

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 685**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7028 (2006.01)

C07H 3/06 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2016 PCT/EP2016/068597**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17021476**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2016 E 16750736 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3331534**

54 Título: **Composiciones nutricionales con 2FL y LNNT para inducir una microbiota intestinal similar a la de los bebés lactantes**

30 Prioridad:

04.08.2015 EP 15179742

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

08.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BERGER, BERNARD y
SPRENGER, NORBERT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 772 685 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones nutricionales con 2FL y LNNT para inducir una microbiota intestinal similar a la de los bebés lactantes

5 Ámbito de la presente invención

La presente invención se refiere a composiciones nutricionales para lactantes o niños pequeños y a sus efectos sobre la salud. En concreto se refiere a fórmulas infantiles que llevan oligosacáridos específicos para inducir una microbiota intestinal similar a la de los bebés alimentados exclusivamente con leche materna humana (LMH).

10 Antecedentes de la presente invención

La leche materna está recomendada para todos los lactantes. Sin embargo, en algunos casos, la lactancia materna es inadecuada o falla por razones médicas o porque la madre decide no amamantar. Para estas situaciones se han desarrollado composiciones nutricionales como las fórmulas infantiles.

15 Las composiciones nutricionales para lactantes y niños pequeños se venden frecuentemente en forma de productos en polvo que deben reconstituirse con agua o, en algunos casos, como composiciones líquidas concentradas o listas para beber. Estas composiciones están pensadas para cubrir la mayoría o todas las necesidades nutricionales de los bebés o niños pequeños.

20 No obstante, es sabido que la leche materna humana constituye el criterio definitivo de referencia en nutrición infantil. Por consiguiente, los fabricantes de fórmulas infantiles han hecho muchos intentos para inducir efectos nutricionales saludables parecidos o similares a los beneficios de la leche materna humana. Sin embargo, muchos estudios han demostrado, en comparación con la leche materna humana, que las fórmulas infantiles no inducen los mismos efectos en el cuerpo. Por ejemplo, los lactantes alimentados con fórmula infantil y los lactantes alimentados con leche materna humana (LMH) pueden presentar una microbiota intestinal diferente.

25 La infancia, sobre todo en las primeras semanas y en los primeros 3, 6 o 12 meses de vida, es un periodo crítico para la constitución de una microbiota intestinal equilibrada.

30 Se sabe que la modulación de la microbiota intestinal durante la infancia puede tener probablemente gran influencia en el futuro estado de salud de los cuerpos. Por ejemplo, la flora intestinal puede influir en la formación de un sistema inmunitario fuerte, en el crecimiento normal e incluso en el desarrollo de obesidad en las siguientes de la vida.

35 Recíprocamente, una flora intestinal sana es un indicador de la salud de un bebé y una microbiota intestinal alterada puede ser un indicador (y/o una causa) de trastornos de salud tales como diarrea, absorción insuficiente de nutrientes, cólico, perturbación del sueño y/o afectación del crecimiento y del desarrollo.

40 Es sabido que la forma del parto también puede afectar a la microbiota inicial del intestino de los recién nacidos: se ha demostrado que los recién nacidos por cesárea tienen una microbiota intestinal diferente, en comparación con los recién nacidos por vía vaginal.

45 Pero en la microbiota intestinal y en su evolución durante el desarrollo del lactante hay un delicado equilibrio entre la presencia y la prevalencia (cantidad) de muchas poblaciones de bacterias intestinales. Algunas bacterias intestinales se clasifican como “generalmente positivas”, mientras que otras son “generalmente negativas” (o patógenas) en cuanto a su efecto sobre la salud general del bebé.

50 Ciertas especies de bacterias “generalmente positivas”, como las bifidobacterias, pueden estar subrepresentadas en los lactantes alimentados con fórmulas infantiles convencionales, en comparación con los lactantes alimentados con leche materna. Por el contrario, hay algunas poblaciones bacterianas que se consideran patógenas y su prevalencia en la microbiota intestinal debe permanecer a bajo nivel.

55 De hecho los lactantes alimentados con fórmulas infantiles pueden no beneficiarse de la flora intestinal bien equilibrada (microbiota intestinal) que tienen los lactantes alimentados de manera exclusiva o predominante con leche materna humana. Esta microbiota natural observada en los lactantes amamantados está muy bien controlada a través del tiempo (evolución temporal) y es compleja.

60 En el microambiente altamente complejo del intestino coexisten muchos taxones de microorganismos, cada uno en proporciones definidas secuencialmente. Al definir la microbiota de los lactantes o niños pequeños deben tenerse en cuenta las dimensiones cuantitativas y cualitativas. Además la variación temporal de la microbiota intestinal aumenta su complejidad.

65 Una microbiota intestinal adecuada y saludable es un factor clave en el desarrollo del sistema inmunitario de la mucosa del lactante. Si bien muchos estudios han identificado formas de promover el crecimiento y la prevalencia de bacterias

positivas específicas en el intestino de los bebés, se sabe poco sobre cómo se puede inducir una microbiota similar a la de los bebés alimentados con leche materna.

Se ha investigado sobre todo el uso de probióticos. Los probióticos se consideran preparaciones microbianas viables que promueven la salud del individuo al preservar la microflora natural del intestino. Se supone que los probióticos se adhieren a la mucosa del intestino, colonizan el tracto intestinal y también evitan la unión de microorganismos dañinos al mismo. Un requisito previo crucial para su acción es que deben alcanzar la mucosa intestinal en una forma adecuada y viable, y no ser destruidos en la parte superior del tracto gastrointestinal, en particular por la influencia del bajo pH reinante en el estómago. Otra dificultad es que la microbiota intestinal es muy diversificada y compleja, y las bacterias

tienen varias interacciones intermedias. Se sabe que los hidratos de carbono indigeribles (prebióticos), entre otros ingredientes, pueden afectar concretamente al desarrollo de una microbiota particular. Se ha demostrado por ejemplo que ciertos galacto-oligosacáridos (GOS) y/o ciertos fructo-oligosacáridos (FOS) pueden promover el crecimiento y la prevalencia de bifidobacterias en el intestino, especialmente en los lactantes.

La leche humana en particular tiene una abundancia de oligosacáridos estructuralmente diversos, conocidos de forma genérica como oligosacáridos de leche humana (OLH), que pueden favorecer la función inmunitaria mediante varios mecanismos posibles, incluido un efecto prebiótico que desarrolla y mantiene una microbiota intestinal saludable, y es un factor clave para el desarrollo del sistema inmunitario de la mucosa (Bode y otros, Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. [Oligosacáridos de la leche humana: todos los bebés necesitan azúcar materno]. Glycobiology 2012;22(9):1147-1162). Los OLH pueden funcionar asimismo como receptores señuelo solubles en el intestino, protegiendo al neonato de los patógenos entéricos (Newburg y otros, "Human milk glycans protect infants against enteric pathogens [Los glucanos de la leche humana protegen a los bebés contra los patógenos entéricos]"). Annual Review of Nutrition 2005;25:37-58) y también pueden interactuar directamente con las células epiteliales del intestino, produciendo cambios que pueden interferir en las interacciones huésped-microbios (Bode y otros, 2012).

La patente WO9843495 de Abbott se refiere a una formulación nutricional que contiene una cantidad efectiva de lacto-N-neotetraosa para simular el crecimiento y/o la actividad metabólica del Bifidobacterium infantis.

La patente WO2009060073 de Nestec SA se refiere al uso de un oligosacárido tal como lacto-N-tetraosa o lacto-N-neotetraosa para promover el desarrollo de una microbiota intestinal beneficiosa en las primeras semanas de la vida del lactante, comparable a la encontrada en los lactantes amamantados, sobre todo una microbiota intestinal dominada por poblaciones apreciables de especies de Bifidobacterium y Lactobacillus en detrimento de otras poblaciones tales como especies de bacteroides, clostridios y estreptococos. En la patente WO2012158517 se describe el uso de OLH purificados tales como 2'-FL, 3-FL o LDFT para estimular el crecimiento de bacterias en el tracto gastrointestinal de un sujeto mamífero, incluidas las bifidobacterias.

Sin embargo las intervenciones actuales con probióticos y/o prebióticos modulan taxones específicos de microbiota, produciendo p.ej. un mayor número de bifidobacterias o un menor número de clostridios, pero actualmente no hay una solución adecuada para acercar la composición de la microbiota global (es decir, la microbiota global/total/completa) de los lactantes alimentados con fórmulas a la de los lactantes alimentados con leche materna.

Ninguna solución existente parece tener en cuenta la función microbiana intestinal.

Por lo tanto hay necesidad de promover y/o inducir en los lactantes alimentados con fórmulas infantiles una microbiota global que sea parecida a la microbiota de los lactantes amamantados, tanto por la composición como por la función.

Se necesitan composiciones nutricionales para bebés o niños pequeños que promuevan y/o induzcan con el tiempo una microbiota global cuya evolución sea similar a la de los bebés alimentados con leche materna.

Es necesario proporcionar a los lactantes o niños pequeños la mejor nutrición que permita desarrollar una microbiota global parecida a la de los lactantes amamantados, bien a corto plazo (es decir, durante la intervención nutricional) y/o a largo plazo (es decir, después de la intervención nutricional).

Se necesitan composiciones nutricionales para bebés o niños pequeños que induzcan un estado óptimo de salud a corto o largo plazo mediante una nutrición inductora y/o promotora del desarrollo de una microbiota global próxima/similar a la de los bebés alimentados con leche materna, de manera que dicho estado de salud incluya un crecimiento óptimo a lo largo del tiempo y un desarrollo óptimo del sistema inmunitario, así como la prevención de los trastornos metabólicos.

Es necesario compensar la microbiota global por debajo de la normal observada en los lactantes o niños pequeños no amamantados, p.ej. en los que son alimentados con una composición nutricional corriente. Es necesario reequilibrar dicha microbiota global.

Es necesario favorecer un buen equilibrio en la microbiota global del intestino de los bebés, sobre todo reduciendo o reprimiendo el crecimiento de bacterias patógenas, durante las primeras semanas de vida, cuando se está formando dicho equilibrio.

- 5 Se necesitan composiciones nutricionales para lactantes o niños pequeños que proporcionen una microbiota global y una huella metabólica más cercana a las adquiridas por los lactantes alimentados con leche materna.

Se necesitan composiciones nutricionales para lactantes o niños pequeños que faciliten un crecimiento saludable, un sistema inmunitario fuerte y una función intestinal sana y/o prevengan la disbiosis microbiótica en dichos lactantes o
10 niños pequeños, p.ej. inmediatamente o más adelante en la vida.

Es necesario proporcionar estos beneficios para la salud a estos bebés o niños pequeños de manera que no induzcan efectos secundarios y/o de forma que sea fácilmente administrable y bien aceptada por los padres o los profesionales sanitarios.

15 Resumen de la presente invención

Los presentes inventores han encontrado una composición que contiene al menos un oligosacárido fucosilado (2FL) y al menos un oligosacárido N-acetilado (LNnT), cuyo uso puede ser beneficioso para proporcionar a los lactantes una
20 microbiota intestinal global más parecida a la de los lactantes alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota intestinal global de los lactantes alimentados con una fórmula infantil convencional que no contiene dichos oligosacáridos. En conjunto, la microbiota fecal y la huella metabólica muestran que la adición de 2 oligosacáridos de la leche humana (OLH), individual y estructuralmente muy específicos, modifica la microbiota intestinal general evaluada en las heces, tanto compositiva como funcionalmente, hacia la observada en los bebés amamantados. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que estos oligosacáridos actúan sinérgicamente para tener esta
25 repercusión en la microbiota global en el intestino.

Por consiguiente la presente invención se refiere a una composición nutricional que contiene al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado, para promover y/o inducir una microbiota global en el intestino de
30 los lactantes o niños pequeños que sea más parecida a la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados de manera predominante o exclusiva con una composición nutricional corriente que no lleva dichos oligosacáridos.

35 La composición nutricional de la presente invención tiene la ventaja de producir un efecto en la composición y/o en la función de toda la microbiota intestinal, tal como la abundancia (o proporción) taxonómica relativa, la diversidad, la actividad y/o la funcionalidad de dicha microbiota.

Se puede usar especialmente para proporcionar un crecimiento saludable, un sistema inmunitario fuerte, una función
40 intestinal sana y/o para prevenir la disbiosis microbiótica en los bebés o niños pequeños.

Según una forma de ejecución especialmente ventajosa, la composición nutricional contiene 2'-fucosil-lactosa (2-FL) y lacto-N-neotetraosa (LNnT), y en particular 2'-fucosil-lactosa (2-FL) en una proporción de 0,8-1,5 g/l de composición
45 nutricional y LNnT en una proporción de 0,5-0,8 g/l de composición nutricional.

Figuras

La figura 1 representa comparativamente el perfil general de la microbiota media global a nivel genérico, medido por perfilado génico con ARNr 16S, entre un grupo de referencia integrado por bebés amamantados (BF), un grupo
50 de control (Ctrl) y un grupo de ensayo.

Las figuras 2 representan la composición relativa de los tres grupos - grupo BF, grupo de control y grupo de ensayo - para los tres taxones principales que mostraron diferencias significativas entre los grupos de ensayo y de control, según la medición por perfilado génico con ARNr 16S: *Bifidobacterium* (figura 2A), *Escherichia* (figura 2B) y *Peptostreptococaceae uncl* (figura 2C). Se muestra la mediana con rangos intercuartiles. Diferencia significativa
55 indicada por *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. BF, grupo de referencia integrado por bebés amamantados.

La figura 3 representa la diversidad alfa de la microbiota global de los tres grupos - grupo BF, grupo de control y grupo de ensayo - calculada mediante el árbol completo de diversidad filogenética basado en el perfilado génico con ARNr 16S. Diferencia significativa indicada por *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

La figura 4 representa el análisis de redundancia basado en datos a nivel genérico, medidos por perfilado génico con ARNr 16S, y muestra una separación significativa de los tres grupos. $p < 0,001$.

La figura 5 es una tabla en la cual se muestra la relación de genes detectados que codifican factores de virulencia conocidos, medidos por metagenómica. C/T, C/B y T/B representan una diferencia significativa entre los grupos de control y de ensayo, entre los grupos de control y de bebés amamantados y entre los grupos de ensayo y de bebés amamantados respectivamente. La significancia entre grupos se evaluó ajustando un modelo de regresión binomial
60 negativa, teniendo en cuenta el exceso de datos de recuento cero en caso necesario. También se indica para cada grupo el número de bebés con genes detectados.

La figura 6 es una tabla en la cual se muestra la relación de genes detectados que codifican genes de resistencia a antibióticos conocidos, medidos por metagenómica. C/T, C/B y T/B representan una diferencia significativa entre los grupos de control y de ensayo, entre los grupos de control y de bebés amamantados y entre los grupos de ensayo y de bebés amamantados respectivamente. La significancia entre grupos se evaluó ajustando un modelo de regresión binomial negativa, teniendo en cuenta el exceso de datos de recuento cero en caso necesario. También se indica para cada grupo el número de bebés con genes detectados.

Las figuras 7 muestran la concentración relativa de metabolitos influyentes obtenida de los datos espectroscópicos de RMN H1 de heces, relativos al metabolismo de aminoácidos y otros ácidos orgánicos: fenilalanina (figura 7A), tirosina (figura 7B), lactato (figura 7C) e isoleucina (figura 7D). * Indica una diferencia significativa por Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). BF, grupo de referencia integrado por bebés amamantados.

Descripción detallada de la presente invención

Tal como se usan aquí, los términos siguientes tienen los siguientes significados.

El término “bebé” se refiere a un niño menor de 12 meses.

La expresión “niño pequeño” se refiere a un niño de edad comprendida entre uno y tres años, también llamado niño de corta edad.

Un “bebé o niño pequeño nacido por cesárea” se refiere a un bebé o niño pequeño que fue alumbrado por cesárea. Significa que el bebé o el niño pequeño no fueron alumbrados por vía vaginal.

Un “bebé o niño pequeño nacido vaginalmente” significa un bebé o niño pequeño que fue alumbrado por vía vaginal y no por cesárea.

Un “pretérmino” o “prematureo” significa un bebé o niño pequeño que no nació a término. Generalmente se refiere a un bebé o niño pequeño nacido antes de completar las 37 semanas de gestación.

La expresión “pequeño para la edad gestacional” o “PEG” designa un bebé o un niño pequeño de tamaño inferior al normal para su edad gestacional al nacer, más comúnmente definido como un peso por debajo del décimo percentil para la edad gestacional. En algunas formas de ejecución el PEG puede estar asociado al retraso del crecimiento intrauterino (RCIU), que se refiere a un estado en el cual un feto no puede alcanzar su tamaño potencial.

La expresión “bajo peso al nacer” se refiere a cualquier peso corporal por debajo de 2500 g al nacer.

La expresión “composición nutricional” significa una composición que nutre a un sujeto. Esta composición nutricional se toma habitualmente por vía oral o intravenosa y en general incluye una fuente de lípidos o grasas y una fuente de proteínas.

En una forma de ejecución concreta la composición nutricional de la presente invención es una composición nutricional hipoalergénica. La expresión “composición nutricional hipoalergénica” se refiere a una composición nutricional que es poco probable que cause reacciones alérgicas.

