o fórmula infantil.
- 20 La expresión "período de destete" significa el período durante el cual la leche materna se sustituye por otro alimento en la alimentación de un bebe.
- 25 La "leche materna" debe entenderse como la leche de la madre o el calostro de la madre (=Leche Materna Humana=HBM (*Human Breast Milk*)).
- 30 El término "oligofructosa" como se usa en el presente documento, se refiere oligómeros de fructosa. Estos pueden ser de cadena larga o de cadena corta, dependiendo del grado de polimerización de la oligofructosa (cantidad de monómeros). Preferentemente, la oligofructosa de la invención es una oligofructosa de cadena corta, muy preferentemente, tiene un grado de polimerización de 2 a 10, por ejemplo, un grado de polimerización de 2 a 8.
- 35 La expresión "palmitato *sn*-2" como se usa en el presente documento se refiere al ácido palmítico en la posición *sn*-2 del triglicérido al que está unido.
- 40 La expresión "triglicérido de alto contenido en palmitato *sn*-2" se refiere a un triglicérido (TG) que contiene más del 30 % de los ácidos palmíticos en la posición *sn*-2. Por ejemplo, Betapol™ B-55 es un ingrediente de alto contenido en palmitato *sn*-2 disponible comercialmente que vende Lipid Nutrition. Este es una mezcla de triglicéridos obtenidos a partir de aceite vegetal en la que al menos el 54 % del ácido palmítico está en la posición *sn*-2 de la molécula de glicerol.
- 45 La expresión "Alfa-lactoalbúmina" se refiere a una proteína del suero de la leche, de alta calidad, de fácil digestión que comprende el 20-25 % de proteína total de leche materna humana (HBM) y es la proteína principal encontrada en la 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.
- 50 El término "prebiótico" significa hidratos de carbono no digeribles que afectan beneficiosamente al hospedador mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de bacterias saludables tales como bifidobacterias en el colon de los seres humanos (Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995;125:1401-12).
- 55 El término "probiótico" significa preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar del hospedador. (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.
- 60 El término "ufc" debe entenderse como unidad formadora de colonias.
- 65 La lactancia materna exclusiva / bebés o niños pequeños alimentados exclusivamente por lactancia materna: tiene el significado común de bebés para los que la gran mayoría de los nutrientes y/o energía se origina a partir de la leche materna humana (la "gran mayoría" puede ser de al menos el 90 % o al menos el 95 %, o al menos el 99 %).
- Los bebés/niños pequeños alimentados predominantemente con fórmula infantil: tiene el significado común y se refiere a bebés o niños pequeños cuyas fuentes de nutrientes y/o energía se originan predominantemente a partir de una fórmula infantil sintética, leche de seguimiento o leches de crecimiento. Predominantemente se refiere al menos al 50 % de los nutrientes y/o energía, o al menos al 75 %.
- Todos los porcentajes son en peso a menos que se indique otra cosa.
- La invención ahora se describirá en mayor detalle. Cabe señalar que los diversos aspectos, características, ejemplos y realizaciones descritos en la presente solicitud pueden ser compatibles y/o combinarse entre sí.
- Además, en el contexto de la invención, las expresiones "que comprende" o "comprende" no excluyen otros elementos posibles. La composición de la presente invención, que incluye las numerosas realizaciones descritas en el presente documento, puede comprender, consistir en o consistir esencialmente en los elementos esenciales y las limitaciones

de la invención descritos en el presente documento, así como cualquier ingrediente, componente o limitación adicional u opcional descritos en el presente documento o de cualquier otra manera en función de las necesidades.

#### Descripción detallada de la invención

Normalmente, una fórmula infantil en una forma líquida lista para consumir (por ejemplo reconstituida a partir de un polvo) proporciona 251-293 kJ (60-70 kcal)/100 ml. Normalmente, la fórmula infantil comprende, por 418 kJ (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 hidratos de carbono seleccionados del grupo que consiste en lactosa, sacarosa, glucosa, jarabe de glucosa, almidón, maltodextrinas y maltosa, y combinaciones de los mismos; y vitaminas y minerales esenciales. La lactosa puede ser el hidrato de carbono predominante en una fórmula infantil. Por ejemplo, una fórmula infantil líquida puede contener aproximadamente 280 kJ (aproximadamente 67 kcal)/100 ml. En algunas realizaciones, la fórmula infantil puede comprender aproximadamente 1,8-3,3 g de proteínas por 418 kJ (100 kcal). La fórmula infantil puede estar en la forma de un polvo que puede reconstituirse en un líquido listo para la alimentación mediante la adición de una cantidad de agua que da como resultado, por ejemplo, un líquido que tiene aproximadamente 280 kJ (aproximadamente 67 kcal)/100 ml.

Una fórmula infantil puede comprender, además, nucleótidos seleccionados 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 los mismos. La fórmula infantil puede comprender, además, luteína, zeaxantina, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, sialilactosa, y/o fucosilactosa. Pueden incluirse en la fórmula infantil ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, tales como ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA). La fórmula infantil puede incluir, además, aminoácidos libres. La fórmula infantil puede incluir, además, otros ingredientes bien conocidos en la técnica.

En una realización, la fórmula infantil de la presente invención comprende aproximadamente 5-6 g por 418 kJ (100 kcal) de grasa (triglicéridos), con al menos aproximadamente el 7,5 % en peso de esta grasa, por ejemplo, aproximadamente el 7,5-12,0 %, consistiendo en ácido palmítico en la posición *sn*-2 de un triglicérido. En algunas realizaciones, aproximadamente el 7,8-11,8 %, aproximadamente el 8,0-11,5 % en peso, aproximadamente el 8,5-11,0 % o aproximadamente el 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 el 15 a aproximadamente el 25 %, tal como de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 20 %, del contenido total de los ácidos grasos en la fórmula, en peso, y al menos de aproximadamente el 30 %, por ejemplo, de aproximadamente el 35 a aproximadamente el 43 % del contenido total de ácido palmítico está en la posición *sn*-2.

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

En la fórmula infantil de la presente invención la grasa comprende una diversidad de triglicéridos que se encuentran, normalmente, en la leche y/o la fórmula infantil. Los residuos de ácidos grasos más comunes en los triglicéridos son los ácidos palmítico y oleico. Los residuos de ácidos grasos además de los ácidos oleico y palmítico que están presentes incluyen, pero no se limitan a, ácido linoleico, ácido alfa linoléico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido docosahexaenoico y ácido araquidónico.

Estudios clínicos recientes en bebés 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 aumentaban la acumulación de DHA en los eritrocitos y en 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 una enfermedad cardiovascular. Dicho equilibrio se logrará mediante la formulación de la presente invención con fuentes de grasa de aceite vegetal que tienen contenido de ácido graso omega 6, tales como, por ejemplo, aceite de soja y aceite de girasol, y contenido de ácido graso omega 3, por ejemplo, de semilla de colza, canola, semilla de lino, chía, perilla o nueces. Para lograr la mezcla de grasa modificada se utilizará una mezcla única de grasa con 5 aceites diferentes

En una realización, la fórmula infantil de la presente invención comprende de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 2,2 g de proteínas totales por 418 kJ (100 kcal), por ejemplo, de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 2,1 g o de aproximadamente 1,9 a aproximadamente 2,1 g de proteínas por 418 kJ (100 kcal), en donde de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,4 g/418 kJ (100 kcal) de las proteínas es alfa-lactoalbúmina. La fórmula infantil de la presente invención puede estar en la forma de un líquido listo para la alimentación, o puede ser un concentrado líquido o una fórmula en polvo que puede reconstituirse en un líquido listo para la alimentación

mediante la adición de una cantidad de agua, lo que dé como resultado un líquido que tiene aproximadamente 280 kJ (aproximadamente 67 kcal)/100 ml. La fórmula infantil de la presente invención incluye todos los ingredientes que son requeridos por la ley en los EE. UU. o la UE, incluyendo, pero no se limita a, ciertas vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales. Puede incluir, además, nucleótidos, tales como CMP, UMP, AMP, GMP e IMP, luteína, zeaxantina, y otros ingredientes conocidos en la técnica.

#### Oligosacáridos

En una realización, la composición nutritiva de la invención comprende al menos un oligosacárido u oligosacáridos. El oligosacárido puede ser un único oligosacárido o una mezcla de oligosacáridos (diferentes). En la presente descripción la mezcla de oligosacáridos se denomina "el oligosacárido" o los "oligosacáridos" o la "mezcla de oligosacárido". Dicho oligosacárido(s) puede ser, por ejemplo, polifruktosa, fructooligosacáridos (FOS), fructooligosacáridos de cadena larga, fructooligosacáridos de cadena corta (por ejemplo, con grado de polimerización (DP) entre 2 y 8), inulina, galactooligosacáridos, oligosacáridos sialilados, oligosacáridos fucosilados, y mezcla de los mismos.

