

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 606**

51 Int. Cl.:

A23L 33/135 (2006.01)
A23L 33/125 (2006.01)
A23L 33/21 (2006.01)
A23L 33/22 (2006.01)
A61K 31/733 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A23L 29/30 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2008** **PCT/NL2008/050376**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2008** **WO08153391**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008** **E 08766799 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018** **EP 2162020**

54 Título: **Composición nutricional con bifidobacteria no viable y oligosacárido no digerible**

30 Prioridad:

15.06.2007 WO PCT/NL2007/050290

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HOUGEE, SANDER;
VRIESEMA, ADRIANUS JOHANNES MARIA;
GARSSEN, JOHAN y
KNOL, JAN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 706 606 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 con bifidobacteria no viable y oligosacárido no digerible

Campo de la invención

- 5 [0001] La presente invención se refiere al campo de la nutrición para bebés y/o niños pequeños. En particular, la presente invención se refiere a una composición nutricional para bebés y/o niños pequeños con oligosacáridos no digeribles y bifidobacterias no viables. Tal composición nutricional se usa ventajosamente para tratar o evitar alergias, preferiblemente alergias alimentarias, y/o enfermedades atópicas, incluyendo la dermatitis atópica y/o el asma.

Antecedentes de la invención

- 10 [0002] Un bebé humano alimentado con leche humana desarrollará después del nacimiento una microbiota intestinal rica en bacterias productoras de ácido láctico. Esto se debe a la presencia de sacáridos no digeribles en la leche humana que son específicamente fermentados por bacterias productoras de ácido láctico, especialmente bifidobacterias.
- 15 [0003] Una microbiota rica en bifidobacterias es beneficiosa, ya que tiene un efecto preventivo en infecciones, diarrea, estreñimiento, inflamación gastrointestinal, maduración intestinal, alergias, en particular alergias alimentarias, enfermedades atópicas, incluyendo dermatitis atópica, y asma, y tiene un efecto beneficioso en el sistema inmunitario.
- 20 [0004] Las fórmulas para niños pequeños se pueden adaptar para imitar el efecto bifidogénico de la leche humana. WO 2005039319 divulga el uso de *Bifidobacterium breve* vivas y una mezcla de dos sacáridos no digeribles diferentes para mejorar la microbiota de bebés alimentados con fórmula. El documento divulga la relevancia de las bifidobacterias a nivel de género, al igual que a nivel de especie. WO 20070046698 divulga el uso de una composición que comprende oligosacáridos no digeribles para la producción de una composición para administración enteral a un bebé nacido por cesárea. Se deben coadministrar bacterias acidolácticas vivas para aumentar la diversidad y/o la cantidad de microorganismos en el intestino del bebé nacido por cesárea. JP 01242532 divulga el uso de *B. breve* viables o no viables como un inmunopotenciador que estimula las placas de Peyer, previniendo así las infecciones del tracto intrainestinal y las alergias. Este documento no se refiere a fórmulas nutricionales para bebés y/o niños pequeños.
- 25

Resumen de la invención

- 30 [0005] La invención se describe mejor mediante las reivindicaciones. Se sabe que las células de *B. breve* vivas pueden mejorar la microbiota y mejorar así las alergias. Sin embargo, se prefiere el uso de *B. breve* no viable. Esto tiene varias ventajas:
- 35 1) Un producto que comprende *B. breve* no viable se puede almacenar más fácilmente y con costes reducidos, ya que no han de tomarse precauciones especiales para mantener la viabilidad de las células de *B. breve* a un nivel aceptable. Este es especialmente el caso en productos con una actividad de agua por encima de 0,3.
- 40 2) No se produce ninguna postacidificación debido a la ausencia de capacidad fermentativa de *B. breve* en productos almacenados con una alta actividad de agua y/o en la fórmula infantil en el periodo posterior a la reconstitución con agua y anterior al consumo.
- 3) Después de la producción, la composición nutricional final con *B. breve* no viable se puede pasteurizar y/o esterilizar, reduciendo consecuentemente la posibilidad de contaminación con microorganismos nocivos, tal como *E. sakazakii*. Así, la presente invención permite que una fórmula líquida lista para usar que comprende *B. breve* no viable se prepare y se almacene a temperatura ambiente.
- 4) Un producto en polvo con *B. breve* no viable se puede reconstituir con agua con una temperatura por encima de 37°C, si se desea.
- 45 5) La dosis de células de *B. breve* recibidas por cada bebé y/o niño pequeño se puede controlar más fácilmente, ya que no se produce crecimiento adicional en un producto líquido, ni crecimiento en el tracto intestinal del bebé. Este último es un factor variable que depende del entorno intestinal del individuo y lleva así a variaciones en el alcance de los efectos beneficiosos en bebés individuales.

- 50 [0006] Los inventores han descubierto sorprendentemente que la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños que comprende oligosacáridos no digeribles se pueden suplementar ventajosamente con células de *Bifidobacterium breve* no viables para obtener un efecto preventivo y/o curativo en las alergias alimentarias y/u

otras enfermedades atópicas. El efecto de *Bifidobacterium breve* no viable en composiciones fue comparable al de células de *B. breve* viables. El efecto antialérgico observado de *B. breve* inactivada no se puede explicar por un efecto probiótico directo, tal como un efecto a través de la mejora de la flora, ya que las células ya no están vivas y, por lo tanto, no aumentan el número de células de *B. breve* en la microbiota. Hasta el momento, se ha supuesto que los efectos beneficiosos de *B. breve* son dependientes de la presencia de células vivas.

[0007] El efecto de las células de *B. breve* no viables fue comparable, pero ligeramente menor que el de *B. breve* vivas. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que el efecto de *B. breve* no viable podría incluso mejorarse aún más con la presencia de oligosacáridos no digeribles. Esto es inesperado, ya que generalmente, en preparaciones simbióticas, el oligosacárido no digerible presente estimula las bacterias probióticas presentes y muestran así un efecto mejorado. Los inventores han descubierto de forma inesperada que, también en preparaciones que comprenden *B. breve* inactivada, que no son capaces de usar y beneficiarse de los oligosacáridos no digeribles presentes, también se halló un efecto mejorado de la combinación en comparación con los compuestos individuales.

[0008] Los oligosacáridos no digeribles estimulan la microbiota intestinal del bebé y/o el niño pequeño, especialmente la cantidad de bifidobacterias y/o lactobacilos. La mejora simultánea de la microbiota por oligosacáridos no digeribles de los bebés y/o niños pequeños alimentados con fórmula, a la vez que se administra *B. breve* no viable, produce un efecto mejorado en la prevención y/o el tratamiento de trastornos, tal como un efecto preventivo en infecciones, diarrea, estreñimiento, inflamación gastrointestinal, maduración intestinal, alergias, particularmente alergias alimentarias, dermatitis atópica y/o asma.

Descripción detallada de la invención

[0009] La presente invención se refiere a una composición nutricional para bebés y/o niños pequeños que comprende un oligosacárido no digerible A y/o B, teniendo dicho oligosacárido no digerible un grado de polimerización de 2 a 200, *Bifidobacterium breve* no viable en una cantidad equivalente a 10^3 a 10^{11} ufc de *B. breve* por g de peso seco de la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños, y que comprende menos de 10^3 *Bifidobacterium breve* viables por g de peso seco de la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños.

[0010] En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para alimentar a un bebé y/o niño pequeño.

[0011] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar y/o prevenir alergias, preferiblemente alergias alimentarias, y/o enfermedades atópicas, incluyendo eczema atópico y/o asma, comprendiendo dicho método la administración de la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños a un sujeto.

[0012] En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para tratar y/o prevenir infecciones, comprendiendo dicho método la administración de la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños a un sujeto.

[0013] En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para tratar y/o prevenir una dermatitis del pañal, comprendiendo dicho método la administración de la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños a un sujeto.