Según una forma de ejecución particular, la composición nutricional de la presente invención es una “composición nutricional sintética”. La expresión “composición nutricional sintética” se refiere a una mezcla obtenida por medios químicos y/o biológicos, que puede ser químicamente idéntica a la mezcla producida naturalmente en las leches de los mamíferos (es decir, la composición sintética no es leche materna).

Tal como se usa aquí, la expresión “fórmula infantil” se refiere a un producto alimenticio destinado particularmente a la nutrición de los lactantes durante los primeros meses de vida, que satisface por sí mismo los requisitos nutricionales de esta categoría de personas (artículo 2(c) de la directiva 91/321/CEE 2006/141/CE de la Comisión europea, de 22 de diciembre de 2006, sobre fórmulas infantiles y fórmulas de continuación). Asimismo se refiere a una composición nutricional destinada a lactantes, como la definida en el Codex Alimentarius (Codex STAN 72-1981), y a especialidades infantiles (incluidos los alimentos para fines médicos especiales). La expresión “fórmula infantil” abarca tanto “fórmula infantil inicial” como “fórmula de seguimiento” o “fórmula de continuación”. En algunas formas de ejecución, la fórmula infantil es una fórmula prematura.

Una “fórmula de seguimiento” o “fórmula de continuación” se da a partir del sexto mes en adelante. Constituye el principal elemento líquido en la dieta progresivamente diversificada de esta categoría de personas.

La expresión “comida para bebés” se refiere a un producto alimenticio destinado particularmente a la nutrición de los lactantes o niños pequeños durante los primeros años de vida.

La expresión “composición de cereales para lactantes” se refiere a un producto alimenticio destinado especialmente a la nutrición de los lactantes o niños pequeños durante los primeros años de vida.

El término “reforzante” se refiere a composiciones nutricionales líquidas o sólidas adecuadas para mezclar con leche materna o fórmulas infantiles.

La sigla “OLH” se refiere a oligosacárido(s) de la leche humana. Estos carbohidratos son muy resistentes a la hidrólisis enzimática, lo cual indica que pueden realizar funciones esenciales que no están relacionadas directamente con su valor calórico. Se ha dilucidado especialmente que desempeñan un papel vital en el desarrollo temprano de los bebés y niños pequeños, como es la maduración del sistema inmunitario. En la leche humana hay muchos tipos diferentes de OLH. Cada oligosacárido está basado en una combinación de glucosa, galactosa, ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico), fucosa y/o N-acetilglucosamina con muchos y variados enlaces entre ellos, lo cual explica la enorme cantidad de oligosacáridos distintos que contiene la leche humana. Hasta la fecha se han identificado más de 130 de estas estructuras. Casi todos ellos tienen un resto de lactosa en su extremo reductor, mientras que el ácido siálico y/o la fucosa (cuando están presentes) ocupan posiciones terminales en los extremos no reductores. Los OLH pueden ser ácidos (p.ej. oligosacáridos que contienen ácido siálico cargado) o neutros (p.ej. oligosacáridos fucosilados).

Un “oligosacárido fucosilado” es el que tiene un resto de fucosa. Es de naturaleza neutra. Algunos de sus ejemplos son 2-FL (2'-fucosil-lactosa), 3-FL (3-fucosil-lactosa), difucosil-lactosa, lacto-N-fucopentaosa (p.ej. lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-fucopentaosa II, lacto-N-fucopentaosa III, lacto-N-fucopentaosa V), lacto-N-fucohexaosa, lacto-N-difucohexaosa I, fucosil-lacto-N-hexaosa, fucosil-lacto-N-neohexaosa, difucosil-lacto-N-hexaosa I, difucosil-lacto-N-neohexaosa II y cualquier combinación de los mismos. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que el epítipo de fucosilo de los oligosacáridos fucosilados puede actuar como señuelo en la superficie de la mucosa.

Las expresiones “oligosacáridos fucosilados que comprenden un epítipo de 2'-fucosilo” y “oligosacáridos 2'-fucosilados” abarcan oligosacáridos fucosilados con una cierta homología formal, ya que contienen un epítipo de 2'-fucosilo, y por lo tanto cabe esperar que tengan cierta homología funcional.

La expresión “oligosacárido(s) N-acetilado(s)” abarca tanto “N-acetil-lactosamina” como “oligosacárido(s) que llevan N-acetil-lactosamina”. Son oligosacáridos neutros que contienen un resto de N-acetil-lactosamina. Como ejemplos adecuados cabe mencionar LNT (lacto-N-tetraosa), para-lacto-N-neohexosa (para-LNnH), LNnT (lacto-N-neotetraosa) y cualquier combinación de los mismos. Otros ejemplos son lacto-N-hexosa, lacto-N-neohexosa, para-lacto-N-hexosa, para-lacto-N-neohexosa, lacto-N-octaosa, lacto-N-neooctaosa, isolacto-N-octaosa, para-lacto-N-octaosa y lacto-N-decaosa.

La expresión “al menos un oligosacárido fucosilado” y “al menos un oligosacárido N-acetilado” significa “al menos un tipo de oligosacárido fucosilado” y “al menos un tipo de oligosacárido N-acetilado”.

Un “precursor de OLH” es un compuesto clave que interviene en la fabricación de OLH, como por ejemplo el ácido siálico y/o la fucosa.

Un “oligosacárido sialilado” es un oligosacárido que contiene ácido siálico cargado; es decir, un oligosacárido que lleva un resto de ácido siálico. Es de naturaleza ácida. Algunos ejemplos son 3-SL (3' sialil-lactosa) y 6-SL (6' sialil-lactosa).

La composición nutricional de la presente invención puede estar en forma sólida (p.ej. en polvo) o en forma líquida. La proporción de los diversos ingredientes (p.ej. los oligosacáridos) se puede expresar en g/100 g de composición en peso seco cuando está en forma sólida, p.ej. en polvo, o como una concentración en g/l de composición cuando se refiere a una forma líquida (esta última también incluye la composición líquida que puede obtenerse reconstituyendo un polvo en un líquido como leche, agua..., p.ej. una fórmula infantil reconstituida o una fórmula de continuación/seguimiento o un producto infantil de cereales o cualquier otra formulación diseñada para la nutrición infantil). También se pueden expresar en g/100 kcal.

La expresión “periodo de destete” se refiere al periodo durante el cual la leche materna es remplazada por otros alimentos en la dieta de un bebé o niño pequeño.

Las expresiones “X días/semanas/meses/años de edad”, “X días/semanas/meses/años de vida” y “X días/semanas/meses/años del nacimiento” se pueden usar indistintamente.

“Leche materna” debe entenderse como la leche o el calostro de la madre. LMH se refiere a la leche materna humana.

Las expresiones “bebés/niños pequeños alimentados exclusivamente con leche materna humana”, “bebés o niños pequeños alimentados exclusivamente con leche materna”, “bebés o niños pequeños exclusivamente amamantados” y “bebés/niños pequeños exclusivamente amamantados” se pueden emplear indistintamente. Se refieren a los bebés o niños pequeños alimentados con una gran mayoría (es decir, con al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% o el total (100%)) de nutrientes y/o energía provenientes de la leche materna humana.

La expresión “bebés o niños pequeños alimentados exclusivamente con composiciones nutricionales” se refiere a los bebés o niños pequeños alimentados con una gran mayoría (es decir, con al menos el 90%, al menos el 95% o al

- menos el 99% o el total (100%)) de nutrientes y/o energía provenientes de composiciones nutricionales sintéticas como fórmulas infantiles, leches de seguimiento o leches de crecimiento. La expresión “lactantes o niños pequeños alimentados predominantemente con composiciones nutricionales” se refiere a los bebés o niños pequeños alimentados con fuentes nutricionales de nutrientes y/o energía procedente sobre todo de composiciones nutricionales sintéticas tales como fórmulas infantiles, leches de seguimiento o leches de crecimiento. Predominantemente se refiere al menos al 50% (o al menos al 60% o al menos al 75%) de estos nutrientes y/o energía, por ejemplo del 50% al 90%, o del 60% al 80%.
- La expresión “promover y/o inducir” una microbiota global particular en el intestino de los bebés o niños pequeños se refiere al desarrollo, aumento, establecimiento, aparición y/o desplazamiento de una microbiota global particular en dichos bebés o niños pequeños.
- La expresión “composición nutricional convencional” se refiere a composiciones nutricionales sintéticas corrientes tales como fórmulas infantiles, leches de seguimiento o leches de crecimiento que ya se encuentran en el mercado. Una “composición nutricional convencional que no contiene dichos oligosacáridos” se refiere a una composición nutricional corriente que no contiene “al menos un oligosacárido fucosilado ni al menos un oligosacárido N-acetilado”.
- Los términos “microbiano”, “microflora” y “microbiota” se pueden usar indistintamente.
- Las expresiones “microbiota en el intestino”, “microbiota del intestino” y “microbiota intestinal” se pueden usar indistintamente.
- Los términos “global”, “general”, “íntegro”, “completo” y “total” se pueden usar de manera indistinta, especialmente en la expresión “microbiota global”. La expresión “microbiota global en/del intestino” se refiere a la microbiota intestinal general (o íntegra, completa, total). Abarca:
- la composición de la microbiota global, es decir, la abundancia (o cantidad) taxonómica relativa y/o la diversidad de toda la microbiota intestinal, es decir, los aspectos “cuantitativos” y/o “cualitativos” de esta microbiota; y/o
 - la función de la microbiota global, es decir, la actividad y/o funcionalidad de toda la microbiota intestinal, en concreto la actividad/funcionalidad metabólica. Se puede evaluar midiendo la abundancia relativa de los genes predichos por metagenómica, o por perfilado cuantitativo de los metabolitos principales, incluidos los aminoácidos, los ácidos orgánicos principales (lactato, succinato, citrato...) y/o carbohidratos.
- Una microbiota intestinal adecuada y saludable es un factor clave en el desarrollo del sistema inmunitario de la mucosa del bebé.
- La expresión “disbiosis microbiótica intestinal” se refiere al desequilibrio microbiano en el intestino.
- La expresión “prevenir y/o tratar la disbiosis microbiótica intestinal” abarca una o varias de las siguientes medidas:
- prevención de la disbiosis microbiótica en el intestino
 - tratamiento de la disbiosis microbiótica en el intestino
 - prevención y tratamiento de la disbiosis microbiótica en el intestino
- Las expresiones “regulación a la baja” y “reducción” se pueden usar indistintamente.
- Los términos “prevenir” o “prevención” se refieren a la evitación de un estado o condición física o de sus consecuencias y/o a la disminución de su incidencia (es decir, reducción de su frecuencia).
- Los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren a una disminución de la duración y/o la gravedad de un estado físico, de una afección o de sus consecuencias.
- La prevención y/o el tratamiento de un estado físico, de una afección o de sus consecuencias puede realizarse durante el tratamiento (es decir, durante la administración de la composición de la presente invención, ya sea inmediatamente después del inicio de la administración o algún tiempo más tarde, p.ej. algunos días o semanas después del inicio). Pero también puede incluir la prevención y/o el tratamiento en la vida posterior. El término “en la vida posterior” se refiere al efecto una vez finalizada la intervención o el tratamiento. El efecto “en la vida posterior” puede durar 1 semana hasta varios meses, por ejemplo de 2 a 4 semanas, de 2 a 6 semanas, de 2 a 8 semanas, de 1 a 6 meses o de 2 a 12 meses.
- El término “prebiótico” se refiere a carbohidratos no digeribles que benefician al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de bacterias sanas tales como las bifidobacterias en el colon de los humanos (Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics [*Modulación dietética de la microbiota colónica humana: introducción al concepto de prebiótica*]. J Nutr. 1995; 125: 1401-12).
- El término “probiótico” se refiere a preparados de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar del huésped. (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. y otros “Probiotics:

how should they be defined [*Probióticos: cómo deben definirse*]” Trends Food Sci. Technol. 1999: 10 107-10). Las células microbianas son generalmente bacterias o levaduras.

El término “ufc” debe entenderse como unidad formadora de colonias.

Todos los porcentajes están expresados en peso, a no ser que se indique de otro modo.

Además, en el contexto de la presente invención, los términos “que contiene” o “contiene” no excluyen otros elementos posibles. La composición de la presente invención, incluidas las diversas formas de ejecución aquí descritas, puede contener, comprender o comprender básicamente los elementos esenciales y limitaciones de la presente invención aquí descrita, así como cualquier otro ingrediente, componente o limitación adicional u opcional, aquí descrito o en función de las necesidades.

En esta descripción, cualquier referencia a documentos del estado técnico anterior no debe considerarse una admisión de que la técnica anterior sea ampliamente conocida o forme parte del conocimiento general común en este campo.

La presente invención se describe seguidamente con mayor detalle. Nótese que los diversos aspectos, características, ejemplos y formas de ejecución descritos en la presente solicitud pueden ser compatibles y/o combinables entre sí.

Así, un primer objeto de la presente invención es una composición nutricional que contenga al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado para promover y/o inducir una microbiota global en el intestino de los lactantes o niños pequeños que sea más parecida a la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados de manera predominante o exclusiva con una composición nutricional corriente que no lleva dichos oligosacáridos.

La composición nutricional de la presente invención contiene al menos un oligosacárido fucosilado. Puede haber uno o varios tipos de oligosacáridos fucosilados. El o los oligosacáridos fucosilados pueden escogerse de la lista formada por 2'-fucosil-lactosa, 3'-fucosil-lactosa, difucosil-lactosa, lacto-N-fucopentaosa (por ejemplo lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-fucopentaosa II, lacto-N-fucopentaosa III, lacto-N-fucopentaosa V), lacto-N-fucohexaosa, lacto-N-difucohexaosa I, fucosil-lacto-N-hexaosa, fucosil-lacto-N-neohexaosa (por ejemplo fucosil-lacto-N-neohexaosa I, fucosil-lacto-N-neohexaosa II), difucosil-lacto-N-hexaosa I, difuco-lacto-N-neohexaosa, difucosil-lacto-N-neohexaosa I, difucosil-lacto-N-neohexaosa II, fucosil-para-lacto-N-hexaosa, tri-fuco-para-lacto-N-hexaosa I y cualquier combinación de los mismos.

En algunas formas de ejecución concretas el oligosacárido fucosilado incluye un epítipo de 2'-fucosilo. Puede elegirse, por ejemplo, de la lista constituida por 2'-fucosil-lactosa, difucosil-lactosa, lacto-N-fucopentaosa, lacto-N-fucohexaosa, lacto-N-difucohexaosa, fucosil-lacto-N-hexaosa, fucosil-lacto-N-neohexaosa, difucosil-lacto-N-hexaosa difuco-lacto-N-neohexaosa, difucosil-lacto-N-neohexaosa, fucosil-para-lacto-N-hexaosa y cualquier combinación de los mismos.

En una forma de ejecución preferida la composición nutricional según la presente invención comprende 2'-fucosil-lactosa (o 2FL, o 2'FL, o 2-FL o 2'-FL). En una forma de ejecución particular no hay otro tipo de oligosacárido fucosilado más que la 2'-fucosil-lactosa, es decir, la composición nutricional según la presente invención contiene solo 2'-fucosil-lactosa como oligosacárido fucosilado.

El o los oligosacáridos fucosilados pueden aislarse por cromatografía o tecnología de filtración a partir de una fuente natural como las leches animales. Alternativamente pueden producirse por medios biotecnológicos con el empleo de fucosiltransferasas y/o fucosidasas específicas, basándose en la tecnología de fermentación enzimática (con enzimas recombinantes o naturales) o en la tecnología de fermentación microbiana. En este último caso los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o se pueden diseñar genéticamente para producir los correspondientes sustratos y enzimas. Se pueden usar cultivos microbianos únicos y/o cultivos mixtos. La formación de oligosacáridos fucosilados puede iniciarse mediante sustratos aceptores, a partir de cualquier grado de polimerización (GP), desde GP = 1 en adelante. Alternativamente los oligosacáridos fucosilados se pueden producir por síntesis química a partir de lactosa y fucosa libre. Los oligosacáridos fucosilados también se pueden adquirir, por ejemplo, de Kyowa Hakko Kogyo de Japón.

La composición nutricional de la presente invención también contiene al menos un oligosacárido N-acetilado. Puede haber uno o varios tipos de oligosacáridos N-acetilados. El o los oligosacáridos N-acetilados pueden ser, por ejemplo, lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (LNnT) o cualquier combinación de ellos. En algunas formas de ejecución particulares el oligosacárido N-acetilado es lacto-N-neotetraosa (LNnT), para-lacto-N-neohexaosa (para-LNnH) o cualquier combinación de ellos. En algunas formas de ejecución particulares el oligosacárido N-acetilado es LNnT. En algunas formas de ejecución particulares el oligosacárido N-acetilado es LNT. En algunas otras formas de ejecución particulares el oligosacárido N-acetilado es una mezcla de LNT y LNnT. En algunas formas de ejecución particulares la composición contiene tanto LNT como LNnT en una relación LNT: LNnT comprendida entre 5:1 y 1:2, o de 2:1 hasta 1:1, o de 2:1,2 hasta 2:1,6.

En una forma de ejecución preferida la composición nutricional conforme a la presente invención contiene lacto-N-neotetraosa (LNnT). En una forma de ejecución particular no hay otro tipo de oligosacárido N-acetilado más que lacto-N-neotetraosa (LNnT), es decir, la composición nutricional de la presente invención contiene solo lacto-N-neotetraosa (LNnT) como oligosacárido N-acetilado.

