

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 776**

51 Int. Cl.:

<b>A23L 33/00</b>	(2006.01)	<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)
<b>A23C 9/12</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/702</b>	(2006.01)
<b>A23C 9/123</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/733</b>	(2006.01)
<b>A23C 9/13</b>	(2006.01)	<b>A61K 35/744</b>	(2015.01)
<b>A23C 9/20</b>	(2006.01)	<b>A61K 35/745</b>	(2015.01)
<b>A23L 33/10</b>	(2006.01)	<b>A23L 33/135</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/21</b>	(2006.01)		
<b>A61K 35/74</b>	(2015.01)		
<b>A61P 1/12</b>	(2006.01)		
<b>A61P 11/06</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2009 PCT/NL2009/050332**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO09151330**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2009 E 09762711 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2293677**

54 Título: **Composición nutricional para bebés nacidos por cesárea**

30 Prioridad:

**13.06.2008 WO PCT/NL2008/050375**  
**31.10.2008 EP 08168054**

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

**28.02.2018**

73 Titular/es:

**N.V. NUTRICIA (100.0%)**  
**Eerste Stationsstraat 186**  
**2712 HM Zoetermeer, NL**

72 Inventor/es:

**SCHMITT, JOACHIM;**  
**PERRIN, EMMANUEL;**  
**STAHL, BERND y**  
**BOEHM, GÜNTHER**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 656 776 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composición nutricional para bebés nacidos por cesárea

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a métodos para alimentar a bebés nacidos por cesárea y a composiciones para administrar a bebés nacidos por cesárea.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Antes de su nacimiento, el tracto intestinal del bebé normalmente es estéril. Durante el parto vaginal el tracto intestinal del bebé se inocula con bacterias vaginales y/o fecales de la madre, lo que produce una colonización del tracto gastrointestinal del bebé por parte de las bacterias provenientes de la madre. Una microbiota materna intestinal sana tiene numerosos efectos positivos en el bebé, tales como una menor incidencia de infecciones y un sistema inmunológico fortalecido.

[0003] En los bebés nacidos por cesárea, la colonización por las bacterias intestinales se retrasa y ocurre por las bacterias presentes en el ambiente hospitalario, lo que produce un desarrollo de una microbiota intestinal diferente, menos óptima. Grönlund et al, 1999, JPGN 28:19-25, revela que hay diferencias en la flora intestinal después del parto por cesárea en comparación con los bebés nacidos vaginalmente. La microbiota intestinal de los bebés nacidos por cesárea comprende menos bacterias, menos bacterias beneficiosas y menos especies de bacterias beneficiosas en comparación con la microbiota intestinal de los bebés nacidos por vía vaginal. En particular, la cantidad y el perfil de las bacterias productoras de ácido láctico, tales como la especie *Bifidobacterium*, de la microbiota de los bebés nacidos por cesárea es diferente de la cantidad y el perfil intestinal de la especie *Bifidobacterium* en bebés nacidos por vía vaginal. Estas diferencias en la microbiota persisten hasta bien entrada la infancia.

[0004] Las fórmulas para lactantes normalmente se diseñan para que imiten el desarrollo de una microbiota intestinal en un bebé que recibe leche materna asumiendo que todos los bebés reaccionan de forma similar a la leche materna y a la fórmula para lactantes. Sin embargo, la subpoblación de bebés nacidos por cesárea reaccionará de forma diferente ya que la colonización se retrasa y es menos óptima.

[0005] La patente EP 1776877 divulga el uso de al menos dos microorganismos diferentes o al menos un microorganismo y al menos un oligosacárido no digerible o al menos dos especies, subespecies o cepas de *Bifidobacterium* diferentes para la producción de una composición para administrar por vía enteral a un bebé nacido por cesárea. Estas bacterias son bacterias vivas.

[0006] La patente WO 2007/046698 divulga el uso de una composición que comprende un oligosacárido no digerible para la producción de una composición para administrar por vía enteral a un bebé nacido por cesárea. Opcionalmente, están presentes bacterias de ácido láctico.

[0007] Natren® produce el producto probiótico Life Start® que está específicamente diseñado para bebés y es adecuado para bebés nacidos por cesárea. Life Start® comprende *Bifidobacterium infantis* viva.

[0008] Heyman et al, 2005, Acta Paediatrica 94:34-36, revela el uso de microorganismos no vivos en la fórmula para lactantes fermentada destinada a bebés sanos con un efecto positivo en la función intestinal.

[0009] La patente US 2006/018890 aborda el uso del tratamiento de infecciones respiratorias y otitis media aguda en bebés mediante la administración de bifidobacterias y una cepa de fomento de la adherencia. Se prefieren las bacterias vivas y los datos experimentales mostrados usan *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus* GG vivas.

[0010] La patente EP 1364586 divulga el uso de *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis* para fomentar la tolerancia oral. Opcionalmente, las bacterias están muertas. Opcionalmente, estas bacterias se agregan a productos fermentados entre los que no se incluyen las fórmulas para lactantes.

[0011] Kirjavainen et al, 2003, JPGN 36:223-227, revela que el uso de LGG viable, pero no inactivada por calor, es un método potencial para la gestión del eczema atópico y la alergia a la leche de vaca. Los productos evaluados no son composiciones fermentadas.

[0012] La patente EP 1597978 divulga un efecto sinérgico entre la polifruktosa y el galacto-oligosacárido cuando se fermentan por las heces del bebé.

[0013] La patente US 2006/0233773 divulga el uso de *Lactobacillus* GG para prevenir o reducir el desarrollo de alergias respiratorias. Estas bacterias están vivas.

[0014] Mcvay et al, 2008, J Pediatr Surg 43:25-29, revela que una fórmula con bacterias probióticas vivas fue mejor para reducir la colonización bacteriana pulmonar y gastrointestinal en comparación con las fórmulas para lactantes y las fórmulas para lactantes de control acidificadas químicamente y fermentadas con *Lactococcus lactis*. Las fórmulas fueron evaluadas en cachorros de conejo nacidos por cesárea.

Resumen de la invención

[0015] Los experimentos en animales mostraron que, pasadas tan solo dos horas después del nacimiento, el intestino de un bebé nacido vaginalmente muestra una respuesta inmunológica a las bacterias, mientras que en los bebés nacidos por cesárea no se observó semejante respuesta inmunológica rápida. Esta respuesta se inicia por los factores inmunogénicos de las bacterias y revela la inducción de tolerancia a estas bacterias, permitiendo así una colonización rápida del intestino. Se cree que esta rápida respuesta inmunológica es muy importante para el desarrollo sano del bebé. Por lo tanto, es particularmente deseable obtener efectos similares en los bebés nacidos por cesárea, particularmente la inducción de tolerancia y la rápida colonización del intestino por las bacterias.

[0016] Los inventores han reconocido que la exposición temprana del intestino del recién nacido nacido por cesárea a un producto derivado de la leche que ha sido fermentado por bacterias productoras de ácido láctico induce una tolerancia intestinal a estas bacterias similar a la de los bebés nacidos vaginalmente, los que permite una colonización rápida del intestino, como en los bebés nacidos vaginalmente.

[0017] Sin embargo, los efectos de inducción de tolerancia de la leche fermentada por sí solos no son suficientes para hacer posible una colonización intestinal suficiente. Por lo tanto, es particularmente importante que la presente composición comprenda una mezcla de oligosacáridos que mejore eficazmente la colonización del intestino por las bacterias productoras de ácido láctico.

[0018] Debido a que la microbiota intestinal juega un papel crucial en el desarrollo del bebé, en particular en la estimulación del sistema inmunológico, la predisposición a las enfermedades atópicas y la resistencia a las infecciones, es de vital importancia estimular un desarrollo rápido y sano de la microbiota intestinal de los bebés nacidos por cesárea.

[0019] Los lactantes nacidos por cesárea nacen en un ambiente hospitalario, lo que es un riesgo de infección patogénica y/o diarrea debido a la presencia de bacterias nosocomiales. Adicionalmente, el desarrollo perjudicado de una microbiota intestinal sana produce una colonización más rápida por las bacterias patogénicas en comparación con una situación en la que el tracto intestinal del bebé se inocula por bacterias maternas. La presente invención pretende particularmente proporcionar una composición que reduzca la incidencia y la gravedad de las infecciones y/o la diarrea en los bebés nacidos por cesárea mediante la inducción de tolerancia del intestino del bebé a las bacterias beneficiosas, mediante la estimulación del crecimiento de bacterias beneficiosas, preferiblemente bacterias productoras de ácido láctico y/o mediante la reducción del crecimiento de bacterias adversas. Por lo tanto, la presente composición puede ser usada ventajosamente para tratar y/o prevenir las infecciones en los bebés nacidos por cesárea.

[0020] Los lactantes nacidos por cesárea tienen un mayor riesgo de sufrir enfermedades atópicas tales como la alergia alimenticia, el asma, la dermatitis atópica, y/o la rinitis alérgica. La presente invención pretende en particular proporcionar una composición que reduzca la incidencia y la gravedad de las enfermedades atópicas tales como el eczema atópico (o dermatitis atópica), la alergia y/o el asma en lactantes nacidos por cesárea mejorando la colonización intestinal por parte de bacterias beneficiosas. Por lo tanto, la presente invención puede ser usada ventajosamente para tratar y/o prevenir la alergia en los lactantes nacidos por cesárea.

[0021] El producto derivado de la leche fermentado por bacterias productoras de ácido láctico comprende fragmentos de bacterias productoras de ácido láctico y/o productos excretados por bacterias productoras de ácido láctico, tales como glicoproteínas, glicolípidos, peptidoglicano, ácido lipoteicoico (LTA), flagelos, lipoproteínas, polisacáridos capsulares y/o ADN. Sin ánimo de restringirse a la teoría, los presentes inventores creen que estas moléculas inmunogénicas inducen tolerancia del tracto intestinal a la colonización por bacterias productoras de ácido láctico. La inducción de tolerancia a las bacterias productoras de ácido láctico en el tracto intestinal produce una colonización más rápida por las bacterias deseadas, mientras, por otro lado, la ausencia de células vivas en el producto produce una mayor seguridad y mejores propiedades tecnológicas en el producto. La ventaja de la seguridad es especialmente importante en el caso de los bebés nacidos por cesárea, que son más vulnerables a las infecciones.

