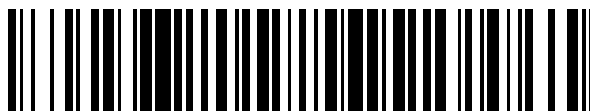


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 200**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A23L 1/308 (2006.01)

A23L 1/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2012** **E 12707135 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014** **EP 2672844**

54 Título: **Modulación del crecimiento de las bifidobacterias mediante una combinación de oligosacáridos de la leche humana**

30 Prioridad:

10.02.2011 US 201161441451 P

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

21.01.2015

73 Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

FRANTZ, DAVID CURTIS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 527 200 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

Modulación del crecimiento de las bifidobacterias mediante una combinación de oligosacáridos de la leche humana

5 **Antecedentes de la presente invención**

La presente invención se refiere a formulaciones prebióticas que contienen oligosacáridos para la nutrición humana, p.ej. para la nutrición infantil, los cuales modulan el crecimiento de las bifidobacterias.

10 Las formulaciones prebióticas proporcionan nutrientes para bacterias beneficiosas como son las diversas especies de bifidobacterias que pueblan los intestinos de un animal huésped tal como un mamífero, por ejemplo un humano. Estas poblaciones de bacterias ayudan a eliminar las bacterias nocivas de los intestinos y también pueden digerir algunos compuestos que el huésped es incapaz de digerir. Por consiguiente las formulaciones prebióticas benefician al huésped promoviendo el crecimiento de las bifidobacterias en sus intestinos.

15 Según Wang, y otros, Am. J. Clin. Nutr., 74(4), 510 (2001), la fórmula infantil tradicional contiene cantidades mucho menores de ácido siálico en oligosacáridos que la leche humana. Además el nivel de ácido siálico en la saliva de los niños prematuros alimentados con leche humana es el doble del de los niños alimentados con fórmulas infantiles comerciales, según Wang, y otros, J. Pediatr., 138, 914-6 (2001).

20 La patente EP1255449 describe formulaciones nutricionales que contienen oligosacáridos. Según la patente EP1255449 los oligosacáridos, especialmente la oligofructosa y las sialil-lactosas, pueden atravesar el intestino humano sin ser digeridos y son fermentados por un número limitado de microorganismos, incluyendo bifidobacterias y lactobacilos. Las sialil-lactosas, especialmente la 3'- y la 6'-sialil-lactosa, se encuentran en la leche humana y se cree que inhiben la fijación de bacterias patógenas en humanos. Esta patente describe el uso de una combinación de oligofructosa y 3'- y/o 6'-sialil-lactosa en una fórmula nutricional.

25 La patente WO 2004/093557 describe una fórmula infantil que contiene una fuente de ácido siálico tal como sialil-lactosa.

30 La patente WO 2004/112509 describe una composición nutricional para inducir una buena maduración de barrera en niños recién nacidos. Dicha composición incluye un microorganismo y oligosacáridos no digeribles, que pueden ser sialo-oligosacáridos.

35 La patente WO 2007/114696 describe el uso de oligosacáridos ovinos para estimular el sistema inmune, tales como 3- o 6-sialil-lactosa.

La patente 2009/059996 describe una composición nutricional para prevenir infecciones secundarias, que contiene 3'- o 6'-sialil-lactosa.

40 La patente US nº 5,260,280 describe un método de neutralización de enterotoxinas bacterianas que consiste en administrar a un paciente humano una cantidad efectiva de sialil-lactosa aislada.

Resumen de la presente invención

45 La presente invención proporciona una formulación prebiótica para administración oral a humanos, que contiene 2'-fucosil-lactosa, 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa. La formulación modula el crecimiento de especies de bifidobacterias en los intestinos humanos. La formulación puede ser una fórmula infantil.

50 La presente invención también proporciona un método para modular o estimular el crecimiento de bifidobacterias, por ejemplo de las especies *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium infantis*.

Descripción breve de los gráficos

55 La fig. 1 muestra las curvas de crecimiento de *Bifidobacterium bifidum* en el medio de control y en el medio que contiene 2'-fucosil-lactosa.

La fig. 2 muestra el ABC de las curvas de la fig. 1.

La fig. 3 muestra las curvas de crecimiento de *Bifidobacterium infantis* en el medio de control y en el medio que contiene 2'-fucosil-lactosa.

60 La fig. 4 muestra el ABC de las curvas de la fig. 3.

La fig. 5 muestra las curvas de crecimiento de *Bifidobacterium infantis* en el medio de control y en el medio que contiene 6'-sialil-lactosa.

La fig. 6 muestra las curvas de crecimiento de *Bifidobacterium breve* en el medio de control y en el medio que contiene 3'-sialil-lactosa.

65 La fig. 7 muestra las curvas de crecimiento de *Bifidobacterium infantis* en el medio de control y en el medio que contiene 3'-sialil-lactosa.

Descripción detallada de la presente invención

La presente invención proporciona una formulación nutricional que comprende una combinación de oligosacáridos estimuladora del crecimiento de más especies de bifidobacterias que un solo oligosacárido. La combinación de oligosacáridos de la presente invención contribuye a que florezca un espectro más amplio de bacterias intestinales beneficiosas, aportando una población de bifidobacterias más variada y naturalmente equilibrada en los intestinos de un sujeto humano que tome la formulación.

La formulación de la presente invención es un alimento o suplemento alimenticio típico de ingestión oral, por ejemplo una formulación líquida para beber. En una forma de ejecución la formulación es una fórmula infantil o un sucedáneo de leche que un niño puede beber de manera convencional.

En una forma de ejecución de la presente invención la formulación es un líquido que contiene al menos 0,1 mg/ml de 2'-fucosil-lactosa, al menos 0,1 mg/ml de 6'-sialil-lactosa y al menos 0,1 mg/ml de 3'-sialil-lactosa. En una forma de ejecución de la presente invención la formulación es un líquido que contiene 0,1-10 mg/ml de 2'-fucosil-lactosa, 0,1-10 mg/ml de 6'-sialil-lactosa y 0,1-20 mg/ml de 3'-sialil-lactosa. En otra forma de ejecución la formulación es un líquido que contiene 0,5-2 mg/ml de 2'-fucosil-lactosa, 0,5-2 mg/ml de 6'-sialil-lactosa y 1-4 mg/ml de 3'-sialil-lactosa. En otra forma de ejecución la formulación es un líquido que contiene 1 mg/ml de 2'-fucosil-lactosa, 1 mg/ml de 6'-sialil-lactosa y 2 mg/ml de 3'-sialil-lactosa.