#### Mezcla de oligosacáridos:

En una realización, los oligosacáridos de la invención están presentes en la composición en una cantidad de entre 0,5 y 10 g/418 kJ (100 kcal), preferentemente entre 1 y 5 g/418 kJ (100 kcal), muy preferentemente entre 2 y 4 g/418 kJ (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/418 kJ (100 kcal), o en una cantidad de 0,6 a 3,1 g/418 kJ (100 kcal), o en una cantidad de 0,6 a 2,0 g/418 kJ (100 kcal), o en una cantidad de 0,7 a 2,0 g/418 kJ (100 kcal), o en una cantidad de 0,8 a 1,8 g/418 kJ (100 kcal), o en una cantidad de 0,9 a 1,7 g/418 kJ (100 kcal), o en una cantidad de 1,0 a 1,5 g/418 kJ (100 kcal) o en una cantidad de 1,0 a 1,6 g/418 kJ (100 kcal).

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

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

En una realización preferida, los oligosacáridos son mezclas de oligosacárido sialilados y GOS.

En una realización, la mezcla de oligosacáridos comprende oligosacáridos N-acetilados, galacto-oligosacáridos (GOS), y oligosacáridos sialilados.

En una realización, la composición comprende:

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

Oligosacárido N-acetilado: En una realización muy preferida, el oligosacárido de la composición de la invención consiste en, o comprende, al menos un oligosacárido N-acetilado, al menos un galactooligosacárido y al menos un oligosacárido sialilado.

El oligosacárido N-acetilado es un oligosacárido que tiene un resto 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 los mismos. Los oligosacáridos N-acetilados pueden prepararse mediante la acción de la glucosaminidasa y/o la galactoaminidasa sobre N-acetil-glucosa y/o N-acetil galactosa. Igualmente, para este fin pueden usarse N-acetil-galactosil transferasas y/o N-acetil-glucosil 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 técnicamente para producir los sustratos y enzimas respectivos. Pueden usarse cultivos microbianos individuales y/o cultivos mezclados. La formación del oligosacárido N-acetilado 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 un oligosacárido que contiene N-acetilhexosamina como se describe en Wrodnigg, T.M, Dtutz, A.E, 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 un resto de N-acetilo.

Las expresiones "galactooligosacárido" y "GOS" pueden usarse indistintamente. Se refieren a un oligosacárido que comprende dos o más moléculas de galactosa que no tienen carga ni resto de N-acetilo (es decir, son oligosacáridos neutros). En una realización particular, dichas dos o más moléculas de galactosa están unidas 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 están unidas 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 los mismos. 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 $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc y Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4Glc y mezclas de los mismos están disponibles comercialmente bajo las marcas comerciales Vivinal® y Elix'or®. Otros proveedores de oligosacáridos son Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH y Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Alternativamente, pueden usarse para producir oligosacáridos neutros glucotransferasas específicas, tales como las galactosiltransferasas.

El oligosacárido sialilado es un oligosacárido que tiene un resto 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,  $\alpha$ 2,3-sialilactosa (3SL),  $\alpha$ 2,6-sialilactosa (6SL), NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc, NeuAc $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc, NeuAc $\beta$ 1,2,3Gal $\beta$ 1,4Glc y NeuAc $\beta$ 1,2,6Gal $\beta$ 1,4Glc pero, además, cualquier mezcla de los mismos.

El oligosacárido(s) sialilado(s) puede seleccionarse del grupo que comprende 3' sialilactosa (3-SL), 6' sialilactosa (6-SL) y cualquier combinación de los mismos. 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 entre 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, pueden producirse, además, mediante biotecnología mediante el uso de sialiltransferasas específicas ya sea por tecnología de fermentación basada en enzimas (enzimas recombinantes o naturales) o por tecnología de fermentación microbiana. En el último caso, los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o pueden diseñarse técnicamente para producir los sustratos y enzimas respectivos. Pueden usarse cultivos microbianos individuales y/o cultivos mezclados. La formación de los sialiloligosacáridos 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 están, además, disponibles comercialmente, por ejemplo, de Kyowa Hakko Kogyo de Japón.

Fuente de prebióticos / oligosacáridos:

Los oligosacáridos pueden aislarse de cualquier fuente. Preferentemente, los oligosacáridos se aíslan, purifican o 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 procedentes 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 procedimiento puede usarse para proporcionar la mezcla de oligosacáridos usada por la presente invención).

Realizaciones específicas:

Se prevé que algunas mezclas de oligosacáridos específicos sean particularmente adecuadas para la invención.

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

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

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

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

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

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

30 En otra realización, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,0015 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) N-acetilado(s), al menos 0,70 g/418 kJ (100 kcal) de galactooligosacárido(s) y al menos 0,0045 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s).

35 En algunas realizaciones específicas, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,0015 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,002 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,0025 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,003 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,0035 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,004 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,0045 g/418 kJ (100 kcal) o al menos 0,005 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) N-acetilado(s). En algunas realizaciones, la composición nutritiva puede comprender de 0,0015 a 0,005 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) N-acetilado(s), tal como de 0,0015 a 0,045 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) N-acetilado(s) o de 0,002 a 0,0045 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) N-acetilado(s).

40 Además, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,70 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,74 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,8 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,85 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,90 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,95 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 1,0 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 1,05 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 1,10 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 1,20 g/418 kJ (100 kcal) o al menos 1,50 de galactooligosacárido(s). En algunas realizaciones, puede comprender de 0,70 a 1,5 g/418 kJ (100 kcal) de galactooligosacárido(s), tal como de 0,70 a 1,20 g/418 kJ (100 kcal) de galactooligosacárido(s) o de 0,74 a 1,2 g/418 kJ (100 kcal) de galactooligosacárido(s).

45 Finalmente, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,0045 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,005 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,0055 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,006 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,0065 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,007 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,0075 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,008 g/418 kJ (100 kcal) o al menos 0,0085 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s). En algunas realizaciones, puede comprender de 0,0045 a 0,0085 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s), tal como de 0,0045 a 0,008 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s) o de 0,0045 a 0,0075 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s).

50 En una realización particular, la composición nutritiva puede comprender de 0,0015 a 0,005 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) N-acetilado(s), de 0,70 a 1,5 g/418 kJ (100 kcal) de galactooligosacárido(s) y de 0,0045 a 0,0085 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s).

55 En otra realización particular, la composición nutritiva puede comprender de 0,0015 a 0,0045 g/418 kJ (100 kcal) de N-acetil-oligosacárido(s), de 0,74 a 1,2 g/418 kJ (100 kcal) de galactooligosacárido(s) y de 0,0045 a 0,0075 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s).

65

- En una realización ventajosa particular, la mezcla de oligosacáridos de la composición nutritiva de acuerdo con la invención comprende del 0,1 al 4,0 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), del 92,0 al 98,5 % en peso del (de los) galactooligosacárido(s) y del 0,3 al 4,0 % en peso del (de los) oligosacárido(s) sialilado(s). En un aspecto de la invención, la composición nutritiva comprende la mezcla de oligosacáridos en una cantidad del 2,5 al 15 % en peso.
- 5 Alternativamente, la composición nutritiva comprende la mezcla de oligosacáridos en una cantidad del 3 al 15 % en peso, o en una cantidad del 3 al 10 % en peso, o en una cantidad del 3,5 al 9,5 % en peso o en una cantidad del 4 al 9 % en peso o en una cantidad del 4,5 al 8,5 % en peso, o en una cantidad del 5,0 al 7,5 % en peso o en una cantidad del 5 al 8 % en peso.
- 10 En algunas realizaciones específicas, la composición nutritiva puede comprender la mezcla de oligosacáridos en una cantidad de 0,5 a 3,1 g/418 kJ (100 kcal), o en una cantidad de 0,6 a 3,1 g/418 kJ (100 kcal), o en una cantidad de 0,6 a 2,0 g/418 kJ (100 kcal), o en una cantidad de 0,7 a 2,0 g/418 kJ (100 kcal), o en una cantidad de 0,8 a 1,8 g/418 kJ (100 kcal), o en una cantidad de 0,9 a 1,7 g/418 kJ (100 kcal), o en una cantidad de 1,0 a 1,5 g/418 kJ (100 kcal) o en una cantidad de 1,0 a 1,6 g/418 kJ (100 kcal).
- 15 La composición nutritiva de la presente invención puede comprender al menos el 0,01 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), al menos el 2,0 % en peso de galactooligosacárido(s) y al menos el 0,02 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).
- 20 En algunas realizaciones, la composición nutritiva de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos el 0,01 % en peso, o al menos el 0,02 % en peso, o al menos el 0,03 % en peso, o al menos el 0,04 % en peso, o al menos el 0,05 % en peso, o al menos el 0,06 % en peso o al menos el 0,07 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s). En algunas realizaciones, puede comprender del 0,01 al 0,07 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), tal como del 0,01 al 0,05 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s) o del 0,01 al 0,03 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s).
- 25 Además, la composición nutritiva puede comprender al menos el 2 % en peso, o al menos el 3 % en peso, o al menos el 4 % en peso, o al menos el 5 % en peso, o al menos el 5,5 % en peso, o al menos el 6 % en peso o al menos el 7 % en peso o al menos el 8 % en peso de galactooligosacárido(s). En algunas realizaciones, puede comprender del 5 al 8 % en peso de galactooligosacárido(s), tal como del 5,75 al 7 % en peso de galactooligosacárido(s) o del 5,85 al 6,5 % en peso de galactooligosacárido(s). Un ejemplo particular es una cantidad del 5,95 % en peso de oligosacárido(s).
- 30 Finalmente, la composición nutritiva puede comprender al menos el 0,02 % en peso, o al menos el 0,03 % en peso, o al menos el 0,04 % en peso, o al menos el 0,05 % en peso, o al menos el 0,06 % en peso, o al menos el 0,07 % en peso, o al menos el 0,08 % en peso o al menos el 0,09 % en peso de oligosacáridos sialilados. En algunas realizaciones, puede comprender del 0,02 al 0,09 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s), tal como del 0,02 al 0,08 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s), o del 0,02 al 0,07 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s) o del 0,003 al 0,07 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).
- 35 En una realización particular, la composición nutritiva de acuerdo con la presente invención puede comprender del 0,01 al 0,07 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), del 2,0 al 8,0 % en peso de galactooligosacárido(s) y del 0,02 al 0,09 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).
- 40 Aún en otra realización particular, la composición nutritiva de acuerdo con la presente invención puede comprender del 0,01 al 0,03 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), el 5,95 % en peso de galactooligosacárido(s) y del 0,02 al 0,09 % en peso de oligosacárido(s) sialilado(s).
- 45 En otra realización, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,0015 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) N-acetilado(s), al menos 0,70 g/418 kJ (100 kcal) de galactooligosacárido(s) y al menos 0,0045 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s).
- 50 En algunas realizaciones específicas, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,0015 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,002 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,0025 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,003 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,0035 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,004 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,0045 g/418 kJ (100 kcal) o al menos 0,005 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) N-acetilado(s). En algunas realizaciones, la composición nutritiva puede comprender de 0,0015 a 0,005 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) N-acetilado(s), tal como de 0,0015 a 0,045 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) N-acetilado(s) o de 0,002 a 0,0045 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) N-acetilado(s).
- 55 Además, la composición nutritiva puede comprender al menos 0,70 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,74 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,8 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,85 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,90 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,95 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 1,0 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 1,05 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 1,10 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 1,20 g/418 kJ (100 kcal) o al menos 1,50 de galactooligosacárido(s). En algunas realizaciones, puede comprender de 0,70 a 1,5 g/418 kJ (100 kcal) de
- 60
- 65