[0022] La composición comprende al menos dos oligosacáridos no digeribles. La presencia de oligosacáridos no digeribles estimula el crecimiento de bacterias productoras de ácido láctico, tales como lactobacilos y/o bifidobacterias, reduce el crecimiento de las bacterias no beneficiosas en el tracto gastrointestinal y/o directamente estimula ventajosamente el sistema inmunológico. Esto produce una mayor colonización por las bacterias beneficiosas. Por lo tanto, la presencia de los oligosacáridos no digeribles y el producto derivado de la

leche obtenido por fermentación con bacterias productoras de ácido láctico actúa sinérgicamente y produce ventajosamente una colonización mayor y más rápida por bacterias productoras de ácido láctico, tales como lactobacilos y/o bifidobacterias.

5 [0023] La presencia de al menos dos oligosacáridos no digeribles diferentes produce una microbiota más diversa con respecto a las diferentes especies de bacterias productoras de ácido láctico, como es el caso en los bebés nacidos vaginalmente. La presencia de al menos dos oligosacáridos no digeribles diferentes y el producto derivado de la leche obtenido por fermentación con bacterias productoras de ácido láctico actúa sinérgicamente y produce ventajosamente una colonización mayor, así como más rápida, así como más diversa por bacterias productoras de ácido láctico, especialmente por lactobacilos y/o bifidobacterias.

10 Se ha observado que una composición que comprende al menos dos oligosacáridos no digeribles diferentes y un producto derivado de la leche obtenido por fermentación con bacterias productoras de ácido láctico tiene un efecto sinérgico en la respuesta inmune, tal y como se ha evaluado en dos modelos animales: un modelo de vacunación y un modelo de alergia.

15 Descripción detallada de las formas de realización preferidas

[0024] La presente invención se refiere a un método para suministrar alimento a un bebé nacido por cesárea y una composición y sus usos según las reivindicaciones anexas. En el contexto de esta invención, el término "sustrato lácteo", también denominado "sustrato acuoso" o sencillamente "sustrato" es el material que se somete a fermentación mediante bacterias productoras de ácido láctico. En el contexto de esta invención, el término "producto derivado de la leche" es el producto que resulta de la fermentación de un sustrato mediante bacterias productoras de ácido láctico y se denomina también "producto fermentado". La fermentación es el proceso de derivar energía de la oxidación de carbohidratos, tales como la lactosa presente en leche, utilizando un aceptor de electrones endógeno, que normalmente es un compuesto orgánico. Esto se diferencia de la respiración celular, donde se donan electrones a un aceptor de electrones exógeno, como oxígeno, mediante una cadena de transporte de electrones.

20 En la presente invención, la fermentación de un producto derivado de la leche mediante bacterias productoras de ácido láctico tiene el significado común de la conversión de los carbohidratos presentes en el producto derivado de la leche a ácidos orgánicos. Estos ácidos orgánicos formados pueden comprender, además de ácido láctico, otros ácidos orgánicos, como acetato. El carbohidrato fermentado preferiblemente es lactosa.

[0025] En cualquier parte del texto que sigue se hace referencia a la composición nutricional de la presente invención o se especifican formas de realización adicionales o preferidas de la composición nutricional de la presente invención, esto también se puede aplicar al uso según la presente invención.

35 Parto por cesárea

[0026] La presente invención se refiere a la administración enteral a bebés nacidos por cesárea de una composición que comprende un producto derivado de la leche que se puede obtener mediante la fermentación de un sustrato lácteo por bacterias productoras de ácido láctico. Un parto por cesárea (cesárea) es un procedimiento quirúrgico en el que un bebé nace mediante una incisión hecha en la pared abdominal de la madre y, a continuación, a través de la pared del útero. Normalmente, se realiza una cesárea cuando es más segura para la madre o para el bebé que un parto vaginal. Alternativamente, una mujer puede elegir tener un parto por cesárea en lugar de parir al bebé vaginalmente.

Producto derivado de la leche fermentado por bacterias productoras de ácido láctico.

[0027] Una composición nutricional de la presente invención o para uso según la presente invención comprende un producto derivado de la leche que es un sustrato lácteo que se fermenta mediante bacterias productoras de ácido láctico y dicho sustrato lácteo comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en leche, suero de leche, proteína de suero de leche, hidrolizado de proteína de suero de leche, caseína, hidrolizado de caseína y/o lactosa. La composición de la presente invención preferiblemente comprende un producto derivado de la leche que se puede obtener mediante un proceso que comprende las etapas siguientes:

- 55 a. inocular bacterias productoras de ácido láctico en un medio acuoso que comprende sustrato lácteo en una cantidad comprendida entre  $1 \times 10^2$  y  $5 \times 10^{10}$  UFC/ml, dicho medio acuoso tiene un pH comprendido entre aproximadamente 4 y 8 y que comprende al menos un sustrato lácteo seleccionado del grupo que consiste en leche, suero de leche, proteína de suero de leche, hidrolizado de proteína de suero de leche, caseína, hidrolizado de caseína, lactosa y sus mezclas derivadas,
- 60 b. incubar dichas bacterias productoras de ácido láctico en dicho medio acuoso, bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas y a una temperatura de aproximadamente de 20 °C a 50 °C, preferiblemente durante al menos 2 h, y
- 65 c. inactivar y/o eliminar físicamente las células vivas de las bacterias productoras de ácido láctico del medio acuoso.
- Opcionalmente, este proceso se puede seguir mediante una o varias de las etapas siguientes:

- d. ultrafiltrar el medio acuoso, preferiblemente a través de una o varias membranas de filtración con un umbral establecido entre 100 y 300 kDa para obtener un retenido concentrado,
- e. fraccionar el retenido concentrado, preferiblemente mediante una deshidratación del retenido concentrado, disolver el retenido deshidratado en un tampón, realizar una cromatografía de exclusión en gel de la solución de retenido, preferiblemente en una columna con un umbral de exclusión de 600 kDa,
- y
- f. recuperar la fracción deseada, preferiblemente recuperando la fracción excluida al final de la cromatografía, cuya fracción comprende o constituye el producto derivado de la leche.

[0028] El producto fermentado comprende preferiblemente fragmentos de célula bacteriana como glicoproteínas, glicolípidos, peptidoglicano, ácido lipoteicoico (LTA), flagelos, lipoproteínas, ADN y/o polisacáridos capsulares. Estos fragmentos evocan una respuesta inmunológica en el intestino del recién nacido, induciendo así tolerancia y acelerando la colonización bacteriana rápida del intestino. Es ventajoso usar el producto derivado de la leche fermentado que comprende bacterias inactivadas y/o fragmentos celulares directamente como una parte del producto nutricional final, ya que esto dará lugar a una mayor concentración de fragmentos de célula bacteriana. Cuando se usan preparaciones comerciales de probióticos, estos generalmente se lavan y se separan del medio de crecimiento acuoso, que comprende los fragmentos de célula bacteriana, reduciendo o eliminando así la presencia de fragmentos de célula de bacteriana. Además, tras la fermentación y/o otras interacciones de bacterias productoras de ácido láctico con el sustrato lácteo, se forman compuestos bioactivos adicionales, tales como péptidos y/o oligosacáridos bioactivos, que también estimulan el sistema inmunológico y/o la colonización de la microbiota intestinal. Por lo tanto, el producto derivado de la leche fermentado tiene un efecto mejorado en comparación con el producto derivado de la leche no fermentado.

[0029] Preferiblemente la composición nutricional comprende del 5 al 100 % en peso del producto fermentado sobre la base del peso en seco, más preferiblemente del 10 al 100 % en peso, más preferiblemente del 20 al 90 % en peso, aún más preferiblemente del 50 al 80 % en peso. Preferiblemente, la composición comprende del 1 al 100 % en peso del producto fermentado por 100 ml, más preferiblemente del 2 al 100 % en peso, más preferiblemente del 5 al 50 % en peso, aún más preferiblemente del 10 al 20 % en peso por 100 ml.

Bacterias productoras de ácido láctico utilizadas para producir el producto fermentado

[0030] Preferiblemente, las bacterias productoras de ácido láctico utilizadas para la fermentación del sustrato lácteo se proporcionan como un monocultivo o un cultivo mixto. Las bacterias productoras de ácido láctico consisten en los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Preferiblemente, las bacterias productoras de ácido láctico usadas para la fermentación comprenden bacterias del género *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium* y/o *Streptococcus*.

[0031] Las bifidobacterias son bacterias grampositivas anaeróbicas en forma de barra. Las presentes especies de *Bifidobacterium* tienen preferiblemente al menos un 95 % de identidad con respecto a la secuencia 16 S rRNA en comparación con la cepa tipo de las especies de *Bifidobacterium* respectivas, más preferiblemente, al menos un 97 % de identidad, tal y como se define en los manuales sobre este sujeto, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor (Nueva York) Laboratory Press. Las bifidobacterias utilizadas preferiblemente también han sido descritas por Scardovi, V. Genus *Bifidobacterium*, p.1418 - p.1434. En: *Bergey's manual of systematic Bacteriology*. Vol. 2. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe y J.G. Holt (ed.). Baltimore: Williams & Wilkins. 1986. 635 p. Preferiblemente, la bacteria productora de ácido láctico utilizada para la fermentación comprende o es al menos una *Bifidobacterium* seleccionada del grupo que consiste en *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. adolescentis*, *B. thermophilum*, *B. gallicum*, *B. animalis* o *lactis*, *B. angulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. thermacidophilum* y *B. longum* más preferiblemente *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum*, más preferiblemente *B. longum* y *B. breve*, aún más preferiblemente *B. breve*, de la forma más preferible *B. breve* I-2219 depositada en la CNCM en París, Francia. Preferiblemente, las bacterias productoras de ácido láctico usadas para la fermentación comprenden al menos una, más preferiblemente al menos dos, aún más preferiblemente al menos tres, de la forma más preferible al menos cuatro especies de *Bifidobacterium* diferentes. Preferiblemente, las bacterias productoras de ácido láctico utilizadas para la fermentación comprenden al menos *B. longum* y/o *B. breve*. Las combinaciones anteriormente mencionadas pretenden comúnmente aumentar la tolerancia frente una cantidad más diversa de microorganismos en el intestino del bebé nacido por cesárea. Esto afecta beneficiosamente al bebé, que muestra numerosos beneficios en su salud.