El o los oligosacáridos N-acetilados se pueden sintetizar químicamente mediante transferencia enzimática de unidades sacáridas de restos donantes a restos aceptores, usando glicosiltransferasas del modo descrito, por ejemplo, en las patentes US nº 5,288,637 y WO 96/10086. Alternativamente se puede preparar LNT y LNnT por conversión química de cetohexosas (p.ej. de fructosa) libres o unidas a un oligosacárido (p.ej. lactulosa) en N-acetilhexosamina o en un oligosacárido que contenga N-acetilhexosamina, tal como se describe en Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) Angew. Chem Int. Ed. 38:827-828. La N-acetil-lactosamina producida de esta manera se puede transferir luego a lactosa como resto aceptor.

En una forma de ejecución particularmente ventajosa de la presente invención, la composición nutricional contiene 2'-fucosil-lactosa (2FL) y lacto-N-neotetraosa (LNnT).

En otra forma de ejecución específica la composición nutricional según la presente invención contiene una mezcla de oligosacáridos constituida por 2'-fucosil-lactosa (2-FL) y lacto-N-neotetraosa (LNnT). En otras palabras, la composición nutricional de la presente invención contiene solo 2'-fucosil-lactosa (2-FL) como oligosacárido fucosilado y solo lacto-N-neotetraosa (LNnT) como oligosacárido N-acetilado.

La proporción total de oligosacárido(s) fucosilado(s) contenido(s) en la composición nutricional conforme a la presente invención puede ser de 0,8-1,5 g/l de composición. En algunas formas de ejecución el o los oligosacáridos fucosilados pueden estar en una proporción total de 0,85-1,3 g/l de composición, por ejemplo 0,9-1,25 g/l o 0,9-1,1 g/l o 1-1,25 g/l o 1-1,2 g/l de composición.

El o los oligosacáridos fucosilados pueden estar contenidos en la composición nutricional en una proporción total de 0,55-1,05 g/100 g de peso seco de composición. El o los oligosacáridos fucosilados pueden estar en una proporción total de 0,66-1 g/100 g de composición, como por ejemplo 0,70-0,97 g/100 g o 0,70-0,85 g/100 g o 0,78-0,97 g/100 g o 0,78-0,93 g/100 g de composición.

El o los oligosacáridos N-acetilados pueden estar contenidos en la composición nutricional según la presente invención en una proporción total de 0,5-0,8 g/l de composición. En algunas formas de ejecución el o los oligosacáridos N-acetilados pueden estar en una proporción total de 0,5-0,75 g/l o 0,5-0,7 g/l o 0,5-0,6 g/l de composición. El o los oligosacáridos N-acetilados pueden estar contenidos en la composición nutricional en una proporción total de 0,39-0,62 g/100 g de peso seco de composición, por ejemplo 0,39-0,58 g/100 g o 0,39-0,54 g/100 g o 0,39-0,47 g/100 g.

El o los oligosacáridos N-acetilados pueden estar contenidos en la composición nutricional según la presente invención en una proporción total de 0,5-0,8 g/l de composición. En algunas formas de ejecución el o los oligosacáridos N-acetilados pueden estar en una proporción total de 0,5-0,75 g/l o 0,5-0,7 g/l o 0,5-0,6 g/l de composición. El o los oligosacáridos N-acetilados pueden estar contenidos en la composición nutricional en una proporción total de 0,39-0,62 g/100 g de peso seco de composición, por ejemplo 0,39-0,58 g/100 g o 0,39-0,54 g/100 g o 0,39-0,47 g/100 g.

Todos estos intervalos diferentes se pueden combinar entre sí.

Así, en una forma de ejecución de la presente invención la composición nutricional contiene al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado, de modo que:

- el o los oligosacáridos fucosilados se encuentran en una proporción total de 0,8-1,5 g/l de composición y/o en una proporción total de 0,62-1,16 g/100 g de peso seco de composición; y/o
- el o los oligosacáridos N-acetilados se encuentran en una proporción total de 0,5-0,8 g/l de composición y/o en una proporción total de 0,39-0,62 g/100 g de peso seco de composición.

En otra forma de ejecución particular la composición nutricional contiene al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado, de modo que:

- el o los oligosacáridos fucosilados se encuentran en una proporción total de 0,9-1,25 g/l de composición y/o en una proporción total de 0,70-0,97 g/100 g de peso seco de composición; y/o
- el o los oligosacáridos N-acetilados se encuentran en una proporción total de 0,5-0,7 g/l de composición y/o en una proporción total de 0,39-0,54 g/100 g de peso seco de composición.

En otra forma de ejecución particular la composición nutricional contiene al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado, de modo que:

- el o los oligosacáridos fucosilados se encuentran en una proporción total de 1-1,2 g/l de composición y/o en una proporción total de 0,78-0,93 g/100 g de peso seco de composición; y/o
- el o los oligosacáridos N-acetilados se encuentran en una proporción total de 0,5-0,6 g/l de composición y/o en una proporción total de 0,39-0,47 g/100 g de peso seco de composición.

Los oligosacáridos fucosilados y los oligosacáridos N-acetilados incluidos en la composición nutricional conforme a la presente invención están normalmente contenidos en una relación de oligosacárido(s) fucosilado(s): oligosacárido(s) N-acetilado(s) de 2:0,54 hasta 2:2,26, como por ejemplo de 2:0,76 - 2:1,8 o 2:0,8 - 2:1,4. En una forma de ejecución particularmente ventajosa esta relación es de 2:1 o alrededor de 2:1.

La composición nutricional según la presente invención también puede contener al menos otro(s) oligosacárido(s) (es decir, distintos del o los oligosacáridos fucosilados y del o los oligosacáridos N-acetilados necesariamente incluidos en la composición) y/o al menos una(s) fibra(s) y/o al menos un(os) precursor(es) de ella(s). El otro oligosacárido y/o fibra y/o precursor de la misma pueden seleccionarse de la lista constituida por galacto-oligosacáridos (GOS), fructo-oligosacáridos (FOS), inulina, xilo-oligosacáridos (XOS), polidextrosa, oligosacáridos sialilados, ácido siálico, fucosa y cualquier combinación de ellos. Pueden estar contenidos en una proporción comprendida entre 0 y 10% en peso de composición.

Los productos comerciales adecuados que pueden usarse además de los oligosacáridos comprendidos en la mezcla de oligosacáridos para preparar las composiciones nutricionales según la presente invención incluyen combinaciones de FOS con inulina tales como el producto que vende BENEOL con la marca comercial Orafit o la polidextrosa que vende Tate & Lyle con la marca comercial STA-LITE®.

En una forma de ejecución particular, la composición nutricional de acuerdo con la presente invención puede contener aproximadamente al menos 0,4 g o al menos 0,7 g de oligofructosa por 100 kcal de composición, como por ejemplo entre 0,4 y 0,9 g aproximadamente, entre 0,4 y 0,7 g aproximadamente, entre 0,4 y 0,5 g aproximadamente, entre 0,7 y 0,8 g aproximadamente o entre 0,7 y 0,9 g aproximadamente de oligofructosa por 100 kcal.

En algunas formas de ejecución la oligofructosa tiene un grado de polimerización de 2 hasta 10. En algunas formas de ejecución, al menos el 80%, 90%, 95%, 99% o 100% de la oligofructosa tiene un grado de polimerización de 2 a 8 (entre 2 y 8).

En una forma de ejecución particular la composición nutricional según la presente invención puede contener GOS. Un galacto-oligosacárido es un oligosacárido que lleva dos o más moléculas de galactosa sin carga ni resto de N-acetilo. Los galacto-oligosacáridos adecuados que también pueden añadirse a la composición nutricional según la presente invención incluyen Galβ1,3Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,4Glc, Galβ1,3Galβ1,3Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,6Galβ1,4Glc, Galβ1,3Galβ1,6Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,3Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,6Galβ1,6Glc, Galβ1,3Galβ1,3Glc, Galβ1,4Galβ1,4Glc y Galβ1,4Galβ1,4Galβ1,4Glc, pero también cualquier mezcla de ellos. Galacto-oligosacáridos sintetizados como Galβ1,6Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,6Galβ1,6Glc, Galβ1,3Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,6Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,3Galβ1,4Glc, Galβ1,3Galβ1,6Galβ1,4Glc, Galβ1,4Galβ1,4Glc y Galβ1,4Galβ1,4Galβ1,4Glc y sus mezclas pueden adquirirse con las marcas comerciales Vivinal® y Elix'or®. Otros proveedores de oligosacáridos son Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GmbH y Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Alternativamente se pueden usar glucotransferasas específicas, como las galactosiltransferasas, para producir oligosacáridos neutros.

En una forma de ejecución particular la composición nutricional también puede contener al menos un oligosacárido de leche bovina. Se pueden usar tecnologías convencionales para fraccionar y enriquecer fracciones de leche bovina en oligosacáridos derivados de ella (estas tecnologías convencionales incluyen filtración en columna, filtración con resina, nanofiltración, tratamiento enzimático, especialmente con beta-galactosidasa, precipitación de proteínas, cristalización y separación de lactosa etc...). Algunas fracciones de leche bovina enriquecidas en oligosacáridos están disponibles comercialmente o se han descrito, por ejemplo, en la patente EP2526784 A1.

En una forma de ejecución particular la composición nutricional también puede incluir adicionalmente una mezcla de oligosacáridos ("BMOS") formada por 0,1 hasta 4,0% en peso de oligosacárido(s) N-acetilados, de 92,0 hasta 98,5% en peso del o los galacto-oligosacáridos y de 0,3 hasta 4,0% en peso del o los oligosacáridos sialilados.

En una forma de ejecución particular la composición nutricional de acuerdo con la presente invención puede contener oligosacáridos sialilados. Puede haber uno o varios oligosacáridos sialilados.

El o los oligosacáridos sialilados se pueden elegir del grupo formado por 3' sialil-lactosa (3-SL), 6' sialil-lactosa (6-SL) y cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de ejecución de la presente invención la composición lleva 3-SL y 6-SL. En algunas formas de ejecución la relación entre 3'-sialil-lactosa (3-SL) y 6'-sialil-lactosa (6-SL) puede estar comprendida en el intervalo entre 5:1 y 1:10 o entre 3:1 y 1:1, o de 1:1 hasta 1:10. En algunas formas de ejecución específicas el oligosacárido sialilado de la composición es 6' sialil-lactosa (6-SL).

El o los oligosacáridos sialilados se pueden aislar por tecnología cromatográfica o de filtración a partir de una fuente natural como las leches animales. Alternativamente se pueden producir por medios biotecnológicos empleando sialil-transferasas o sialidasas, neuraminidasas específicas, ya sea mediante una tecnología de fermentación enzimática (con enzimas recombinantes o naturales), por síntesis química o mediante una tecnología de fermentación microbiana. En el último caso los microbios pueden expresar sus enzimas y sustratos naturales o pueden diseñarse para producir los sustratos y enzimas respectivos. Se pueden usar cultivos microbianos individuales o cultivos mixtos. La formación de sialiloligosacáridos se puede iniciar mediante sustratos aceptores, partiendo de cualquier grado de polimerización

(GP), desde GP = 1 en adelante. Como alternativa las sialil-lactosas se pueden sintetizar químicamente partiendo de lactosa y ácido N'-acetilneuramínico libre (ácido siálico). Las sialil-lactosas también se pueden adquirir en el comercio, por ejemplo, de Kyowa Hakko Kogyo de Japón.

5 En ejemplos particulares la composición puede llevar 0,05 hasta 5 g/l de oligosacárido(s) sialilado(s) o 0,1 hasta 4 g/l, 0,3 hasta 2 g/l, 0,4 hasta 1,5 g/l, 0,4 hasta 1 g/l, por ejemplo 0,5 o 0,9 g/l de oligosacárido(s) sialilado(s). En algunas formas de ejecución particulares la composición puede contener 0,8 hasta 1,7 g/l de oligosacárido(s) sialilado(s).

10 La composición según la presente invención puede incluir 0,03 hasta 3,88 g de oligosacárido(s) sialilado(s) por 100 g de peso seco de composición, p.ej. 0,08-3,10 g o 0,23-1,55 g o 0,31-1,16 g o 0,31-0,77 g o 0,39-0,7 g o 0,62-1,32 g de oligosacárido(s) sialilado(s) por 100 g de peso seco de composición.

15 En algunas formas de ejecución particulares de la presente invención la composición nutricional lleva oligosacárido(s) sialilado(s) en una proporción inferior a 0,1 g/100 g de peso seco de composición.

En algunas formas de ejecución particulares de la presente invención la composición nutricional no contiene ningún oligosacárido sialilado.

20 La composición conforme a la presente invención también puede contener opcionalmente al menos un precursor de oligosacáridos. Puede haber uno o varios precursores de oligosacáridos. Por ejemplo, el precursor de oligosacáridos de la leche humana es ácido siálico, fucosa o una mezcla de los mismos. En algunas formas de ejecución particulares la composición incluye ácido siálico.

25 En ejemplos concretos la composición contiene 0 hasta 3 g/l de precursor(es) de oligosacáridos o 0 hasta 2 g/l, 0 hasta 1 g/l, 0 hasta 0,7 g/l, 0 hasta 0,5 g/l, 0 hasta 0,3 g/l, 0 hasta 0,2 g/l de precursor(es) de oligosacáridos.

La composición de acuerdo con la presente invención puede contener 0 hasta 2,1 g de precursor(es) de oligosacáridos por 100 g de peso seco de composición, como p.ej. 0 hasta 1,5 g, 0 hasta 0,8 g o 0 hasta 0,15 g de precursor(es) de oligosacáridos por 100 g de peso seco de composición.

30 Además la composición nutricional de la presente invención puede incluir al menos un probiótico (o cepa probiótica), por ejemplo una cepa bacteriana probiótica.

35 Los microorganismos probióticos utilizados más a menudo son principalmente bacterias y levaduras de los siguientes géneros: *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* y *Saccharomyces spp.*

Según algunas formas de ejecución específicas el probiótico es una cepa bacteriana probiótica. En algunas formas de ejecución específicas se trata en concreto de bifidobacterias y/o lactobacilos.

40 Las cepas bacterianas probióticas adecuadas incluyen *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 comercializado por Valio Oy de Finlandia con la marca LGG, *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116, *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225, *Streptococcus salivarius* DSM 13084 comercializado por BLIS Technologies Limited de Nueva Zelanda con la marca KI2, *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446 comercializado entre otros por la compañía danesa Christian Hansen con la marca Bb 12, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 comercializado por Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón con la marca BB536, *Bifidobacterium breve* comercializado por Danisco con la marca Bb-03, *Bifidobacterium breve* comercializado por Morinaga con la marca M-16V, *Bifidobacterium infantis* comercializado por Procter & Gamble Co. con la marca Bifantis, y *Bifidobacterium breve* comercializado por el Institut Rosell (Lallemand) con la marca R0070.

50 En una forma de ejecución particular el probiótico es un *Bifidobacterium lactis* tal como el *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446.

55 La composición nutricional de acuerdo con la presente invención puede contener 10^3 hasta 10^{12} ufc de cepa probiótica, preferiblemente entre 10^7 y 10^{12} ufc, como, por ejemplo, entre 10^8 y 10^{10} ufc de cepa probiótica por g de peso seco de composición.

En una forma de ejecución los probióticos son viables. En otra forma de ejecución los probióticos son no replicantes o bien están inactivados. En algunas otras formas de ejecución puede haber tanto probióticos viables como probióticos inactivados.

60 Además la composición nutricional de la presente invención puede contener al menos un fago (bacteriófago) o una mezcla de fagos, dirigida preferiblemente contra estreptococos patógenos, Haemophilus, Moraxella y estafilococos.

65 La composición nutricional según la presente invención puede ser, por ejemplo, una fórmula infantil, una fórmula infantil inicial, una fórmula de continuación o seguimiento, una fórmula pretérmino, un alimento para bebés, una composición infantil de cereales, un reforzante o un suplemento de la leche humana. En algunas formas de ejecución particulares

la composición según la presente invención es una fórmula infantil, un reforzante o un suplemento que puede estar destinado a los primeros 4 o 6 meses de edad. En una forma de ejecución preferida la composición nutricional de la presente invención es una fórmula infantil.

5 En algunas otras formas de ejecución la composición nutricional de la presente invención es un reforzante. Puede ser un reforzante de la leche materna (p.ej. un reforzante de la leche humana) o un reforzante de fórmulas infantiles o de fórmulas de continuación/seguimiento. Si la composición nutricional es un suplemento se puede preparar en forma de dosis unitarias.

10 La composición nutricional de la presente invención puede estar en forma sólida (p.ej. en polvo), líquida o gelatinosa.

La composición nutricional según la presente invención contiene generalmente una fuente proteica. La proteína puede estar en una proporción de 1,6 a 3 g por 100 kcal. En algunas formas de ejecución, sobre todo cuando la composición está destinada a bebés prematuros, la proporción de proteína puede estar comprendida entre 2,4 y 4 g/100 kcal o por encima de 3,6 g/100 kcal. En algunas otras formas de ejecución la proporción de proteína puede ser inferior a 2,0 g por 100 kcal, p.ej. entre 1,8 y 2,1 g/100 kcal o 1,8-2 g/100 kcal o 1,9-2,1 g de proteína por 100 kcal, o en una proporción inferior a 1,8 g por 100 kcal, como por ejemplo 1,4-1,8 g/100 kcal o 1,5-1,7 g/100 kcal.