[0014] En otras palabras, la presente invención se refiere al uso de la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños para la producción de una composición o composición nutricional para el tratamiento y/o prevención de alergias, preferiblemente alergias alimentarias, enfermedades atópicas incluyendo eczema atópico y/o asma, o, en otras palabras, la presente invención se refiere a la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños para uso en el tratamiento y/o la prevención de alergias, preferiblemente alergias alimentarias, eczema atópico y/o asma.

[0015] También alternativamente redactado, la presente invención se refiere al uso de la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños para la producción de una composición o composición nutricional para el tratamiento y/o prevención de infecciones o, en otras palabras, la presente invención se refiere a la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños para uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones.

[0016] También redactado de forma alternativa, la presente invención se refiere al uso de la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños para la producción de una composición o composición nutricional para el tratamiento y/o la prevención de la dermatitis del pañal o, en otras palabras, la presente invención se refiere a

la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños para uso en el tratamiento y/o la prevención de la dermatitis del pañal.

Bifidobacterium breve

5 [0017] *Bifidobacterium breve* es una bacteria gram-positiva anaeróbica en forma de bastón ramificado. La presente *B. breve* tiene preferiblemente al menos un 95% de identidad con la secuencia del ARNr 16S cuando se compara con la cepa tipo *B. breve* ATCC 15700, más preferiblemente al menos un 97% de identidad (Stackebrandt & Goebel, 1994, Int. J. Syst. Bacteriol. 44:846-849). La bifidobacteria incluida en la composición y los métodos y usos de la presente invención híbrida preferiblemente con la sonda de *B. breve* y da una señal con el método de ensayo de nucleasa 5' como se describe en WO 2005039319.

10 [0018] Las cepas de *B. breve* preferidas son aquellas aisladas de las heces de bebés alimentados con leche humana sanos. Típicamente, estas están disponibles comercialmente de productores de bacterias acidolácticas, pero también se pueden aislar directamente de heces, identificarse, caracterizarse y producirse. Según una forma de realización preferida, la presente composición contiene al menos una *B. breve* seleccionada del grupo que
15 consiste en *B. breve* Bb-03 (Rhodia/Danisco), *B. breve* M-16V (Morinaga), *B. breve* R0070 (Institute Rosell, Lallemant), *B. breve* BR03 (Probiotal), *B. breve* BR92 (Cell Biotech), DSM 20091 y LMG 11613. De la forma más preferible, la *B. breve* no viable es *B. breve* M-16V (Morinaga) no viable. De la forma más preferible, la *B. breve* no viable es de la cepa *B. breve* 1-2219 depositada en el CNCM en París, Francia.

20 [0019] La presente composición comprende una cantidad de *Bifidobacterium breve* no viable equivalente a al menos 10^3 ufc por g de peso seco de la composición. La presente composición comprende *B. breve* no viable en un equivalente de 10^3 a 10^{13} unidades formadoras de colonias (ufc) de *B. breve* por gramos de peso seco de la presente composición, preferiblemente de 10^4 a 10^{12} , más preferiblemente de 10^5 a 10^{11} , de la forma más preferible el equivalente de 10^5 a 10^{10} ufc de *B. breve* por gramos de peso seco de la presente composición. Preferiblemente, la presente composición comprende *B. breve* no viable en un equivalente de 10^4 a 10^{13} , más
25 preferiblemente de 10^5 a 10^{12} , de la forma más preferible el equivalente de 10^6 a 5×10^{11} unidades formadoras de colonias (ufc) de *B. breve* por g del total de oligosacárido no digerible. La dosis de *B. breve* no viable según la presente invención se administra preferiblemente a una dosis diaria del equivalente de 10^4 a 10^{14} , más preferiblemente de 10^5 a 10^{13} , aún más preferiblemente el equivalente de 10^6 a 10^{12} , de la forma más preferible 10^8 a 5×10^{11} unidades formadoras de colonias (ufc). Cuando la composición es un líquido, la composición comprende preferiblemente el equivalente de 10^4 a 10^{14} unidades formadoras de colonias (ufc) de *B. breve* no
30 viable por 100 ml de la presente composición, preferiblemente de 10^5 a 10^{13} , más preferiblemente de 10^6 a 10^{12} , de la forma más preferible el equivalente de 10^6 a 10^{11} ufc de *B. breve* por 100 ml de la presente composición.

[0020] Una cantidad de *Bifidobacterium breve* no viable equivalente a al menos 10^3 ufc por g de peso seco significa *Bifidobacterium breve* no viable en una cantidad que es la equivalencia de una cantidad de al menos 10^3 ufc de *B. breve* por g de peso seco.

35 [0021] El equivalente de ufc se puede determinar realizando el ensayo de nucleasa 5' con las sondas y los cebadores de *B. breve* como se describe en WO 2005039319 en el producto (es decir, una fórmula para lactantes) que comprende *B. breve* no viable y comparar esto con una curva de calibración obtenida a partir de un producto comparable (por ejemplo, una fórmula para lactantes estándar) al que se le han añadido cantidades conocidas de ufc de *B. breve* viable. Las bifidobacterias viables secas se pueden obtener comercialmente como
40 se ha descrito anteriormente. El valor de ufc en la curva de calibración hecha con *B. breve* viable o viva que tiene la misma respuesta al ensayo de nucleasa 5' que el producto que comprende la *B. breve* inactivada se considera que es la cantidad equivalente en ufc de *B. breve* no viable. Alternativamente, la cantidad de ufc por g de peso seco se puede determinar en una composición justo antes de la etapa de inactivación.

45 [0022] La presencia de una alta cantidad de bifidobacterias todavía produciría una postacidificación en fórmulas infantiles líquidas. La presente composición comprende por lo tanto menos de 10^3 ufc de bifidobacterias viables, preferiblemente menos de 10^2 , más preferiblemente menos de 10 ufc por g de peso seco de la composición. Cuando está en forma de un líquido, la presente composición comprende preferiblemente menos de 10^4 ufc de bifidobacterias viables, preferiblemente menos de 10^3 , más preferiblemente menos de 10^2 ufc por 100 ml. Las ufc de bifidobacterias viables puede determinarse idóneamente como se describe en Ingham, S. C., 1999, J. Food
50 Prot. 62 (1) p. 77-80. Preferiblemente, la composición no comprende en absoluto ninguna ufc de *B. breve* viva medible. La ausencia total de *B. breve* vivas es, sin embargo, difícil o imposible de determinar. Adecuadamente, la ausencia de *B. breve* vivas por métodos de cultivo se puede determinar como que están por debajo del límite de detección. Este límite de detección es 10^3 ufc/g de peso seco de la composición.

55 [0023] *B. breve* no viables como en la presente aplicación se refiere a *B. breve* muertas, *B. breve* no cultivables, *B. breve* que no crecen y/o *B. breve* (metabólicamente) inactivas. Las células de *B. breve* se pueden hacer no

viables por métodos conocidos en la técnica, incluyendo etapas de tratamiento térmico (incluyendo esterilización, pasteurización, tratamiento UHT), radiación (UV), tratamiento con oxígeno, tratamiento con bactericidas tal como etanol, sonicación, aplicación de presión ultraelevada, homogeneización a alta presión y uso de un disruptor celular. Preferiblemente, la *B. breve* se mata por calor.

[0024] La presencia de *B. breve* no viables previene ventajosamente y/o trata al menos un trastorno seleccionado del grupo que consiste en infecciones, diarrea, estreñimiento, inflamación gastrointestinal, trastornos causados por una maduración intestinal alterada, alergias (alimentarias), dermatitis atópica, eczema y asma, a la vez que proporciona muchos beneficios tecnológicos de los productos, incluyendo una mayor vida útil, una menor incidencia de contaminación bacteriana, una menor postacidificación del producto, un mejor control de la dosificación y una mejor conveniencia de la reconstitución.