En una forma de ejecución de la presente invención la formulación contiene 2'-fucosil-lactosa, 6'-sialil-lactosa y 3'-sialil-lactosa según una relación ponderal de 0,5-2,0 a 0,5-2,0 a 1,0-4,0, respectivamente. La proporción en peso de 3'-sialil-lactosa es al menos tan grande como la de 2'-fucosil-lactosa. En otra forma de ejecución de la presente invención la formulación contiene 2'-fucosil-lactosa, 6'-sialil-lactosa y 3'-sialil-lactosa según una relación ponderal de 0,9-1,1 a 0,9-1,1 a 1,8-2,2, respectivamente.

En una forma de ejecución de la presente invención la formulación es un polvo seco. Una formulación seca en polvo según la presente invención es como la formulación líquida de la misma, pero que ha sido secada para eliminar el agua. La formulación seca en polvo se puede reconstituir añadiendo agua para formar la formulación líquida de la presente invención. En una forma de ejecución de la presente invención la formulación seca en polvo contiene al menos 0,4% e.p. de 2'-fucosil-lactosa, al menos 0,4% e.p. de 6'-sialil-lactosa y al menos 0,8% e.p. de 3'-sialil-lactosa respecto al peso total de la formulación seca. En una forma de ejecución de la presente invención la formulación seca en polvo contiene 0,4-1,5% e.p. de 2'-fucosil-lactosa, 0,4-1,5% e.p. de 6'-sialil-lactosa y 0,8-3,0% e.p. de 3'-sialil-lactosa respecto al peso total de la formulación seca. En una forma de ejecución de la presente invención la formulación seca en polvo contiene 0,7-0,9% e.p. de 2'-fucosil-lactosa, 0,7-0,9% e.p. de 6'-sialil-lactosa y 1,4-1,7% e.p. de 3'-sialil-lactosa respecto al peso total de la formulación seca. Por tanto estos tres oligosacáridos constituyen el 1,6-6,0% del peso del polvo seco. Los porcentajes en peso señalados en este párrafo son los mismos para cualquier formulación líquida de la presente invención, siempre que el porcentaje en peso se calcule sobre la base de todos los ingredientes excepto el agua (indicado de aquí en adelante como "peso seco").

La formulación de la presente invención también puede estar en forma de un concentrado líquido que comprenda los mismos ingredientes en las mismas proporciones que la formulación líquida antedicha, pero con menor cantidad de agua y por tanto mayor concentración de los demás ingredientes. El porcentaje de oligosacáridos respecto al peso seco será el mismo que para cualquier otra formulación de la presente invención. Este concentrado líquido se puede combinar con una cantidad apropiada de agua para formar la formulación líquida antedicha. Los especialistas en la materia entenderán fácilmente cómo hacer un concentrado líquido de tal tipo y cómo determinar cuánta agua hay que añadirle sin excesiva experimentación.

Tal como se usa aquí, el término "fórmula infantil" se refiere a una formulación nutricional (en forma líquida o de polvo seco reconstituible mediante adición de agua para preparar una fórmula infantil líquida) que proporciona una nutrición completa para un niño y se puede utilizar como sustituto de la leche humana en la alimentación infantil. Estas fórmulas son bien conocidas en el estado técnico.

Normalmente una fórmula infantil en forma líquida lista para el consumo proporciona 60-70 Kcal/100 ml. La fórmula infantil contiene típicamente por 100 Kcal: 1,8-4,5 g de proteína, 3,3-6,0 g de grasa (lípidos), 300-1200 mg de ácido linoleico, 9-14 g de carbohidratos escogidos del grupo formado por lactosa, sacarosa, glucosa, jarabe de glucosa, almidón, malto-dextrinas y maltosa, y combinaciones de ellos, más vitaminas y minerales esenciales. La lactosa puede ser el carbohidrato predominante en una fórmula infantil. Una fórmula infantil líquida puede contener unas 67 Kcal/100 ml. La fórmula infantil puede contener aproximadamente 1,8-3,3 g de proteína por 100 Kcal, por ejemplo unos 1,8-1,1 g de proteína por 100 Kcal.

Una fórmula infantil también puede llevar nucleótidos seleccionados entre citidina 5'-monofosfato (CMP), uridina 5'-monofosfato (UMP), adenosina 5'-monofosfato (AMP), guanosina 5'-monofosfato (GMP) e inosina 5'-monofosfato (IMP), y mezclas de ellos. La fórmula infantil también puede contener luteína, zeaxantina, fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, sialil-lactosa y/o fucosil-lactosa. En una fórmula infantil se pueden incluir ácidos grasos

poliinsaturados de cadena larga tales como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (AA). La fórmula infantil también puede incluir aminoácidos y otros ingredientes bien conocidos en el estado técnico.

La finalidad de una fórmula infantil consiste en proporcionar al niño toda la energía y nutrición que necesita, que de otro modo podría recibir con la leche humana de su madre. Sin embargo la leche humana tiene una composición muy compleja y la fórmula infantil no puede reproducirla exactamente. Los especialistas en la materia han trabajado durante muchos años para hacer que la fórmula infantil sea más parecida a la leche humana y para elaborar una fórmula infantil que proporcione al niño la mayor parte posible de los beneficios de la leche humana.