[0032] Los lactobacilos son bacterias gram positivas anaeróbicas en forma de barra. Las presentes especies de *Lactobacillus* tienen preferiblemente al menos un 95 % de identidad con respecto a la secuencia 16 S rRNA en comparación con la cepa tipo de las especies de *Lactobacillus* respectivas, más preferiblemente al menos un 97 % de identidad tal y como se define en los manuales sobre este sujeto, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor (Nueva York) Laboratory Press. Preferiblemente, las bacterias productoras de ácido láctico utilizadas para la fermentación comprenden al menos una, más preferiblemente al menos dos especies de *Lactobacillus* seleccionadas del

grupo que consiste en *L. casei*, *L. reuteri*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. zeae*, *L. fermentum* y *L. plantarum*, más preferiblemente *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus*, *L. fermentum* y, más preferiblemente incluso, *L. paracasei*. Aún más preferiblemente, las bacterias productoras de ácido láctico utilizadas para la fermentación comprenden

5 *Bifidobacterium breve* y/o *Lactobacillus paracasei* debido a que el crecimiento de estas bacterias se ve perjudicado en el intestino de los bebés alimentados con fórmulas, incluso cuando se añaden oligosacáridos no digeribles a la fórmula para lactantes, en comparación con el intestino de los bebés alimentados con leche materna. Esta biodiversidad aumentada tendrá un efecto estimulador en la salud del recién nacido nacido por cesárea.

10 [0033] Preferiblemente, las bacterias productoras de ácido láctico utilizadas para la fermentación comprenden al menos un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, más preferiblemente, comprenden o son *Streptococcus thermophilus*. Esta biodiversidad aumentada tendrá un efecto

15 [0034] La densidad de la inoculación está comprendida preferiblemente entre  $1 \times 10^2$  y  $5 \times 10^{10}$ , preferiblemente entre  $1 \times 10^4$  y  $5 \times 10^9$  UFC de bacterias productoras de ácido láctico/ml de medio acuoso que contiene sustrato lácteo, más preferiblemente entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^9$  UFC de bacterias productoras de ácido láctico/ml de medio acuoso que contiene sustrato lácteo. La densidad bacteriana final después de la fermentación se encuentra

20 comprendida preferiblemente entre  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^{10}$ , más preferiblemente entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^9$  UFC/ml de medio acuoso que contiene sustrato lácteo.

25 [0035] Preferiblemente, la presente composición nutricional comprende bacterias productoras de ácido láctico inactivadas y/o fragmentos bacterianos derivados de las bacterias productoras de ácido láctico obtenidos a partir de más del  $1 \times 10^2$  UFC de productoras de ácido láctico por g sobre la base del peso en seco de la composición final, más preferiblemente  $1 \times 10^4$  UFC, aún más preferiblemente  $1 \times 10^5$  UFC. Preferiblemente, las bacterias inactivadas o los fragmentos bacterianos se obtienen a partir de menos de  $1 \times 10^{11}$  UFC de bacterias productoras

30 de ácido láctico por g sobre la base del peso en seco de la composición final, más preferiblemente  $1 \times 10^{10}$  UFC, aún más preferiblemente  $1 \times 10^9$  UFC.

#### Proceso de fermentación

35 [0036] El sustrato lácteo por fermentar se selecciona del grupo que consiste en leche, suero de leche, proteína de suero de leche, hidrolizado de proteína de suero de leche, caseína, hidrolizado de caseína y lactosa y sus mezclas derivadas, de la forma más preferible leche desnatada. La leche puede ser leche entera, leche semidesnatada y/o leche desnatada. El suero de leche puede ser suero de leche dulce y/o suero de leche ácido. Preferiblemente, el suero de leche está presente en una concentración de 3 a 80 g de peso en seco por l de medio acuoso que contiene sustrato lácteo, más preferiblemente de 40 a 60 g por l. Preferiblemente el

40 hidrolizado de proteína de suero de leche está presente de 2 a 80 g de peso en seco por l de medio acuoso que contiene sustrato lácteo, más preferiblemente de 5 a 15 g/l. Preferiblemente, la lactosa está presente de 5 a 50 g de peso en seco por l de sustrato acuoso, más preferiblemente de 1 a 30 g/l. Preferiblemente, el medio acuoso que contiene sustrato lácteo comprende sales tampón para mantener el pH dentro del rango deseado. Preferiblemente, se usa dihidrógeno fosfato de potasio o sodio como sal tampón, preferiblemente de 0,5 a 5 g/l,

45 más preferiblemente de 1,5 a 3 g por l. Preferiblemente, el medio acuoso que contiene sustrato lácteo comprende cisteína en una cantidad de 0,1 a 0,5 g por l de sustrato acuoso, más preferiblemente de 0,2 a 0,4 g/l. La presencia de cisteína produce un bajo potencial redox del sustrato que es ventajoso para la actividad de las bacterias productoras de ácido láctico, en particular las bifidobacterias. Preferiblemente, el medio acuoso que contiene sustrato lácteo comprende extracto de levadura en una cantidad de 0,5 a 5 g/l de medio acuoso que

50 contiene sustrato lácteo, más preferiblemente de 1,5 a 3 g/l. El extracto de levadura es una rica fuente de cofactores de enzima y factores de crecimiento para las bacterias productoras de ácido láctico. La presencia de extracto de levadura aumentará la fermentación por parte de las bacterias productoras de ácido láctico.

55 [0037] De forma adecuada, el medio acuoso que contiene sustrato lácteo se pasteuriza antes de la etapa de fermentación para eliminar la presencia de bacterias vivas indeseadas. De forma adecuada, el producto se pasteuriza después de la fermentación para inactivar las enzimas. De forma adecuada, la inactivación enzimática tiene lugar a 75 °C durante 3 min. De forma adecuada, el medio acuoso que contiene sustrato lácteo se homogeneiza antes y/o el producto derivado de la leche se homogeneiza después de la fermentación. La homogeneización produce un sustrato y/o producto fermentado más estable, especialmente en presencia de

60 grasa.

[0038] La fermentación se realiza preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 20 °C a 50 °C, más preferiblemente de 30 °C a 45 °C, aún más preferiblemente de aproximadamente 37 °C a 42 °C. La temperatura óptima para el crecimiento y/o la actividad de las bacterias productoras de ácido láctico, más particularmente los lactobacilos y/o las bifidobacterias es de entre 37 °C y 42 °C.

65

[0039] La incubación se realiza preferiblemente con un pH de 4 a 8, más preferiblemente de 6 a 7,5. Este pH no induce precipitación de proteínas y/o un sabor desagradable, mientras, al mismo tiempo, las bacterias productoras de ácido láctico, tales como los lactobacilos y/o las bifidobacterias, son capaces de fermentar el sustrato lácteo.

5

[0040] El período de incubación es preferiblemente de al menos 2 h, preferiblemente de entre 4 y 48 h, más preferiblemente de entre 6 y 24 h, aún más preferiblemente de entre 6 y 12 h. Un periodo de tiempo suficientemente largo permite que la fermentación y la producción concomitante de fragmentos celulares inmunogénicos, tales como glicoproteínas, glicolípidos, peptidoglicano, ácido lipoteicoico (LTA), flagelos, lipoproteínas, ADN y/o polisacáridos capsulares, tenga lugar en un alto grado, sin que sea necesario que el período de incubación sea innecesariamente largo por cuestiones económicas.

10

[0041] Opcionalmente, una o varias de las siguientes etapas pueden seguir al proceso anterior:

15 i) Ultrafiltrar el producto derivado de la leche después de la fermentación a través de membranas de filtración con un umbral establecido entre 100 y 300 kDa, para obtener un retenido concentrado. Las membranas son preferiblemente membranas de polietersulfona y la filtración se realiza preferiblemente a una temperatura inferior a 60 °C.

20 ii) Lavar el retenido concentrado con agua.

iii) Deshidratar el retenido concentrado, preferiblemente mediante liofilización.

iv) Disolver el retenido deshidratado en un tampón, preferiblemente un tampón Tris con un pH de 6-8.

v) Realizar una cromatografía de exclusión en gel de la solución de retenido en una columna con un umbral de exclusión de 600 kDa, preferiblemente una columna de dextrano o agarosa como Superdex

25 vi) Desalar el producto con una membrana con un umbral de 10 kDa. Recuperar la fracción excluida al final de la cromatografía, dicha fracción comprende o constituye el producto derivado de la leche.

[0042] Se pueden añadir ingredientes adicionales para producir la composición nutricional que se desea obtener. Normalmente estos se agregan después de la etapa vi) anteriormente mencionada. Para una fórmula láctea para lactantes, se pueden añadir ingredientes como la leche desnatada, el suero de leche, la lactosa, la grasa vegetal, minerales, vitaminas, etc., tal y como se conoce en la técnica.

30

[0043] Preferiblemente, se pasteuriza, enfría y fermenta un sustrato de leche, preferiblemente leche desnatada, con una o más cepas de *Lactobacillus* hasta un cierto grado de acidez, tras lo cual el producto fermentado se enfría y almacena. Preferiblemente, se prepara un segundo producto derivado de la leche de forma similar, pero utilizando esta vez una o más especies de *Bifidobacterium* para la fermentación. Posteriormente, los dos productos fermentados preferiblemente se mezclan juntos y se mezclan con otros componentes usados en la fabricación de una fórmula para lactantes, excepto el componente de grasa. Preferiblemente, la mezcla se precalienta y, posteriormente, se añade grasa en línea, la mezcla se homogeneiza, se pasteuriza y se seca.

35

[0044] Preferiblemente, un sustrato de leche, preferiblemente lactosa, se pasteuriza, enfría y fermenta con una o más cepas de *Streptococcus thermophilus*, después de lo cual el producto fermentado se enfría y se almacena. Preferiblemente, se prepara un segundo producto derivado de la leche de forma similar, pero utilizando esta vez leche desnatada y una o más especies de *Bifidobacterium* para la fermentación. Posteriormente, los dos productos fermentados preferiblemente se mezclan juntos y se mezclan con otros componentes usados en la fabricación de una fórmula para lactantes, se pasteurizan y se secan.

45

[0045] Un método preferido para la preparación del producto fermentado de la presente invención se describe en la patente WO 01/01785, particularmente en los ejemplos 1 y 2. Un método preferido para la preparación del producto fermentado de la presente invención se describe en la patente WO 2004/093899, más particularmente en el ejemplo 1.