Oligosacáridos no digeribles

[0025] La presente composición comprende un oligosacárido no digerible A y/o B. El oligosacárido no digerible A y/o B estimula preferiblemente el crecimiento de las bacterias intestinales productoras de ácido láctico, particularmente bifidobacterias y/o lactobacilos y, por lo tanto, estimula la formación de una microbiota intestinal sana, y se fermenta preferiblemente a ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos formados estimulan la producción de moco y, por lo tanto, mejoran aún más la función de barrera intestinal y/o la maduración en bebés. Por lo tanto, la presencia de oligosacárido no digerible A y/o B tiene un efecto ventajoso en infecciones, alergias y/o enfermedades atópicas. Ventajosamente, el oligosacárido no digerible A y/o B es hidrosoluble (según el método descrito en L. Prosky et al, J. Assoc. Anal. Chem 71: 1017-1023, 1988) y es un oligosacárido con un grado de polimerización (GP) de 2 a 200. El GP (medio) del oligosacárido no digerible A y/o B está preferiblemente por debajo de 200, más preferiblemente por debajo de 100, aún más preferiblemente por debajo de 60, de la forma más preferible por debajo de 40. El oligosacárido no digerible A y/o B no se digiere en el intestino por la acción de las enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo superior humano (intestino delgado y estómago). El oligosacárido no digerible A y/o B se fermenta preferiblemente por la microbiota intestinal humana. Por ejemplo, la glucosa, la fructosa, la galactosa, la sacarosa, la lactosa, la maltosa y las maltodextrinas se consideran digeribles. Las materias primas de los oligosacáridos pueden comprender monosacáridos tales como glucosa, fructosa, fucosa, galactosa, ramnosa, xilosa, ácido glucurónico, GalNac etc., pero estas no son parte de los oligosacáridos según la presente invención.

[0026] El oligosacárido no digerible A y/o B incluido en las composiciones y los métodos y usos según la presente invención incluye una mezcla de oligosacáridos no digeribles. Esto es práctica común, debido a que el uso de oligosacáridos no digeribles con, por ejemplo, longitud de una cadena es muy caro. Preferiblemente, el oligosacárido no digerible se selecciona del grupo que consiste en fructo-oligosacárido (incluyendo inulina), dextrina no digerible, galacto-oligosacárido (incluyendo transgalacto-oligosacárido), xilo-oligosacárido, arabino-oligosacárido, arabinogalacto-oligosacárido, gluco-oligosacárido (incluyendo gentio-oligosacárido y ciclodextrina), glucomano-oligosacárido, galactomano-oligosacárido, manano-oligosacárido, quito-oligosacárido, oligosacárido de ácido urónico, sialiloligosacárido (incluyendo 3-SL, 6-SL, LSTa,b,c, DSLNT, S-LNH, DS-LNH) y fuco-oligosacárido (incluyendo fucoidano (no) sulfatado OS, 2-FL, 3-FL, LNFP I, II, III, V, LNnFPI, LNDH) y sus mezclas, más preferiblemente fructo-oligosacárido (incluyendo inulina), galacto-oligosacárido (incluyendo transgalacto-oligosacárido, con enlaces α y preferiblemente β , oligosacárido de ácido urónico y fuco-oligosacárido) y sus mezclas, aún más preferiblemente transgalacto-oligosacárido y/o inulina, de la forma más preferible transgalacto-oligosacárido. Cuando el oligosacárido no digerible A y/o B es una mezcla, las medias de los respectivos parámetros se usan para definir la presente invención.

[0027] La presente invención proporciona preferiblemente una composición con dos oligosacáridos no digeribles diferentes, es decir, oligosacárido no digerible A y oligosacárido no digerible B. El oligosacárido no digerible A y el oligosacárido no digerible B tienen preferiblemente un tipo diferente de enlace glicosídico, un grado diferente de polimerización y/o una composición monosacárida diferente.

[0028] Según una forma de realización preferida de la presente invención, el porcentaje de un monosacárido particular en el oligosacárido no digerible A es al menos un 40% en número superior al porcentaje del mismo monosacárido en el oligosacárido no digerible B, preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 75%, aún más preferiblemente al menos un 90%. Una mayor diversidad de monosacáridos estimula una población más amplia de bacterias intestinales beneficiosas. El porcentaje de un monosacárido en el oligosacárido no digerible se puede calcular sencillamente dividiendo el número de las respectivas unidades monosacáridas (por ejemplo, glucosa) en el oligosacárido no digerible entre el número total de unidades monosacáridas de ese oligosacárido no digerible y multiplicándolo por 100. Cuando el oligosacárido no digerible es una mezcla de oligosacáridos no digeribles, debe tenerse en cuenta la aportación de cada unidad monosacárida individual en la mezcla de oligosacáridos no digeribles. El porcentaje de un monosacárido en una mezcla de oligosacáridos no digeribles puede determinarse sencillamente hidrolizando completamente la mezcla y determinando el porcentaje en número para cada monosacárido. Preferiblemente, el oligosacárido no digerible

A contiene al menos un 40% en número de galactosa, más preferiblemente al menos un 67% de galactosa, más preferiblemente al menos un 75% de galactosa. Preferiblemente, el oligosacárido no digerible B contiene al menos un 30% en número de fructosa, más preferiblemente al menos un 67% de fructosa, aún más preferiblemente al menos un 80% de fructosa.

5 [0029] Según una forma de realización preferida de la presente invención, el GP medio de oligosacárido no digerible A es al menos 5 unidades monosacáridas inferior al GP medio de oligosacárido no digerible B, preferiblemente al menos 10, aún más preferiblemente al menos 15. Preferiblemente, el oligosacárido no digerible A tiene un GP medio de 2-10, más preferiblemente 3-5. Preferiblemente, el oligosacárido no digerible B tiene un GP medio por debajo de 200, más preferiblemente 11-60, aún más preferiblemente 20-30. La inclusión de un
10 oligosacárido no digerible con un mayor grado de polimerización reduce la carga osmótica, lo que es ventajoso para una composición nutricional infantil y/o mejora la estimulación prebiótica de la microbiota intestinal también en partes más distales del colon. Los oligosacáridos no digeribles A y B con un GP diferente pueden tener la misma composición monosacárida o una diferente. Preferiblemente, los oligosacáridos no digeribles A y B tienen una composición monosacárida diferente y un GP diferente.

15 [0030] Preferiblemente al menos un 80% en peso, más preferiblemente al menos un 95% en peso, de la forma más preferible al menos un 98% en peso del peso acumulativo de los oligosacáridos no digeribles A y B tiene un GP por debajo de 60, más preferiblemente por debajo de 40, de la forma más preferible por debajo de 20. El menor GP reduce ventajosamente la viscosidad y aumenta la fermentabilidad de los oligosacáridos no digeribles. Preferiblemente al menos un 50% en peso, preferiblemente al menos un 75% en peso del peso acumulativo de
20 los oligosacáridos no digeribles A y B son oligosacáridos no digeribles con un GP de 2-8. Usando una mezcla con un alto porcentaje en peso de oligosacáridos no digeribles pequeños, se aumenta la fermentabilidad y el efecto estimulador en el crecimiento de las bacterias acidolácticas y bifidobacterias.