Una práctica común consiste en elaborar una fórmula infantil partiendo de leche bovina, pues la mayoría de los nutrientes que necesita el niño se hallan en la leche bovina. No obstante la leche bovina tiene una composición que difiere bastante de la humana. Por ejemplo, la leche bovina tiene un contenido proteico con una relación suero a caseína de 20:80 aproximadamente, mientras que en la leche humana dicha relación es de 60:40 aproximadamente. Además la leche bovina tiene mucha menos alfa-lactoalbúmina (una proteína sérica) que la leche humana y la mayor parte del contenido de la caseína bovina es beta-lactoglobulina, que no se halla en cantidades importantes en la leche humana. Por estas y otras diferencias los especialistas han desarrollado métodos para modificar la leche bovina, por ejemplo preparando una fracción de suero de leche bovina enriquecida con alfa-lactoalbúmina que se pueda usar en fórmulas infantiles, a fin de que su composición tenga un perfil proteico más parecido al de la leche humana. Estos métodos son bien conocidos del estado técnico. La patente U.S. nº 6,913,778, por ejemplo, describe una fórmula infantil hecha por combinación de una fracción de suero de leche enriquecida en alfa-lactoalbúmina con una fracción de leche bovina descremada. Esta patente también describe una fórmula infantil con menor contenido proteico. La leche bovina contiene aproximadamente 15-16 g/l de proteína, pero la leche humana solo unos 11 g/l.

Las formulaciones nutricionales distintas de las fórmulas infantiles también son bien conocidas en el estado técnico. Por ejemplo, hay formulaciones diseñadas para un niño o un adulto con el fin de proporcionar una nutrición completa o complementar la dieta del consumidor infantil o adulto. Los especialistas en la materia han trabajado para que estas formulaciones tengan el mayor beneficio posible para los consumidores.

Los oligosacáridos 2'-fucosil-lactosa, 6'-sialil-lactosa y 3'-sialil-lactosa son compuestos muy conocidos y asequibles comercialmente.

Se ha visto que la 2'-fucosil-lactosa estimula el crecimiento de las especies *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium infantis*, aunque puede inhibir el crecimiento de *Bifidobacterium breve*, mientras que la 6'-sialil-lactosa estimula el crecimiento de *Bifidobacterium infantis* y la 3'-sialil-lactosa el crecimiento de *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium infantis*. Se ha descubierto que el uso combinado de estos tres oligosacáridos en las cantidades y relaciones aquí descritas tiene un efecto beneficioso en el crecimiento de estas tres bifidobacterias en los intestinos humanos. Por lo tanto la presente invención promueve un balance saludable de bacterias en el intestino del consumidor.

La formulación de la presente invención, ya sea en forma de producto líquido, concentrado líquido o seco en polvo, se puede preparar por métodos corrientes de combinación de ingredientes de una formulación, los cuales son todos conocidos del estado técnico. Los especialistas en la materia comprenderán fácilmente cómo preparar la formulación o podrán determinar cómo hacerla sin excesiva experimentación.

En el método de la presente invención se administra oralmente a un humano una formulación nutricional líquida de la presente invención para modular el crecimiento de bifidobacterias como, por ejemplo, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium infantis*.

Los siguientes ejemplos se aportan para ilustrar algunas formas de ejecución de la presente invención, pero no deben interpretarse como limitadores de su alcance.

Ejemplo 1: efecto de la 2'-fucosil-lactosa, 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa en el crecimiento de las especies *Bifidobacterium Infantis* ATCC 15697, *Bifidobacterium Breve* ATCC 15700 y *Bifidobacterium Bifidum* ATCC 29521

Para cultivar las bifidobacterias se usó medio reforzado de clostridios (RCM). Como medio de control se utilizó RCM sin glucosa. El RCM es un medio muy conocido para cultivar y contar anaerobios, que fue formulado por primera vez por Hirsch y Grinstead, J. Dairy Res., 21:101 (1954).

Los ingredientes del ensayo fueron la 2'-fucosil-lactosa, 6'-sialil-lactosa y 3'-sialil-lactosa disueltas en el medio de control a las siguientes concentraciones: 1 mg/ml de 2'-fucosil-lactosa, 1 mg/ml de 6'-sialil-lactosa y 1 mg/ml de 3'-sialil-lactosa.

Las bifidobacterias se cultivaron anaeróbicamente en RCM por separado durante la noche y luego se midieron y se diluyeron hasta una densidad óptica de 0,1 determinada por espectroscopia de absorbancia a 595 nm, y después se diluyeron diez veces más para disponer de un patrón de trabajo, del cual se añadieron 50 µl a cada pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía 200 µl de medio de control (48 pocillos) o 200 µl de solución de ingredientes de

ensayo (48 pocillos). La placa se cultivó anaeróbicamente durante 30 horas y la densidad óptica a 595 nm de abs cada 15 minutos. Los valores de pocillos análogos se promediaron y se representaron gráficamente frente al tiempo (figs. 1, 3 y 5-7), y el área bajo la curva (ABC) se calculó para un periodo de 30 horas (figs. 2 y 4).

5 A. 2'-Fucosil-lactosa y *Bifidobacterium Bifidum*

Se promediaron los valores de dos ensayos. Después de cultivar la bacteria durante 8 horas según el procedimiento anterior, el crecimiento fue significativamente mayor en los pocillos que contenían el ingrediente de ensayo y el ABC fue aproximadamente un 25,1% superior para el ingrediente de ensayo, tal como se muestra en las figs. 1 y 2.

10

B. 2'-Fucosil-lactosa y *Bifidobacterium Infantis*

Tras cultivar la bacteria durante 8 horas según el procedimiento anterior, el crecimiento fue significativamente mayor en los pocillos que contenían el ingrediente de ensayo y el ABC fue aproximadamente un 30,5% superior para el ingrediente de ensayo, tal como se muestra en las figs. 3 y 4.

15

C. 6'-Sialil-lactosa y *Bifidobacterium Infantis*

Tras cultivar la bacteria durante 12 horas según el procedimiento anterior, el crecimiento fue significativamente mayor en los pocillos que contenían el ingrediente de ensayo, tal como se muestra en la fig. 5.

20

D. 3'-Sialil-lactosa y *Bifidobacterium Breve*

Tras cultivar la bacteria durante 6 horas según el procedimiento anterior, el crecimiento fue significativamente mayor en los pocillos que contenían el ingrediente de ensayo, tal como se muestra en la fig. 6.

25

E. 3'-Sialil-lactosa y *Bifidobacterium Infantis*

Tras cultivar la bacteria durante 8 horas según el procedimiento anterior, el crecimiento fue significativamente mayor en los pocillos que contenían el ingrediente de ensayo, tal como se muestra en la fig. 7.