galactooligosacárido(s), tal como de 0,70 a 1,20 g/418 kJ (100 kcal) de galactooligosacárido(s) o de 0,74 a 1,2 g/418 kJ (100 kcal) de galactooligosacárido(s).

Oligosacáridos/BMOS:

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

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

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

El GOS puede ser de una fuente comercial "Vivinal GOS" a partir de Friesland Campina (PB).

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

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

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

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

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

30 La composición nutritiva puede comprender al menos 0,0045 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,005 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,0055 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,006 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,0065 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,007 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,0075 g/418 kJ (100 kcal), o al menos 0,008 g/418 kJ (100 kcal) o al menos 0,0085 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s). En algunas realizaciones, puede comprender de 0,0045 a 0,0085 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s), tal como de 0,0045 a 0,008 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s) o de 0,0045 a 0,0075 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s).

40 En una realización particular, la composición nutritiva puede comprender de 0,0015 a 0,005 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) N-acetilado(s), de 0,70 a 1,5 g/418 kJ (100 kcal) de galactooligosacárido(s) y de 0,0045 a 0,0085 g/418 kJ (100 kcal) de oligosacárido(s) sialilado(s).

45 En otra realización particular, la composición nutritiva puede comprender de 0,0015 a 0,0045 g/418 kJ (100 kcal) de N-acetil-oligosacárido(s), de 0,74 a 1,2 g/418 kJ (100 kcal) de galactooligosacárido(s) y de 0,0045 a 0,0075 g/418 kJ (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 del 0,1 al 4,0 % en peso de oligosacárido(s) N-acetilado(s), del 92,0 al 98,5 % en peso del (de los) galactooligosacárido(s) y del 0,3 al 4,0 % en peso del (de los) oligosacárido(s) sialilado(s).

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

Otros oligosacáridos / oligofruktosa (OF)

55 La fórmula infantil de la presente invención puede comprender al menos aproximadamente 0,4 g o al menos 0,7 g de oligofruktosa por 418 kJ (100 kcal) de la composición. En algunas realizaciones, 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, oligofruktosa por 418 kJ (100 kcal).

60 En algunas realizaciones, la oligofruktosa tiene un grado de polimerización de 2 a 10. En algunas realizaciones, al menos el 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de la oligofruktosa tiene un grado de polimerización de 2 a 8 (entre 2 y 8). En una realización, la composición de la invención comprende

- al menos 3 g/l o al menos 5 g/l de oligofruktosa (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 oligofruktosa 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 OF/418 kJ (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 OF/418 kJ (100 kcal) de la composición.

Generalmente, se admite, en vista de los resultados ilustrados por los ejemplos, que una alta cantidad de oligofruktosa suministra un efecto más fuerte. Un límite superior para un efecto beneficioso de oligofruktosa puede, sin embargo, existir cuando comienzan los efectos secundarios desventajosos. Dicho límite superior puede ser, por ejemplo, 2,2 g/418 kJ (100 kcal), 2,0 g/418 kJ (100 kcal), 1,8 g/418 kJ (100 kcal), 1,5 g/418 kJ (100 kcal) o 1,2 g/418 kJ (100 kcal). Preferentemente, la composición de la invención comprende 5 g OF/l o 0,75 o 0,9 g OF/418 kJ (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 (por ejemplo, prebióticos). Estos están, habitualmente, en una cantidad de entre el 0,3 y el 10 % en peso de la composición.

Los prebióticos son, habitualmente, no digeribles en el sentido de que no se degradan y absorben en el estómago o el intestino delgado y, así, permanecen intactos cuando pasan al colon, donde los fermentan selectivamente 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 al 90 % con fructooligosacáridos de cadena corta al 10 %. Otra combinación de prebióticos es fructooligosacáridos de cadena corta al 70 % e inulina (=FOS de cadena larga) al 30 %. Ambos, así como la oligofruktosa (OF), se encuentran disponibles comercialmente, en particular, en la empresa BNEO (Beneo GmbH, Maximilianstrasse, 68165, Mannheim, Alemania).

Probióticos

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

En el presente documento se divulga el probiótico *B. lactis*, es el "BB12" comercial disponible de Chr. Hansen, Dinamarca. De acuerdo con la invención, el probiótico *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* (*B. lactis*) es CNCM I-3446.

La dosificación de probióticos puede ser, por ejemplo, de entre 105 y 1012 ufc por gramo de composición, preferentemente, en una cantidad suficiente para suministrar un efecto sinérgico con los oligosacáridos (por ejemplo, BMOS) de la composición y, preferentemente, entre 106 y 108 ufc/g de la composición.

Proteínas / Alfa-lactoalbúmina

La composición de la invención comprende una fuente de proteína. Dicha fuente de proteína puede, por ejemplo, suministrar entre 1,6 g y 3 g de proteína/418 kJ (100 kcal). En una realización, destinada para bebés prematuros, tal cantidad puede ser de entre 2,4 y 4 g/418 kJ (100 kcal) o más que 3,6 g/418 kJ (100 kcal). En una realización, la cantidad puede ser menor que 2,0 g por 418 kJ (100 kcal), por ejemplo, en una cantidad menor que 1,8 g por 418 kJ (100 kcal).

No se cree que el tipo de proteína sea de máxima importancia para la presente invención siempre que se cumplan los requisitos mínimos para el contenido de aminoácidos esenciales y se garantice un crecimiento satisfactorio. Sin embargo, proteínas particulares pueden proporcionar un sustrato más adecuado para la microbiota. Por tanto, pueden usarse fuentes de proteínas basadas en suero de la leche, caseína y mezclas de los mismos, así como fuentes de proteínas basadas en soja. En lo que se refiere a las proteínas del suero de leche, la fuente de proteína puede basarse en suero de la leche ácido o suero de la leche dulce, o mezclas de los mismos, y puede incluir alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina en cualquier proporción deseada.

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

Las proteínas pueden estar intactas o hidrolizadas o ser una mezcla de proteínas intactas e hidrolizadas. Por el término "intactas" se entiende que la parte principal de las proteínas está intacta, es decir, la estructura molecular no está alterada, por ejemplo, al menos el 80 % de las proteínas no está alterada, tal como al menos el 85 % de las proteínas no está alterada, preferentemente, al menos el 90 % de las proteínas no está alterada, aún más preferentemente, al

menos el 95 % de las proteínas no está alterada, tal como al menos el 98 % de las proteínas no está alterada. En una realización particular, el 100 % de las proteínas no está alterada.

5 El término "hidrolizada" significa, en el contexto de la presente invención, una proteína que se ha hidrolizado o degradado en sus aminoácidos componentes.