[0031] En otra forma de realización preferida de la presente invención, el porcentaje de al menos un enlace glicosídico de oligosacárido no digerible A en base a los enlaces glicosídicos totales del oligosacárido no digerible
25 A es al menos un 40% mayor o inferior al porcentaje del mismo enlace glicosídico en el oligosacárido B, preferiblemente al menos un 50%, aún más preferiblemente al menos un 75%. El término "enlace glicosídico" como se usa en la presente invención se refiere a un enlace C-O-C formado entre los anillos de dos monosacáridos cíclicos mediante la eliminación de agua. Una mayor diversidad de enlaces glicosídicos estimula una gama más amplia de bacterias beneficiosas. Los enlaces glicosídicos difieren en que unen de manera
30 covalente átomos de carbono de las unidades monosacáridas en posiciones numeradas de manera diferente, y/o en que forman enlaces α o β . Ejemplos de diferentes enlaces glicosídicos que ocurren en sacáridos no digeribles son enlaces $\beta(1,3)$, $\alpha(1,4)$, $\beta(2,1)$, $\alpha(1,2)$ y $\beta(1,4)$. Preferiblemente, los enlaces glicosídicos en el oligosacárido no digerible A comprenden al menos un 40% de enlaces glicosídicos $\beta(1,4)$ y/o $\beta(1,6)$, más preferiblemente al menos un 75%. Los enlaces glicosídicos en el oligosacárido no digerible B comprenden preferiblemente al menos un
35 40% de enlaces glicosídicos $\beta(2,1)$, más preferiblemente al menos un 75%. Preferiblemente, los oligosacáridos no digeribles A y B difieren en la composición de unidades monosacáridas y en el tipo de enlace glicosídico. Preferiblemente, los oligosacáridos no digeribles A y B difieren en el tipo de enlace glicosídico y el GP. De la forma más preferible, los oligosacáridos no digeribles A y B difieren en el tipo de enlace glicosídico, la composición monosacárida y el GP, para mejorar de manera óptima la biodiversidad y estimular el crecimiento de
40 múltiples organismos intestinales, especialmente especies diferentes de *Bifidobacterium*.

[0032] Preferiblemente, al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 75%, aún más preferiblemente un 90%, de la forma más preferible un 98% de las unidades monosacáridas totales de los oligosacáridos no digeribles A y B son monosacáridos seleccionados del grupo que consiste en los monosacáridos galactosa (gal), fructosa (fru) y glucosa (glu).

45 [0033] El oligosacárido no digerible A es preferiblemente un oligosacárido seleccionado del grupo que consiste en β -galacto-oligosacárido, α -galacto-oligosacárido y galactano. Según una forma de realización más preferida, el oligosacárido no digerible A es β -galacto-oligosacárido o transgalacto-oligosacárido. Preferiblemente, el oligosacárido no digerible A comprende galacto-oligosacáridos con enlaces glicosídicos $\beta(1,4)$ y/o $\beta(1,6)$ y una glucosa terminal. El transgalacto-oligosacárido está disponible, por ejemplo, bajo el nombre comercial
50 Vivinal®GOS (Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Países Bajos), Bi2muno (Clasado), Cup-oligo (Nissin Sugar) y Oligomate55 (Yakult).

[0034] El oligosacárido no digerible B es preferiblemente un fructo-oligosacárido. Un fructo-oligosacárido puede, en otro contexto, tener nombres como fructopolisacáridos, oligofructosa, polifructosa, polifructano, inulina, levano y fructano y puede referirse a oligosacáridos que comprenden unidades de fructosa con enlaces β , que se
55 enlazan preferiblemente mediante enlaces glicosídicos $\beta(2,1)$ y/o $\beta(2,6)$, y un GP preferiblemente entre 2 y 200. Preferiblemente, el fructo-oligosacárido contiene una glucosa terminal con enlace glicosídico $\beta(2,1)$. Preferiblemente, el fructo-oligosacárido contiene al menos 7 unidades de fructosa con enlace β . En otra forma de realización preferida, la inulina se usa como oligosacárido no digerible B. La inulina es un tipo de fructo-

oligosacárido en el que al menos un 75% de los enlaces glicosídicos son enlaces $\beta(2,1)$. Típicamente, la inulina tiene una longitud de cadena media entre 8 y 60 unidades monosacáridas. Un fructo-oligosacárido adecuado para uso en las composiciones de la presente invención está comercialmente disponible bajo el nombre comercial Raftiline®HP (Orafti). Otras fuentes adecuadas son Raftilose (Orafti), Fibrulose y Fibruline (Cosucra) y Frutafit y Frutalose (Sensus).

[0035] Son más preferidos un transgalacto-oligosacárido con un GP medio por debajo de 10, preferiblemente por debajo de 6, como oligosacárido no digerible A y un fructo-oligosacárido con un GP medio por encima de 7, preferiblemente por encima de 11, aún más preferiblemente por encima de 20, como oligosacárido no digerible B, ya que tal combinación resultó ser óptima para mejorar la microbiota intestinal.

[0036] Si la composición comprende los oligosacáridos no digeribles A y B, la proporción en peso de oligosacárido no digerible A con relación al oligosacárido no digerible B es preferiblemente de 1/99 a 99/1, más preferiblemente de 1/19 a 19/1, aún más preferiblemente de 1 a 19/1. Esta proporción en peso es particularmente ventajosa cuando el oligosacárido no digerible A tiene un bajo GP y el oligosacárido no digerible B tiene un GP relativamente alto. Esto asegura un equilibrio óptimo entre osmolalidad y fermentabilidad. También asegura un efecto óptimo de la diversidad en la composición monosacárida, los enlaces glicosídicos y/o el grado de polimerización. Preferiblemente, el oligosacárido A es un transgalacto-oligosacárido y el oligosacárido B es un fructo-oligosacárido.

[0037] Así, según una forma de realización de la presente composición nutricional infantil, comprende los oligosacáridos no digeribles A y B, en la que los oligosacáridos no digeribles A y B difieren:

- i) en el porcentaje de al menos un monosacárido del oligosacárido A en base a las unidades monosacáridas totales del oligosacárido A, siendo el monosacárido al menos un 40 % en número mayor que el porcentaje del mismo monosacárido en el oligosacárido B; y/o
- ii) en el porcentaje de al menos un enlace glicosídico del oligosacárido A en base a los enlaces glicosídicos totales del oligosacárido A, siendo el enlace glicosídico al menos un 40% mayor que el porcentaje del mismo enlace glicosídico en el oligosacárido B; y/o
- iii) en el grado de polimerización del oligosacárido A, siendo el grado de polimerización del oligosacárido A al menos 5 unidades monosacáridas inferior al grado de polimerización del oligosacárido B.

[0038] En una forma de realización preferida, la presente composición comprende además un oligosacárido no digerible C. El oligosacárido no digerible C comprende oligosacáridos de ácido urónico. El término oligosacárido de ácido urónico como se usa en la presente invención se refiere a un oligosacárido en el que al menos un 50% en número de las unidades monosacáridas presentes en el oligosacárido es uno seleccionado del grupo que consiste en ácido gulurónico, ácido manurónico, ácido galacturónico, ácido idurónico, ácido riburónico y ácido glucurónico. En una forma de realización preferida, el oligosacárido de ácido urónico comprende al menos un 50% en número de ácido galacturónico en base a las unidades de ácido urónico totales en el oligosacárido de ácido urónico. Los oligosacáridos de ácido urónico usados en la invención se obtienen preferiblemente de la degradación de pectina, pectato, alginato, condroitina, ácidos hialurónicos, heparina, heparano, carbohidratos bacterianos y/o sialoglicanos, más preferiblemente de pectina y/o alginato, aún más preferiblemente de pectina, de la forma más preferible ácido poligalacturónico. Preferiblemente, la pectina degradada se prepara por hidrólisis y/o beta-eliminación de pectinas de la fruta y/o vegetales, más preferiblemente pectina de manzana, cítricos y/o remolacha azucarera, aún más preferiblemente pectina de manzana, cítricos y/o remolacha azucarera degradada por al menos una liasa.

[0039] Preferiblemente, la presente composición comprende entre un 25 y un 100% en peso, más preferiblemente entre un 50 y un 100% en peso de oligosacárido de ácido urónico con un GP de 2 a 250 en base al peso total del oligosacárido de ácido urónico en la composición, más preferiblemente un GP de 2 a 100, aún más preferiblemente un GP de 2 a 50, de la forma más preferible un GP de 2 a 20 en base al peso total del oligosacárido de ácido urónico en la composición.