50

Métodos de inactivación y/o eliminación física de células vivas

[0046] Las células vivas de las bacterias productoras de ácido láctico en el producto derivado de la leche se eliminan preferiblemente después de la fermentación en su totalidad esencialmente, por ejemplo, mediante inactivación y/o eliminación física. Preferiblemente, las células se inactivan. Las células bacterianas vivas se inactivan preferiblemente mediante métodos seleccionados del grupo que consiste en tratamiento térmico, tratamiento UV, sonicación, tratamiento con oxígeno, tratamiento con bactericidas tales como etanol, aplicación de ultra alta presión, homogeneización de alta presión y/o el uso de un disruptor celular. Preferiblemente, las bacterias productoras de ácido láctico se matan con calor después de la fermentación del producto derivado de la leche. Las formas preferibles de muerte por calor son la pasteurización, la esterilización, el tratamiento de temperatura ultra alta, cocción y/o secado por pulverización a temperaturas en las que las bacterias no sobreviven. Los fragmentos celulares se obtienen preferiblemente mediante tratamiento térmico, sonicación, tratamiento con bactericidas tales como etanol, aplicación de ultra alta presión, homogeneización de alta presión y/o el uso de un disruptor celular. Preferiblemente, las células intactas de las bacterias se retiran del producto

55

60

65

fermentado mediante eliminación física como filtración o centrifugación, por ejemplo, centrifugación de 1 h a 3000 g, de esta forma, las células intactas quedan en el granulado o el retenido y los fragmentos celulares quedan en el sobrenadante y/o filtrado, respectivamente. La inactivación y/o la eliminación física de las células vivas se realiza de manera que la cantidad de bacterias productoras de ácido láctico vivas está por debajo del límite de

5  
10  
15

[0047] La inactivación de las células vivas tiene la ventaja de que, después de la producción, la composición nutricional final se puede pasteurizar y/o esterilizar, reduciendo en consecuencia el riesgo de contaminación con microorganismos nocivos, tales como el *E. sakazakii*. Esto es de especial importancia para los bebés nacidos por cesárea ya que, debido a su colonización intestinal retardada, son más propensos a sufrir infecciones. Así, la presente invención permite que la fórmula líquida, lista para tomar se prepare y se almacene a temperatura ambiente. Además, la dosis de componentes bioactivos recibida por cada bebé y/o niño se puede controlar más

10  
15

[0048] Otras ventajas son que la composición nutricional se puede almacenar más fácilmente y con menos costes ya que no hay que tomar precauciones especiales para mantener la viabilidad de las bacterias productoras de ácido láctico en un nivel aceptable. Este es especialmente el caso en los productos con una actividad acuosa por encima de 0,3. Asimismo, no se produce una postacidificación en los productos almacenados con una alta actividad acuosa y/o en la fórmula para lactantes en el período posterior a la reconstitución con agua y antes del consumo. De esta forma, se evitan los efectos adversos relacionados con la coagulación de las proteínas y el sabor desagradable.

20  
25

#### Oligosacáridos no digeribles

[0049] La presente composición comprende preferiblemente al menos dos oligosacáridos no digeribles. El oligosacárido no digerible estimula preferiblemente el crecimiento de las bacterias intestinales productoras de ácido láctico, particularmente las bifidobacterias y/o los lactobacilos, más preferiblemente las bifidobacterias. La presencia de oligosacáridos no digeribles estimula el crecimiento de las bacterias productoras de ácido láctico, tales como los lactobacilos y/o las bifidobacterias, reduce el crecimiento de las bacterias no beneficiosas en el tracto gastrointestinal y/o directamente estimula de forma ventajosa el sistema inmunológico. Esto tiene como resultado una colonización más alta por las bacterias beneficiosas. Por lo tanto, la presencia de oligosacáridos no digeribles y el producto derivado de la leche obtenido mediante la fermentación por bacterias productoras de ácido láctico actúa sinérgicamente y produce ventajosamente una colonización mayor y más rápida por bacterias productoras de ácido láctico, tales como lactobacilos y/o bifidobacterias.

30  
35

[0050] La presencia de al menos dos oligosacáridos no digeribles diferentes produce una microbiota más diversa con respecto a las especies de bacterias productoras de ácido láctico diferentes, como es el caso en los bebés nacidos vaginalmente. La presencia de al menos dos oligosacáridos no digeribles diferentes y el producto derivado de la leche obtenido mediante fermentación con bacterias productoras de ácido láctico actúa sinérgicamente y produce ventajosamente una colonización mayor, así como más rápida, así como más diversa por bacterias productoras de ácido láctico, especialmente por lactobacilos y/o bifidobacterias. El término "oligosacárido", tal y como se usa en la presente invención, se refiere a sacáridos con un grado de polimerización (GP) de 2 a 250, preferiblemente un GP de 2 a 100, más preferiblemente de 2 a 60, aún más preferiblemente de 2 a 10. Si el oligosacárido con un GP de 2 a 100 se incluye en la presente composición, esto incluye las composiciones que contienen oligosacáridos con un GP de entre 2 y 5, un GP de entre 50 y 70 y un GP de 7 a 60. El término "oligosacárido no digerible", tal y como se usa en la presente invención, se refiere a los oligosacáridos que no se digieren en el intestino por la acción de los ácidos o enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo superior humano (intestino delgado y estómago) sino que son fermentados preferiblemente por la microbiota intestinal humana. Por ejemplo, la sacarosa, la lactosa, la maltosa y las maltodextrinas se consideran digeribles.

40  
45  
50

[0051] Preferiblemente, el presente oligosacárido no digerible es soluble. El término "soluble", tal y como se utiliza aquí cuando se hace referencia a un polisacárido, fibra u oligosacárido, significa que la sustancia es al menos soluble según el método descrito por L. Prosky et al., J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71,1017-1023 (1988).

55

[0052] Preferiblemente, la presente composición comprende carbohidratos no digeribles con un GP de entre 2 y 250, más preferiblemente de 2 a 60. Los carbohidratos no digeribles son al menos dos seleccionados del grupo que consiste en fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, arabino-oligosacáridos, manano-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, fuco-oligosacáridos, arabinogalacto-oligosacáridos, glucomanano-oligosacáridos, galactomanano-oligosacáridos, oligosacáridos que comprenden ácido siálico y oligosacáridos de ácido urónico. Preferiblemente, la presente composición comprende fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos y/o oligosacáridos de ácido galacturónico, más preferiblemente galacto-oligosacáridos, de la forma más preferible

60  
65

beta-galacto-oligosacáridos. El grupo de fructo-oligosacáridos incluye inulina, el grupo de galacto-oligosacáridos incluye transgalacto-oligosacáridos o beta-galacto-oligosacáridos, el grupo de gluco-oligosacáridos incluye ciclodextrina, gentio y nigero-oligosacáridos y polidextrosa, el grupo de arabinogalacto-oligosacáridos incluye goma arábica y el grupo de galactomanano-oligosacáridos incluye goma guar parcialmente hidrolizada.

[0053] La presente composición comprende preferiblemente al menos dos oligosacáridos no digeribles con diferentes grados de polimerización medios (GP). Preferiblemente, las proporciones en peso consisten en:

- a. (oligosacáridos no digeribles con un GP de 2 a 5): (oligosacáridos no digeribles con un GP de 6, 7, 8, y/o 9) > 1; y/o
- b. (oligosacáridos no digeribles con un GP de 10 a 60): (oligosacáridos no digeribles con un GP de 6, 7, 8, y/o 9) > 1

Preferiblemente, ambas proporciones en peso son superiores a 2, aún más preferiblemente superiores a 5.

[0054] Para una mejora adicional, el presente oligosacárido no digerible tiene preferiblemente un contenido relativamente alto de oligosacáridos de cadena corta, ya que estos estimulan fuertemente el crecimiento de las bifidobacterias. Por lo tanto, preferiblemente al menos un 10 % en peso de los oligosacáridos no digeribles en la presente composición tiene un GP de 2 a 5 (es decir, de 2, 3, 4 y/o 5) y al menos un 5 % en peso tiene un GP de 10 a 60. Preferiblemente al menos un 50 % en peso, más preferiblemente al menos un 75 % en peso de los oligosacáridos neutros no digeribles tiene un GP de 2 a 9 (es decir, de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y/o 9).

[0055] Más preferiblemente, la composición comprende galacto-oligosacáridos. Los galacto-oligosacáridos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en beta-galacto-oligosacáridos, lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (neo-LNT), fucosil-lactosa, LNT fucosilada y neo-LNT fucosilada. En una forma de realización particularmente preferida, la presente composición comprende beta-galacto-oligosacáridos. El término beta-galacto-oligosacáridos, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a oligosacáridos compuestos por alrededor del 50 %, preferiblemente alrededor del 65 % de unidades de galactosa basado en subunidades monoméricas, con un grado de polimerización (GP) de 2 a 20, donde al menos el 50 %, más preferiblemente al menos el 75 %, aún más preferiblemente al menos el 90 % de las unidades de galactosa están enlazadas las unas a las otras mediante un enlace glucosídico beta, preferiblemente un enlace glucosídico beta-1,4. Los enlaces beta también predominan en los oligosacáridos de la leche humana. El GP medio es preferiblemente de 3 a 6. Una unidad de glucosa puede estar presente en el extremo reductor de la cadena de unidades de galactosa. Los beta-galacto-oligosacáridos también se denominan a veces transgalacto-oligosacáridos (TOS). Una fuente adecuada de beta-galacto-oligosacáridos es Vivinal®GOS (comercializado por Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Países Bajos). Otras fuentes adecuadas son Oligomate (Yakult), Cupoligo (Nissin) y Bi2muno (Classado). Se ha descubierto que los beta-galacto-oligosacáridos estimulan el crecimiento de las bacterias productoras de ácido láctico, preferiblemente de las bifidobacterias.