30

Ejemplo 2:

A continuación se describe una fórmula líquida prebiótica según la presente invención que puede ser adecuada para la alimentación infantil:

35

Ingrediente	Peso por 100 ml	Ingrediente	Peso por 100 ml
Proteína	1,4 g	Niacina	0,75 mg
Carbohidrato	7 g	Folato	16 µg
Grasa	3,5 g	Biotina	3 µg
2'-Fucosil-lactosa	0,10 g	Ácido pantoténico	0,5 mg
6'-Sialil-lactosa	0,10 g	Calcio	63 mg
3'-Sialil-lactosa	0,20 g	Fósforo	36 mg
Vitamina A	1 mg	Magnesio	6,7 mg
Vitamina C	13 mg	Hierro	1 mg
Vitamina D	1,6 µg	Cinc	0,9 mg
Vitamina E	1 mg	Manganeso	7,5 µg
Vitamina K	10 µg	Cobre	50 µg
Vitamina B1	0,15 mg	Yodo	15 µg
Vitamina B2	0,16 mg	Sodio	24 mg
Vitamina B6	80 µg	Potasio	97 mg
Vitamina B12	0,2 µg	Cloruro	65 mg
CMP	1,9 mg	Selenio	2 µg
UMP	0,75 mg	Colina	15 mg
AMP	0,6 mg	Inositol	6,7 mg
GMP	0,3 mg	Taurina	7 mg
IMP	0,3 mg	Luteína	12 µg
DHA	11 mg	Agua	c.s.
Ácido araquidónico	18 mg		

La proteína utilizada en este ejemplo de formulación procede de leche y suero de bovino, siendo el 60-65% proteína sérica y el 35-40% proteína caseínica. En esta formulación se ha usado una fracción de suero con mayor contenido de alfa-lactoalbúmina, a fin de proporcionar un contenido proteico de unos 0,2 g de alfa-lactoalbúmina por 100 ml de formulación.

40

Ejemplo 3:

A continuación se describe una fórmula líquida prebiótica según la presente invención que puede ser adecuada para la alimentación infantil:

5

Ingrediente	Peso por 100 ml	Ingrediente	Peso por 100 ml
Proteína	1,3 g	Niacina	0,75 mg
Carbohidrato	7,3 g	Folato	16 µg
Grasa	3,6 g	Biotina	3 µg
2'-Fucosil-lactosa	0,11 g	Ácido pantoténico	0,5 mg
6'-Sialil-lactosa	0,11 g	Calcio	63 mg
3'-Sialil-lactosa	0,22 g	Fósforo	36 mg
Vitamina A	0,9 mg	Magnesio	6,7 mg
Vitamina C	10 mg	Hierro	1 mg
Vitamina D	1,2 µg	Cinc	0,9 mg
Vitamina E	1 mg	Manganeso	7,5 µg
Vitamina K	10 µg	Cobre	50 µg
Vitamina B1	0,15 mg	Yodo	15 µg
Vitamina B2	0,16 mg	Sodio	24 mg
Vitamina B6	80 µg	Potasio	97 mg
Vitamina B12	0,2 µg	Cloruro	65 mg
DHA	12 mg	Selenio	2 µg
Ácido araquidónico	18 mg	Luteína	12 µg
Colina	15 mg	Agua	c.s.
Inositol	6,7 mg		
Taurina	7 mg		

La proteína utilizada en este ejemplo de formulación procede de leche y suero de bovino, siendo el 60-65% proteína sérica y el 35-40% proteína caseínica. En esta formulación se ha usado una fracción de suero con mayor contenido de alfa-lactoalbúmina, a fin de proporcionar un contenido proteico de unos 0,2 g de alfa-lactoalbúmina por 100 ml de formulación.