[0040] En una forma de realización preferida, al menos una de las unidades de ácido hexurónico terminales del oligosacárido de ácido urónico tiene un doble enlace. El doble enlace protege eficazmente contra la fijación de bacterias patógenas a las células epiteliales intestinales. Esto es ventajoso para los bebés. Preferiblemente, una de las unidades de ácido hexurónico terminales comprende el doble enlace C4-C5. El doble enlace en la unidad de ácido hexurónico terminal puede, por ejemplo, obtenerse por hidrólisis enzimática de la pectina con liasa.

[0041] El oligosacárido de ácido urónico puede derivarse. El oligosacárido de ácido urónico se puede metoxilar y/o amidar. En una forma de realización, los oligosacáridos de ácido urónico se caracterizan por un grado de metoxilación por encima de un 20%, preferiblemente por encima de un 50%, aún más preferiblemente por encima de un 70%. Como se utiliza en la presente, "grado de metoxilación" (también referido como GE o "grado de

esterificación") pretende significar la extensión a la que los grupos de ácido carboxílico libres contenidos en el oligosacárido de ácido urónico se han esterificado (por ejemplo, por metilación).

[0042] Preferiblemente, la composición comprende los oligosacáridos no digeribles transgalacto-oligosacárido, fructo-oligosacárido y un producto de la degradación de la pectina. La proporción en peso del transgalacto-oligosacárido:fructo-oligosacárido:producto de degradación de la pectina es preferiblemente (20 a 2):1:(1 a 3), más preferiblemente (12 a 7):1:(1 a 2).

[0043] La presente composición comprende preferiblemente de un 0,05 a un 20% en peso de oligosacárido no digerible (A + B + C), más preferiblemente de un 0,5 a un 15% en peso, aún más preferiblemente de un 1 a un 10% en peso, más preferiblemente de un 2,0 a un 10% en peso, en base al peso seco de la presente composición.

Fórmulas

[0044] La presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños se administra preferiblemente por vía enteral, más preferiblemente por vía oral. La presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños se usa preferiblemente como una fórmula infantil. La presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños puede aplicarse ventajosamente como una composición nutricional completa para bebés. Tal alimento comprende preferiblemente lípidos, proteínas y carbohidratos y se administra preferiblemente en forma líquida. Preferiblemente, la composición es un alimento líquido listo para usar, por ejemplo, está en una forma líquida lista para tomar. Un alimento líquido listo para usar envasado implica ventajosamente menos etapas para la preparación que un polvo para reconstituir y, por lo tanto, una posibilidad reducida de contaminación por microorganismos nocivos.

[0045] Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición nutricional para bebés y/o niños pequeños que comprende preferiblemente entre un 5 y un 50% en. de lípidos, entre un 5 y un 50% en. de proteínas, entre un 15 y un 90% en. de carbohidratos y B. breve no viables y los oligosacáridos no digeribles A y/o B y, opcionalmente, C. Preferiblemente, la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños comprende entre un 35 y un 50% en. de lípidos, entre un 7,5 y un 12,5% en. de proteínas y entre un 35 y un 80% en. de carbohidratos (% en. es la forma abreviada de porcentaje de energía y representa la cantidad relativa de cada constituyente que contribuye al valor calórico total de la preparación).

[0046] Preferiblemente, la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños comprende lípidos. Preferiblemente, la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños comprende lípidos vegetales. Preferiblemente, el componente lípidico es una combinación de lípidos vegetales y al menos un aceite seleccionado del grupo que consiste en aceite de pescado, animal, de algas y bacteriano. Preferiblemente, el lípido comprende más de 50 mg/100 kcal (preferiblemente, más de un 1% en peso en base a los ácidos grasos totales) de ácido α -linolénico (ALA). Preferiblemente, la composición lípidica tiene una proporción peso/peso de ácido linoleico (LA) y ALA entre 4 y 15, más preferiblemente entre 5 y 8. Preferiblemente, la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños comprende ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), más preferiblemente ácido eicosapentanoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA) y/o ácido araquidónico (ARA). Preferiblemente, la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños comprende, en base a los ácidos grasos totales, de un 0,03 a un 0,8% en peso, más preferiblemente de un 0,12 a un 0,4% en peso de DHA. Preferiblemente, la composición comprende, en base a los ácidos grasos totales, de un 0,01 a un 0,2% en peso, más preferiblemente de un 0,03 a un 0,1% en peso de EPA. Preferiblemente, la composición comprende de un 0,03 a un 1,6% en peso, más preferiblemente de un 0,12 a un 0,8% en peso de ARA en base a los ácidos grasos totales. La presencia de LC-PUFA reduce ventajosamente la permeabilidad intestinal o mejora el sistema inmunitario o las dos cosas, ejercitando así un efecto sinérgico con los otros componentes de la invención con respecto a un efecto contra alergias, dermatitis atópica, infecciones y similares.

[0047] Preferiblemente, la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños comprende proteínas. Las proteínas usadas en la preparación nutricional se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en proteínas animales no humanas (tales como proteínas de la leche, incluyendo caseínas y proteínas de suero de leche, proteínas de carne y proteínas de huevos), proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz, proteína de patata y proteína de guisante), hidrolizados (total y/o parcialmente y/o exhaustivamente), aminoácidos libres y sus mezclas. Se prefieren particularmente fuentes de nitrógeno derivadas de leche de vaca, particularmente proteínas de la leche de vaca tales como caseína y proteínas de suero de leche, ya que la composición de aminoácidos de estas proteínas está bien equilibrada. Como la presente composición se usa adecuadamente para reducir la reacción alérgica en un bebé y/o niño pequeño, la proteína de la composición nutricional infantil se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en proteína hidrolizada de la leche (por ejemplo, caseína hidrolizada y/o proteína de suero de leche hidrolizada), proteína vegetal hidrolizada y/o aminoácidos. El uso de estas proteínas reduce además las reacciones alérgicas del bebé y/o el niño pequeño.

y/o aumenta la absorción de proteínas. Preferiblemente, la fuente de proteínas se hidroliza exhaustivamente y/o parcialmente. Más preferiblemente, la fuente de proteínas es proteína de suero de leche exhaustivamente hidrolizada derivada de leche de vaca.

5 [0048] Preferiblemente, la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños comprende carbohidratos digeribles. Los carbohidratos digeribles usados en la preparación nutricional se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en sacarosa, lactosa, maltosa, galactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, almidón y maltodextrinas, y sus mezclas, más preferiblemente lactosa.

10 [0049] La presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños comprende preferiblemente minerales, oligoelementos y vitaminas, colina, taurina, carnitina, mioinositol y/o sus mezclas. Preferiblemente, la presente composición contiene taurina, que reduce los síntomas del asma (Adv. Exp. Med. Biol. 2003 526:403-10). La taurina actúa sinérgicamente con los componentes de la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños. Preferiblemente, la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños comprende nucleótidos. Preferiblemente, la composición comprende citidina 5'-monofosfato, uridina 5'-monofosfato, adenosina 5'-monofosfato, guanosina 5'-monofosfato e inosina 5'-monofosfato. Preferiblemente, la presente
15 composición nutricional para bebés y/o niños pequeños comprende de un 0,005 a un 0,07, más preferiblemente de un 0,01 a un 0,035% en peso de nucleótidos en base al peso seco. La presencia de nucleótidos afecta ventajosamente al sistema inmunitario, la barrera intestinal y/o la microbiota intestinal. Así, se espera que los nucleótidos ejerzan un efecto sinérgico con los otros componentes de la invención con respecto a un efecto contra alergias, dermatitis atópica, infecciones y similares. Preferiblemente, la presente composición nutricional
20 para bebés y/o niños pequeños comprende tanto LC-PUFA como nucleótidos.