[0056] Preferiblemente, la composición comprende fructo-oligosacáridos. El término fructo-oligosacáridos, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a carbohidratos compuestos por alrededor del 50 %, preferiblemente alrededor del 65 % de unidades de fructosa basado en subunidades monoméricas, donde al menos el 50 %, más preferiblemente al menos el 75 %, aún más preferiblemente al menos el 90 %, de las unidades de fructosa están enlazadas mediante un enlace glucosídico beta, preferiblemente un enlace glicosídico beta-2,1. Una unidad de glucosa puede estar presente en el extremo reductor de la cadena de unidades de galactosa. Preferiblemente, el fructo-oligosacárido tiene un GP o un GP medio de 2 a 250, más preferiblemente de 2 a 100, aún más preferiblemente de 10 a 60. El fructo-oligosacárido comprende levano, levano hidrolizado, inulina, inulina hidrolizada y fructo-oligosacáridos sintetizados. Preferiblemente, la composición comprende fructo-oligosacáridos de cadena corta con un grado de polimerización medio (GP) de 3 a 6, más preferiblemente inulina hidrolizada o fructo-oligosacárido sintético. Preferiblemente la composición comprende fructo-oligosacáridos de cadena larga con un GP medio por encima de 20, como RaftilinHP. Preferiblemente, la composición comprende fructo-oligosacáridos tanto de cadena corta como de cadena larga. Un fructo-oligosacárido adecuado para usar en las composiciones también está fácilmente disponible en el mercado, por ejemplo, RaftilineHP (Orafti).

[0057] Más preferiblemente la composición comprende una combinación de galacto-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos, más preferiblemente fructo-oligosacáridos de cadena larga. Dicha mezcla estimula el crecimiento de una microbiota intestinal sana, particularmente de las bifidobacterias y reduce el riesgo de *E. coli* en bebés nacidos por cesárea. La mezcla estimula sinérgicamente las bacterias productoras de ácido láctico, en particular las bifidobacterias.

[0058] La presente composición preferiblemente comprende oligosacáridos de ácido urónico, más preferiblemente oligosacáridos de ácido galacturónico. El término oligosacárido de ácido urónico, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un oligosacárido donde al menos el 50 % de las unidades de monosacáridos presentes en el oligosacárido son de ácido urónico. El término oligosacárido de ácido galacturónico, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un oligosacárido donde al menos el 50 % de

las unidades de monosacáridos presentes en el oligosacárido son de ácido galacturónico. Los oligosacáridos de ácido galacturónico utilizados en la invención se obtienen preferiblemente a partir de la degradación de pectina, pectato, y/o ácido poligalacturónico. Preferiblemente, la pectina degradada se prepara mediante hidrólisis y/o beta-eliminación de pectinas de fruta y/o vegetales, más preferiblemente pectina de manzana, cítrico y/o remolacha azucarera, aún más preferiblemente pectina de manzana, cítrico y/o remolacha azucarera degradada por al menos una liasa. En una forma de realización preferida, al menos una de las unidades terminales de ácido galacturónico del oligosacárido de ácido galacturónico tiene un enlace doble. El enlace doble protege eficazmente contra la adhesión de las bacterias patogénicas a las células epiteliales intestinales. Preferiblemente, una de las unidades terminales de ácido galacturónico comprende un enlace doble C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>. El oligosacárido de ácido galacturónico puede ser un oligosacárido derivatizado. El oligosacárido de ácido galacturónico puede ser un oligosacárido metoxilado y/o amidado. Preferiblemente, los oligosacáridos de ácido galacturónico se caracterizan por un grado de metoxilación por encima del 20 %, preferiblemente por encima del 50 %, aún más preferiblemente por encima del 70 %. Los oligosacáridos de ácido urónico reducen ventajosamente la adhesión de los microorganismos patogénicos a las células epiteliales intestinales, reduciendo así la colonización por las bacterias patogénicas (nosocomiales) del colon del bebé nacido por cesárea. Además, los oligosacáridos de ácido urónico estimulan preferiblemente la formación de una microbiota intestinal sana y se fermentan, dando como resultado una producción de ácidos orgánicos intestinales y una reducción del pH intestinal, lo que inhibe el crecimiento de las bacterias patogénicas (nosocomiales).

[0059] Por lo tanto, en una forma de realización, la composición para uso según la presente invención comprende preferiblemente al menos beta-galacto-oligosacáridos. En una forma de realización, la composición para uso según la presente invención comprende preferiblemente al menos fructo-oligosacáridos de cadena corta y/o fructo-oligosacáridos de cadena larga, preferiblemente fructo-oligosacáridos de cadena larga. En una forma de realización, la composición para uso según la presente invención comprende preferiblemente al menos oligosacáridos de ácido urónico. En una forma de realización, la composición para uso según la presente invención comprende preferiblemente al menos beta-galacto-oligosacáridos y al menos fructo-oligosacáridos de cadena corta o fructo-oligosacáridos de cadena larga o ambos. En una forma de realización, la composición para uso según la presente invención comprende preferiblemente al menos beta-galacto-oligosacáridos y al menos oligosacáridos de ácido urónico. En una forma de realización, la composición para uso según la presente invención comprende preferiblemente al menos fructo-oligosacáridos de cadena corta y oligosacáridos de ácido urónico o fructo-oligosacáridos de cadena larga y oligosacáridos de ácido urónico. En una forma de realización, la composición para uso según la presente invención comprende preferiblemente al menos beta-galacto-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos de cadena corta y oligosacáridos de ácido urónico o al menos beta-galacto-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos de cadena larga y oligosacáridos de ácido urónico. Una mezcla de al menos dos carbohidratos no digeribles diferentes estimula ventajosamente a las bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal en un grado mayor que las basadas en un solo tipo de carbohidrato no digerible. Una mezcla de al menos dos carbohidratos no digeribles diferentes estimula ventajosamente una mayor diversidad de bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal que un solo tipo de carbohidrato no digerible. Preferiblemente, la proporción en peso entre la mezcla de dos carbohidratos no digeribles diferentes, preferiblemente beta-galacto-oligosacárido y fructo-oligosacárido, es de entre 20 y 0,05, más preferiblemente de entre 20 y 1. Los beta-galacto-oligosacáridos son más similares a los oligosacáridos de la leche humana. Preferiblemente, la presente composición comprende beta-galacto-oligosacáridos con un GP de 2-10 y/o fructo-oligosacáridos con un GP de 2-60. Se ha descubierto que esta combinación aumenta sinérgicamente las bifidobacterias y los lactobacilos. La presencia de estos tres oligosacáridos no digeribles estimula aún más las bifidobacterias. La proporción en peso de transgalacto-oligosacárido : fructo-oligosacárido : producto de degradación de pectina es preferiblemente (20 a 2) : 1 : (1 a 20), más preferiblemente (12 a 7) : 1 : (1 a 3).

[0060] Preferiblemente, la composición comprende de 80 mg a 2 g de oligosacáridos no digeribles por 100 ml, más preferiblemente de 150 mg a 1,50 g, aún más preferiblemente de 300 mg a 1 g. Sobre la base del peso en seco, la composición preferiblemente comprende del 0,25 % en peso al 20 % en peso, más preferiblemente del 0,5 % en peso al 10 % en peso, aún más preferiblemente del 1,5 % en peso al 7,5 % en peso. Una cantidad inferior de oligosacáridos no digeribles será menos eficaz en la estimulación de las bacterias beneficiosas en la microbiota, mientras que una cantidad demasiado alta dará lugar a efectos secundarios de hinchamiento e incomodidad abdominal.

#### Fórmulas

[0061] Las composiciones usadas en la presente invención son preferiblemente composiciones nutricionales y/o farmacéuticas y adecuadas para la administración a bebés. La presente composición se administra preferiblemente de forma enteral, más preferiblemente por vía oral.

[0062] Preferiblemente, la presente composición es una fórmula nutricional, preferiblemente una fórmula para lactantes. La presente composición se puede utilizar ventajosamente como una nutrición completa para bebés. La presente composición comprende preferiblemente un componente lipídico, un componente de proteína y un componente de carbohidrato y se administra preferiblemente de forma líquida. La presente invención incluye un

alimento seco (por ejemplo, polvos) que se acompaña de instrucciones sobre la mezcla de dicho alimento seco con un líquido adecuado (por ejemplo, agua).

[0063] La presente invención proporciona ventajosamente una composición donde el lípido proporciona del 5 al 50 % de las calorías totales, la proteína proporciona del 5 al 50 % de las calorías totales y el componente de carbohidrato digerible proporciona del 15 al 90 % de las calorías totales. Preferiblemente, en la presente composición el lípido proporciona del 35 al 50 % de las calorías totales, la proteína proporciona del 7,5 al 12,5 % de las calorías totales y el carbohidrato digerible proporciona del 40 al 55 % de las calorías totales. Para calcular el % de calorías totales de proteína, el total de energía proporcionado por las proteínas, hay que tener en cuenta los péptidos y los aminoácidos.

[0064] La presente composición comprende preferiblemente al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en lípidos animales (exceptuando los lípidos humanos) y lípidos vegetales. Preferiblemente, la presente composición comprende una combinación de lípidos vegetales y al menos un aceite seleccionado del grupo que consiste en aceite de pescado, aceite animal, aceite de algas, aceite fúngico y aceite bacteriano. La presente composición excluye la leche humana.

[0065] La proteína utilizada en la preparación nutricional se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en proteínas animales no humanas (preferiblemente proteínas lácteas), proteínas vegetales (preferiblemente proteína de soja y/o proteína de arroz), hidrolizados de las mismas, aminoácidos libres y sus mezclas derivadas. La presente composición contiene preferiblemente caseína, suero de leche, caseína hidrolizada y/o proteína de suero de leche hidrolizada. Preferiblemente, la proteína comprende proteínas intactas, más preferiblemente proteínas de suero de leche bovina intactas y/o proteínas de caseína bovina intactas. Dado que la presente composición se usa adecuadamente para reducir la reacción alérgica en un bebé, la proteína se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en proteína de leche hidrolizada. Preferiblemente, la presente composición comprende caseína hidrolizada y/o proteína de suero de leche hidrolizada, proteína vegetal y/o aminoácidos. El uso de estas proteínas redujo de forma adicional las reacciones alérgicas del bebé. El uso de estas proteínas hidrolizadas mejora ventajosamente la absorción del componente de proteína dietética por el intestino inmaduro del bebé nacido por cesárea.

[0066] La presente composición comprende preferiblemente carbohidratos digeribles seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, almidón y malto dextrinas, más preferiblemente lactosa.