10 Las proteínas pueden hidrolizarse completamente, extensamente o parcialmente. Puede ser conveniente suministrar proteínas parcialmente hidrolizadas (grado de hidrólisis entre el 2 y el 20 %), por ejemplo, para bebés que se cree están en riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca. Si se precisan proteínas hidrolizadas, el procedimiento 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 la leche pueden prepararse por la hidrólisis enzimática de la fracción del suero de la leche en una o más etapas. Si la fracción del suero de la leche usada como material de partida está sustancialmente libre de lactosa, se encuentra que la proteína experimenta mucho menos bloqueo de la lisina durante el procedimiento de hidrólisis. Esto hace posible reducir el grado de bloqueo de la lisina desde aproximadamente el 15 % en peso de lisina total a menos de aproximadamente el 10 % en peso de lisina; por ejemplo, aproximadamente el 7 % en peso de lisina, lo que mejora enormemente la calidad nutritiva de la fuente de proteína.

20 En una realización preferida, las proteínas de la composición se hidrolizan, se hidrolizan completamente, se hidrolizan extensamente o se hidrolizan parcialmente. El grado de hidrólisis (DH) de la proteína puede ser de entre 8 y 40, o entre 20 y 60 o entre 20 y 80 o más que 10, 20, 40, 60, 80 90. Se entiende que las proteínas hidrolizadas pueden tener varios 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 proporcionando un efecto doble, posiblemente un efecto sinérgico actuando al menos en 2 niveles diferentes en el establecimiento de los síntomas alérgicos o el estado alérgico.

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

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

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

40 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/418 kJ (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 potencia el efecto de la oligofructosa al proporcionar, por ejemplo, un sustrato nutricional adecuado para la microbiota.

45 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 bebés alimentados por lactancia materna, especialmente para bebés vulnerables.

Matriz preferida de la composición nutritiva:

50 La composición de acuerdo con la invención puede ser una composición nutritiva sintética. Puede ser una fórmula infantil, una fórmula infantil de inicio, una fórmula de continuación, una fórmula para bebés prematuros 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.

55 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 del 33 % de los ácidos palmíticos en la posición sn-2.

60 En una realización, la composición nutritiva de la presente invención comprende aproximadamente 5-6 g por 418 kJ (100 kcal) de grasa (triglicéridos), con al menos aproximadamente el 7,5 % en peso de esta grasa, por ejemplo, aproximadamente el 7,5-12,0 %, consistiendo en ácido palmítico en la posición sn-2 de un triglicérido.

65 En una realización de la invención, la composición comprende al menos el 7,5 %, preferentemente, el 8 %, más preferentemente, al menos el 9,6 % de la grasa que es palmitato sn-2.

En algunas realizaciones, aproximadamente el 7,8-11,8 %, aproximadamente el 8,0-11,5 % en peso, aproximadamente el 8,5-11,0 % o aproximadamente el 9,0-10,0 % en peso de la grasa es ácido palmítico en la posición *sn-2* de un triglicérido.

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

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

20 En la composición nutritiva de la presente invención la grasa comprende una diversidad de triglicéridos que se encuentran, normalmente, en la leche y/o en una composición nutritiva. Los restos de ácido graso más comunes en los triglicéridos son los ácidos palmítico y oleico. Los restos de ácido graso además de los ácidos oleico y palmítico que están presentes incluyen, pero no se limitan a, ácido linoleico, ácido alfa linolénico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido docosahexaenoico y ácido araquidónico.

25 Una composición disponible comercialmente vendida por Lipid Nutrition es Betapol™ B-55, que es una mezcla de triglicéridos obtenidos de aceite vegetal en la que al menos el 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 de Betapol™ B-55 al 40-50 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente el 43 % a aproximadamente el 45 % en peso. Los expertos en la materia 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.

30 Aunque alimentar a un bebé 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 un reblandecimiento superior en las heces al tiempo que se induce un equilibrio óptimo de la microbiota intestinal y una potenciación de la regulación a la baja o de la reducción de la carga de bacterias patógenas en el colon de los bebés alimentados con fórmula.

#### Efecto en la salud

40 La composición de la invención tiene un efecto positivo sobre la microbiota de los sujetos bebés o niños pequeños. Dicho efecto positivo puede comprender la regulación a la baja, la disminución o la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas y/o la regulación al alza, el aumento o el estímulo del crecimiento de bacterias beneficiosas.

45 El efecto en la salud de la composición de la invención comprende estimular o inducir una microbiota intestinal que sea más cercana a la microbiota de bebés alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota de bebés alimentados predominantemente con una composición nutritiva convencional (o fórmula infantil) que no comprende dicho probiótico. Dicho efecto es en bebés o niños pequeños de entre 0 y 36 meses, opcionalmente entre 0 y 12 meses de edad.

50 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, pueden pasar 4, 6, 8 semanas antes de que se observe la microbiota inducida.

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

60 La microbiota inducida es específica en torno a 2 dimensiones: Cuantitativamente la flora intestinal comprende más bacterias beneficiosas y menos bacterias no beneficiosas o perjudiciales. Cualitativamente la diversidad de taxones bacterianos se asemeja más a una microbiota de bebés alimentados por lactancia materna.

65 Regulando a la baja, disminuyendo y/o inhibiendo el crecimiento de poblaciones de bacterias patógenas y/o induciendo bacterias más beneficiosas, cualitativa y cuantitativamente, la composición de la invención proporciona efectos positivos para la salud. Una microbiota intestinal/del intestino tan saludable está relacionada en última instancia con una absorción adecuada de nutrientes, un crecimiento adecuado, menos cólicos, menos infecciones, menos diarrea y la mejor salud intestinal.

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

El efecto de la invención puede ser preventivo (por ejemplo, evitar el desequilibrio de la microbiota intestinal, evitar las infecciones intestinales, mantener una microbiota intestinal saludable, inducir una microbiota intestinal saludable) o curativo (restablecer una microbiota intestinal saludable cuando esta se altera, ayudar a eliminar o disminuir poblaciones patógenas en el tracto intestinal/del intestino, inducir una microbiota saludable después de la alteración debida, por ejemplo, a diarreas o infecciones).

El efecto en la salud relacionado al bebé puede medirse mediante diversos métodos como se ilustra a continuación en el ejemplo. Sin embargo, en una realización el efecto en la microbiota se mide mediante la distribución promedio de las distancias UNIFRAC (véase a continuación).

De acuerdo con la invención, el efecto en la salud de "estimular o inducir una microbiota intestinal que sea más cercana a la microbiota de los bebés alimentados exclusivamente con leche materna humana" se caracteriza además por estimular o inducir una microflora intestinal que tiene una distancia filogenética con la microbiota de los bebés alimentados por lactancia materna menor que 0,3 unidades (medido por el método Unifrac), preferentemente, menor que 0,25 unidades.

#### Bebés objetivo

En una realización de la invención los bebés o niños pequeños objetivo son los nacidos con una microbiota vulnerable o desequilibrada o disbiosis de la microbiota. Por ejemplo, tales bebés pueden ser niños prematuros, bebés nacidos pequeños para la edad gestacional o nacidos por operación cesárea, bebés hospitalizados o bebés tratados o que se hayan tratado con antibióticos.

En una realización, los bebés o niños pequeños son nacidos a término. Todos los bebés pueden beneficiarse de la invención debido a que todos los bebés son o pueden ser, a una edad determinada, susceptibles de adquirir una microbiota intestinal/del intestino desequilibrada. En una realización, los bebés o niños pequeños nacen prematuros (pretérmino). En una realización, los bebés o niños pequeños nacen pequeños para la edad gestacional. En una realización, los bebés o niños pequeños nacen por parto vaginal. En una realización, los bebés o niños pequeños nacen por cesárea. Se prevé que la composición de la invención puede ser incluso más beneficiosa para bebés nacidos con la microbiota intestinal posiblemente alterada o bebés vulnerables (tales como bebés nacidos prematuramente y/o bebés nacidos por cesárea). Se prevé, además, que la composición de la invención puede ser incluso más beneficiosa para bebés que presentan trastornos intestinales (tales como diarreas, infecciones o cólicos) después del nacimiento, por ejemplo, durante las primeras 4 semanas después del nacimiento.

En realizaciones de la invención, los bebés son nacidos prematuramente o pequeños para la edad gestacional o nacidos por cesárea, o presentan una microbiota intestinal desequilibrada o anómala, o padecen una infección intestinal; opcionalmente, dichas condiciones anteriores son objetivo de la composición de la invención cuando los bebés son de 0-6 meses de edad. Sin quedar ligado a teoría alguna, se cree que los bebés más pequeños se benefician de la invención aún más, especialmente cuando los bebés tienen (o están en riesgo de tener) una "microbiota intestinal desequilibrada" y/o tienen un estado de salud vulnerable (como se ejemplifica por las condiciones citadas anteriormente).

En tales bebés o niños pequeños, es de particular interés la adquisición de una microbiota intestinal que sea cercana a la microbiota intestinal de los bebés alimentados por lactancia materna (preferentemente, bebés alimentados exclusivamente por lactancia materna). De hecho, esto les proporciona un buen número de factores de salud que pueden ser beneficiosos, especialmente para los bebés vulnerables.