20 No se cree que el tipo de proteína sea crítico en la presente invención, siempre que se cumplan los requisitos mínimos del contenido de aminoácidos esenciales y se garantice un crecimiento satisfactorio. Por tanto pueden usarse fuentes proteicas basadas en suero de leche, caseína y mezclas de las mismas, así como fuentes proteicas a base de soja. En cuanto a las proteínas de suero de leche, la fuente proteica puede estar basada en suero de leche ácido o dulce o en mezclas de los mismos y puede incluir alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina en cualquier proporción deseada. La "alfa-lactoalbúmina" se refiere a una proteína de suero de leche de gran calidad y fácil de digerir, que comprende el 20-25% de la proteína total de la leche materna humana (LMH) y es la proteína primaria encontrada en la LMH. La estructura de la alfa-lactoalbúmina está compuesta por 123 aminoácidos y 4 puentes disulfuro y la proteína tiene un peso molecular de 14,2 K Daltons. La alfa-lactoalbúmina es ideal para fórmulas infantiles con bajo contenido proteico debido a su elevado contenido de aminoácidos esenciales, en particular de triptófano. En una forma de ejecución, la composición nutricional de la presente invención comprende alfa-lactoalbúmina en una proporción aproximada de 0,2 hasta 0,4 g/100 kcal de composición nutricional, o en una proporción de al menos 1,7 g/l, al menos 2,0 g/l, al menos 2,3 g/l o al menos 2,6 g/l de composición nutricional.

35 En algunas formas de ejecución ventajosas la fuente proteica es predominantemente suero de leche (es decir, más del 50% de las proteínas provienen de proteínas de suero de leche, por ejemplo un 60% o 70%).

Las proteínas pueden ser intactas o hidrolizadas o una mezcla de proteínas intactas e hidrolizadas. El término "intacto" significa que la parte principal de las proteínas está intacta, es decir, que la estructura molecular está inalterada, por ejemplo que al menos el 80% de las proteínas no están alteradas, que al menos el 85% de las proteínas no están alteradas, preferiblemente que al menos el 90% de las proteínas no están alteradas, con mayor preferencia que al menos el 95% de las proteínas no están alteradas, por ejemplo que al menos el 98% de las proteínas están inalteradas. En una forma de ejecución particular el 100% de las proteínas están inalteradas.

45 En el contexto de la presente invención el término "hidrolizado" se refiere a una proteína que ha sido hidrolizada o descompuesta en sus aminoácidos integrantes.

Las proteínas pueden estar total (es decir, extensamente) o parcialmente hidrolizadas. Puede ser deseable suministrar proteínas parcialmente hidrolizadas (grado de hidrólisis entre 2 y 20%), por ejemplo para los bebés o niños pequeños supuestamente con riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca. Si se requieren proteínas hidrolizadas, el proceso de hidrólisis se puede llevar a cabo del modo deseado y conocido en el estado técnico. Por ejemplo, los hidrolizados de proteína de suero de leche se pueden preparar hidrolizando enzimáticamente la fracción del suero de la leche en una o más etapas. Si la fracción de suero de leche usada como material de partida está prácticamente libre de lactosa se observa que la proteína sufre mucho menos bloqueo de lisina durante el proceso de hidrólisis. Esto permite reducir el grado del bloqueo de lisina de aproximadamente un 15% en peso de lisina total hasta menos de aproximadamente un 10% en peso de lisina; por ejemplo hasta aproximadamente un 7% en peso de lisina, lo cual mejora en gran medida la calidad nutricional de la fuente proteica.

60 En una forma de ejecución de la presente invención, al menos el 70% de las proteínas están hidrolizadas, de manera preferente al menos el 80% de las proteínas están hidrolizadas, por ejemplo, al menos el 85% de las proteínas están hidrolizadas, con mayor preferencia al menos el 90% de las proteínas están hidrolizadas, por ejemplo al menos el 95% de las proteínas están hidrolizadas, especialmente al menos el 98% de las proteínas están hidrolizadas. En una forma de ejecución particular el 100% de las proteínas están hidrolizadas.

65 En una forma de ejecución particular las proteínas de la composición nutricional se hidrolizan o bien están completa o parcialmente hidrolizadas. El grado de hidrólisis (GH) de la proteína puede estar comprendido entre 8 y 40, o entre 20 y 60 o entre 20 y 80 o por encima de 10, 20, 40, 60, 80 o 90.

En una forma de ejecución particular, la composición nutricional conforme a la presente invención es una composición hipoalergénica. En otra forma de ejecución particular, la composición según la presente invención es una composición nutricional hipoalergénica.

5 La composición nutricional según la presente invención contiene en general una fuente de carbohidratos, lo cual es especialmente preferible cuando la composición nutricional de la presente invención es una fórmula infantil. En este caso se puede emplear cualquier fuente de carbohidratos encontrada normalmente en las fórmulas infantiles, como por ejemplo lactosa, sacarosa, maltodextrina, almidón y mezclas de los mismos, aunque una de las fuentes preferidas de carbohidratos es la lactosa.

10 La composición nutricional según la presente invención lleva en general una fuente de lípidos, lo cual es especialmente relevante cuando la composición nutricional de la presente invención es una fórmula infantil. En este caso la fuente de lípidos puede ser cualquier lípido o grasa adecuada para usar en las fórmulas infantiles. Algunas fuentes adecuadas de grasa incluyen el aceite de palma, el aceite de girasol alto en oleico y el aceite de cártamo alto en oleico. También se pueden añadir los ácidos grasos esenciales linoleico y ácido α -linolénico, así como pequeñas cantidades de aceites con elevadas proporciones de ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico preformados, como por ejemplo aceites de pescado o aceites microbianos. La fuente de grasa puede tener una relación entre ácidos grasos n-6 y n-3 de 5:1 hasta 15:1 aproximadamente; por ejemplo de 8:1 hasta 10:1 aproximadamente.

20 En una forma de ejecución, la composición nutricional de la presente invención contiene triglicéridos con alto contenido de sn-2 palmitato, preferiblemente triglicéridos que tienen más del 33% de los ácidos palmíticos en la posición sn-2.

25 En una forma de ejecución, la composición nutricional de la presente invención contiene aproximadamente 5 o 6 g de grasa por 100 kcal y por ejemplo al menos el 7,5% en peso de esta grasa, aproximadamente, por ejemplo el 7,5-12,0% aproximadamente, está compuesta por ácido palmítico en la posición sn-2.

30 En una forma de ejecución de la presente invención la composición lleva al menos un 7,5%, preferiblemente un 8%, con mayor preferencia al menos un 9,6% de grasa, que es sn-2 palmitato. Por ejemplo, aproximadamente 7,8-11,8% en peso, aproximadamente 8,0-11,5% en peso, aproximadamente 8,5-11,0% en peso o aproximadamente 9,0-10,0% en peso de la grasa es de ácido palmítico en la posición sn-2 de un triglicérido.

35 En algunas formas de ejecución el ácido palmítico constituye un 15 hasta un 25% aproximadamente, por ejemplo un 15 hasta un 20% aproximadamente, en peso, del contenido total de ácidos grasos de la fórmula, y al menos el 30% aproximadamente, por ejemplo entre el 35 y el 43% aproximadamente del contenido total de ácido palmítico está en la posición sn-2.

40 La composición Betapol™ B-55 comercializada por Lipid Nutrition es una mezcla de triglicéridos procedente de aceite vegetal en la cual al menos el 54% del ácido palmítico está en la posición sn-2 de la molécula de glicerina. En una forma de ejecución la composición nutricional de la presente invención tiene un contenido de grasa constituida por un 40-50% en peso aproximadamente de Betapol™ B-55, por ejemplo entre un 43% y 45% en peso aproximadamente. Los especialistas en la materia reconocerán que el porcentaje empleado de grasa rica en sn-2 y la proporción total de sn-2 palmitato en la fórmula puede variar, y que se puede usar un aceite rico en sn-2 palmitato diferente, sin apartarse de la esencia y del alcance de la presente invención.

45 La composición nutricional de la presente invención también puede contener todas las vitaminas y minerales que se consideran esenciales en la dieta diaria y en cantidades nutricionalmente significativas. Se han fijado unos requisitos mínimos de ciertas vitaminas y minerales. Como ejemplos de minerales, vitaminas y otros nutrientes opcionalmente contenidos en la composición de la presente invención cabe citar: vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina E, vitamina K, vitamina C, vitamina D, ácido fólico, inositol, niacina, biotina, ácido pantoténico, colina, calcio, fósforo, yodo, hierro, magnesio, cobre, zinc, manganeso, cloro, potasio, sodio, selenio, cromo, molibdeno, taurina y L-carnitina. Los minerales se añaden generalmente en forma salina. La presencia y las cantidades de minerales específicos y otras vitaminas variarán según la población prevista.

50 Si es necesario, la composición nutricional de la presente invención puede contener emulsionantes y estabilizantes tales como soja, lecitina, ésteres de ácido cítrico de mono- y diglicéridos, y similares.

La composición nutricional de la presente invención también puede incluir otras sustancias de efecto beneficioso tales como lactoferrina, nucleótidos, nucleósidos y similares.

60 La composición nutricional de la presente invención también puede contener carotenoide(s). En algunas formas de ejecución particulares de la presente invención la composición nutricional de la presente invención no lleva ningún carotenoide.

65 La composición nutricional de acuerdo con la presente invención se puede preparar de cualquier manera adecuada. Seguidamente se describe una composición a modo de ejemplo.

Por ejemplo, una fórmula de tipo infantil se puede preparar mezclando en proporciones apropiadas la fuente proteica, la fuente de carbohidratos y la fuente de grasa. En caso de usar emulsionantes pueden incluirse en este momento. Las vitaminas y minerales también se pueden agregar en este punto, pero en general se añaden más tarde para evitar la degradación térmica. Cualquier vitamina lipófila, emulsionante y similares se pueden disolver en la fuente de grasa antes de realizar la mezcla. Para formar una mezcla líquida se puede agregar agua, preferiblemente agua que haya sido sometida a ósmosis inversa. La temperatura del agua está comprendida convenientemente en el intervalo entre 50°C y 80°C aproximadamente, para favorecer la dispersión de los ingredientes. Para formar la mezcla líquida pueden emplearse licuadores disponibles comercialmente. El oligosacárido u oligosacáridos fucosilados y el oligosacárido u oligosacáridos N-acetilados se pueden agregar en esta etapa, sobre todo si el producto final debe tener una forma líquida. Cuando el producto final debe ser en polvo también se pueden incorporar en esta etapa, si así se desea.

Luego la mezcla líquida se homogeneiza, por ejemplo en dos etapas.

Después la mezcla líquida se puede tratar térmicamente para reducir las cargas bacterianas, calentando rápidamente la mezcla líquida a una temperatura comprendida en el intervalo aproximado entre 80°C y 150°C durante un tiempo entre aproximadamente 5 segundos y aproximadamente 5 minutos, por ejemplo, lo cual se puede realizar por inyección de vapor, en un autoclave o con un intercambiador de calor, por ejemplo con un intercambiador de calor de placas.

Entonces la mezcla líquida se puede enfriar entre 60°C y 85°C aproximadamente, por ejemplo mediante refrigeración instantánea. La mezcla líquida se puede homogeneizar de nuevo, por ejemplo en dos etapas entre 10 MPa y 30 MPa aproximadamente en la primera etapa y entre 2 MPa y 10 MPa aproximadamente en la segunda etapa. Después la mezcla homogeneizada puede enfriarse para agregar los ingredientes térmicamente sensibles, como las vitaminas y minerales. En este punto se ajusta adecuadamente el pH y el contenido de sólidos de la mezcla homogeneizada.

Si el producto final debe ser en polvo, la mezcla homogeneizada se transfiere a un aparato adecuado de secado, como por ejemplo un secador por pulverización o un liofilizador, y se convierte en polvo. El contenido de humedad del polvo debe ser inferior al 5% en peso aproximadamente. El oligosacárido u oligosacáridos fucosilados y el oligosacárido u oligosacáridos N-acetilados se pueden incorporar opcionalmente en esta etapa mezclándolos en seco o formando un jarabe cristalino junto con la(s) cepa(s) probiótica(s) (si se usan) y secando la mezcla por pulverización o liofilización.

Si se prefiere una composición líquida, la mezcla homogeneizada puede esterilizarse y luego envasarse asépticamente en recipientes adecuados o puede envasarse primero en los recipientes y luego esterilizarse en autoclave.

En otra forma de ejecución la composición de la presente invención puede ser un suplemento.

El suplemento puede estar en forma de tabletas, cápsulas, pastillas o en forma líquida, por ejemplo. El suplemento puede contener además hidrocoloides protectores (como por ejemplo gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes filmógenos, agentes/materiales de encapsulación, materiales de pared/envoltura, compuestos matriciales, recubrimientos, emulsionantes, agentes surfactantes, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, vehículos, cargas, compuestos auxiliares, agentes dispersantes, agentes humectantes, coadyuvantes de procesamiento (disolventes), agentes fluidificantes, agentes enmascaradores del sabor, agentes espesantes, agentes coagulantes y agentes gelificantes. El suplemento también puede contener aditivos y adyuvantes farmacéuticos habituales, excipientes y diluyentes, incluidos, entre otros, agua, gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, lignina-sulfonato, talco, azúcares, almidón, goma arábica, aceites vegetales, polialquilenglicoles, agentes aromatizantes, conservantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, cargas y similares.

Además, el suplemento puede contener un material soporte orgánico o inorgánico que sea apto para la administración oral o parenteral, así como vitaminas, minerales, oligoelementos y otros micronutrientes según las recomendaciones de organismos gubernamentales como la USRDA.

La composición nutricional según la presente invención es para uso de bebés o niños pequeños. Está especialmente adaptado para bebés menores de 6 meses.

Los bebés o niños pequeños pueden ser nacidos a término o prematuramente. En una forma de ejecución particular la composición nutricional de la presente invención es para uso de bebés o niños pequeños que nacieron prematuros. En una forma de ejecución particular la composición nutricional de la presente invención es para uso de bebés nacidos prematuramente.

En una forma de ejecución la composición nutricional de la presente invención también se puede usar para un bebé o un niño que nació de pequeño tamaño para la edad gestacional o con peso.

Los bebés o niños pequeños con bajo peso al nacer pueden ser o no prematuros, y análogamente los bebés o niños de pequeño tamaño para la edad gestacional pueden ser o no prematuros.

La composición nutricional de la presente invención también se puede usar para un bebé o un niño pequeño que nació por cesárea o que fue alumbrado por vía vaginal.

Todos los bebés y niños pequeños se pueden beneficiar de la presente invención, ya que todos ellos son o pueden ser a cierta edad susceptibles de adquirir una microbiota intestinal desequilibrada.

En algunas formas de ejecución ventajosas de la presente invención, la composición nutricional es para bebés o niños pequeños con una microbiota frágil o desequilibrada o disbiosis microbiana, como los bebés prematuros, los bebés nacidos por cesárea, los bebés nacidos con menor tamaño para la edad gestacional o con bajo peso, los bebés/niños pequeños hospitalizados, los bebés/niños pequeños que han sido tratados o están en tratamiento con antibióticos y/o los bebés/niños pequeños que sufren o han sufrido una infección y/o inflamación intestinal.

De hecho se prevé que la composición de la presente invención sea incluso más beneficiosa para bebés nacidos con una microbiota intestinal potencialmente deteriorada o para bebés/niños pequeños delicados (como los bebés nacidos prematuramente y/o los bebés nacidos por cesárea). También se prevé que la composición de la presente invención sea incluso más beneficiosa para los bebés/niños pequeños que presentan trastornos intestinales (tales como diarrea, infecciones o cólicos), especialmente después del nacimiento, por ejemplo durante las primeras 4 semanas después del nacimiento.

En ciertas formas de ejecución de la presente invención, la composición según la misma está destinada a los bebés nacidos prematuramente o por cesárea, o nacidos con menor tamaño para la edad gestacional o con bajo peso, o que tienen una microbiota intestinal desequilibrada o anormal o que sufren o han sufrido infección y/o inflamación intestinal, sobre todo cuando se trata de bebés de 0-6 meses de edad. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que los niños más pequeños se benefician aún más de la composición de la presente invención, especialmente cuando los niños tienen (o corren el riesgo de tener) una microbiota intestinal desequilibrada y/o tienen un estado de salud delicado (como el ejemplificado por las afecciones anteriormente mencionadas).

Es de particular interés que dichos niños adquieran una microbiota intestinal parecida a la microbiota intestinal de un lactante amamantado (preferiblemente de lactantes exclusivamente amamantados). De hecho les proporciona una buena cantidad de elementos saludables que pueden ser beneficiosos, especialmente para aquellos niños delicados.

La composición nutricional se puede administrar (o facilitar o tomar) a una edad y durante un periodo que depende de las necesidades.

En una forma de ejecución los bebés o niños pequeños tienen 0-36 meses de edad, por ejemplo 0-12 meses o 0-6 meses de edad. Se prevé que la composición de la presente invención sea incluso más beneficiosa para los lactantes recién nacidos (de 0-4 semanas o 0-8 semanas) ya que su tracto intestinal puede ser más delicado.

En algunas formas de ejecución particulares la composición nutricional puede ser una fórmula infantil especialmente destinada a bebés entre 0 y 12 meses de edad alimentados predominantemente con fórmulas infantiles.