[0067] La presente composición tiene preferiblemente una viscosidad de entre 1 y 60 mPa.s, preferiblemente de entre 1 y 20 mPa.s, más preferiblemente de entre 1 y 10 mPa.s, de la forma más preferible de entre 1 y 6 mPa.s. La viscosidad baja asegura una administración adecuada del líquido, por ejemplo, un paso apropiado a través de la totalidad de una boquilla. Además, esta viscosidad se parece mucho a la viscosidad de la leche humana. Asimismo, una viscosidad baja produce un vaciado gástrico normal y una mejor toma de energía, lo que es esencial para los bebés, ya que necesitan la energía para un crecimiento y un desarrollo óptimos. La presente composición se prepara preferiblemente mezclando una composición en polvo con agua. Normalmente, la fórmula para lactantes se prepara de este modo. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición en polvo envasada donde dicho envase dispone de instrucciones para mezclar el polvo con una cantidad adecuada de líquido, dando así como resultado una composición líquida con una viscosidad de entre 1 y 60 mPa.s. La viscosidad del líquido se determina usando un reómetro Physica MCR 300 (Physica Messtechnik GmbH, Ostfilden, Alemania) a una velocidad de cizalladura de  $95 \text{ s}^{-1}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

[0068] Las irregularidades en las deposiciones (por ejemplo, heces duras, volumen de deposición insuficiente y diarrea) son un problema importante en los bebés nacidos por cesárea. Pueden deberse al alto contenido de *E. coli* de las heces. Se ha observado que los problemas de deposición se pueden reducir administrando los presentes oligosacáridos no digeribles en un alimento líquido con una osmolalidad de entre 50 y 500 mOsm/kg, más preferiblemente de entre 100 y 400 mOsm/kg. La reducción de las irregularidades en las deposiciones mejora la colonización y el desarrollo de una microbiota intestinal sana.

[0069] En vista de lo anterior, también es importante que el alimento líquido no tenga una densidad calórica excesiva y, sin embargo, proporcione las calorías necesarias para alimentar al sujeto. Por lo tanto, el alimento líquido tiene preferiblemente una densidad calórica de entre 0,1 y 2,5 kcal/ml, aún más preferiblemente una densidad calórica de entre 0,5 y 1,5 kcal/ml, de la forma más preferible de entre 0,6 y 0,8 kcal/ml.

#### Aplicación

[0070] La presente invención proporciona, en una forma de realización, una composición nutricional enteral según la presente invención para usar en la administración a bebés nacidos por cesárea. Preferiblemente, la presente invención proporciona (i) el tratamiento y/o la prevención de un trastorno en bebés nacidos por cesárea y/o (ii) la estimulación de la salud en los bebés nacidos por cesárea. El trastorno se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en trastornos intestinales provocados por una microbiota baja en bifidobacterias. Preferiblemente, el trastorno se selecciona del grupo de la alergia, el eczema, el asma, la infección y la diarrea.

[0071] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición nutricional según la presente invención para usar en el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en alergia, eczema, asma, infección y diarrea.

5

[0072] Proporcionar al bebé recién nacido nacido por cesárea el producto derivado de la leche que es un sustrato lácteo fermentado por bacterias productoras de ácido láctico que comprende factores inmunogénicos (células inactivadas y/o fragmentos de bacterias tales como glicoproteínas, glicolípidos, peptidoglicano, ácido lipoteicoico (LTA), flagelos, lipoproteínas, ADN y/o polisacáridos capsulares), induce tolerancia a dichas bacterias, aumentando así la colonización intestinal por estas bacterias y/o puede reducir la colonización por bacterias adversas. Estos factores inmunogénicos también pueden tener un efecto directo en la estimulación del crecimiento de las bifidobacterias y/o en la disminución el crecimiento de las bacterias adversas. La inducción de tolerancia a las bacterias en el tracto intestinal produce una colonización más rápida por las bacterias deseadas, mientras, por otro lado, la ausencia de células vivas en el producto produce un aumento de la seguridad y mejora las propiedades tecnológicas del producto.

10

15

[0073] La presente invención proporciona preferiblemente un método para la prevención y/o el tratamiento de infecciones y/o trastornos infecciosos, en particular las infecciones gastrointestinales, más preferiblemente el tratamiento y/o la prevención de las infecciones provocadas por uno o más microorganismos seleccionados del grupo que consiste en *Staphylococcus* (especialmente *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemoliticus*), *Streptococcus* (especialmente *Streptococcus del grupo B*), *Clostridium* (especialmente *C. difficile*) *Bacillus* (especialmente *B. subtilis*), *Pseudomonas* (especialmente *P. aeruginosa*), *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, y *Escherichia*, preferiblemente *Escherichia coli* (*E. coli*), dicho método comprende la administración de una composición nutricional según la presente invención.

20

25

[0074] Preferiblemente, la presente composición se usa en un método para el tratamiento y/o la prevención de infecciones intestinales, inflamaciones intestinales y/o diarrea en bebés nacidos por cesárea. Preferiblemente la presente composición se usa en un método para modular el sistema inmunológico en bebés nacidos por cesárea. En otro aspecto, la presente invención proporciona, por lo tanto, un método para tratar y/o prevenir las infecciones sistémicas, las infecciones de las vías urinarias, la otitis y/o las infecciones respiratorias en bebés nacidos por cesárea, dicho método comprende la administración de una composición nutricional según la presente invención.

30

[0075] En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar y/o prevenir la alergia (particularmente la alergia alimentaria, más particularmente la alergia a la leche de vaca), el eczema atópico (por ejemplo, la dermatitis atópica), el asma, la rinitis alérgica y la conjuntivitis alérgica en bebés nacidos por cesárea, aún más preferiblemente la alergia y/o el asma, dicho método comprende la administración de una composición que comprende el presente producto fermentado derivado de la leche al bebé. Estos efectos en la salud se obtienen mediante los efectos en el sistema inmunológico, la pared intestinal y/o la microbiota intestinal.

35

40

[0076] En el contexto de la presente invención, "prevenir" una enfermedad o cierto trastorno también significa "tratar a una persona en riesgo" de contraer dicha enfermedad o dicho cierto trastorno.

[0077] La administración de la presente composición tiene como resultado la mejora de la microbiota intestinal y posteriormente la formación de ácidos orgánicos como productos finales metabólicos de fermentación microbiana. Una cantidad aumentada de ácidos orgánicos tiene como resultado una mayor producción de mucosidad, una mejor maduración intestinal y/o una mayor barrera intestinal. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir la permeabilidad de la pared intestinal en bebés nacidos por cesárea y/o para mejorar la maduración de la pared intestinal en los bebés nacidos por cesárea, donde dicho método comprende la administración de una composición que comprende un producto derivado fermentado por bacterias productoras de ácido láctico al bebé.

45

50

[0078] Preferiblemente, la presente composición se usa para inducir tolerancia en el intestino del bebé nacido por cesárea a las bacterias y/o para mejorar la colonización intestinal de la microbiota en los bebés nacidos por cesárea para alcanzar la microbiota que se halla en los bebés nacidos vaginalmente y/o para lograr una colonización rápida de una microbiota rica en bacterias productoras de ácido láctico en los bebés nacidos por cesárea.

55

[0079] La presente invención también proporciona un método para estimular el desarrollo de una microbiota intestinal sana en un bebé que comprende la etapa A: mezclar I) un líquido nutricionalmente o farmacéuticamente aceptable; y II) una composición seca, donde la composición seca II comprende el presente producto fermentado derivado de la leche; y la etapa B) administrar la composición obtenida en la etapa A a un bebé nacido por cesárea.

60

[0080] La presente composición se administra preferiblemente al bebé nacido por cesárea en el primer año de vida, preferiblemente en los primeros 3 meses después de su nacimiento, más preferiblemente en las primeras

65

seis semanas después de su nacimiento, aún más preferiblemente en las primeras dos semanas después de su nacimiento, aún más preferiblemente en la primera semana después de su nacimiento, más preferiblemente en las primeras 72 horas, de la forma más preferible en las primeras 48 horas después de su nacimiento.

5 Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto de los oligosacáridos no digeribles en la microbiota de los bebés nacidos por cesárea.

10 [0081] Se administró fórmula para lactantes enriquecida con 0,72 g/100ml de galacto-oligosacáridos (GOS) con un GP medio de entre 2 y 7 y 0,08 g/100ml de fructo-oligosacáridos con un GP medio superior a 20 (FOS, Raftilin HP®) (grupo GFSF) o fórmula para lactantes estándar sin oligosacáridos no digeribles (grupo SF).

15 [0082] Se determinó el contenido bifidobacteriano de las heces. El porcentaje del género *Bifidobacterium* como un porcentaje de las bacterias totales en la primera semana fue del 4,3 % en bebés nacidos por cesárea (n=44) frente al 19,8 % en bebés nacidos vaginalmente (n=28). En la 6ª semana, el porcentaje de bifidobacterias fue del 12,3 % en el grupo SF de bebés nacidos por cesárea (n=21) y del 17,2 % en el grupo GFSF de bebés nacidos por cesárea (n=13). El pH fecal del grupo SF de bebés nacidos por cesárea fue de 7,2 frente al 6,5 del grupo GFSF de bebés nacidos por cesárea. El porcentaje de *E. coli* fue del 11,8 % en el grupo SF de bebés nacidos por cesárea y del 0 % en el grupo GFSF de bebés nacidos por cesárea (véase la Tabla 1).

20 [0083] Estos resultados revelan que administrar oligosacáridos neutros no digeribles a bebés nacidos por cesárea (grupo GFSF) produce una flora más bifidobacteriana y reduce el contenido de bacterias potencialmente patogénicas en comparación con los bebés nacidos por cesárea que no reciben oligosacáridos no digeribles (el grupo SF). Adicionalmente, los resultados revelan una reducción del contenido de *E. coli* debida a la  
 25 administración de oligosacáridos no digeribles. Los resultados revelan el uso ventajoso de oligosacáridos no digeribles, particularmente de galacto-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos en la presente composición para mejorar aún más la presente terapia en bebés nacidos por cesárea.

30 Tabla 1: Porcentaje de *bifidobacterias* en bebés nacidos vaginalmente y por cesárea alimentados con una fórmula con (GFSF) o sin (SF) oligosacáridos no digeribles.