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

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

#### Régimen de alimentación previsto

En una realización, la composición de la invención se administra al lactante o a niños pequeños (o se pretende administrar o se indica administrar) durante 2, 4, 8, 12 semanas o durante al menos 2, 4, 8, 12 semanas. En realizaciones preferidas, se administra (o se pretende administrar o se indica administrar) durante las primeras 4, 8 o 12 semanas de la vida del lactante. Se cree que para inducir el efecto pretendido es preferible empezar pronto (al nacer o cerca del nacimiento).

Se espera que la salud sea más notable 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 use para cubrir el 50 % o más, o el 75 % o más, de las necesidades nutricionales (por ejemplo, las necesidades de energía) de los bebés o niños pequeños objetivo.

Ejemplo 1:

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 de OF	fórmula sn2+5 g/l de OF
Energía	% en Kcal	670	670	670	670
Proteína	g	13,4	13,4	13,4	13,4
Grasa	g	36	36	36	36
% de C16 en sn-2	% grasa total	2,6	9,6	9,6	9,6
Hidratos de carbono	g	73	73	73	73
Oligofruktosa	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 B1	mcg	1000	1000	1000	1000
Vitamina B2	mcg	1100	1100	1100	1100
Vitamina B6	mcg	550	550	550	550
Vitamina B12	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	S	8
Zinc	mg	6	6	6	6
Manganeso	mcg	50	50	50	50

(continuación)

Por litro	Unidades	Fórmula de control	fórmula "sn2"	fórmula sn2+3 g/l de OF	fórmula sn2+5 g/l de OF
Cobre	mcg	333	333	333	333
Yodo	mcg	100	100	100	100
Sodio	mg	160	160	160	160
Potasio	mg	650	650	650	650
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
OMP	mg	2,0	2,0	2,0	2,0
IMP	mg	2,0	2,0	2,0	2,0

Las composiciones anteriores de la tabla 1 contienen adicionalmente, respectivamente, el probiótico *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* (BB12 o alternativamente CNCM I-3446) en una cantidad de 106 (fórmula de control), 108 (fórmula sn2), 109, (fórmula sn2 + 3 g de OF) 1010 (fórmula Sn2 5 g de OF) ufc/g de composición.

- 5 A continuación, en la Tabla 2 se proporcionan ejemplos adicionales de la composición de una composición nutritiva para su uso de acuerdo con la presente invención. La fuente de proteína es una mezcla del 60 % de MSWP28 y el 40 % de caseína.

TABLA 2

Nutriente	por 418 kJ (100 kcal)	por litro
Energía (kcal)	418 (100)	2805 (670)
Proteína (g)	1,83	12,3
Grasa (g)	5,3	35,7
Ácido linoleico (g)	0,79	5,3
Ácido $\alpha$ -linolénico (mg)	101	675
Lactosa (g)	11,2	74,7
Oligosacáridos prebióticos		
GOS (g)	0,64	4,3
o		
BMOS (g)	1,1	7,5
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 ( $\mu$ g)	8	50

(continuación)

Nutriente	por 418 kJ (100 kcal)	por litro
Se ( $\mu$ g)	2	13
Vitamina A ( $\mu$ g RE)	105	700
Vitamina D ( $\mu$ g)	1,5	10
Vitamina E (mg TE)	0,8	5,4
Vitamina K1 ( $\mu$ g)	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 ( $\mu$ g)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 ( $\mu$ g)	0,3	2
Biotina ( $\mu$ g)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I ( $\mu$ g)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
<i>Probióticos:</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> NCC2818 (CNCM I-3446),	1x10 <sup>7</sup> ufc/g de polvo	

### Ejemplo 2: Estudio clínico

#### Configuración del estudio

- 15 Se llevó a cabo en la India un ensayo clínico multicéntrico, prospectivo, aleatorizado, controlado, con doble enmascaramiento de dos grupos en paralelo. Se incluyó un grupo no aleatorizado, alimentado exclusivamente por lactancia materna como referencia. Los criterios de inclusión principales para todos los bebés consistieron en estar sano, haber nacido a término, tener menos de 3 meses en el momento de la inclusión y tener necesidad de
- 20 alimentación con fórmula debido al fracaso de la lactancia materna (grupos aleatorizados), o recibir alimentación exclusivamente por lactancia materna (grupo de referencia). Los bebés aleatorizados se asignaron a uno de 2 grupos de tratamiento:

1. Sujetos que reciben la fórmula de inicio que contiene *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* NCC 2818 (= *B. lactis* CNCM 1-3446) de entre 14 días y 3 meses a 6 meses (Grupo O). La fórmula infantil del Grupo O es una composición nutritiva de la invención.

5 2. Sujetos que reciben la fórmula de inicio con la misma composición, pero sin *B. lactis* de entre 14 días y 3 meses a 6 meses (Grupo V) (no es una composición de la invención sino una fórmula infantil convencional).

El grupo de referencia se alimentó exclusivamente por lactancia materna desde el nacimiento hasta los 6 meses (Grupo BF)

10 La "fórmula de inicio" que se usó fue una fórmula infantil de inicio convencional (fórmula infantil destinada a bebés de 0-6 meses) similar a la fórmula infantil de "control" del ejemplo 1, con la excepción de que no contiene inicialmente el probiótico *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* (= *B. lactis*).

15 Se recogieron muestras de heces a los 4 meses de edad del bebé, se refrigeraron a 4 °C durante un máximo de 10 horas después de la emisión y se mantuvieron congeladas a -80 °C hasta que se llevó a cabo el análisis de la microbiota.

#### 20 Análisis de la microbiota fecal

Se estudió la composición de la microbiota fecal en 17 (Grupo O), 15 (Grupo V) y 16 (grupo BF) bebés.

25 La composición de la microbiota fecal se midió mediante pirosecuenciación de las regiones variables de los genes de ARN 16S presentes en la población microbiana. El ADN se extrajo de muestras fecales con el Qiacube (QIAgen). Los cebadores se diseñaron como se propuso previamente [Hamady, M., Walker, J. J., Harris, J. K., N. *et al.* (2008), Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex, *Nat. Methods*, 5:235-237] para amplificar las regiones variables V1 a V3 del gen 16S, que presenta un alto nivel taxonómico informativo. Mediante el uso de técnicas de código de barras, se realizó una pirosecuenciación múltiple. Se han identificado lecturas de alta calidad y se analizaron mediante el uso del paquete analítico QIIME [Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J. *et al.* (2010), QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nat Methods*, 7(5):335-6]. Las lecturas se agruparon en Grupos Taxonómicos Operacionales (los OTU, forma siglada de *Operational Taxonomic Groups*) al 97 % de identidad y se clasificaron adicionalmente mediante el uso del clasificador RDP [Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. y Cole, J. R. (2007), Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:5261-5267]. Mediante el uso de QIIME se calculó entre las muestras la distancia Unifrac ponderada (que toma en cuenta la distancia filogenética entre los OTU). Después, se analizó dentro de cada grupo la distribución de las distancias de cada muestra en comparación con las muestras del grupo alimentado por lactancia materna. La significación estadística se determina mediante la prueba de la U de Mann-Whitney.

40 Alternativamente, la similitud puede evaluarse mediante una ordenación multivariable con contraste de hipótesis basado en los procedimientos de aleatorización (por ejemplo, Análisis de Correlación Canónica (ACC), Análisis de Redundancia (AR)) o una prueba paramétrica o no paramétrica multivariable (por ejemplo, Adonis, ANOSIM, ANOVA multivariable). Se esperan resultados similares.

#### 45 *Resultados*

La composición de la microbiota global de los bebés alimentados con la fórmula con *B. lactis* (grupo O) fue diferente con respecto al grupo alimentado con la fórmula de control y filogenéticamente más estrechamente relacionada al grupo alimentado por lactancia materna (Figura 1). En particular, el grupo de la fórmula *B. lactis* (grupo O) tenía *B. animalis* aumentada y *Coprobacillus* y *Streptococcus* disminuidas en comparación con el grupo de la fórmula de control.

#### Ejemplo 3: Estudio clínico

55 *Ensayo de intervención nutricional.* A una edad media de 5 días, 115 bebés sanos nacidos a término se incluyeron en un ensayo de intervención nutricional. Los bebés de madres que decidieron no amamantarlos se distribuyeron al azar ya sea en una fórmula infantil de inicio (fórmula de control C, n=37, 1,8 g de proteína/418 kJ (100 kcal); relación suero de la leche/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 fórmula en polvo; 1,4x10<sup>7</sup> ufc/l de fórmula reconstituida) (fórmula de prueba T, n=39), durante un período de alimentación de 12 semanas. Los bebés de las madres que decidieron exclusivamente amamantarlos 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.

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

ensayo de alimentación, los bebés del grupo T, pero no los del grupo C, mostraron una proporción de deposiciones amarillentas frente a verdosas equivalente a los bebés B (Figura 5). La semejanza del color es un indicador de presentar una microbiota similar / cercana.