En algunas formas de ejecución ventajosas la composición nutricional se puede administrar inmediatamente después del nacimiento de los bebés, por ejemplo. La composición de la presente invención también se puede administrar durante la primera semana de vida del bebé, o durante las primeras 2 semanas de vida, o durante las primeras 3 semanas de vida, o durante el primer mes de vida, o durante los primeros 2 meses de vida, o durante los primeros 3 meses de vida, o durante los primeros 4 meses de vida, o durante los primeros 6 meses de vida, o durante los primeros 8 meses de vida, o durante los primeros 10 meses de vida, o durante el primer año de vida, o durante los primeros dos años de vida o incluso más. En algunas formas de ejecución particularmente ventajosas de la presente invención la composición nutricional se proporciona (o administra) a un bebé durante los primeros 4 o 6 meses tras el nacimiento de dicho bebé. En algunas otras formas de ejecución, la composición nutricional de la presente invención se administra durante pocos días (p.ej. 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20...), o pocas semanas (p.ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10...), o unos pocos meses (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10...) después del nacimiento.

La composición nutricional de la presente invención se puede administrar durante algunos días (1, 2, 3, 4, 5, 6...), o durante algunas semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o incluso más) o durante algunos meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o incluso más), según las necesidades.

En algunas formas de ejecución la composición según la presente invención se puede usar antes y/o durante el periodo de destete.

En una forma de ejecución la composición de la presente invención se proporciona al bebé o niño pequeño como una composición complementaria de la leche materna. En algunas formas de ejecución el bebé o niño pequeño recibe la leche materna durante al menos las primeras 2 semanas o los primeros 1, 2, 4 o 6 meses. En una forma de ejecución, la composición nutricional de la presente invención se proporciona al bebé o niño pequeño después de dicho periodo de nutrición materna, o se administra durante dicho periodo de nutrición con leche materna. En otra forma de ejecución

la composición se administra al bebé o niño pequeño como composición nutricional única o principal durante al menos un periodo de tiempo, p.ej. después del 1^{er}, 2^o o 4^o mes de vida, durante al menos 1, 2, 4 o 6 meses.

En una forma de ejecución la composición nutricional de la presente invención es una composición nutricional completa (que satisface todas o la mayoría de necesidades nutricionales del sujeto). En otra forma de ejecución la composición nutricional es un suplemento o un reforzante destinado, por ejemplo, a suplementar la leche humana o complementar una fórmula infantil o una fórmula de continuación/seguimiento.

La composición nutricional de la presente invención tiene un efecto positivo en la microbiota global de los lactantes o niños pequeños: en el intestino de los lactantes o niños pequeños alimentados con la composición nutricional de la presente invención promueve y/o induce una microbiota global más parecida a la de los bebés o niños pequeños alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota intestinal global de los bebés o niños pequeños alimentados de manera predominante o exclusiva con una composición nutricional corriente que no contenga dichos oligosacáridos (es decir que no contenga al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado).

El principal y sorprendente beneficio para la salud de la composición nutricional de la presente invención es que modula la microbiota global de los lactantes alimentados con la composición nutricional de la presente invención de manera global para asemejarla a la de los bebés amamantados. No solo modifica algunos taxones específicos de la microbiota, sino que la composición nutricional induce especialmente una transformación de la composición de la microbiota global hacia la inducida por la lactancia. Además, tal como se deduce de los ensayos, tanto la composición de la microbiota intestinal (es decir, la abundancia taxonómica relativa y/o la diversidad de la microbiota global) como la función de la microbiota intestinal (es decir, su actividad y/o funcionalidad, p.ej. los metabolitos resultantes) se aproxima más a las de los lactantes amamantados. Por consiguiente, respecto a la composición de la microbiota intestinal, la microbiota inducida/promovida es específica en 2 aspectos:

“cuantitativamente”: la flora intestinal contiene más bacterias beneficiosas y menos bacterias no beneficiosas o perjudiciales;

“cualitativamente”: la variedad de taxones bacterianos se parece más a una microbiota de lactantes amamantados.

La diversidad de la microbiota global puede ser la diversidad alfa (los detalles se indican en la parte de los ejemplos) y se puede ilustrar, por ejemplo, midiéndola según el árbol completo de diversidad filogenética. El efecto en la salud que aporta la composición nutricional de la presente invención se puede medir en bebés o niños pequeños de edad comprendida entre 0 y 36 meses, opcionalmente entre 0 y 12 meses. Se puede observar tras unos días o semanas de uso de la composición, por ejemplo después de 4 semanas o 6 semanas u 8 semanas de uso. Sin embargo pueden pasar 4, 6, 8 semanas antes de poder observar la microbiota inducida. Es decir, pueden transcurrir 4, 6, 8 semanas antes de que esta microbiota global promovida/inducida sea observable. Se puede medir por ejemplo en las heces de los bebés/niños pequeños. En el contexto de la presente invención, el beneficio para la salud aproxima la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños a la microbiota de los lactantes o niños pequeños alimentados exclusivamente con leche materna. Esto se observa sobre todo al compararla con la de los bebés o niños pequeños que no reciben la composición de la presente invención.

Este efecto positivo puede comprender i) la regulación a la baja, disminución o inhibición del crecimiento de bacterias patógenas o la reducción de la carga de bacterias patógenas y/o ii) la regulación al alza, aumento o promoción del crecimiento de las bacterias beneficiosas. En algunas formas de ejecución la composición nutricional de la presente invención implica (o comprende o está acompañada o se caracteriza por) una regulación al alza de la población de *Bifidobacterium* y/o una regulación a la baja de las poblaciones de *Escherichia* y/o *Peptostreptococcaceae*, respecto a la microbiota global en el intestino de bebés o niños pequeños alimentados predominante o exclusivamente con una composición nutricional corriente. Este efecto se puede medir en las heces de dichos bebés o niños pequeños, por ejemplo a las 1, 4, 6 u 8 semanas de edad o más tarde, y por ejemplo tras 1, 4, 6 u 8 semanas de alimentación con dicha composición nutricional. La composición de la microbiota en las heces se puede medir, por ejemplo, basándose en el análisis del ADNr 16S o en el análisis metagenómico (los detalles se indican en la parte de los ejemplos).

Regulando a la baja, reduciendo y/o inhibiendo el crecimiento de poblaciones bacterianas patógenas y/o induciendo cualitativa y cuantitativamente las bacterias más beneficiosas, la composición de la presente invención proporciona efectos positivos para la salud. Esta microbiota intestinal saludable está vinculada en última instancia a una absorción adecuada de los nutrientes, a un crecimiento adecuado, a menos cólicos, menos infecciones, menos diarreas y a una mejor salud intestinal.

El efecto de la presente invención puede ser preventivo (por ejemplo, evitar el desequilibrio de la microbiota intestinal, evitar infecciones intestinales, mantener una microbiota intestinal sana, inducir una microbiota intestinal saludable) o curativo (restablecer una microbiota intestinal sana cuando está alterada, ayudar a eliminar o disminuir las poblaciones patógenas en el intestino, inducir una microbiota saludable después de los trastornos debidos, por ejemplo, a diarreas o infecciones).

En algunas formas de ejecución, la composición nutricional de la presente invención implica (o comprende o está acompañada o se caracteriza por) una disminución de patógenos y/o una reducción de factores de virulencia, en

comparación con la microbiota global del intestino de lactantes o niños pequeños alimentados de modo predominante o exclusivo con la composición nutricional corriente que no contiene los oligosacáridos. Estos efectos pueden medirse en las heces de dichos bebés o niños pequeños, por ejemplo a las 1, 4, 6 u 8 semanas de edad, y por ejemplo después de 1, 4, 6 u 8 semanas de alimentación con dicha composición nutricional.

La disminución de patógenos se refiere a una reducción de la aparición y/o proporción de patógenos (p.ej. su carga, cantidades). Se puede medir, por ejemplo, utilizando el método PCR Luminex (los detalles se indican en la parte de los ejemplos). Los patógenos que pueden reducirse pueden ser virus, bacterias y/o protistas. Ejemplos particulares de patógenos virales son los norovirus (p.ej. los norovirus GI/GII) y/o los rotavirus (p.ej. rotavirus A). Ejemplos particulares de patógenos bacterianos son *Clostridium difficile* (p.ej. la toxina *Clostridium difficile* A/B), *Campylobacter*, *Escherichia coli* (p.ej. *E. coli* 0157). Ejemplos particulares de patógenos protistas son los *Cryptosporidium*.

En un ejemplo particular la composición nutricional implica una reducción del patógeno bacteriano *Clostridium difficile*.

Los factores de virulencia pueden ser genes virulentos y/o genes de resistencia a los antibióticos, los cuales pueden detectarse, por ejemplo, mediante análisis metagenómico (los detalles se indican en la parte de los ejemplos). Como ejemplos particulares de genes virulentos cabe citar gi: 16767513 (yjcB - proteína putativa de membrana interna) de la *Salmonella enterica* LT2, gi: 21284341 (cna - precursor de adhesina de colágeno) del *Staphylococcus aureus* MW2, gi: 24528016 (I7045 - L7045) de la *Escherichia coli* 536, gi: 15808725 (fecB - FecB) de la *Shigella flexneri* YSH6000 y gi: 21282741 (isdA - proteína de la superficie celular) del *Staphylococcus aureus* MW2.

En algunas formas de ejecución la composición nutricional de la presente invención implica (o comprende o está acompañada o se caracteriza por) una reducción de la producción de aminoácidos libres y/o una estimulación de la producción de lactato en comparación con la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados de manera predominante o exclusiva con una composición nutricional corriente que no contiene los oligosacáridos. El lactato es producido por bacterias de ácido láctico como lactobacilos y bifidobacterias, y puede evitar el crecimiento de otras bacterias, incluidas las patógenas. Como ejemplos particulares de aminoácidos libres cabe citar: fenilalanina, tirosina e isoleucina. Estos efectos se pueden medir en las heces de dichos bebés o niños pequeños, por ejemplo a las 1, 4, 6 u 8 semanas de edad, y después de 1, 4, 6 u 8 semanas de alimentación con dicha composición nutricional. Las mediciones pueden realizarse utilizando un método metabonómico bien establecido basado en la espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) (Moco y otros, 2013, Metabolomics perspectives in pediatric research [Perspectivas de la metabolómica en la investigación pediátrica], *Pediatr.Res.*73, 570-576).

El efecto en la salud proporcionado a los lactantes o niños pequeños se puede medir por diversos métodos, tal como se ilustra en el siguiente ejemplo.

En una forma de ejecución el efecto en la microbiota global se mide calculando la diversidad alfa de cada muestra y analizando su distribución (los detalles se indican en la parte de los ejemplos).

En una forma de ejecución, el efecto en la microbiota global se mide calculando la diversidad beta entre grupos con una métrica que tiene en cuenta las distancias filogenéticas entre las UTO (unidades taxonómicas operacionales), por ejemplo el método UniFrac, y analizando su distribución. La diversidad beta entre los grupos de control, ensayo y lactancia materna puede evaluarse alternativamente mediante una ordenación multivariada con pruebas de hipótesis basadas en métodos de aleatorización (p.ej. análisis de correspondencia canónica (ACC), análisis de redundancia (ARD) o una prueba paramétrica o no paramétrica multivariada (p.ej. Adonis, ANOSIM, ANOVA multivariante). En un ejemplo particular la diversidad beta se calcula mediante ARD.

En una forma de ejecución de la presente invención, la microbiota global promovida y/o inducida en el intestino de los lactantes y/o niños pequeños alimentados con la composición nutricional de la presente invención tiene una diversidad alfa significativamente reducida (p.ej. una reducción de al menos 0,10 unidades, al menos 0,12 unidades o al menos 0,15 unidades, por ejemplo 0,19 unidades) en comparación con la microbiota global del intestino de lactantes o niños pequeños alimentados de manera predominante o exclusiva con una composición nutricional corriente que no contiene los oligosacáridos contenidos en la composición nutricional de la presente invención (p.ej. al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado) y por lo tanto es más parecida a la de los lactantes amamantados.

Una microbiota intestinal adecuada y saludable es un factor clave en el desarrollo del sistema inmunitario de la mucosa del lactante. La composición nutricional de la presente invención se puede emplear con finalidad preventiva y/o como tratamiento.

En un aspecto particular la presente invención también se refiere a una composición nutricional para proporcionar un crecimiento saludable, promover un sistema inmunitario saludable, procurar una función intestinal saludable y/o para prevenir y/o tratar la disbiosis microbiana intestinal en los lactantes o niños pequeños.

Los beneficios para la salud proporcionados por la composición de la presente invención pueden ser efectivos a corto y/o largo plazo.

El efecto puede ser inmediato a la administración de la composición de la presente invención, o en un momento de la vida posterior, es decir, después de la administración de la composición, p.ej. a partir de 1 semana hasta varios meses, por ejemplo entre 2 y 4 semanas, entre 2 y 6 semanas, entre 2 y 8 semanas, entre 1 y 6 meses o entre 2 y 12 meses a partir de dicha administración.

5

Otros objetivos:

Otro objeto de la presente invención es el uso de al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado en la preparación de una composición nutricional para promover y/o inducir en los bebés o niños pequeños una microbiota intestinal global más semejante a la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados de manera predominante o exclusiva con una composición nutricional corriente que no contenga dichos oligosacáridos.

10

Otro objeto de la presente invención es el uso de la composición nutricional según la presente invención para facilitar un crecimiento saludable, promover un sistema inmunitario saludable, procurar una función intestinal saludable y/o para prevenir y/o tratar la disbiosis microbiana intestinal en los lactantes o niños pequeños.

15

Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que lleva al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado para promover y/o inducir en bebés o niños pequeños una microbiota intestinal global más similar a la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota intestinal global de los bebés o niños pequeños alimentados de manera predominante o exclusiva con una composición nutricional corriente que no contiene dichos oligosacáridos.

20

Esta composición farmacéutica puede usarse para facilitar un crecimiento saludable, promover un sistema inmunitario saludable, procurar una función intestinal saludable y/o para prevenir y/o tratar la disbiosis microbiana intestinal en los lactantes o niños pequeños.

25

Otro objeto de la presente invención se refiere a un método para promover y/o inducir en bebés o niños pequeños una microbiota intestinal global más similar a la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota intestinal global de los bebés o niños pequeños alimentados de modo predominante o exclusivo con una composición nutricional corriente que no contiene dichos oligosacáridos. Dicho método consiste en administrar a dicho bebé o niño pequeño una composición nutricional que contenga al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado.

30

Otro objeto de la presente invención es un método para proporcionar un crecimiento saludable, promover un sistema inmunitario saludable, procurar una función intestinal saludable y/o prevenir y/o tratar la disbiosis microbiana intestinal en bebés o niños pequeños. Dicho método consiste en administrar a dicho bebé o niño pequeño una composición nutricional que contenga al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado.

35

Las formas de ejecución y los ejemplos mencionados anteriormente (relacionados p.ej. con los tipos y proporciones de oligosacáridos, la composición nutricional, la administración, la población objeto...) también son aplicables a estos diversos objetos (es decir, a los usos, a la composición farmacéutica, a los métodos...).

40

45 Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran algunas formas de ejecución concretas de la composición para usar según la presente invención. Los ejemplos se facilitan únicamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitaciones de la presente invención, ya que la misma admite muchas variaciones sin apartarse de su esencia.

50

Ejemplo 1

En la siguiente tabla 1 se proporciona un ejemplo de una composición nutricional (p.ej. de una fórmula infantil) según la presente invención. Esta composición se proporciona solo a modo ilustrativo.

55

Tabla 1: ejemplo de una composición nutricional (p.ej. de una fórmula infantil) según la presente invención

Nutrientes	por 100 kcal	por litro
Energía (kcal)	100	670
Proteína (g)	1,83	12,3
Grasa (g)	5,3	35,7
Ácido linoleico (g)	0,79	5,3
Ácido α -linolénico (mg)	101	675
Lactosa (g)	11,2	74,7
Minerales (g)	0,37	2,5
Na (mg)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Mn (μ g)	8	50
Se (μ g)	2	13
Vitamina A (μ g RE)	105	700
Vitamina D (μ g)	1,5	10
Vitamina E (mg TE)	0,8	5,4
Vitamina K1 (μ g)	8	54
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,47
Vitamina B2 (mg)	0,15	1,0
Niacina (mg)	1	6,7
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,50
Ácido fólico (μ g)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 (μ g)	0,3	2
Biotina (μ g)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (μ g)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
Oligosacáridos (OLH)	2FL (g)	1
	LNnT (g)	0,5

Ejemplo 2

5

Descripción del estudio clínico

Se realizó un ensayo de seguridad en el Dipartimento Materno Infantile, Unità Operativa Complessa di Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale, AOUP "Paolo Giaccone" en Palermo, Italia y Kinderartsenpraktijk en Hasselt, Bélgica.

10

Este estudio fue un ensayo clínico aleatorizado y controlado en dos centros de intervención con 2 grupos alimentados paralelamente con fórmulas. La población de estudio para los grupos alimentados con fórmula estaba integrada por bebés sanos, varones y hembras, nacidos a término, de 0 a 14 días de edad, que estaban alimentados exclusivamente con fórmula en el momento de la inscripción. Los bebés seleccionables fueron asignados aleatoriamente a una de las dos fórmulas de estudio (control o ensayo), utilizando el tipo de parto (vaginal o por cesárea) y el género como factores de estratificación. En la fase 1 los bebés aleatorizados fueron alimentados exclusivamente con las fórmulas de ensayo o de control desde la inscripción hasta los 4 meses de edad, en cantidades adecuadas para su peso, edad y apetito. Los padres/cuidadores, los investigadores, el personal auxiliar del estudio y el gerente del proyecto clínico no conocían la identidad de las fórmulas del ensayo.