10

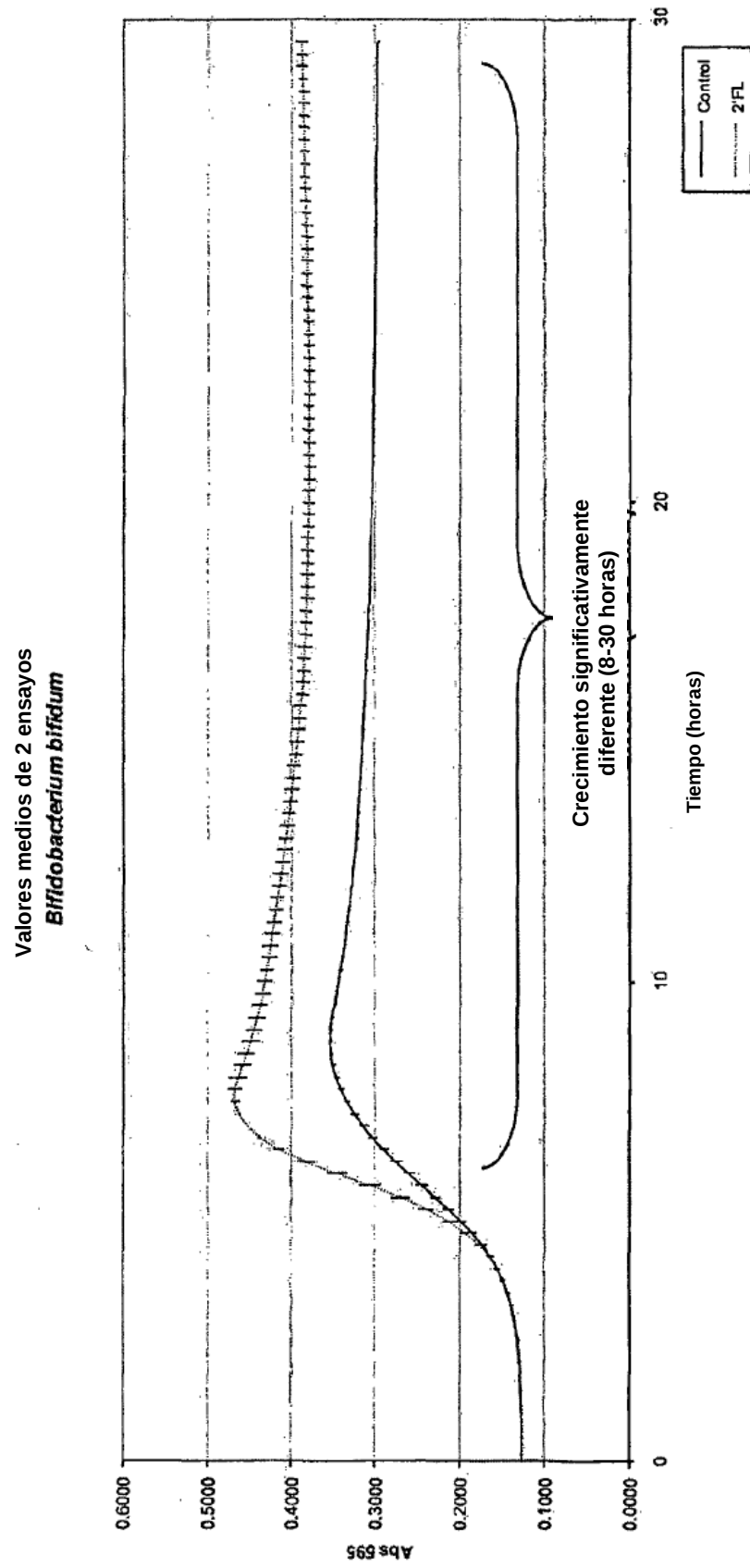
A los especialistas en la materia se les ocurrirán muchas variaciones de la presente invención no ilustradas aquí. La presente invención no se limita a las formas de ejecución ilustradas y descritas aquí, pero abarca todo el contenido comprendido dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n prebi3tica para administraci3n oral a un humano, que lleva 2'-fucosil-lactosa, 6'-sialil-lactosa y 3'-sialil-lactosa y en la cual la proporci3n en peso de 3'-sialil-lactosa es, como m3nimo, igual a la de 2'-fucosil-lactosa.
2. La formulaci3n de la reivindicaci3n 1, en la cual la 2'-fucosil-lactosa, la 6'-sialil-lactosa y la 3'-sialil-lactosa constituyen el 1,6-6,0% del peso seco de la formulaci3n.
3. La formulaci3n de la reivindicaci3n 1 o 2, que contiene 2'-fucosil-lactosa, 6'-sialil-lactosa y 3'-sialil-lactosa en una relaci3n ponderal de 0,5-2,0 a 0,5-2,0 a 1,0-4,0, respectivamente.
4. La formulaci3n de la reivindicaci3n 3, en la cual la relaci3n ponderal es de 0,9-1,1 a 0,9-1,1 a 1,8-2,2, respectivamente.
5. La formulaci3n de la reivindicaci3n 1, que comprende una f3rmula infantil.
6. La f3rmula infantil de la reivindicaci3n 5, la cual es una composici3n l3quida que contiene 0,1-10 mg/ml de 2'-fucosil-lactosa, 0,1-10 mg/ml de 6'-sialil-lactosa y 0,1-20 mg/ml de 3'-sialil-lactosa.
7. La f3rmula infantil de la reivindicaci3n 5, la cual es una composici3n l3quida que contiene 0,5-2 mg/ml de 2'-fucosil-lactosa, 0,5-2 mg/ml de 6'-sialil-lactosa y 1-4 mg/ml de 3'-sialil-lactosa.
8. La f3rmula infantil de la reivindicaci3n 5, la cual es una composici3n l3quida que contiene 1 mg/ml de 2'-fucosil-lactosa, 1 mg/ml de 6'-sialil-lactosa y 2 mg/ml de 3'-sialil-lactosa.
9. La f3rmula infantil de la reivindicaci3n 5, la cual es una composici3n seca en polvo que contiene 0,4-1,5% e.p. de 2'-fucosil-lactosa, 0,4-1,5% e.p. de 6'-sialil-lactosa y 0,8-3,0% e.p. de 3'-sialil-lactosa.
10. La f3rmula infantil de la reivindicaci3n 9, la cual contiene 0,7-0,9% e.p. de 2'-fucosil-lactosa, 0,7-0,9% e.p. de 6'-sialil-lactosa y 1,4-1,7% e.p. de 3'-sialil-lactosa.
11. M3todo para modular o estimular el crecimiento de b3fidobacterias en los intestinos humanos, que comprende la administraci3n oral a un humano de la formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

FIG. 1: Ensayo con 2'-fucosil-lactosa - curva de crecimiento -- *Bifidobacterium bifidum*