5 *Análisis microbiológico de las deposiciones: PCR cuantitativa en tiempo real.* Se recolectaron muestras de las deposiciones de los bebés antes de la primera aplicación del producto, y a las 6 y 12 semanas de edad, cuando estaban en el régimen de alimentación asignado. En el análisis según el protocolo, estuvieron disponibles las deposiciones de 18 a 23 bebés por grupo y punto de tiempo. Se recolectaron muestras de deposiciones 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 °C hasta que se llevó a cabo el análisis de la microbiota. Se extrajo el ADN total mediante el uso del QIAamp DNA Stool Mini Ki (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante, excepto por la adición de una serie de etapas de ruptura mecánica (11 × 45 s) mediante el uso de un aparato FastPrep y tubos Lysing Matrix B (MP Biochemicals). Los inventores utilizaron cebadores del gen del ARNr 16S, que permite la diferenciación taxonómica. Los recuentos totales de bifidobacterias aumentaron en los tres grupos entre la inclusión y 6 semanas de edad, después de lo cual se mantuvieron constante hasta las 12 semanas (Figura 4A). En comparación con los bebés del grupo C, los bebés del grupo T mostraron un aumento más pronunciado del título de *Bifidobacterium* de 0,8 log. En el grupo T, el título fecal final de bifidobacterias fue de 0,8x10<sup>10</sup> bacterias/g de deposición, significativamente mayor que en los grupos C y B. *Bacteroides* y los lactobacilos mostraron un número en las deposiciones 10 veces más alto y 10 veces más bajo, respectivamente, en los bebés del grupo C en comparación con el grupo T (datos no mostrados y Figura 4B).

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

25 *Composición de la microbiota: Índice de diversidad.* El análisis de la microbiota se complementó mediante la pirosecuenciación del gen de ARNr 16S. Las regiones variables V1 a V3 de 16S se amplificaron por PCR y se secuenciaron en el secuenciador Roche 454 GS-FLX-Titanium Sequencer. Los datos brutos de las secuencias se analizaron utilizando los paquetes informáticos 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 una selección *de novo* de OTU con una identidad del 97 % y la asignación de taxonomía de las secuencias representativas de OTU utilizó el clasificador RDP en la base de datos de referencia Greengenes v.13.8. Las mismas secuencias se alinearon usando PyNast en el alineamiento de referencia de núcleo 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 distancias UniFrac. Después del análisis y exclusión de sujetos con conjuntos de datos incompletos, los inventores obtuvieron las composiciones de la microbiota fecal para los tres puntos de tiempo de al menos 13 bebés por grupo. La Figura 3 compara la  $\alpha$ -diversidad de los tres grupos al 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 bebés del grupo C mostraron un mayor índice de diversidad, debido a un aumento tanto en la riqueza como en la uniformidad en comparación con los bebés en el grupo T y el grupo B. A las 12 semanas de edad, el grupo C, pero no el grupo T, difirió 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 utilizando QIIME. Después, dentro de cada grupo se analizó la distribución de las distancias de cada muestra en comparación con las muestras del grupo alimentado por lactancia materna. La significación estadística se proporciona mediante la prueba de la U de Mann-Whitney (Figura 2). La composición de la microbiota global de los bebés 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 estrechamente relacionada con el grupo alimentado por lactancia materna (B).

#### 55 Ejemplo 4: Estudio clínico adicional

*Intervención nutricional; ensayo aleatorizado con doble enmascaramiento y controlado.*

Un estudio multicéntrico, aleatorizado, controlado, con doble ocultación llevado a cabo en Sudáfrica analizó el efecto de una fórmula suplementada con un prebiótico, una mezcla de oligosacáridos procedentes de leche bovina (BMOS) generados a partir de permeado de suero de la leche (que contiene galactooligosacáridos y oligosacáridos de la leche, tales como 3'- y 6'-sialilactosa) y el prebiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) cepa CNCM I-3446, sobre los niveles de *Bifidobacteria* en el intestino de los bebés 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 ensayo es como se definió en la presente invención.

Un total de 430 bebés sanos nacidos a término, nacidos de madres positivas para VIH que habían elegido alimentar a sus hijos exclusivamente con fórmula desde el nacimiento ( $\leq 3$  días de edad) fueron distribuidos al azar en este ensayo multicéntrico de 4 grupos paralelos. En el conjunto de análisis completo (FAS, forma siglada de *full analysis set*) se incluyó un total de 421 bebés que habían recibido alguna ingesta de fórmula del estudio.

Los dos primeros grupos consistieron en bebés nacidos por cesárea asignados a la fórmula de prueba (n=92) (una FI 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 una FI de control (n=101), los segundos dos grupos consistieron en bebés nacidos por parto vaginal distribuidos al azar para las mismas fórmulas de prueba (n=115) o de control (n=113) desde la inclusión hasta los 6 meses.

El resultado de eficacia principal fueron los recuentos de bifidobacterias fecales a los 10 días y el resultado de seguridad principal fue la ganancia de peso diaria (g/día) entre los 10 días y los 4 meses.

A los 10 días, los recuentos de bifidobacterias fecales fueron significativamente más altos en la de prueba que en el grupo de fórmula de control entre los bebés con parto por cesárea (mediana [intervalo] log: 9,41 [6,30 - 10,94] UFC/g frente a 6,30 [6,30 - 10,51] UFC/g, prueba de Wilcoxon,  $p = 0,002$ ) pero no entre los nacidos por parto vaginal (mediana [intervalo] log: 10,06 [5,93 - 10,77] UFC/g frente a 9,85 [6,15 - 10,79] UFC/g,  $p = 0,126$ ). El límite inferior del intervalo de confianza del 95 % bilateral 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 los bebés los nacidos por parto vaginal y en los nacidos por cesárea, lo que indica que el crecimiento en los bebés alimentados con la fórmula de prueba no fue inferior al de los bebés alimentados con la fórmula control.

A los 10 días y a las 4 semanas, el pH fecal de los bebés alimentados con la fórmula de prueba fue significativamente menor que en los alimentados con la fórmula control, independientemente del modo de nacimiento: para parto vaginal: 4,93 frente a 5,59  $p < 0,001$  (10 días) y 5,01 frente a 5,71  $p < 0,001$  (4 semanas), para los nacidos por cesárea 5,14 frente a 5,65  $p = 0,009$  (10 días), 5,06 frente a 5,75  $p < 0,001$  (4 semanas) A los 3 meses, este efecto de acidificación solo persistía entre los bebés 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 nacimiento, pero corrige más explícitamente desde el nacimiento el bajo nivel de *Bifidobacterium* encontrado en los bebés nacidos por cesárea. La FI suplementada disminuyó el pH fecal y mejoró la microbiota fecal tanto en los bebés nacidos por parto normal como por cesárea.

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

En la población de 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 de control en los bebés nacidos por cesárea (cuadrados en la Figura 6). Después, a los 28 días, la mediana [intervalo] del log de recuentos de bifidobacterias fueron de 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 de control, respectivamente (prueba no paramétrica de Wilcoxon,  $p = 0,001$ ). A los 84 días, la mediana [intervalo] del log de recuentos de bifidobacterias fueron de 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 de control, respectivamente (prueba no paramétrica de Wilcoxon,  $p < 0,001$ ).

Entre los bebés nacidos por parto vaginal (triángulos en la figura 6), el grupo de fórmula de prueba también había aumentado significativamente los recuentos de *Bifidobacterium* a los 28 días y 84 días en comparación con el grupo de fórmula de control. A los 28 días, la mediana [intervalo] del log de los recuentos de bifidobacterias fueron de 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 de control, respectivamente (prueba no paramétrica de Wilcoxon,  $p < 0,001$ ). A los 84 días, la mediana [intervalo] del log de los recuentos de bifidobacterias fueron de 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 de 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 de control entre los bebés con ambos modos de nacimiento (datos no mostrados). 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 entre los bebés nacidos por parto vaginal (datos no mostrados).