20

Las fórmulas infantiles utilizadas en el estudio fueron las siguientes:

- Al grupo de control se le dio la siguiente fórmula de control: una fórmula infantil inicial estándar con predominio de suero de leche, que contenía AGPI-CL pero ningún probiótico (66,9 kcal/100 ml de fórmula reconstituida, 1,888 g de proteína/100 kcal de polvo con una proporción suero de leche:caseína de 71,6%: 28,4%, véase la composición detallada en la tabla 2).
- Al grupo de ensayo se le dio la siguiente fórmula: una fórmula como la de control, pero con una parte de la lactosa reemplazada con 2 OLH (2FL y LNnT) en las siguientes proporciones: 0,5-0,6 g de LNnT y 1,0-1,2 g de 2'FL por litro de fórmula reconstituida (véase la composición detallada en la tabla 2).

25

Como grupo de referencia (grupo alimentado con leche materna = grupo BF) se reclutaron lactantes exclusivamente amamantados durante al menos durante 3 meses, para tomar muestras de heces a los 3 meses de edad.

5

Tabla 2: composición de la fórmula de control y de la fórmula de ensayo

Parámetros	100 g de fórmula de control	100 g de fórmula de ensayo
Energía (kcal)	518,7	518,7
Agua (g)	2,6	2,6
Grasa (g)	27,5	27,5
Ácidos grasos saturados (g)	11	11
Ácidos grasos mono-insaturados (g)	9,4	9,4
Ácido alfa-linolénico C18:3 n-3 (mg)	510	510
Ácido docosahexaenoico C22:6 n-3 (DHA) (mg)	61	61
Ácido araquidónico C20:4 n-6 (ARA) (mg)	61	61
Ácido linoleico C18:2 n-6 (mg)	4270	4270
Ácidos grasos poli-insaturados (g)	4,9	4,9
Proteína (g)	9,8	9,8
Carbohidratos disponibles (g)	58	58
Lactosa (g)	56	55
Oligosacáridos (OLH)	LNnT (g)	0,39-0,47
	2FL (g)	0,77-0,93
Azúcares (g)	56	56
Cenizas (g)	2,1	2,1
Sodio (mg)	162	162
Potasio (mg)	575	575
Cloro (mg)	348	348
Calcio (mg)	317	317
Fósforo (mg)	178	178
Magnesio (mg)	43	43
Manganeso (µg)	121	121
Selenio (µg)	13	13
Hierro (mg)	4,8	4,8
Cobre (mg)	0,37	0,37
Cinc (mg)	5	5
Yodo (µg)	102	102
Flúor (µg)	60	60
Vitamina A (Retinol) (µg RE)	542	542
Vitamina D (Calciferol) (µg D)	7,6	7,6
Vitamina E (Tocoferol) (mg TE)	8,4	8,4
Vitamina K (Fitoquinona) (µg)	45	45
Vitamina C (Ácido ascórbico) (mg)	80	80
Vitamina B1 (Base tiamina) (mg)	0,6	0,6
Vitamina B2 (Riboflavina) (mg)	0,67	0,67
Niacina (mg)	4,1	4,1
Vitamina B6 (Base piridoxina) (mg)	0,34	0,34
Ácido fólico (µg)	80,9	80,9
Ácido pantoténico (mg)	3,4	3,4
Vitamina B12 (Cianocobalamina) (µg)	1,8	1,8
Biotina (µg)	14	14
Colina (mg)	48	48
Inositol (mg)	48	48
Taurina (mg)	33	33
Carnitina, L (mg)	9,5	9,5
Nucleótidos (mg)	15	15
Adenosin 5'-monofosfato (mg)	3,8	3,8
Citidin 5'-monofosfato (mg)	6	6
Guanosin 5'-monofosfato (mg)	1,2	1,2
Uridin 5'-monofosfato (mg)	4	4
Ca / P (relación)	1,781	1,781
Linoleico / alfa-linolénico (relación)	8,373	8,373
Vitamina C / Fe (relación)	16,667	16,667
Fenilalanina, L (mg)	488	488

(continuación)

Parámetros	100 g de fórmula de control	100 g de fórmula de ensayo
Alanina, L (mg)	391	391
Arginina, L (mg)	258	258
Cistina, L (mg)	247	247
Histidina, L (mg)	226	226
Isoleucina, L (mg)	502	502
Leucina, L (mg)	1,045	1,045
Metionina, L (mg)	205	205
Treonina, L (mg)	460	460
Triptófano, L (mg)	200	200
Tirosina, L (mg)	399	399
Valina, L (mg)	542	542

Se evaluó la microbiota en heces de cada grupo a los 3 meses de edad, usando diferentes técnicas; véase tabla 3.

Tabla 3: número de bebés en los grupos de intención de tratamiento (ITT), en los grupos de protocolo (PP) y número de muestras de heces disponibles de los grupos de protocolo o del grupo de referencia de bebés amamantados para el análisis de la microbiota por secuenciación global de ADNr 16S, amplificación específica de patógenos por PCR Luminex, secuenciación global de metagenomas y perfilado de metabolitos basado en RMN.

Nº de muestras	ITT	PP	Muestras PP ADNr 16S	Muestras PP Luminex PCR	Muestras PP metagenoma	Muestras PP metabolitos
Control	87	75	63	54	65	64
Ensayo	88	71	58	50	58	57
Amamantados	-	38	33	-	34	32

Materiales y métodos

Recogida de heces

Los padres recogieron en casa muestras de heces de todos los sujetos durante las 48 horas anteriores a la visita de 3 meses. Para ello los padres recibieron un kit (bolsa aislada, bolsa de hielo, botes con espátulas, bolsas de plástico sellables, hoja de instrucciones). Se pidió a los padres que recogieran 2 muestras, que las conservaran en casa dentro de un congelador a -20°C y las llevaran dentro de la bolsa aislada, con una bolsa de hielo congelado en su interior, al lugar de la visita, donde las muestras se mantuvieron congeladas a -80°C. Después las muestras se enviaron en hielo seco al Centro de investigación de Nestlé en Suiza y se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su análisis.

Extracción de ADN fecal

Se extrajo ADN total con el Mini Kit QIAamp DNA Stool (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante, excepto por la adición de una serie de pasos de disrupción mecánica (11 x 45 s), empleando un aparato FastPrep y tubos Lysing Matrix B (MP Biochemicals) (Junick y Blaut, 2012, Quantification of human fecal bifidobacterium species by use of quantitative real-time PCR analysis targeting the groEL gene [Cuantificación de especies de bifidobacterias fecales humanas con el uso del análisis cuantitativo por PCR en tiempo real dirigido al gen groEL]. Appl Environ Microbiol 78: 2613-2622).

Amplificación y secuenciación de genes 16S

Después se amplificó por PCR la región variable V3 a V4 de 16S (Klindworth y otros, 2013, Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies [Evaluación de cebadores generales de PCR del gen de ARN ribosomal 16S para estudios de diversidad basados en secuenciación clásica y de nueva generación]. Nucleic Acids Res 41: e1) y se secuenció usando la tecnología Illumina Miseq universal del modo previamente descrito (Caporaso y otros, 2012, Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms [Análisis de ultra alto rendimiento de la comunidad microbiana en las plataformas Illumina HiSeq y MiSeq]. ISME J 6: 1621-1624).

Análisis de los datos de 16S

Después de la filtración cualitativa, 6.710.039 secuencias especificaron la microbiota de 154 muestras del grupo de protocolo (PP) (véase tabla 3), con una cobertura media de 42.739 secuencias por muestra clasificadas en 173 UTO. Del análisis de ADNr 16S se excluyeron tres muestras con menos de 10.000 secuencias.

Los datos primarios de secuenciación se analizaron usando una mezcla de los paquetes de software Mothur (Schloss y otros, 2009, Introducción del Mothur: programa de código abierto, independiente de plataformas y compatible con comunidades, para describir y comparar comunidades microbianas. Appl Environ Microbiol 75: 7537-7541) y QIIME (Caporaso y otros, 2010, el QIIME permite analizar los datos de secuenciación de comunidades de alto rendimiento. Nat Methods 7: 335-336). Las secuencias de extremos pareados se demultiplexaron y se unieron del modo descrito (Kozich y otros, 2013, Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform [*Desarrollo de una estrategia de secuenciación doble y flujo de gestión de datos para analizar las secuencias de amplicones obtenidas en la plataforma de secuenciación MiSeq Illumina*]. Appl Environ Microbiol 79: 5112-5120). Después las secuencias se dividieron en archivos FASTA separados para cada muestra utilizando los comandos de Mothur [deunique.seqs (), degap.seqs () y split.groups ()]. La conversión al formato QIIME mediante add_qiime_labels.py y los pasos analíticos posteriores se realizaron en QIIME. La revisión de quimeras y la selección de UTO con 97% de identidad se realizaron usando Uchime (Edgar y otros, 2011, UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [*UCHIME mejora la sensibilidad y la velocidad de detección de quimeras*]. Bioinformatics 27: 2194-2200) con pick_open_reference.py. La taxonomía se asignó mediante secuencias representativas empleando el clasificador RDP con un umbral de confianza de 0,6 (Wang y otros, 2007, Clasificador bayesiano ingenuo para la asignación rápida de secuencias de ARNr a la nueva taxonomía bacteriana. Appl Environ Microbiol 73: 5261-5267). Las secuencias representativas de UTO se alinearon usando el método PyNast (Caporaso y otros, 2010, PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment [*herramienta flexible para alinear secuencias con un patrón de alineación*]. Bioinformatics 26: 266-267) y Uclust como método de alineación por pares. Luego las múltiples alineaciones resultantes se filtraron y se usaron para construir un árbol filogenético con el método FastTree (Price y otros, 2009, FastTree: cálculo de grandes árboles de evolución mínima con perfiles en lugar de una matriz de distancias. Mol Biol Evol 26: 1641-1650). Tras la filtración cualitativa (Bokulich y otros, 2013, Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing [*La filtración cualitativa mejora enormemente las estimaciones de diversidad de la secuenciación de amplicones Illumina*]. Métodos Nat 10: 57-59), se realizaron análisis de diversidad alfa en QIIME y análisis de redundancia (ARD) (Kindt R y Coe R., 2005, Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies [*Análisis de árboles de diversidad. Manual y software de métodos estadísticos comunes para estudios ecológicos y de biodiversidad*]. Nairobi: World Agroforestry Center - ICRAF) a nivel genérico con los sitios web Calypso en <http://bioinfo.qimr.edu.au/calypso>.

30 *Análisis de metagenomas*

La composición microbiana de las muestras de heces de los tres grupos se determinó por secuenciación multiplexada de alto rendimiento del ADN aislado de las heces, empleando el aparato Illumina HiSeq con lecturas de PE 100. Las bibliotecas de ADN se crearon con el protocolo Nextera XT. Las muestras se secuenciaron en 6 celdas de flujo de alto rendimiento.

Las primeras lecturas se recortaron usando el programa DynamicTrim (v2.1) del paquete SolexaQA (Cox, MP y otros, BMC Bioinformatics, 2010, SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data [*Evaluación cualitativa a simple vista de datos de secuenciación Illumina de segunda generación*]. BMC Bioinformatics 11: 485-490) con un límite de probabilidad de 0,05. A continuación las secuencias recortadas resultantes se filtraron hasta un umbral de longitud de 25 pb con el programa LengthSort (v2.1) del paquete SolexaQA. Las lecturas filtradas se mapearon frente al genoma humano completo hg19 con el programa Bowtie v2.2.5 (Langmead, B. y Salzberg, S., Nature Methods., 2012, Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [*Alineación rápida por lectura con huecos mediante Bowtie 2*]. Nature Methods 9: 357-359) para eliminar lecturas humanas. En promedio se identificó un 0,9, 0,02 y 3,3% de lecturas humanas en los grupos de control, ensayo y amamantados, respectivamente. Para aumentar la eficiencia computacional se redujo aún más el número de lecturas, utilizando la función unique.seqs de Mothur v1.35 (Schloss, PD, y otros, Appl Environ Microbiol, 2009, Introducción del Mothur: programa de código abierto, independiente de plataformas y compatible con comunidades, para describir y comparar colonias microbianas. (Appl Environ Microbiol 75: 7537-7541), que retorna solo las secuencias características encontradas. Este paso redujo un 50% el número de lecturas. Tras la filtración cualitativa se obtuvo una mediana de 76 a 80 millones de secuencias, de 157 muestras del grupo de protocolo (PP) (véase tabla 3), con una cobertura igual a la de los grupos de referencia de control, ensayo y BF. Se obtuvo una mediana de 36 a 42 millones de secuencias únicas nuevamente distribuidas por igual entre los grupos. Del análisis de metagenomas se excluyó una muestra con solo 53661 secuencias. Las lecturas restantes se utilizaron para perfilar la composición de comunidades microbianas mediante el programa MetaPhlAn v2 (Segata, N. y otros, Nature Methods, 2012, Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes [*Perfilado de comunidades microbianas metagenómicas usando genes característicos como marcadores específicos del clado*]. Nature Methods 9: 811-814).

La presencia de genes codificadores de factores de virulencia conocidos o de genes de resistencia a los antibióticos se estudió empleando ShortBRED. ShortBRED es un canal de comunicación que recoge un conjunto de secuencias proteicas, las agrupa en familias, extrae un conjunto de cadenas características ("marcadores") y luego busca estos marcadores en datos metagenómicos y determina la presencia y abundancia de las familias proteicas de interés. Los marcadores de los factores de virulencia se basaron en todas las secuencias proteicas (2447 secuencias proteicas) de la versión R3 de la base de datos de factores de virulencia de bacterias patógenas (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/> - Chen, LH y otros, 2012, Toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors [*Hacia la diversidad genética y la evolución molecular de los factores de virulencia bacteriana*]. Nucleic Acids Res 40 (publicación

de la base de datos): D641-D645). Los marcadores de los genes de resistencia a los antibióticos se basaron en todas las secuencias proteicas (7828 secuencias proteicas) de la versión 1.1 de la base de datos de genes de resistencia a los antibióticos (<http://ardb.cbc.umd.edu/> - Liu, B. y Pop., M., NAR, 2009, Base de datos de genes de resistencia a los antibióticos ARDB. Nucleic Acids Res 37 (publicación de la base de datos): D443-D447). La significación estadística entre los grupos se evaluó ajustando un modelo de regresión binomial negativa que tiene en cuenta el exceso de datos de recuento cero, si es necesario.

Detección de patógenos por Luminex en las muestras de heces

Las muestras de heces se sometieron a una serie de pasos de disrupción mecánica (3 x 60 s) utilizando un aparato FastPrep y tubos B de Lysing Matrix (MP Biochemicals); la extracción simultánea de ADN y ARN se llevó a cabo con el kit QIAamp MinElute Virus Spin (Qiagen). Los ácidos nucleicos se detectaron empleando el panel de patógenos gastrointestinales (xTAG GPP) de cebadores específicos de secuencia con el sistema Luminex 200, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Luminex Molecular Diagnostics, Inc., Toronto, Canadá). Los analitos detectados fueron serotipos del adenovirus 40/41, Campylobacter (*C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*), toxinas de Clostridium difficile A/B, Cryptosporidium (*C. parvum* y *C. hominis*), Entamoeba histolytica, Escherichia coli 0157, toxinas enterotoxígenas de *E. coli* (ETEC) LT/ST, Giardia (*G. lamblia* también conocida como *G. intestinalis* y *G. duodenalis*), norovirus GI/GII, rotavirus A, *E. coli* productora de toxina tipo Shiga (STEC) stx1/stx2, Vibrio cholera y Yersinia enterocolitica. Los resultados de la detección de Salmonella y Shigella no se tuvieron en cuenta por inconsistencias en las muestras de control.

Análisis de los metabolitos de las heces.

Para adquirir conocimientos más allá del aspecto composicional de la microbiota de las heces, los presentes inventores exploraron la composición bioquímica de las heces usando un método metabonómico bien establecido, basado en la espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹H). La RMN ¹H metabonómica de las heces permite perfilar cuantitativamente los metabolitos más importantes, incluidos los aminoácidos, los ácidos orgánicos principales (lactato, succinato, citrato, etc.) y los carbohidratos, y por tanto abre una ventana única para controlar la funcionalidad metabólica intestinal.