Modelo fijo lineal $p=0.0024$

FIG. 2: 2'-fucosil-lactosa ABC (0-30 Hrs) – *Bifidobacterium bifidum*

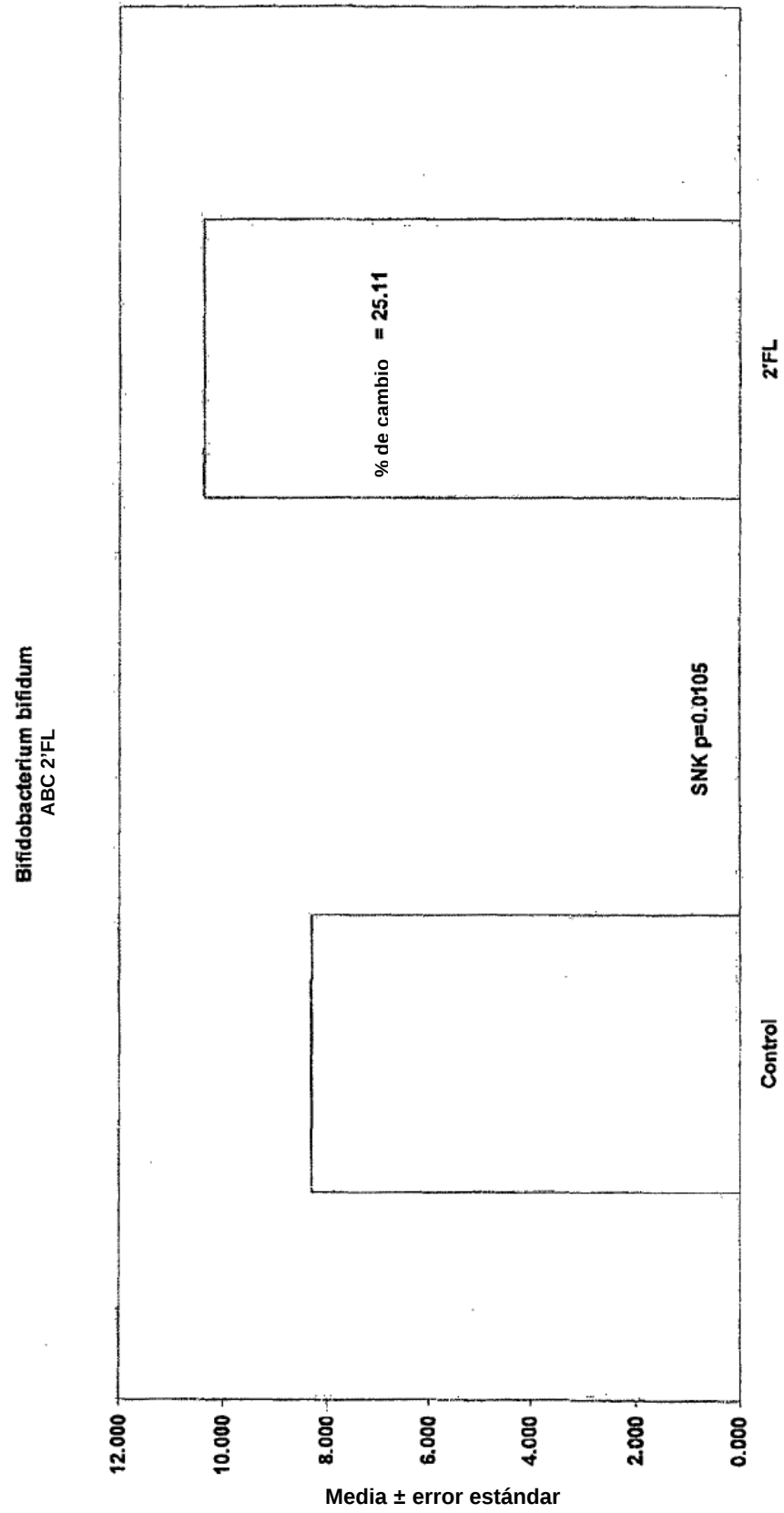


FIG. 3: Ensayo con 2'-fucosil-lactosa - curva de crecimiento - *Bifidobacterium infantis*