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

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición nutritiva para bebés o niños pequeños que comprende un probiótico de *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* para su uso en el estímulo o la inducción de una microbiota intestinal que esté más cercana a la microbiota de bebés alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota de bebés alimentados predominantemente con una composición nutritiva convencional que no comprende dicho probiótico, en bebés o niños pequeños de entre 0 y 36 meses, opcionalmente de entre 0 y 12 meses de edad,
- 10 caracterizada por que dicho "estímulo o inducción de una microbiota intestinal que está más cercana a la microbiota de bebés alimentados exclusivamente con leche materna humana" se caracteriza además por estimular o inducir una microflora intestinal que tiene una distancia filogenética con la microbiota de bebés alimentados por lactancia materna de menos de 0,3 unidades (medido por el método Unifrac), preferentemente de menos de 0,25 unidades, caracterizada por que dicho *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* probiótica es CNCM I-3446.
- 15 2. La composición para el uso de reivindicación 1, caracterizada por que dicha composición comprende al menos un oligosacárido N-acetilado y/o al menos un galactooligosacárido, y/o al menos un oligosacárido sialilado, opcionalmente en la siguiente cantidad:
- 20 - Oligosacáridos N-acetilados entre el 0,001 y el 1 % en peso, preferentemente entre el 0,003 % en peso y el 0,3 % en peso  
 - Galactooligosacáridos entre el 1 y el 10 % en peso, preferentemente entre el 3 y el 6 % en peso  
 - Oligosacáridos sialilados entre el 0,005 y el 1 % en peso, preferentemente entre el 0,01 y el 0,4 % en peso
- 25 todos calculados como % en peso de la composición.
- 30 3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que dichos bebés nacen con una microbiota vulnerable o desequilibrada, o disbiosis de la microbiota, tales como bebés prematuros, bebés nacidos pequeños para la edad gestacional, bebés nacidos por operación cesárea, bebés hospitalizados o bebés tratados o que se hayan tratado con antibióticos.
- 35 4. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dichos bebés tienen de 0 a 6 meses.
- 40 5. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha composición comprende oligofruktosa, preferentemente dicho al menos 90 %, 99 % o 100 % de dicha oligofruktosa tiene un grado de polimerización de entre 2 y 8.
- 45 6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha composición comprende grasa y al menos el 8 %, preferentemente al menos el 9,6 % de dicha grasa es palmitato sn2.
- 50 7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha composición comprende triglicéridos que tienen más del 33 % del ácido palmítico en la posición sn2.
- 55 8. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha composición es una fórmula infantil o una fórmula de continuación.
- 60 9. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha composición comprende proteínas alfa-lactoalbúmina en una cantidad de al menos 0,3 g/418 kJ (100 kcal) o 2,3 g/l de la composición.
- 65 10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho estímulo o inducción de una microbiota intestinal que esté más cercana a la de bebés alimentados exclusivamente con leche materna humana se caracteriza además por que comprende una regulación al alza de la población de *B. animalis* y/o *Bifidobacterium*, y/o *B. Longum* y/o *Lactobacillus*, y/o una regulación a la baja de las poblaciones de *Coprobacillus* y/o *Streptococcus*.
11. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho estímulo y/o inducción de una microbiota intestinal que esté más cercana a la de bebés alimentados exclusivamente con leche materna humana es medible en heces de bebés, opcionalmente, medible a las 1, 4, 6 u 8 semanas de edad, o después, y opcionalmente después de 1, 4, 6 u 8 semanas de alimentación con dicha composición nutritiva.
12. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha composición se administra o se pretende administrar durante las primeras 1, 2 4, 8 o 12 semanas de vida.
13. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho estímulo y/o inducción de una microbiota intestinal que esté más cercana a la de bebés alimentados exclusivamente con leche

materna humana se caracteriza además por estimular y/o inducir un crecimiento sano, un sistema inmunitario sano y/o una función intestinal sana, especialmente más tarde en la vida.

- 5 14. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho probiótico está presente en dicha composición 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.