Bebés	<i>Bifidobacterias</i> en la primera semana (%)	<i>Bifidobacterias</i> después de 6 semanas (%)	pH fecal	<i>E. coli</i> (%)
Parto vaginal	19,8			
Cesárea SF	4,3	12,3	7,2	11,8
Cesárea GFSF	4,3	17,2	6,5	0

Ejemplo 2: Preparación de un producto derivado de la leche fermentado con *B. breve* inactivada.

35 [0084] Se obtuvo un producto fermentado con un cultivo de *B. breve* CNCM I-2219 mediante un proceso de dos etapas. Se añadió un cultivo iniciador en forma de gránulos concentrados a leche desnatada pasteurizada y se incubó durante 8 h a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas. Durante el proceso, el número de células *B. breve* aumentó aproximadamente  $3 \times 10^9$  UFC por ml y tuvo lugar una acidificación de un pH de alrededor de 6,7 a un  
 40 pH de entre 4,5 y 5,0, lo que revela que el proceso de fermentación tuvo lugar. De forma adecuada, estuvo presente cisteína en la cantidad de 0,1 a 0,5 g por l y/o extracto de levadura en una cantidad de 0,5 a 5 g/l de sustrato acuoso.

Posteriormente se diluyó este producto fermentado 10 veces en leche desnatada pasteurizada concentrada (43 % en peso de sustancia seca) con una temperatura de 37 °C. El pH inicial de la leche se redujo a 6-6,1 mediante este paso de dilución. Después de una incubación durante 8 h a 37°C en un tanque con agitación periódica  
 45 durante 10 minutos cada 2 horas, el pH se mantuvo entre 6-6,1 y la población de *B. breve* fue de  $10^9$  UFC/ml. El concentrado se pasteurizó y posteriormente se secó por pulverización y se llamó BbC50cf. La cantidad de células de *B. breve* vivas estaba por debajo del límite de detección ( $< 10^3$  UFC/g).

50 Ejemplo 3: Efecto sinérgico del producto derivado de la leche fermentado con *B. breve* inactivadas y oligosacáridos no digeribles en el aumento de la respuesta de Th1 en un modelo de vacunación en murinos.

Métodos:

55 [0085] Se evaluó el efecto de las dietas que comprenden (a) BbC50cf preparada según el Ejemplo 2; (b) una combinación de galacto-oligosacáridos (Elixor) y fructo-oligosacáridos (Raftilin HP); y (c) una combinación de (a) y (b), en un modelo de ratón donde una respuesta a un antígeno se mide por una respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH). Esta respuesta de DTH en las orejas después de la exposición local a un antígeno presente en una vacuna es una medida de la proliferación celular de Th1. Durante la respuesta a una infección y/o vacuna, las células de Th1 proliferan en respuesta a la exposición al antígeno. Estas células Th1 infiltran la oreja cuando  
 60 la oreja se expone posteriormente al antígeno y provocan una inflamación. La infiltración con las células de Th1

en la oreja dura aproximadamente 24 h y, por lo tanto, la inflamación se retarda. Cuantas más células de Th1 proliferan durante la vacuna y/o infección inicial, más DTH se observa después de la exposición al antígeno.

Se liofilizó la BbC50cf y se usó en la dieta de ratón en una concentración final de 3 % en peso. La mezcla de oligosacárido no digerible (GF) con transgalacto-oligosacáridos (GOS) (fuente Vivinal-GOS (Borculo Domo Ingredients, Países Bajos)) y fructo-oligosacárido (FPS) (fuente RaftilineHP, Orafiti, Tiense, Bélgica) se usó en una proporción en peso GOS : FPS de 9: 1. Se evaluaron dietas con un 1 % en peso de GF sobre la base del peso total de la dieta de ratón. Se evaluaron los efectos de una combinación de oligosacáridos no digeribles y una mezcla fermentada por *B. breve* (GF más BbC50cf) en una dieta con un 1 % en peso de GF y un 3 % en peso de BbC50cf sobre la base del peso total de la dieta.

[0086] Se alojó en grupo a ratones hembra de 6 semanas de edad C57B1/6 (Harlan Nederland BV, Horst, Países Bajos) bajo un régimen corriente de 12 de horas de luz/oscuridad. El tamaño de los grupos fue de 10 animales por grupo y de 3 animales en los grupos de control negativo. Los animales recibieron dietas semisintéticas (Research Diet Services, Wijk bij Duurstede, Países Bajos). Se hicieron dietas de control según las especificaciones AIN93G (Reeves et al (1993) J Nutrition 123 (11): 1923-31), las dietas enriquecidas con oligosacárido se basaron en estas especificaciones.

[0087] Las vacunaciones comenzaron después de un periodo de 20 días de adaptación a las dietas y el alojamiento nuevos. El día 0, se recogió una muestra sanguínea antes de la vacunación. El día 1, se administró de forma subcutánea la primera vacuna. Tres semanas después, se administró una vacuna de refuerzo (día 22). Nueve días después de la inyección de refuerzo (día 31), se midió el espesor basal de la oreja con un micrómetro de exteriores Digimatic (Mitutoyo, Veenendaal, Países Bajos) y se indujo una respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) inyectando la solución de antígeno i. c. (de forma intracutánea) en el pabellón auricular del ratón. 24 h después (día 32), se midió la respuesta de DTH, se tomó una muestra sanguínea y se sacrificó a los ratones. Este es el grosor de la oreja después de 24 h restado con el grosor de la oreja a t=0.

[0088] Las vacunas consistieron en una inyección i. c. (intracutánea) de 100 µl de una mezcla 1: 1 de solución de antígeno y adyuvante Stimune (Specol, Cedi-diagnostics BV, Lelystad, Países Bajos). La solución antigénica fue una dilución 1: 100 de Influvac 2002/2003 (Solvay Pharmaceuticals, Weesp, Países Bajos) en PBS (tampón fosfato salino). Influvac es una vacuna de proteína trivalente, que contiene 3x3011 g/ml de hemaglutinina de tres cepas de gripe diferentes. Para las respuestas de DTH, se inyectó i. c. a los ratones 25 µl de Influvac dializado en ambas orejas como una exposición para una prueba de DTH.

Resultados:

[0089] Las dietas con dosificaciones de un 1 % en peso de GF o un 3 % en peso de BbC50cf produjeron un ligero aumento estadísticamente no significativo en la respuesta de DTH. La combinación de un 1 % en peso de GF y un 3 % en peso de BbC50cf produjo un aumento estadísticamente significativo del 89 % en la respuesta de DTH (véase la Tabla 2). Dado que el efecto es significativamente mayor en las respuestas DTH de las dietas que contenían únicamente oligosacáridos y también mucho mayor en las basadas en el efecto aditivo del GF y la BbC50cf, que se puede calcular como un aumento del 49 % en la DTH, estos resultados reflejan el efecto sinérgico proporcionado por la administración de oligosacáridos no digeribles y la BbC50cf en el aumento de la respuesta de Th1. El efecto observado revela el uso ventajoso de una combinación de al menos dos carbohidratos no digeribles diferentes y un producto obtenido fermentando un producto derivado de la leche que comprende bacterias productoras de ácido láctico inactivadas en los presentes usos.

Tabla 2: Respuesta de DTH

Grupo:	DTH media µm (S.E.)	Δ DTH µm	DTH relativa
Simulación	-1,7 (4,6)	0	0
Placebo	67,6 (14,9)	69,3	1,00
GF	73,55 (8,6)	75,25	1,09
BbC50cf	95,55 (5,5)	97,25	1,40
GF+BbC50cf	129,4* (17,1)	131,1	1,89
GF+BbC50cf teóricamente	101,50	103,2	1,49

\* significativamente diferente del control (P < 0,01).

Ejemplo 4: Efecto sinérgico del producto fermentado derivado de leche con *B. breve* inactivadas y oligosacáridos no digeribles en la reducción de la respuesta de Th2 en un modelo de alergia en murinos.

Métodos

[0090] El efecto de las dietas, como en el ejemplo 3, se evaluó en un modelo de ratón donde una respuesta a un alérgeno se mide mediante una respuesta de hipersensibilidad inmediata (ITH). Esta respuesta de ITH en las orejas después de una exposición a un alérgeno en los pulmones es una forma de medir un aumento en la respuesta de Th2. Durante la respuesta al alérgeno en los pulmones, los mastocitos sufren una degranulación sistemática casi de forma inmediata, incluyendo en las orejas. Todas estas reacciones implican IgE que, a su vez, requiere una respuesta Th2 durante el desarrollo de las células T auxiliares. Por lo tanto, una ITH refleja un aumento de la IgE y, por lo tanto, un aumento de la respuesta de Th2.

Los ratones macho libres de patógenos específicos BALB/c se obtuvieron de Charles River (Maastricht, Países Bajos). El alimento y el agua se proporcionaron a voluntad y los ratones se usaron cuando tenían 6-9 semanas de edad. La ovalbúmina (clase V) y el cloruro de acetil-β-metilcolina (metacolina) se compraron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). El hidróxido de aluminio (AlumImject) se compró en Pierce (Rockford, IL, EE.UU.).

Se evaluaron las mismas dietas que en el ejemplo 3 durante 14 días antes de la sensibilización a la OVA (ovalbúmina) hasta el final experimento. Se sensibilizó a los ratones con dos inyecciones i.p. de 10 µg de ovalbúmina adsorbida en 2,25 mg de hidróxido de aluminio en 100 µl de solución salina o solución salina únicamente en los días 0 y 7. Se expuso a los ratones los días 35, 38 y 41 mediante inhalación de aerosoles de ovalbúmina en una cámara de exposición de plexiglás durante 20 minutos. Los aerosoles se generaron nebulizando una solución de ovalbúmina (10 mg/ml) en la solución salina mediante un nebulizador Pari LC Star (Pari respiratory Equipment, Richmond, VA, EE.UU.). Se midió la ITH 1 h después de la exposición a la ovalbúmina alérgena.

Resultados

[0091] Los resultados en la ITH se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3: respuesta de ITH

Grupo:	ITH media µm (S.E.)	Δ ITH µm	ITH relativa
Control	104,3 (3,8)	0	0
Placebo	184,7 (8,7)	80,4	1
GF	159,8 (17,9)*	55,5	0,69
BbC50cf	173,1 (20,3)	68,8	0,86
GF+BbC50cf	136,6 (14,4)**	32,3	0,40
GF+BbC50cf teóricamente	151,7	47,4	0,59

\* significativamente diferente del control (\*P < 0,05 y \*\* P < 0,01).