[0050] Preferiblemente, la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños es una composición no fermentada. La fermentación por microorganismos produce una disminución del pH, lo que puede ser desventajoso para los dientes recién formados. Preferiblemente, la composición tiene un pH por encima de 5,5, más preferiblemente 6,0, aún más preferiblemente 6,5, para reducir el daño a los dientes. Preferiblemente, la
25 composición nutricional para bebés y/o niños pequeños tiene un pH de entre 6 y 8.

[0051] Preferiblemente, la presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños es una composición fermentada. Preferiblemente, la presente composición nutricional comprende un producto derivado de la leche fermentado por *Bifidobacterium breve*, de la cual se inactivan las células después de la fermentación. El producto derivado de la leche que ha sido fermentado por *B. breve* comprende fragmentos y/o productos excretados de *B. breve*, tales como glicoproteínas, glicolípidos, peptidoglicano, ácido lipoteicoico (LTA), lipoproteínas, polisacáridos capsulares y/o ADN. Estas moléculas inmunogénicas inducen la tolerancia del tracto intestinal frente a la colonización con bacterias productoras de ácido láctico. Además, tras la fermentación y/u otras interacciones de *B. breve* con los productos derivados de la leche, se pueden formar compuestos bioactivos adicionales, tales como péptidos bioactivos y/u oligosacáridos, que estimulan también el sistema inmunitario y/o estimulan la colonización de la microbiota intestinal. El producto derivado de la leche se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en leche, caseína, proteína de caseína, hidrolizado de proteínas de caseína, péptidos de caseína, suero de leche, proteína de suero de leche, hidrolizado de proteínas de suero de leche, péptidos de suero de leche y lactosa o sus mezclas. 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 sustrato acuoso que
30 va a fermentarse es leche desnatada.
35
40

[0052] Las irregularidades de deposición (por ejemplo, heces duras, volumen de deposición insuficiente, diarrea) es un gran problema en muchos bebés. Se ha observado que se pueden reducir los problemas de deposición administrando la presente combinación de *B. breve* no viable y un oligosacárido no digerible en el alimento líquido que tiene una osmolalidad de entre 50 y 500 mOsm/kg, más preferiblemente entre 100 y 400 mOsm/kg.

45 [0053] En vista de lo anterior, también es importante que la composición alimenticia líquida no tenga una densidad calórica excesiva, pero aún así proporcione calorías suficientes 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 0,4 y 1,2 kcal/ml, de la forma más preferible entre 0,55 y 0,75 kcal/ml.

50 [0054] La presente composición nutricional para bebés y/o niños pequeños tiene preferiblemente una viscosidad de entre 1 y 60 mPa·s, preferiblemente entre 1 y 20 mPa·s, más preferiblemente entre 1 y 10 mPa·s, de la forma más preferible entre 1 y 6 mPa·s. La baja viscosidad asegura una administración apropiada del líquido, por ejemplo, un paso apropiado a través del agujero de una tetina. Además, esta viscosidad se parece mucho a la viscosidad de la leche humana. Además, una viscosidad baja produce un vaciado gástrico normal y una mejor toma de energía, lo que es esencial para bebés y/o niños pequeños que necesitan la energía para un crecimiento y desarrollo óptimos. La presente composición se prepara preferiblemente mediante la mezcla de una
55 composición en polvo con agua. Normalmente, la fórmula infantil se prepara de tal manera. La presente invención

también se refiere así a una composición en polvo empaquetada donde dicho paquete dispone de instrucciones para mezclar el polvo con una cantidad adecuada de líquido, resultando así en una composición líquida con una viscosidad de entre 1 y 60 mPa·s.

5 [0055] La viscosidad del líquido se determina usando un reómetro Physica MCR 300 (Physica Messtechnik GmbH, Ostfilden, Alemania) a una velocidad de cizalladura de 95 s^{-1} a 20°C .

10 [0056] La inclusión de *B. breve* no viable aumenta la vida útil de la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños, en particular en comparación con la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños que comprende *B. breve* viable. Esto es ventajoso particularmente para la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños líquida. Así, la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños según la presente invención es preferiblemente estable a la conservación a temperatura ambiente durante al menos 6 meses, preferiblemente al menos 12 meses, preferiblemente cuando la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños está en una forma líquida lista para tomar.

Aplicaciones

15 [0057] Se ha observado que la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños según la presente invención es particularmente útil como una composición nutricional para bebés nacidos prematuramente, bebés nacidos maduros (por parto vaginal, al igual que bebés nacidos por cesárea), bebés que están en el periodo de adaptación a alimentos sólidos, bebés y/o niños pequeños con un mayor riesgo de o que sufren alergias, y/o bebés y/o niños pequeños con un mayor riesgo de infecciones, tales como bebés y/o niños pequeños que asisten a guarderías, o que padecen infecciones. La invención es particularmente ventajosa para bebés nacidos por parto vaginal. La invención es particularmente ventajosa para los bebés nacidos por cesárea, ya que estos bebés tienen una colonización microbiana del intestino grueso alterada.

25 [0058] Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para proporcionar nutrición a un bebé y/o niño pequeño humano, comprendiendo dicho método la administración de la presente composición al bebé y/o niño pequeño. Preferiblemente, el bebé y/o niño pequeño tiene una edad de entre 0 y 36 meses, aún más preferiblemente entre 0 y 18 meses, más preferiblemente entre 0 y 12 meses. En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un método para proporcionar nutrición a un bebé humano con la edad de 0-12 meses. En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un método para proporcionar nutrición a un niño pequeño humano con la edad de 12-36 meses.

30 [0059] La presente invención proporciona también un método para estimular la salud de un bebé y/o niño pequeño, que comprende la administración de una composición que comprende *B. breve* no viable y un oligosacárido no digerible A y/o B y, opcionalmente, C al bebé y/o niño pequeño.

35 [0060] La presente invención proporciona también así un método para estimular la salud de un bebé y/o niño pequeño que comprende la etapa a) mezcla de i) un líquido en particular nutricionalmente o farmacéuticamente aceptable; y ii) una composición seca, en la que la composición seca II comprende *B. breve* y un oligosacárido no digerible A y/o B y opcionalmente C, y la etapa b) administración de la composición obtenida en la etapa a) a un bebé y/o niño pequeño.

40 [0061] La administración de una composición nutricional infantil que comprende *B. breve* no viable y un oligosacárido no digerible produce ventajosamente la mejora de la microbiota intestinal mediante el aumento de los números de las bacterias productoras de ácido láctico y/o mediante la disminución de los números de bacterias patógenas y/o mediante la estimulación del sistema inmunitario. Preferiblemente, una composición nutricional para bebés y/o niños pequeños que comprende *B. breve* no viable y oligosacáridos no digeribles A y/o B y, opcionalmente, C se usa en un método para el tratamiento y/o la prevención de trastornos gastrointestinales y/o trastornos inmunitarios en bebés y/o niños pequeños, comprendiendo dicho método la administración de dicha composición a un bebé y/o niño pequeño.

45 [0062] Se pueden tratar adecuadamente con la presente composición nutricional en particular alergias (más particularmente, alergias alimentarias), rinitis alérgica, hipersensibilidad alimentaria, dermatitis atópica, es decir, eczema alérgico o atópico, particularmente piel pruriginosa causada por dermatitis, conjuntivitis alérgica, asma, particularmente sibilancias causadas por asma, diarrea, inflamación intestinal, infecciones, estreñimiento, calambres intestinales y/o cólicos. En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o la prevención de alergias (alimentarias), rinitis alérgica, hipersensibilidad alimentaria, eczema (es decir, dermatitis atópica), asma, diarrea, inflamación intestinal y/o infecciones. Preferiblemente, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o la prevención de infecciones y/o diarrea. En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o la prevención de alergias (alimentarias), asma y/o dermatitis atópica. La frecuencia reducida de

estas enfermedades se debe a una microbiota mejorada, un sistema inmunitario mejorado y/o una translocación reducida de los alérgenos a través de la barrera intestinal. En una forma de realización, la composición se utiliza para mejorar la piel y reducir el picor de la piel de un bebé y/o niño pequeño. En una forma de realización, la composición se utiliza para reducir las sibilancias en un bebé y/o niño pequeño.