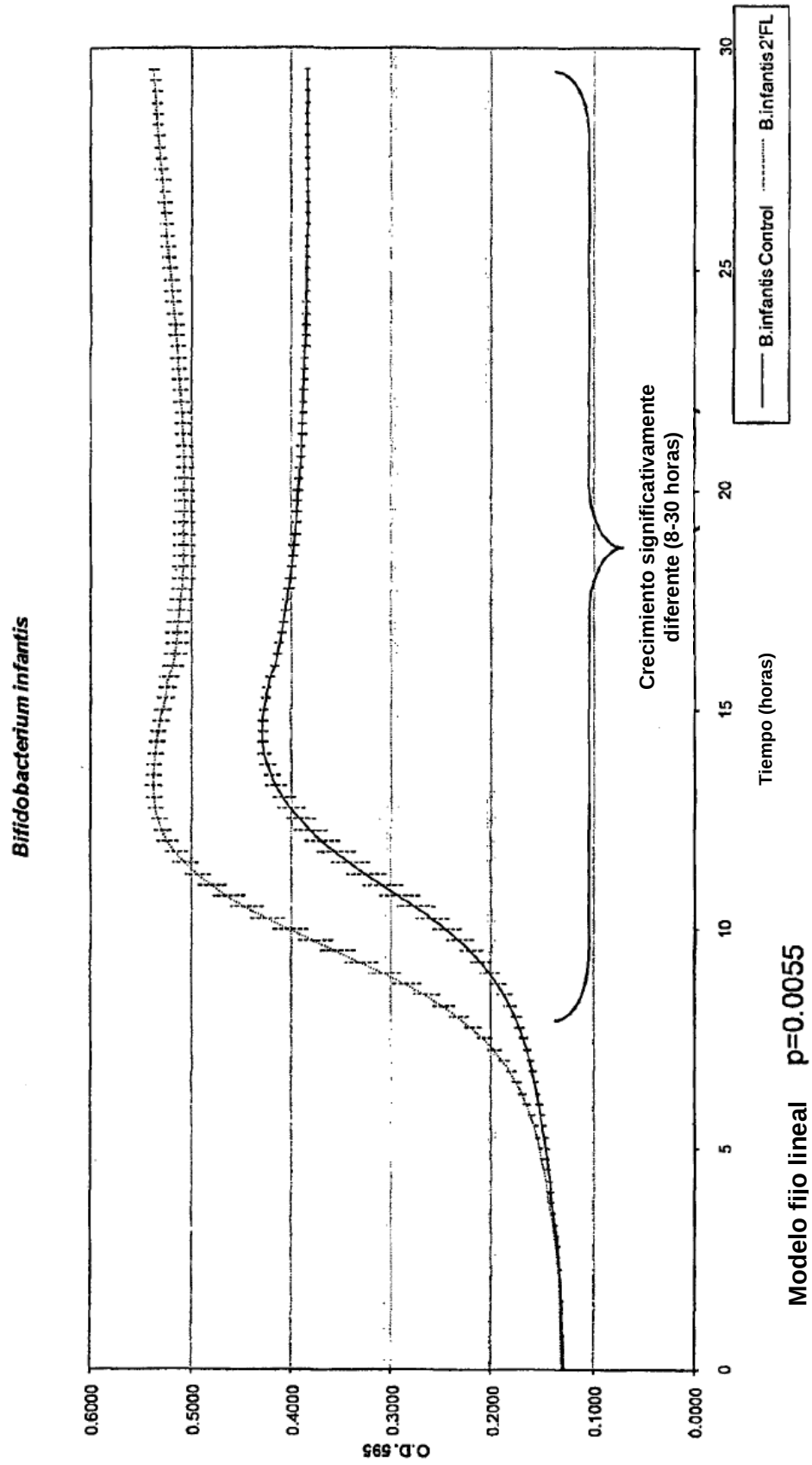


FIG. 4: 2'-fucosil-lactosa ABC (0-30 Hrs) – *Bifidobacterium infantis*

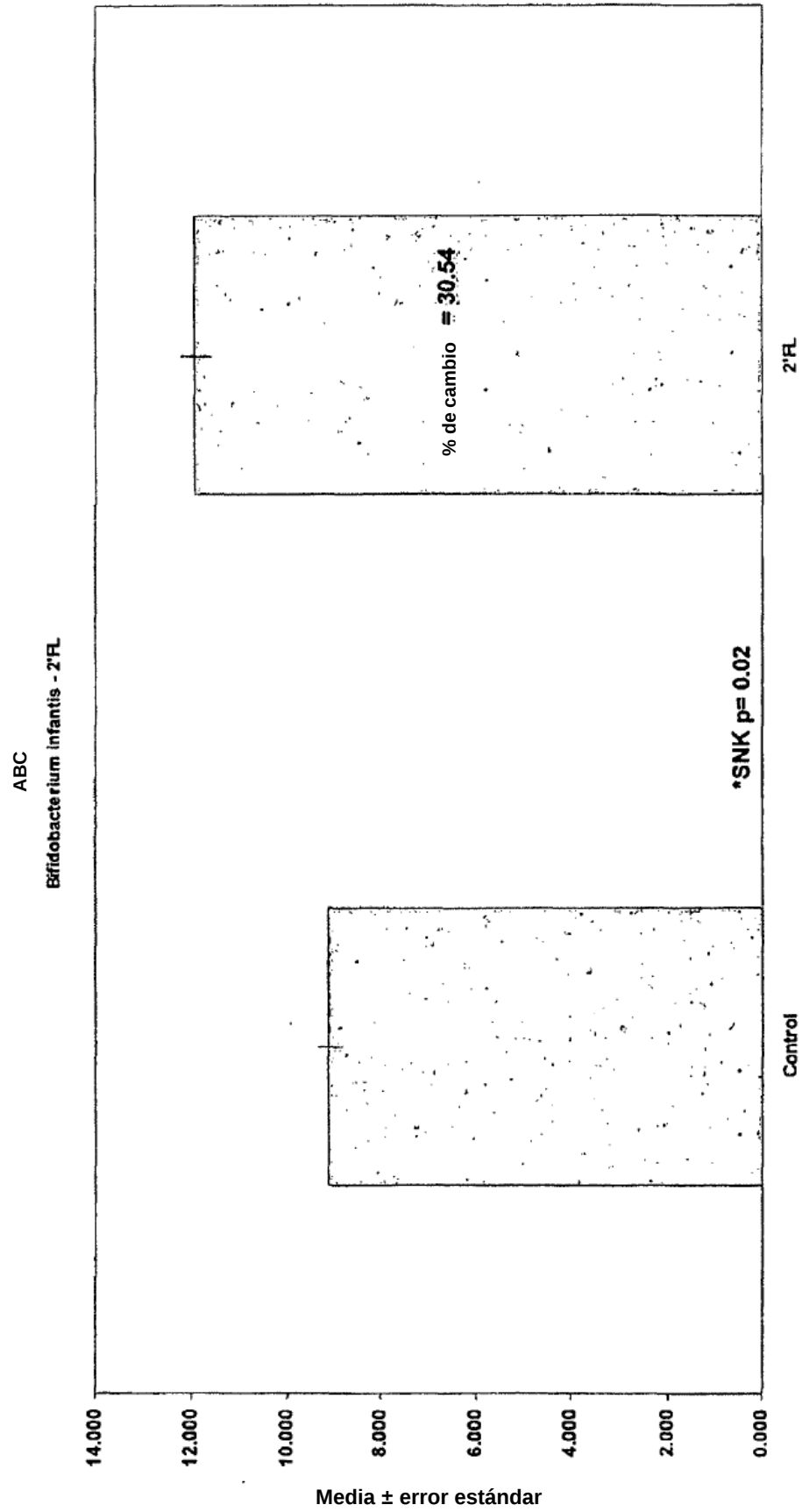
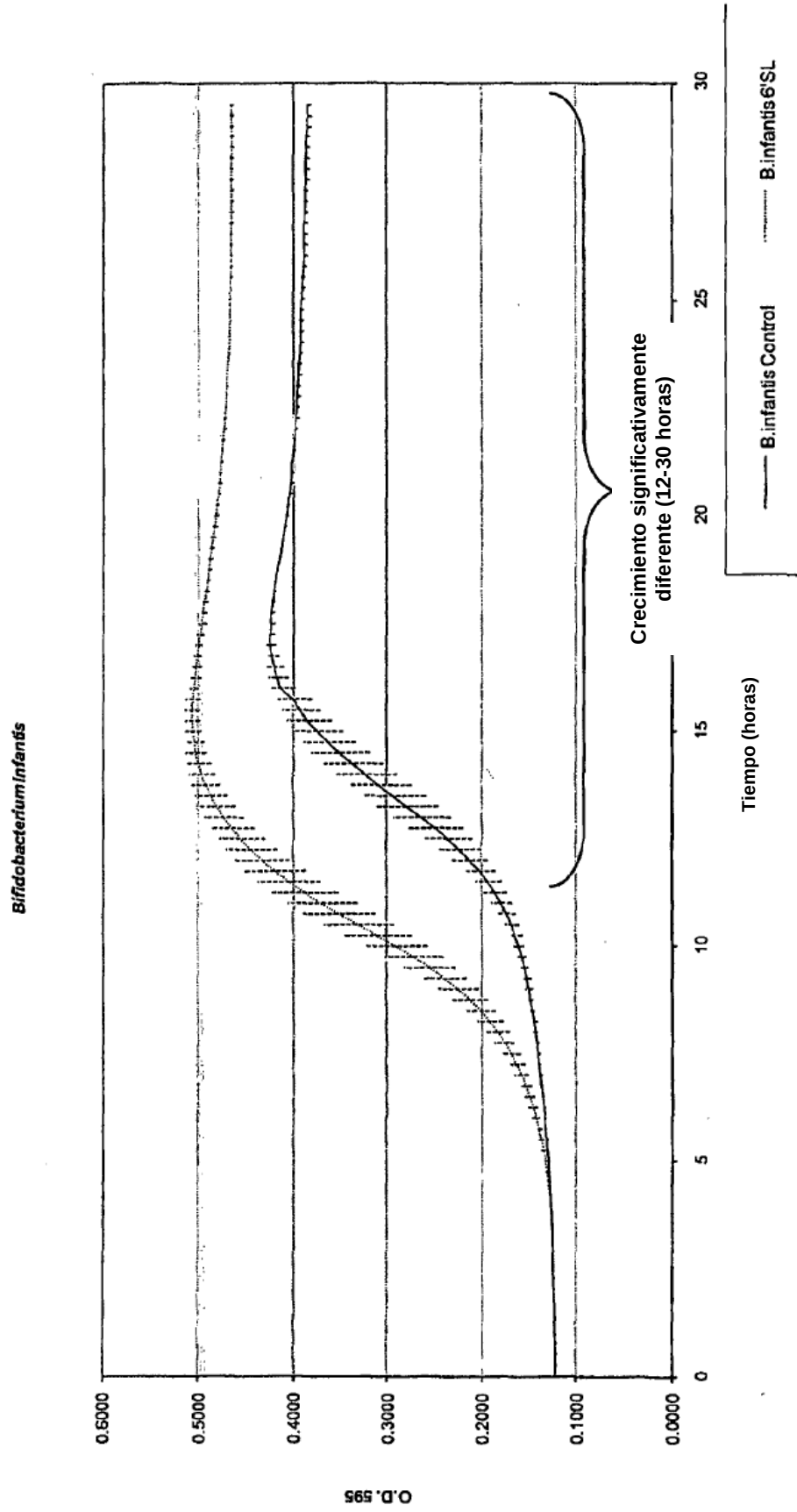