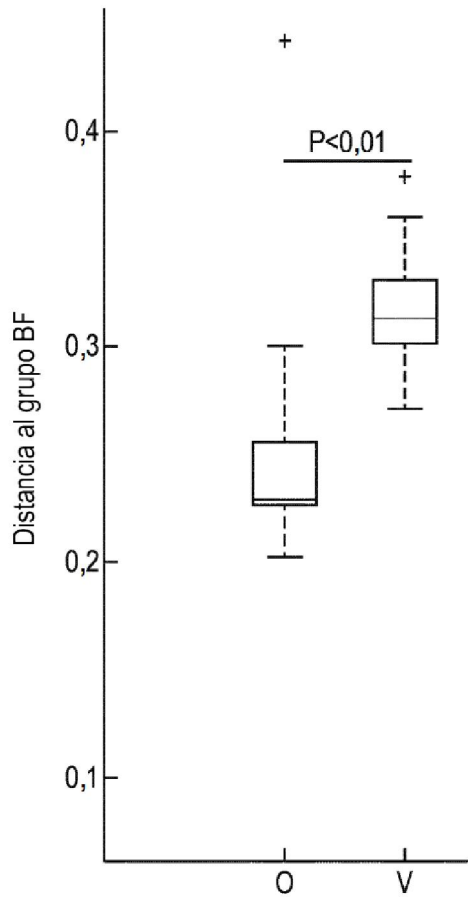


FIG. 1

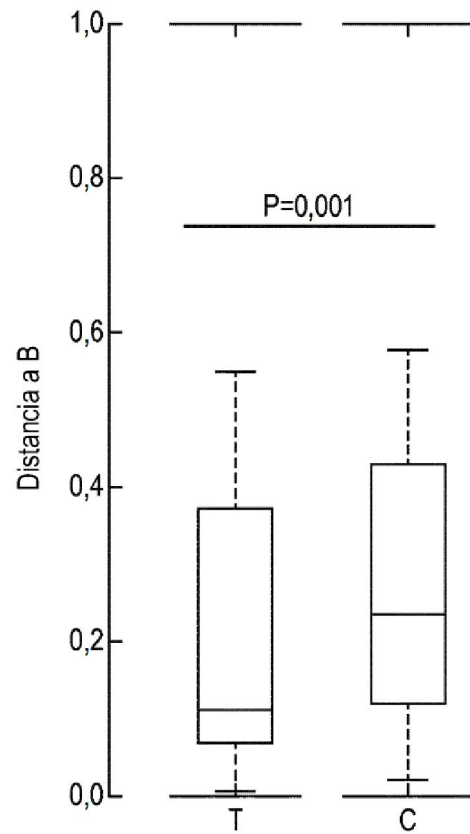


FIG. 2

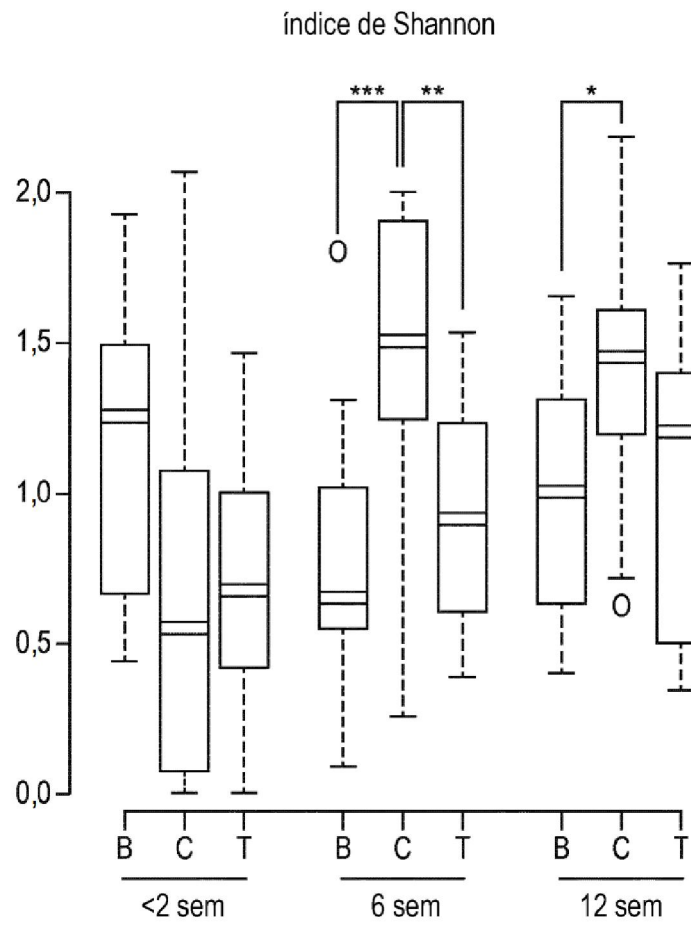


FIG. 3

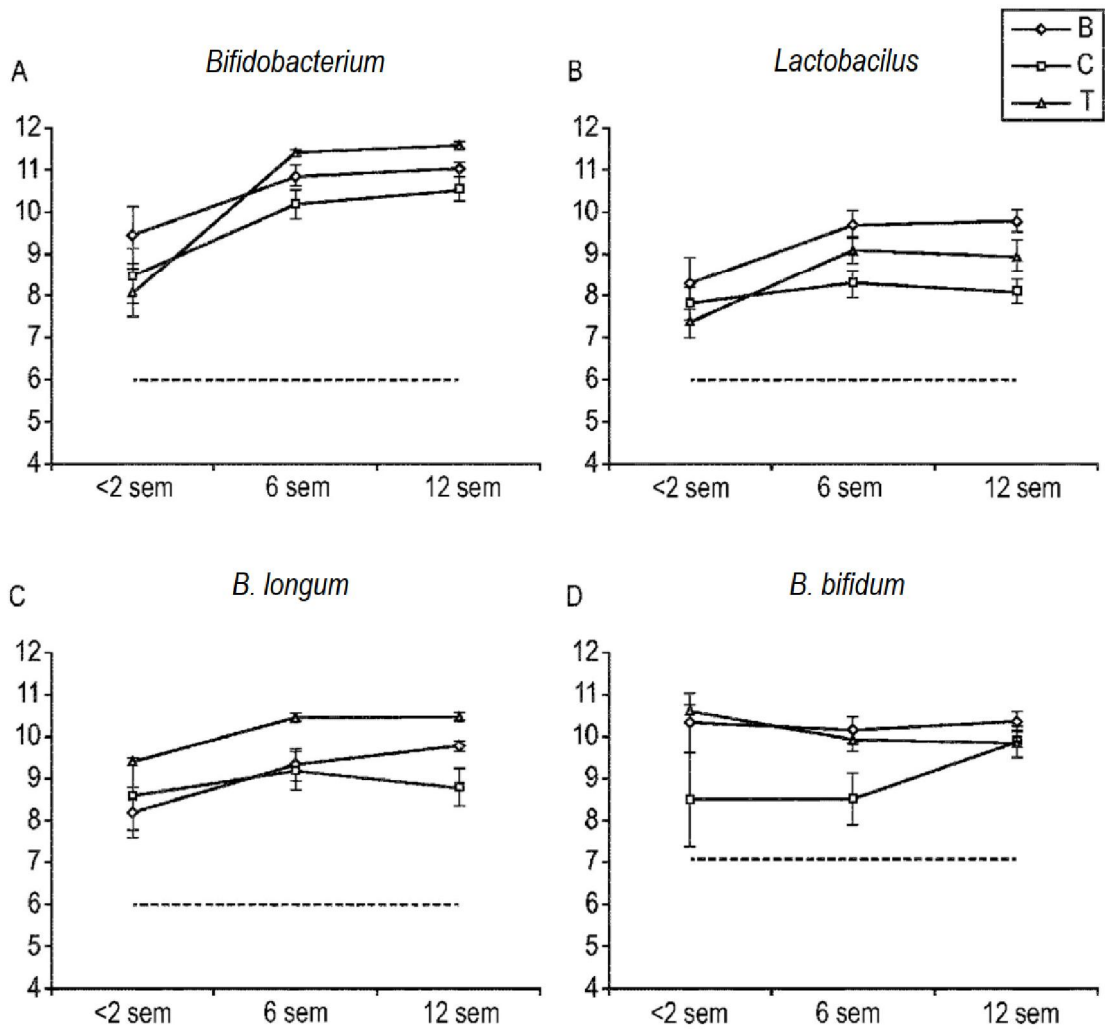


FIG. 4

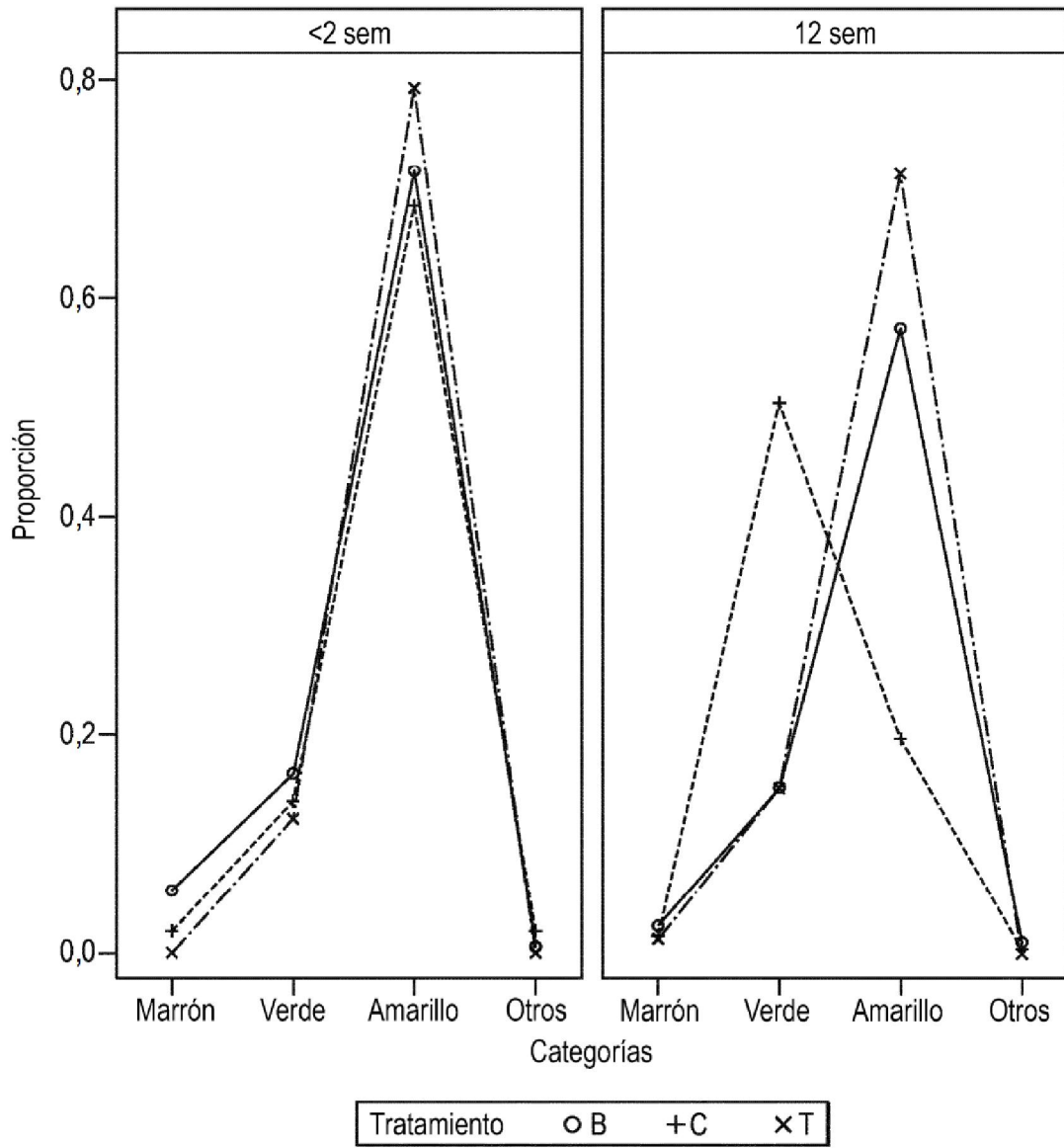


FIG. 5

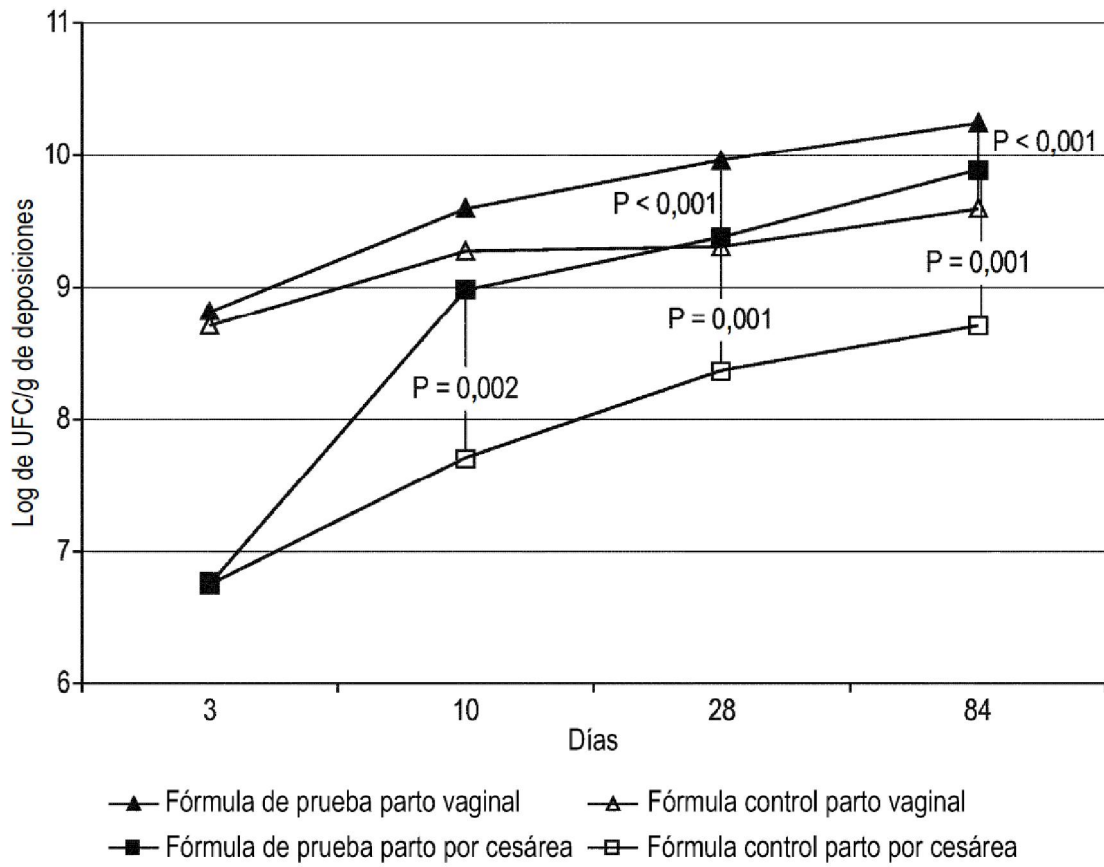


FIG. 6