[0092] Las dietas con dosificaciones de un 1 % en peso de GF o un 3 % en peso de BbC50cf indujeron una ligera reducción en la respuesta de ITH. La combinación de un 1 % en peso de GF más un 3 % en peso de BbC50cf indujo una reducción estadísticamente significativa de aproximadamente el 60 % en la respuesta de ITH (véase la Tabla 3). Dado que el efecto es significativamente mayor que las respuestas de ITH de las dietas que contenían oligosacáridos únicamente y también mucho mayor que las basadas en el efecto aditivo del GF y la BbC50cf, que se puede calcular como una reducción del 40 % de la ITH, estos resultados revelan el efecto sinérgico proporcionado por la administración de oligosacáridos no digeribles y un producto fermentado derivado de la leche en la reducción de la respuesta de Th2. El efecto observado revela el uso ventajoso de una combinación de oligosacáridos no digeribles y un producto obtenido mediante la fermentación de un sustrato derivado de la leche con bifidobacterias y posteriormente la inactivación y/o eliminación de las bifidobacterias de modo que la cuenta sea inferior a 1 10<sup>3</sup> UFC/g en los presentes usos. Los resultados de este experimento revelan que la presente invención puede usarse ventajosamente como apoyo en la prevención y/o el tratamiento de, en particular, el asma, la alergia, la dermatitis atópica, la conjuntivitis alérgica, la alergia a los ácaros, la urticaria y la rinitis alérgica.

Ejemplo 5: Composición para bebés nacidos por cesárea

[0093] Se preparó una fórmula para lactantes que comprendía, por 100 g de material seco: 13 g de proteína (80 % de caseína y 20 % de suero de leche); 25,5 g de grasa vegetal; 42,25 g de lactosa; 16 g de maltodextrina; 3 g de minerales; 0,25 g de vitaminas.

[0094] Se añadió grasa vegetal a la leche de vaca calentada a 75°C. La mezcla se homogeneizó en dos etapas, la primera a 200 kg.s/cm<sup>2</sup>, la segunda a 50 kg.s/cm<sup>2</sup>. Se añadieron soluciones acuosas de lactosa y maltodextrina y vitaminas y minerales. La composición se pasteurizó a 115°C y se concentró mediante evaporación hasta el 48 % de material seco. El concentrado se enfrió hasta los 37°C y se fermentó con un 5 %

de un cultivo de *B. breve* 1-2219 que contenía  $10^9$  bacterias/ml y se incubó durante 8 h a 37°C. Posteriormente, el concentrado se pasteurizó de nuevo.

5 [0095] El concentrado se secó por pulverización y la adición de 140 g por litro de agua proporcionó una fórmula láctea para lactantes reconstituida. Se incluyeron oligosacáridos no digeribles para alcanzar 0,72 g de beta-galacto-oligosacáridos y 0,08 g de inulina por 100 ml de fórmula lista para beber. El envase y/o material de soporte que acompaña al producto indica que el producto puede usarse adecuadamente para a) estimular la colonización intestinal con bacterias beneficiosas, b) prevenir y/o tratar infecciones en bebés nacidos por cesárea; y/o c) prevenir y/o tratar la alergia en bebés nacidos por cesárea.

10 Ejemplo 6: Composición para bebés nacidos por cesárea

15 [0096] Se preparó una fórmula para lactantes que comprende 21 g/l de proteína, 24 g/l de grasa, 83 g/l de carbohidratos, 8 g/l de oligosacáridos no digeribles, 5 g/l de minerales, 0,45 g/l de vitaminas.

20 [0097] Se añadió grasa a leche esterilizada UHT a 70°C y la mezcla se homogeneizó en dos etapas, la primera a 200 kg/cm<sup>2</sup>, la segunda a 50 kg/cm<sup>2</sup>. A 37°C la mezcla se inoculó con un 1,5 % de un cultivo de *B. breve* 1-2219 con  $1$  a  $5 \times 10^9$  bacterias/ml y se fermentó durante 8 h a 37°C. A continuación, la mezcla se enfrió a 5°C. Los demás ingredientes se disolvieron en el agua y se añadieron al producto resultante. La composición comprendía, por 100 ml de fórmula preparada para beber, 0,72 g de beta-galacto-oligosacáridos y 0,08 g de inulina de cadena larga y/o de cadena corta.

[0098] La mezcla resultante se esterilizó a temperatura ultra alta (UHT) a 140°C durante 6 a 7 segundos y se envasó asépticamente.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición nutricional que comprende
- 10 a) un producto derivado de la leche, donde dicho producto derivado de la leche es un sustrato lácteo fermentado por bacterias productoras de ácido láctico y dicho sustrato lácteo comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en leche, suero de leche, proteína de suero de leche, hidrolizado de proteína de suero de leche, caseína, hidrolizado de caseína y/o lactosa,
- 15 b) menos de  $10^3$  UFC de bacterias productoras de ácido láctico por g de peso en seco de la composición, y
- c) al menos dos oligosacáridos no digeribles seleccionados del grupo que consiste en fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, arabino-oligosacáridos, manano-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, fuco-oligosacáridos, arabinogalacto-oligosacáridos, glucomanano-oligosacáridos, galactomanano-oligosacáridos, oligosacáridos que comprenden ácido siálico y oligosacáridos de ácido urónico.
- 20 2. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde dichas bacterias productoras de ácido láctico comprenden *Bifidobacterium breve* y/o *Streptococcus thermophilus*, preferiblemente *Bifidobacterium breve*, más preferiblemente *B. breve* CNCM I-2219.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la composición comprende galacto-oligosacáridos y/o fructo-oligosacáridos.
- 25 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la composición comprende del 0,5 al 10 % en peso de oligosacáridos no digeribles sobre la base del peso en seco de la composición.
- 30 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la composición comprende proteína, carbohidrato y grasa, donde la proteína proporciona del 5 al 25 % de las calorías totales, la grasa proporciona del 25 al 60 % de las calorías totales y el carbohidrato digerible proporciona del 30 al 70 % de las calorías totales.
- 35 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la composición tiene una viscosidad de 1 a 6 mPa.s a una velocidad de cizalladura de  $95 \text{ s}^{-1}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- 40 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el producto derivado de la leche se puede obtener mediante un proceso que incluye las etapas de:
- a) inocular bacterias productoras de ácido láctico en un medio acuoso que comprende sustrato lácteo en una cantidad de entre  $1 \times 10^2$  y  $5 \times 10^{10}$  UFC de bacterias productoras de ácido láctico/ml, donde dicho medio acuoso tiene un pH de aproximadamente entre 4 y 8 y comprende al menos un sustrato lácteo seleccionado del grupo que consiste en leche, suero de leche, proteína de suero de leche, hidrolizado de proteína de suero de leche, caseína, hidrolizado de caseína, y/o lactosa,
- 45 b) incubar dicha mezcla bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas a una temperatura de aproximadamente  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante al menos 2 h, y
- c) inactivar y/o eliminar físicamente las células vivas de bacterias productoras de ácido láctico del medio acuoso.
- 50 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición es adecuada para ser administrada enteralmente a un bebé nacido por cesárea durante la semana posterior a su nacimiento.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para usar en uno seleccionado del grupo que consiste en:
- 55 I) el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en alergia, eczema, asma, infección y diarrea en bebés nacidos por cesárea, y
- II) la inducción de tolerancia intestinal a las bacterias productoras de ácido láctico en bebés nacidos por cesárea, y/o para usar para mejorar la colonización de una microbiota rica en bacterias productoras de ácido láctico en bebés nacidos por cesárea.
- 60 10. Composición nutricional que comprende
- 65 a) un producto derivado de la leche, donde dicho producto derivado de la leche es un sustrato lácteo fermentado por bacterias productoras de ácido láctico y donde dicho sustrato lácteo comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en leche, suero de leche, proteína de suero de leche, hidrolizado de proteína de suero de leche, caseína, hidrolizado de caseína y/o lactosa, y

b) menos de  $10^3$  UFC de bacterias productoras de ácido láctico por g de peso en seco de la composición, para uso para uno seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 I) el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en alergia, eczema, asma, infección y diarrea en bebés nacidos por cesárea,  
II) inducción de tolerancia intestinal a las bacterias productoras de ácido láctico en bebés nacidos por cesárea y/o para usar para mejorar la colonización de una microbiota rica en bacterias productoras de ácido láctico en bebés nacidos por cesárea.

10 11. Composición para uso según la reivindicación 10 donde el producto derivado de la leche se puede obtener mediante un proceso que incluye las etapas de:

- 15 a) inocular bacterias productoras de ácido láctico en un medio acuoso que comprende sustrato lácteo en una cantidad de entre  $1 \times 10^2$  y  $5 \times 10^{10}$  UFC de bacterias productoras de ácido láctico/ml, donde dicho medio acuoso tiene un pH de aproximadamente entre 4 y 8 y comprende al menos un sustrato lácteo seleccionado del grupo que consiste en leche, suero de leche, proteína de suero de leche, hidrolizado de proteína de suero de leche, caseína, hidrolizado de caseína y/o lactosa,  
20 b) incubar dicha mezcla bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas a una temperatura de aproximadamente 20 °C a 50 °C durante al menos 2 h, y  
c) inactivar y/o eliminar físicamente las células vivas de las bacterias productoras de ácido láctico del medio acuoso.

25 12. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 10-11 que comprende además proteína, carbohidrato y grasa, donde la proteína proporciona del 5 al 25 % de las calorías totales, la grasa proporciona del 25 al 60 % de las calorías totales y el carbohidrato digerible proporciona del 30 al 70 % de las calorías totales.

30 13. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 10-12 que comprende además al menos un oligosacárido no digerible seleccionado del grupo que consiste en fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, arabino-oligosacáridos, manano-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, fuco-oligosacáridos, arabinogalacto-oligosacáridos, glucomanano-oligosacáridos, galactomanano-oligosacáridos, oligosacáridos que comprenden ácido siálico y oligosacáridos de ácido urónico.

35 14. Composición para uso según la reivindicación 13 donde el oligosacárido no digerible se selecciona del grupo que consiste en galacto-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos.

15. Composición para uso según la reivindicación 13 o 14 que comprende del 0,5 al 10 % en peso de oligosacárido no digerible sobre la base del peso en seco de la composición.