FIG. 5: Ensayo con 6'-sialil-lactosa - curva de crecimiento - *Bifidobacterium infantis*



| Modelo fijo lineal $p=0.0045$

FIG. 6: Ensayo con 3'-sialil-lactosa - curva de crecimiento – *Bifidobacterium breve*

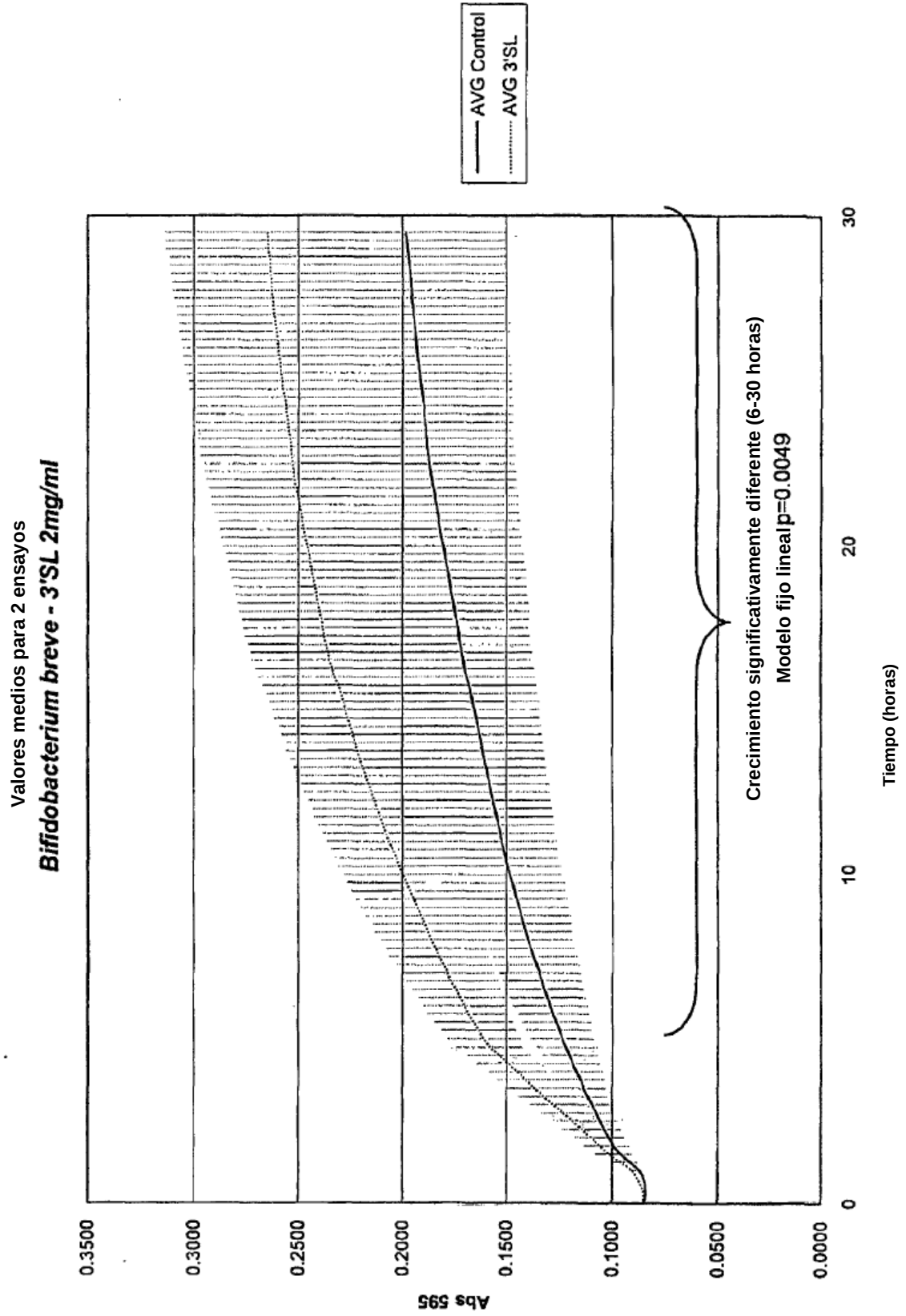


FIG. 7: Ensayo con 3'-sialil-lactosa - curva de crecimiento – *Bifidobacterium infantis*

Valores medios para 2 ensayos

Bifidobacterium infantis - 3'SL 2mg/ml