[0063] Además, la administración de una composición nutricional para bebés y/o niños pequeños que comprende *B. breve* no viable y un oligosacárido no digerible fortalece el sistema inmunitario. En una forma de realización, una composición nutricional para bebés y/o niños pequeños que comprende *B. breve* no viable y un oligosacárido no digerible A y/o B y, opcionalmente, C se usa en un método para el tratamiento o la prevención de infecciones sistémicas y/o respiratorias y/o la inflamación en bebés y/o niños pequeños, comprendiendo dicho método la administración de dicha composición nutricional infantil a un bebé y/o un niño pequeño.

[0064] Preferiblemente, una composición nutricional para bebés y/o niños pequeños que comprende *B. breve* no viable y un oligosacárido no digerible A y/o B y, opcionalmente, C se usa en un método para el tratamiento o la prevención de dermatitis del pañal (o erupciones del pañal, erupciones del área del pañal, dermatitis del área del pañal), en bebés y/o niños pequeños, comprendiendo dicho método la administración de dicha composición nutricional infantil a un bebé y/o un niño pequeño.

[0065] Preferiblemente, una composición nutricional para bebés y/o niños pequeños que comprende *B. breve* no viable y un oligosacárido no digerible A y/o B y, opcionalmente, C se usa en un método para el tratamiento o la prevención de cólicos y/o calambres abdominales, hinchamiento abdominal, flatulencia, dolor abdominal, estreñimiento, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, y/o para la mejora de la mineralización ósea y/o la prevención de la obesidad a edades más avanzadas (particularmente obesidad central) en bebés y/o niños pequeños, comprendiendo dicho método la administración de dicha composición nutricional infantil a un bebé y/o un niño pequeño.

[0066] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para referirse a que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos no mencionados específicamente. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. Por tanto, el artículo indefinido "un" o "una" significa normalmente "al menos uno".

Ejemplos

Ejemplo 1: *B. breve* no viable tiene un efecto antialérgico

(Ejemplo de referencia)

[0067] Se obtuvieron ratones BALB/C machos (6-8 semanas) de Charles River (Somerren, Países Bajos). Los ratones se alojaron individualmente en jaulas tipo II con alimento semisintético (AING93) basados en la formulación de crecimiento del American Institute of Nutrition (1993) y agua, ambos proporcionados *ad libitum*. Los ratones se dividieron en los diferentes grupos de tratamiento A-D (N=6) y cada grupo se dividió en dos cohortes de 3 animales por cohorte. La segunda cohorte comenzó con un retraso de una semana.

[0068] La sensibilización activa se realizó mediante dos inyecciones intraperitoneales el día 0 y el día 7. Los ratones del grupo de control negativo (grupo A) se sensibilizaron con suero salino tamponado con fosfato (PBS) que contenía 2,25 mg de hidróxido de aluminio y 2,25 de hidróxido de magnesio como adyuvante (Alum Imject, Pierce) en un volumen de 100 µl por inyección i.p. Los ratones de los otros grupos se sensibilizaron con 10 µg de ovalbúmina (OVA) en PBS (filtrado por 0,2 µm) que contenía 2,25 mg de hidróxido de aluminio y 2,25 mg de hidróxido de magnesio (Alum Imject, Pierce) en un volumen de 100 µl por inyección i.p.

[0069] Cuatro semanas después de la última inyección (los días 35, 38 y 41), los ratones de los grupos B, C y D se expusieron durante 20 minutos a ovalbúmina pulverizada (10 mg/ml) (completamente 3 veces un aerosol durante 20 minutos). Los ratones del grupo A se expusieron a solución salina pulverizada. Los aerosoles se generaron con un nebulizador Jet (Pari IS-2, Pari-Werk GmbH, Starnberg, Alemania, tamaño de partícula de 2-3 micras) conectado a una jaula de macrolón en la que se colocaron los ratones.

[0070] Empezando el día 28 y finalizando el día 42, los ratones se trataron por vía oral a diario: los ratones de los grupos A y B recibieron 200 µl de NaCl/día. Los ratones del grupo C recibieron 10⁹ ufc de *Bifidobacterium breve* M16-V en 200 µl de solución salina y los ratones del grupo D recibieron la misma cantidad de bacterias que el grupo C con la diferencia de que se inactivó por calor durante 10 minutos a 90°C. La composición C comprendía

menos de 10^3 ufc de *B. breve* viva por g de peso seco (es decir, por debajo del límite de detección). La composición C comprendía *B. breve* inactivada en una cantidad equivalente a 10^9 ufc de *B. breve*.

[0071] El día 41 se determinó el espesor auricular basal utilizando un calibrador de resorte (Mitutoyo, Veenendaal, Países Bajos). Posteriormente, los ratones se estimularon mediante inyección de 20 µl de OVA (40 µg/ml en PBS) por vía intracutánea en el pabellón auricular de ambas orejas después de que se anestesiara a los animales con isoflurano, O₂ y N₂O. Se tomaron mediciones dobles de ambas orejas antes y 1, 6 y 24 horas después del estímulo con OVA bajo anestesia de los animales.

[0072] Los resultados se muestran en la tabla 1.

[0073] El control negativo mostró un aumento del grosor de la oreja de aproximadamente un 20% en comparación con el control positivo, que se estableció como el 100%. El tratamiento con *B. breve* viable mostró solo un 45% de aumento del grosor de la oreja. Esto indica una reducción de la reacción alérgica de aproximadamente un 70% en comparación con los controles negativo y positivo. La *B. breve* no viable resultó en un 60% de aumento del grosor de la oreja. Esto indica una reducción de la reacción alérgica de aproximadamente un 52% en comparación con los controles negativo y positivo. Estos resultados son indicativos de un efecto antialérgico y/o de mejora inmunitaria de *B. breve* no viable en un grado comparable (aproximadamente un 75%) a células de *B. breve* viables. Esto es sorprendente, ya que no se espera que *B. breve* inactivada tenga tal efecto, pues no puede tener un efecto a través de la mejora de la flora.

Tabla 1: porcentaje del aumento del grosor de la oreja debido a una reacción alérgica a ovalbúmina en ratones balb/c.

Grupo de tratamiento de ratones	Aumento relativo de la oreja en % (e.e.)	Reducción relativa de la reacción alérgica en %
Grupo A, control negativo	20,49 (9,83)	100
Grupo B, control positivo	100 (6,86)	0
Grupo C, tratamiento con <i>B. breve</i> viva	45,13 (8,64)*	69
Grupo D, tratado con <i>B. breve</i> no viable	58,60 (13,12)*	52
* p < 0,05 en comparación con el control positivo.		

Ejemplo 2: la combinación de *B. breve* no viable y oligosacáridos no digeribles tiene un efecto antialérgico mejorado en comparación con los componentes individuales.

[0074] Se obtuvieron ratones CH3/HeOuJ (3-5 semanas) de Charles River. Los ratones se alojaron individualmente en jaulas tipo II con alimento semisintético libre de proteínas de la leche de vaca y agua, ambos proporcionados *ad libitum*. Los ratones se dividieron en los diferentes grupos de tratamiento A-E (N=6) durante 2 semanas. Los diferentes grupos de tratamiento A-E (N=6) fueron un grupo de control negativo (grupo A), un grupo de control positivo (grupo B), un grupo que recibía 2×10^9 ufc de *Bifidobacterium breve* M16-V, inactivadas por calor durante 10 minutos a 90°C, por g de dieta (grupo C), un grupo que recibía 20 mg de oligosacáridos no digeribles (TOS (derivado de Vivinal GOS, Borculo Domo) y IcFOS (Raftilin HP, Orafiti) en una proporción p/p de 9/1 por g de dieta (grupo D), y un grupo que recibía tanto *B. breve* inactivada por calor y oligosacáridos no digeribles (grupo E). La dieta de los grupos C y D comprende así *B. breve* inactivada en una cantidad equivalente a 2×10^9 ufc por g de dieta. La composición comprende menos de $1 \cdot 10^3$ ufc de *B. breve* viva/g de dieta (que está por debajo del límite de detección).

[0075] La sensibilización activa se realizó por alimentación forzada intragástrica los días 14, 21, 28, 35, 42 y 49 con 0,5 ml de proteína de suero de leche (DMV International, Veghel, 40 mg de proteína de suero de leche/ml de PBS, con toxina de cólera, 20 µg/ml de PBS, como un adyuvante). Los ratones del grupo de control negativo (grupo A) se sensibilizaron con PBS (suero salino tamponado con fosfato) que contenía toxina de cólera como adyuvante.

[0076] El día 54, los ratones de los grupos A, B, C, D y E se estimularon mediante inyección intradérmica de 20 µl de proteína de suero de leche (0,5 mg de proteína/ml de PBS) en el pabellón auricular izquierdo. Se inyectó PBS en la oreja derecha como un control. El grosor de la oreja se midió por duplicado utilizando un micrómetro digital

(Mitutuyo, Veenendaal) a t=0 y t=1. La inflamación a t=0 y de la oreja derecha de control se sustrajeron del grosor medido en la oreja izquierda a t=1.

5 [0077] Los resultados se muestran en la tabla 2. El control negativo mostró un aumento del grosor de la oreja de 36,0 μm (establecido como el 0%) en comparación con el control positivo, 159,9 μm , que se estableció como el 100%. El tratamiento con *B. breve* no viable mostró solo un aumento del grosor de la oreja de 116,0 μm . Esto indica una reducción de la reacción alérgica de aproximadamente un 35% en comparación con los controles negativo y positivo. El uso de oligosacáridos no digeribles resultó en un aumento de 103,8 μm del grosor de la oreja. Esto indica una reducción de la reacción alérgica de aproximadamente un 45% en comparación con los controles negativo y positivo. La combinación de *B. breve* no viable y oligosacáridos no digeribles resultó en un aumento del grosor de la oreja de solo 80,4. Esto indica una reducción mejorada inesperada de la reacción alérgica de un 64% en comparación con los controles negativo y positivo.

Tabla 2: aumento del grosor de la oreja medio debido a una reacción alérgica a la proteína de suero de leche en ratones.

Grupo de tratamiento de ratones	Aumento de oreja en μm (e.e.)	Reducción relativa de la reacción alérgica en %
Grupo A, control negativo	36,0 (5,7)*	100
Grupo B, control positivo	159,9 (12,2)	0
Grupo C, tratamiento con <i>B. breve</i> no viable	116,0 (12,2)*	35
Grupo E, tratado con <i>B. breve</i> no viable y prebióticos	80,4 (10,8)*	64
* p < 0,05 en comparación con el control positivo.		

15 [0078] Estos resultados son indicativos de un efecto mejorado inesperado de la combinación de oligosacáridos no digeribles y *B. breve* no viable en comparación con los componentes individuales. Esto es inesperado, ya que la *B. breve* inactivada no puede metabolizar los oligosacáridos no digeribles.

Ejemplo 3: leche líquida para niños pequeños con *B. breve*

[0079] Una leche de crecimiento líquida lista para beber que comprende por 100 ml:

- 67 Kcal
- 20 - 1,9 g de proteína (proteína de leche de vaca)
- 8,1 g de carbohidratos digeribles (de los cuales, 7,8 g de lactosa)
- 3,0 g de grasa
- 0,8 g de oligosacáridos no digeribles:
 - 0,72 galacto-oligosacáridos derivados de Vivival GOS
 - 25 0,08 g de fructano derivado de RaftilinHP
- $5 \cdot 10^9$ ufc equivalente de *Bifidobacterium breve* no viable por calor, pH aproximadamente 6,7.

REIVINDICACIONES

1. Composición nutricional para bebés y/o niños pequeños que comprende un oligosacárido no digerible A y/o B, teniendo dicho oligosacárido no digerible un grado de polimerización de 2 a 200 y *Bifidobacterium breve* no viable en una cantidad equivalente a de 10^3 a 10^{13} ufc de *B. breve* por g de peso seco de la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños, y que comprende menos de 10^3 ufc de *Bifidobacterium breve* viable por g de peso seco de la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños.
2. Composición nutricional según la reivindicación 1 que está en una forma líquida lista para tomar.
3. Composición nutricional según la reivindicación 1 o 2 que comprende además una fuente de proteínas exhaustivamente y/o parcialmente hidrolizada.
4. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es estable a la conservación a temperatura ambiente durante al menos 6 meses.
5. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es una composición nutricional para bebés y/o niños pequeños no fermentada.
6. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el pH de la composición nutricional es de entre 6 y 8.
7. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende oligosacáridos no digeribles A y B, en la que los oligosacáridos no digeribles A y B difieren:
 - i) en el porcentaje de al menos un monosacárido del oligosacárido A en base a las unidades monosacáridas totales del oligosacárido A, siendo el monosacárido al menos un 40% en número mayor que el porcentaje del mismo monosacárido en el oligosacárido B; y/o
 - ii) en el porcentaje de al menos un enlace glicosídico del oligosacárido A en base a los enlaces glicosídicos totales del oligosacárido A, siendo el enlace glicosídico al menos un 40% superior al porcentaje del mismo enlace glicosídico en el oligosacárido B; y/o
 - iii) en el grado de polimerización del oligosacárido A, siendo el grado de polimerización del oligosacárido A al menos 5 unidades monosacáridas inferior al grado de polimerización del oligosacárido B.
8. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el oligosacárido no digerible se selecciona del grupo que consiste en fructo-oligosacárido, dextrina no digerible, galacto-oligosacárido, xilo-oligosacárido, arabino-oligosacárido, arabinogalacto-oligosacárido, gluco-oligosacárido, glucomano-oligosacárido, galactomano-oligosacárido, manano-oligosacárido, quito-oligosacárido, oligosacárido de ácido urónico, sialiloligosacárido y fuco-oligosacárido.
9. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que al menos un 60% en número de las unidades monosacáridas totales del oligosacárido A y/o B son monosacáridos seleccionados del grupo que consiste en galactosa, fructosa y glucosa.
10. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende los oligosacáridos A y B en la que la proporción en peso entre los oligosacáridos A y B es de 19/1 a 1/19.
11. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el oligosacárido A es un transgalacto-oligosacárido y el oligosacárido B es un fructo-oligosacárido.
12. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende de un 0,5 a un 10% en peso de oligosacáridos no digeribles en base al peso seco de la composición nutricional para bebés y/o niños pequeños.
13. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además ácido eicosapentanoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA) y/o ácido araquidónico (ARA).
14. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además entre un 5 y un 50% en. de lípidos, entre un 5 y un 50 % en. de proteínas, entre un 15 y un 90% en. de carbohidratos.

15. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la *B. breve* no viable se selecciona de la cepa de *B. breve* M-16V y la cepa de *B. breve* I-2219 no viables.

16. Uso de una composición nutricional para bebés y/o niños pequeños según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la producción de una composición para proporcionar nutrición a bebés y/o niños pequeños.

5 17. Composición nutricional para bebés y/o niños pequeños según cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para uso en el tratamiento y/o la prevención de alergias, preferiblemente alergias alimentarias, y/o enfermedades atópicas, incluyendo eczema y/o asma.

18. Composición nutricional para bebés y/o niños pequeños según cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones.

10 19. Composición nutricional para bebés y/o niños pequeños según cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para uso en el tratamiento y/o la prevención de la dermatitis del pañal.

20. Composición nutricional para bebés y/o niños pequeños según cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para proporcionar nutrición a bebés y/o niños pequeños.