El perfilado metabólico de las muestras de heces fue adaptado a partir de nuestro método publicado con anterioridad (Martin y otros, 2014, Impact of breast-feeding and high- and low-protein formula on the metabolism and growth of infants from overweight and obese mothers [*Influencia de la lactancia materna y de las fórmulas de contenido proteico alto y bajo en el metabolismo y en el crecimiento de los bebés de madres con sobrepeso y obesidad*]. Pediatr Res 75, 535-543. DOI: 10.1038/pr.2013.250). Resumiendo, se tomaron muestras de 80-100 mg de heces congeladas del tubo de recogida de heces, se pesaron y se liofilizaron. Las muestras secas se suspendieron en 1,2 ml de solución tampón de fosfato deuterado KH₂PO₄ 0,2 M que contenía 0,3 mM de azida sódica como agente antibacteriano y 1 mM de 3-(trimetilsilil)-[2,2,3,3-2H₄]-1-propionato sódico como referencia de desplazamiento químico en RMN. Los homogenatos se centrifugaron a 17.000 x g durante 10 minutos y se pasaron 5500 µl del sobrenadante a tubos de RMN de 5 mm. Los perfiles metabólicos de RMN ¹H se obtuvieron con un espectrómetro Bruker Avance III de 600 MHz dotado de una criosonda de 5 mm a 300 K (Bruker, Biospin, Alemania), usando una secuencia estándar de pulsos y una secuencia de pulso spin-eco con supresión de agua, y se procesaron con el paquete de software TOPSPIN (vs 3.2., Bruker). El procesamiento y el análisis de datos se realizó del modo anteriormente indicado (Martin y otros, 2014). Los metabolitos influyentes identificados a partir del análisis multivariante de datos se cuantificaron relativamente por integración de la señal y se analizaron mediante las pruebas de Kruskal-Wallis. Debido a la naturaleza exploratoria del estudio no se corrigieron los valores p para las pruebas múltiples.

Resultados

Composición de la microbiota fecal basada en el análisis de ADNr 16S

El perfil promedio global de los tres grupos a nivel genérico ha revelado que, aunque la composición microbiana global de los grupos de control y ensayo mostró un patrón similar de alimentación con fórmula, el grupo de ensayo tiende a ser más parecido al grupo BF que el grupo de control. Véase la figura 1, que ilustra el perfil general de los 3 grupos.

Los análisis estadísticos identificaron varios taxones distintamente presentes entre los grupos de control y ensayo. En efecto, al analizar estadísticamente las diferencias de composición microbiótica a nivel genérico (prueba de rangos de Wilcoxon, sin corrección para las pruebas múltiples), los grupos de control y ensayo se distinguieron por seis taxones (véase la tabla 4). Tres taxones tuvieron valores mediana de cero en todos los grupos y solo registraron recuentos de algunos valores atípicos. Los otros se muestran en las figuras 2. La importancia de estos tres taxones (*Bifidobacterium*, *Escherichia* y *Peptostreptococaceae_uncl*) como principales discriminantes entre los grupos de control y ensayo se confirmó por análisis de bosques aleatorios (disminución media de exactitud de 0,013 a 0,006). Hay especialmente una regulación positiva de la población de bifidobacterias y una regulación negativa de las poblaciones de *Escherichia* y/o *Peptostreptococaceae*, en comparación con la microbiota global del grupo control.

Tabla 4: se empleó la prueba de rangos de Wilcoxon a nivel genérico para evaluar diferencias significativas entre el grupo de control y ensayo, expresadas por el valor p. El grupo BF no se utilizó para las pruebas estadísticas, pero sus valores están indicados como referencia. Los valores de los grupos de ensayo, control y BF son medianas de la abundancia relativa del género indicado. Los valores q de FDR son valores p que corrigen las pruebas múltiples para una tasa definida de descubrimientos falsos.

Género	valor p	valor q de FDR	Ensayo	Control	BF (referencia)
<i>Escherichia</i>	0,008207	0,15888	1,616	4,432	2,196
<i>Bifidobacterium</i>	0,010146	0,15888	82,678	74,433	90,684
<i>Coprobaillaceae_g_uncl</i>	0,010592	0,15888	0	0	0
<i>Peptostreptococcaceae_g_uncl</i>	0,0258	0,2608	0,172	0,313	0
<i>Dorea</i>	0,033119	0,2608	0	0	0
<i>Megamonas</i>	0,035533	0,2608	0	0	0

La diversidad alfa de cada muestra se calculó utilizando una métrica que tiene en cuenta las distancias filogenéticas entre las UTO y su distribución en los tres grupos comparados; véase figura 3. Aunque la diversidad del grupo BF es significativamente menor que la diversidad de ambos grupos de fórmulas, la diversidad del grupo de ensayo disminuye significativamente (la media se reduce en 0,19 unidades) en comparación con el grupo de control y por tanto se parece más a la del grupo BF.

La distinta composición de la microbiótica global a partir de los datos de ADNr 16S entre los tres grupos se evaluó por ordenación (véase figura 4). Las estadísticas basadas en permutaciones aleatorias del análisis de redundancia (ARD) demostraron que los tres grupos pueden separarse significativamente a nivel genérico ($p < 0,001$). Los centroides de los grupos BF y de control estuvieron claramente separados, mientras que el grupo ensayo se hallaba en una posición intermedia entre el BF y el grupo de control.

Carga de patógenos en las muestras de heces

Se dispuso de un subconjunto de muestras de heces para analizar la carga de patógenos específicos con el panel de patógenos gastrointestinales Luminex xTAG. La tabla 5 presenta el número de bebés con al menos un patógeno detectado en las heces recogidas a los 3 meses de edad. El número de bebés con un patógeno viral detectable fue muy similar entre el grupo de ensayo y el grupo de control, que representan el 28% y el 31,5%, respectivamente. El patógeno detectado con mayor frecuencia fue el norovirus. Por otra parte, el 14% de los bebés alimentados con la fórmula de ensayo tenían patógenos bacterianos detectables en las heces, mientras que el 26% de las heces de los bebés de control mostró al menos un patógeno bacteriano. Sin embargo esta diferencia no alcanzó una significación estadística (índice de probabilidad 0,46, $p = 0,15$). La toxina A/B de *Clostridium difficile* fue con mucha diferencia el patógeno más frecuentemente detectado en estos bebés europeos. Los patógenos eucariotas (Protista) se detectaron muy raramente, solo en el 2% de los bebés alimentados con fórmula de ensayo y en el 5,6% de los bebés alimentados con fórmula de control que presentan *Cryptosporidium* en las heces.

Tabla 5: número de bebés con presencia de al menos un patógeno en las heces a los 3 meses de edad. Se calculó el índice de probabilidad y el valor p de un ensayo bilateral mediante el test exacto de probabilidad de Fisher

Patógenos	Ensayo	Control	Índice de probabilidad (95% de IC)	valor p
	n %	n %		
Viral	14/50 28%	17/54 31,5%	0,846 (0,364 - 1,967)	0,83
Adenovirus 40/41	4/50	0/54		
Norovirus GI/GII	10/50	15/54		
Rotavirus A	1/50	2/54		
Bacteriano	7/50 14%	14/54 26%	0,465 (0,170 - 1,270)	0,149
Toxina A/B de <i>C. difficile</i>	7/50	12/54		
Campylobacter	0/50	1/54		
<i>E. coli</i> O 157	0/50	1/54		
ETEC LT/ST	0/50	0/54		
STEC stx1/stx2	0/50	0/54		
<i>Vibrio cholerae</i>	0/50	0/54		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0/50	0/54		
Protista	1/50 2%	3/54 5,6%	0,347 (0,035 - 3,45)	0,619
<i>Cryptosporidium</i>	1/50	3/54		
<i>Entamoeba histolytica</i>	0/50	0/54		

Giardia	0/50	0/54		
---------	------	------	--	--

La carga patógena de las muestras fecales infantiles también se evaluó usando el conjunto de datos metagenómicos. El 36% de los bebés del grupo de ensayo y el 46% del grupo de control eran portadores de *Clostridium difficile*, según los datos metagenómicos. Se observó un patrón similar para la toxina A/B de *C. difficile* mediante el método Luminex PCR, de modo que el 14% de los bebés en el grupo de ensayo y el 22% de los bebés en el grupo de control tenían niveles detectables.

Primeros aspectos funcionales seleccionados de la microbiota fecal

Además de estudiar los patógenos, los presentes inventores también consultaron el conjunto de datos metagenómicos para averiguar la presencia de genes codificadores de factores de virulencia conocidos o de genes de resistencia a los antibióticos. La figura 5 resume los resultados de genes de virulencia conocidos, con y sin correcciones de pruebas múltiples. En total los presentes inventores detectaron 7 genes codificadores de factores de virulencia conocidos cuyos niveles resultaron significativamente diferentes entre los grupos de control y de ensayo. De estos 7 genes, 5 resultaron diferentes entre control y ensayo, así como entre control y BF, pero no entre ensayo y BF, lo cual indica que el grupo de ensayo era más parecido al de referencia BF para esos genes. Los niveles de los otros 2 genes resultaron diferentes entre los 3 grupos.

En cuanto a los genes codificadores de genes de resistencia a los antibióticos, los presentes inventores detectaron en total 8 genes codificadores de genes de resistencia a los antibióticos conocidos, cuyos niveles fueron notablemente diferentes entre los grupos de control y de ensayo; véase figura 6. De estos 8 genes, 4 resultaron diferentes entre control y ensayo, así como entre control y BF, pero no entre ensayo y BF, lo cual indica que el grupo de ensayo era más parecido al de referencia BF para estos genes. Los niveles de los otros 4 genes solo fueron diferentes entre los grupos de ensayo y control, pero no entre ninguno de los grupos de fórmula y de referencia BF.

Huella metabólica fecal

El análisis multivariante de datos identificó metabolitos influyentes cuyos niveles difieren entre los grupos de ensayo y de control y el grupo de referencia de bebés amamantados (véanse las figuras 7). El contenido de algunos aminoácidos y ácidos orgánicos en las heces difirió bastante entre la fórmula de ensayo y la de control; las diferencias observadas en la fórmula de ensayo tendían hacia los valores observados en las heces de los bebés amamantados. Es decir, los niveles de fenilalanina e isoleucina fueron distintos entre los lactantes alimentados con fórmula de ensayo y fórmula de control, y diferentes de los hallados en las heces de los bebés alimentados con leche materna. La tirosina no fue notablemente distinto entre los grupos de ensayo y de control, pero difirió respecto al grupo de lactancia materna. Por otro lado, los niveles de lactato fueron más elevados en las heces de los lactantes alimentados con fórmula de ensayo respecto al control, mientras que las muestras de referencia de los bebés alimentados con leche materna no dieron una diferencia estadísticamente significativa respecto a las de los lactantes alimentados con fórmula.

Conclusión

Estos distintos análisis demuestran que la composición microbiana global del grupo de ensayo (es decir, de los bebés alimentados con una fórmula infantil conforme a la presente invención) tiende a ser más parecida a la del grupo BF (es decir, de los bebés alimentados exclusivamente con leche materna humana) que a la del grupo control (es decir, de los bebés alimentados con una composición nutricional corriente).

En efecto, este ensayo clínico en dos centros, aleatorizado y controlado con placebo, demostró que la suplementación de una fórmula infantil inicial estándar con los 2 oligosacáridos específicos de la leche humana 2'FL y LNT modula la microbiota intestinal a los 3 meses de edad, según la evaluación a partir de las muestras de heces. En particular, la composición de la microbiota global y las mediciones funcionales de los bebés alimentados con la fórmula de ensayo no solo difirieron de los controles, sino que se asemejaron al grupo de referencia de lactancia materna. En concreto, esta posición intermedia de la microbiota fecal del grupo de ensayo entre la de los grupos de control y referencia de lactancia materna se observa en la gráfica de diversidad alfa, en el análisis de redundancia a nivel genérico y también en la comparación de la abundancia relativa de taxones específicos a nivel genérico. Los principales contribuidores al desplazamiento que se observa en el grupo de ensayo hacia el grupo de referencia BF son las bacterias de los taxones *Bifidobacterium*, *Escherichia* y *Peptostreptococcaceae*. Este cambio en la composición de la microbiota es corroborado además por el cambio observado en el contenido fecal de los metabolitos bacterianos intestinales resultantes de la digestión de la leche, tal como se ve en la RMN ^1H metabólica. Esto indica que los OLH 2'FL y LNT en la fórmula de ensayo no solo influyen en la composición, sino también en la función microbiana intestinal.

Para seguir destacando las ventajas relativas a la salud del bebé, los presentes inventores también han investigado la presencia de patógenos auténticos específicos y factores de virulencia en general. Aunque no alcanzó significación estadística, el patógeno bacteriano *C. difficile* mostró niveles claramente más bajos - tanto por amplificación específica de la toxina A/B por PCR, como por análisis metagenómico - en el grupo de ensayo respecto al grupo de control y se acercó a los niveles más bajos de los datos metagenómicos observados en el grupo de referencia BF. Cabe destacar que la abundancia de varios genes conocidos de virulencia y de resistencia a los antibióticos detectados por el análisis

metagenómico en el grupo de ensayo fue diferente en comparación con la de las heces infantiles del grupo de control y similar a la abundancia en el grupo de referencia BF. En total, suponiendo que la referencia BF es el estándar, estas observaciones indican que la ecología microbiana intestinal del huésped en el grupo de ensayo sería menos favorable para tolerar posibles bacterias dañinas.

5 Los niveles más altos de aminoácidos libres fenilalanina, tirosina e isoleucina en las heces de los grupos alimentados con fórmula respecto al grupo de referencia BF pueden estar relacionados con una mayor actividad proteolítica o con un exceso de aminoácidos enriquecidos en la fórmula, pero no absorbidos en el intestino superior.

10 Los presentes hallazgos con la fórmula de ensayo demuestran que la adición de los OLH 2'FL y LNnT a una fórmula tiende a disminuir el contenido de aminoácidos libres en las heces y a la vez estimula la producción de lactato. Estos cambios describen el potencial del 2'FL y LNnT para inducir cambios metabólicos microbianos intestinales hacia los niveles de metabolitos observados en las heces de los lactantes del grupo BF y, por consiguiente, hacia la equivalencia metabólica con la leche materna.

15 En conjunto, la microbiota y la huella metabólica en las heces demuestran que la adición a una fórmula infantil inicial de 2 OLH individuales, estructuralmente muy específicos, cambia la microbiota intestinal evaluada en las heces, tanto en la composición global como en la función, hacia la observada en los lactantes del grupo BF. Globalmente, los bebés del grupo de ensayo se ubican entre los bebés alimentados con la fórmula de control y los lactantes del grupo BF. Sin embargo, en algunas mediciones específicas, el grupo de ensayo incluso parecía idéntico al grupo de referencia BF.

20 Una composición nutricional que lleve al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado, tales como 2FL y LNnT, parece ser muy eficiente en los bebés o niños pequeños para promover y/o inducir en dichos bebés o niños pequeños una microbiota global intestinal más parecida a la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota global intestinal de bebés o niños pequeños alimentados de forma predominante o exclusiva con una composición nutricional convencional que no contiene dichos oligosacáridos.

25 Por tanto también se cree que es particularmente eficiente para proporcionar un crecimiento saludable, promover un sistema inmunitario fuerte, procurar una función intestinal sana y/o para prevención y/o tratar la disbiosis microbiana intestinal en lactantes o niños pequeños.

REIVINDICACIONES

1. Composición nutricional que contiene al menos un oligosacárido fucosilado y al menos un oligosacárido N-acetilado para promover y/o inducir en el intestino de los bebés o niños pequeños una microbiota global más parecida a la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados exclusivamente con leche materna humana, en comparación con la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados de manera predominante o exclusiva con una composición nutricional corriente que no contiene dichos oligosacáridos.
2. Composición nutricional para usar según la reivindicación 1, en la cual el oligosacárido fucosilado se elige de la lista formada por 2'-fucosil-lactosa, 3'-fucosil-lactosa, difucosil-lactosa, lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-fucopentaosa II, lacto-N-fucopentaosa III, lacto-N-fucopentaosa V, lacto-N-fucohexaosa, lacto-N-difuco-hexaosa I, fucosil-lacto-N-hexaosa, fucosil-lacto-N-neohexaosa I, fucosil-lacto-N-neohexaosa II, difucosil-lacto-N-hexaosa I, difucosil-lacto-N-neohexaosa I, difucosil-lacto-N-neohexaosa II, fucosil-para-lacto-N-hexaosa y cualquier combinación de los mismos.
3. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el oligosacárido fucosilado incluye un epítipo de 2'-fucosilo.
4. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el oligosacárido N-acetilado es lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (LNnT) o cualquier combinación de ellos.
5. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el oligosacárido N-acetilado es lacto-N-neotetraosa (LNnT), para-lacto-N-neohexaosa (para-LNnH) o cualquier mezcla de los mismos; en la cual el oligosacárido N-acetilado es preferiblemente lacto-N-neotetraosa (LNnT).
6. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene 2'-fucosil-lactosa y lacto-N-neotetraosa (LNnT) o una mezcla de oligosacáridos formada por 2'-fucosil-lactosa (2'FL) y lacto-N-neotetraosa (LNnT).
7. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el o los oligosacáridos fucosilados están en una proporción total de 0,8-1,5 g/l de composición y/o en una proporción total de 0,62-1,16 g/100 g de peso seco de composición; y/o el o los oligosacáridos N-acetilados están en una proporción total de 0,5-0,8 g/l de composición y/o en una proporción total de 0,39-0,62 g/100 g de peso seco de composición.
8. Composición nutricional para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene al menos otro(s) oligosacárido(s) y/o fibra(s) y/o precursor(es) de las mismas, seleccionados de lista formada por GOS, FOS, XOS, inulina, polidextrosa, oligosacáridos sialilados, ácido siálico, fucosa y cualquier combinación de los mismos.
9. Composición nutricional para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma de una fórmula infantil, una fórmula infantil inicial, una fórmula de continuación o de seguimiento, una fórmula pretérmino, un alimento infantil, una composición infantil de cereales, un reforzante o un suplemento, destinada preferiblemente a los bebés de edad inferior a 6 meses.
10. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, destinada a los bebés o niños pequeños que tienen una microbiota frágil o desequilibrada o una disbiosis microbiana, como los bebés prematuros, los bebés nacidos por cesárea, los bebés nacidos con menor tamaño para la edad gestacional o con bajo peso, los bebés/niños pequeños hospitalizados, los bebés/niños pequeños que han sido tratados o están en tratamiento con antibióticos y/o los bebés/niños pequeños que padecen o han padecido una infección y/o inflamación intestinal.
11. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de modo que la microbiota global del intestino se refiere a la composición y/o a la función de la microbiota intestinal íntegra, tal como la abundancia taxonómica relativa, la diversidad, la actividad y/o la funcionalidad de dicha microbiota.
12. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de forma que dicha promoción y/o inducción implica una regulación al alza de la población de *Bifidobacterium* y/o una regulación a la baja de las poblaciones de *Escherichia* y/o *Peptostreptococcaceae*, en comparación con la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados de modo predominante o exclusivo con la composición nutricional corriente que no contiene dichos oligosacáridos.
13. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de forma que dicha promoción y/o inducción implica una disminución de patógeno(s), principalmente de la proporción del patógeno bacteriano *Clostridium difficile*, y/o una reducción de factor(es) de virulencia, en comparación con la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados de manera predominante o exclusiva con la composición nutricional corriente que no contiene dichos oligosacáridos.

14. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de forma que dicha promoción y/o inducción implica una disminución de la producción de aminoácidos libres y/o una estimulación de la producción de lactato, en comparación con la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados de manera predominante o exclusiva con la composición nutricional corriente que no contiene dichos oligosacáridos.
15. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de forma que dicha microbiota global promovida y/o inducida en el intestino de los bebés y/o niños pequeños tiene una diversidad alfa considerablemente reducida en comparación con la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados de manera predominante o exclusiva con la composición nutricional corriente que no contiene dichos oligosacáridos.
16. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de forma que dicha microbiota global promovida y/o inducida en el intestino de los bebés y/o niños pequeños tiene una diversidad alfa reducida en al menos 0,10 unidades, por ejemplo en al menos 0,12 unidades o en al menos 0,15 unidades, por ejemplo en 0,19 unidades, en comparación con la microbiota global del intestino de los bebés o niños pequeños alimentados de manera predominante o exclusiva con la composición nutricional corriente que no contiene dichos oligosacáridos.
17. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de forma que dicha microbiota global promovida y/o inducida en el intestino se puede medir en las heces de dichos bebés o niños pequeños, por ejemplo a la edad de 1, 4, 6 o 8 semanas o posteriormente, y por ejemplo tras 1, 4, 6 o 8 semanas de alimentación con dicha composición nutricional.
18. Composición nutricional para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual sirve o está ideada para la alimentación durante las primeras 1, 2, 4, 8 o 12 semanas de vida, o durante los primeros 2, 4, 6, 8 o 12 meses de vida.

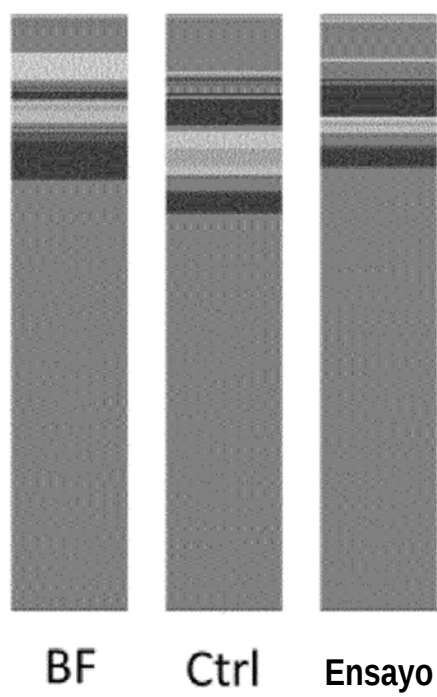


Fig. 1

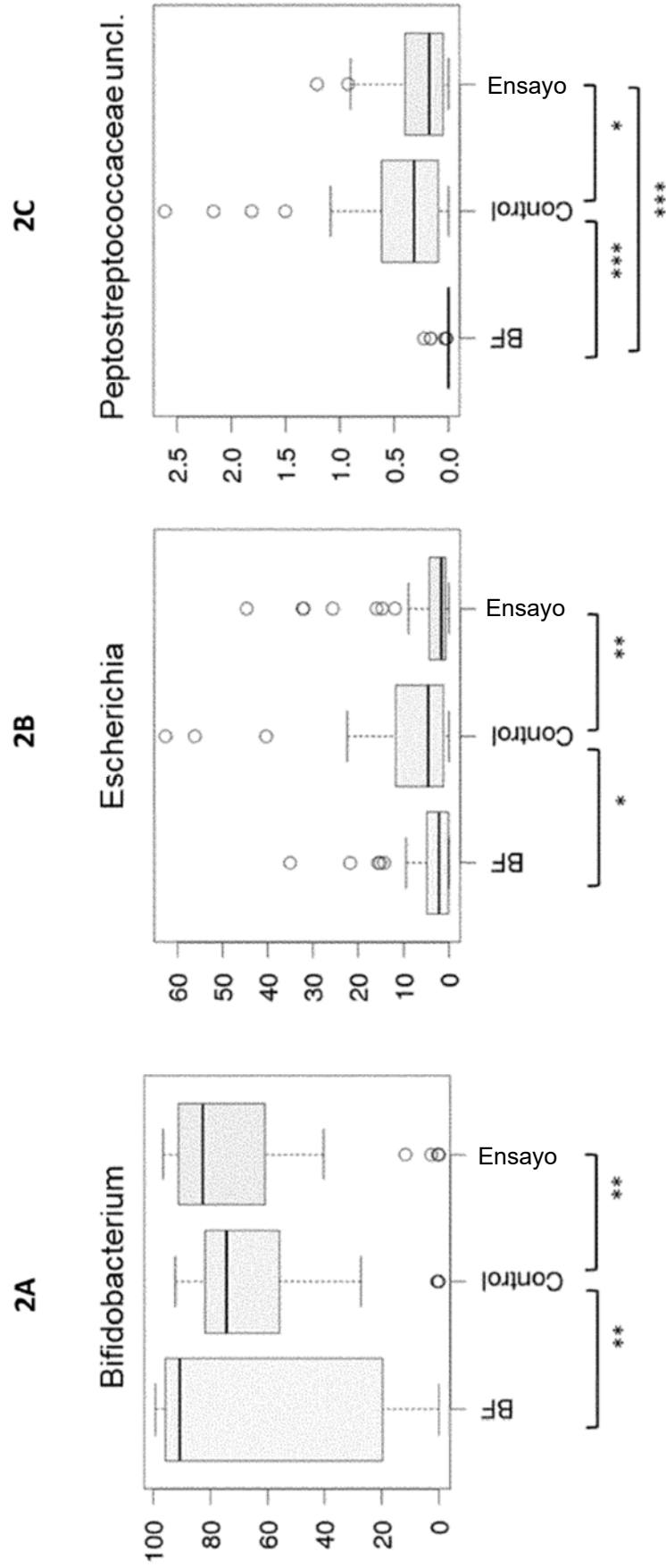


Fig. 2

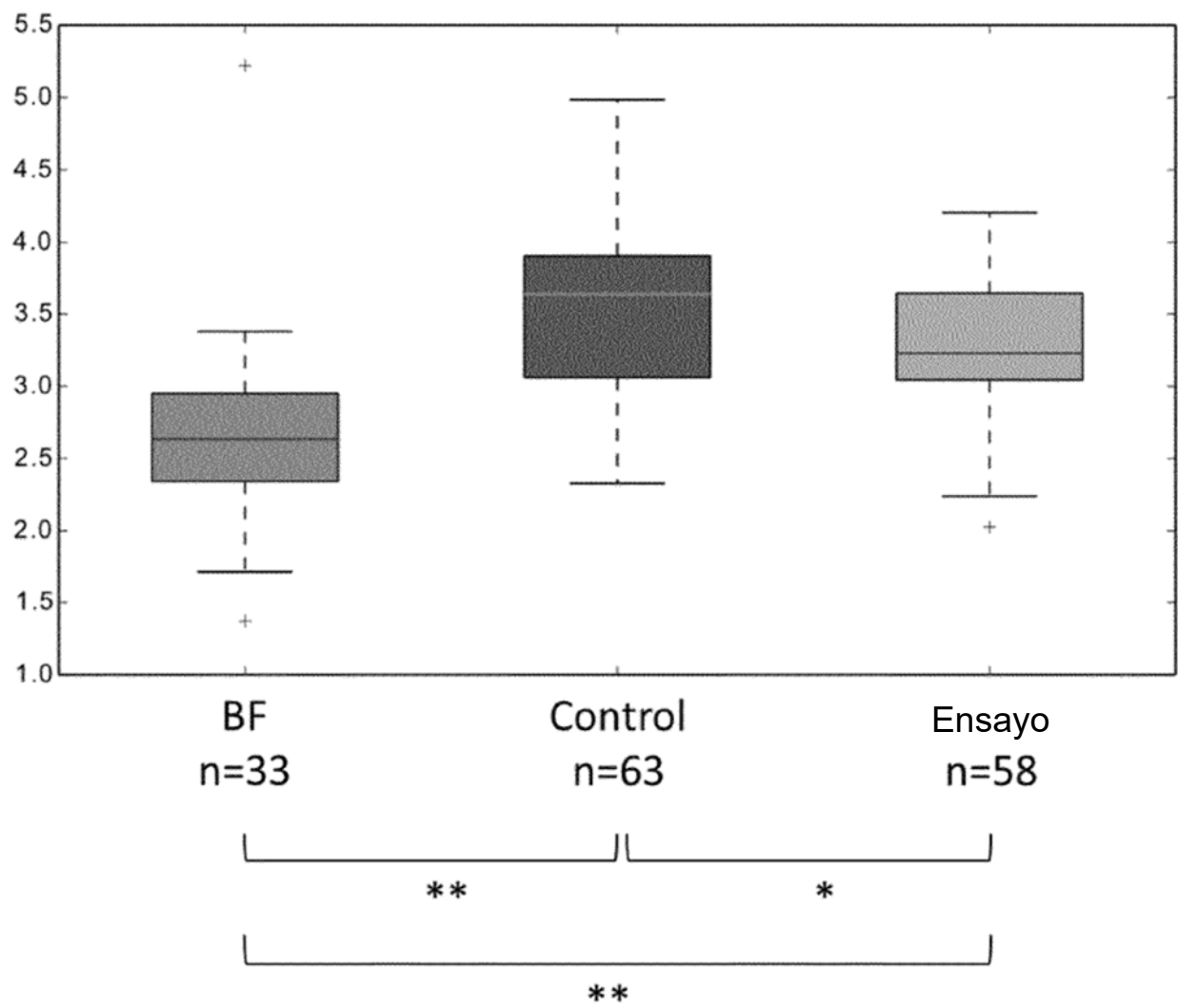


Fig. 3

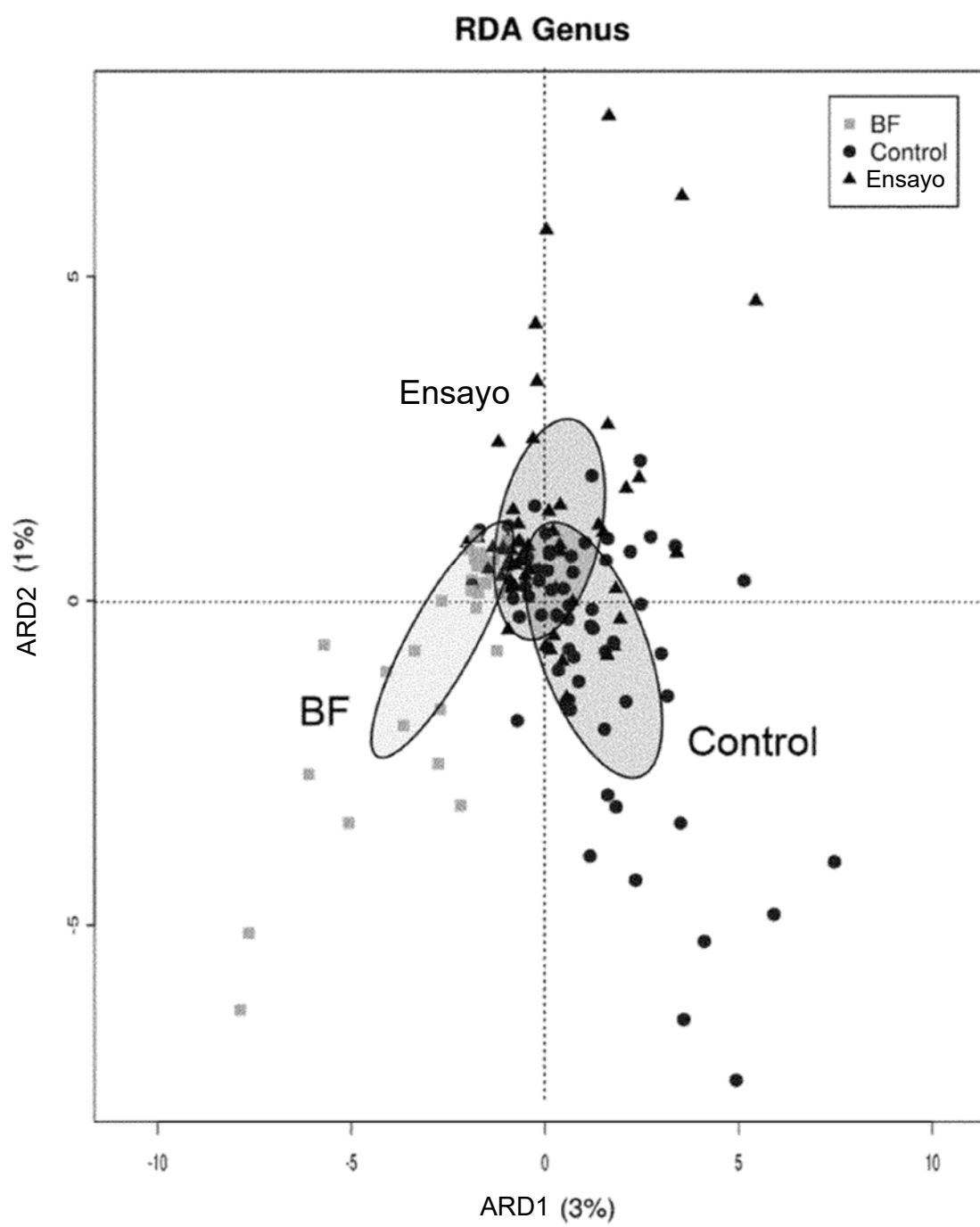


Fig. 4

	(C/E y C/B) no E/B	C/E y C/B y E/B	Ensayo	Control	BF	ID génica y función
con corrección para las muestras múltiples	VFG0583		18/58	20/65	6/34	gi: 16767513: yjcB - proteína putativa de membrana interna [Salmonella enterica (serovar typhimurium) LT2]
	VFG1291		4/58	1/65	11/34	gi: 21284341: cna - precursor de adhesina de colágeno [Staphylococcus aureus MW2] (VF0005)
	VFG1485		50/58	56/65	25/34	gi: 24528016: l7045 - L7045 [Escherichia coli 536]
	VFG1045		42/58	59/65	25/34	gi: 15808725: fecB - FecB [Shigella flexneri (serotipo 2a) YSH6000]
además: sin corrección para las muestras múltiples	VFG1318		12/58	8/65	16/34	gi: 21282741: isdA - proteína de superficie celular [Staphylococcus aureus MW2] (VF0015)
	VFG1299		13/58	10/65	16/34	gi: 21281855: cap8C - enzima de síntesis de polisacáridos capsulares Cap8C [Staphylococcus aureus MW2] (VF0003)
	VFG1300		15/58	9/65	16/34	gi: 21281856: cap8D - enzima de síntesis de polisacáridos capsulares Cap8D [Staphylococcus aureus MW2] (VF0003)

Fig. 5

	C/E no (C/B y E/B)	(C/E y C/B) no E/B	Ensayo	Control	BF	Función
con corrección para las muestras múltiples	YP_001436495		40/58	49/65	20/34	undecaprenil pirofosfato fosfatasa [Enterobacter sakazakii ATCC BAA-894]
	YP_403947		47/58	58/65	19/34	proteína transportadora de macrólidos ATP/permeasa [Shigella dysenteriae Sd197]
	YP_691152		36/58	44/65	15/34	proteína de resistencia multifármaco D [Shigella flexneri 5 str. 8401]
	YP_691421		42/58	52/65	20/34	proteína del sistema de eflujo multifármaco MdtO [Shigella flexneri 5 str. 8401]
	YP_001453760		26/58	28/65	10/34	proteína transportadora de macrólidos ATP/permeasa [Citrobacter koseri ATCC BAA-895]
además: sin corrección para las muestras múltiples	ZP_02070590		22/58	22/65	7/34	proteína hipotética BACUNI_02013 [Bacteroides uniformis ATCC 8492]
	ZP_02206446		50/58	59/65	26/34	proteína hipotética COPEUT_01215 [Coprococcus eutactus ATCC 27759]
	ZP_02632675		18/58	16/65	9/34	TetA [Clostridium perfringens E str. JGS1987]

Fig. 6

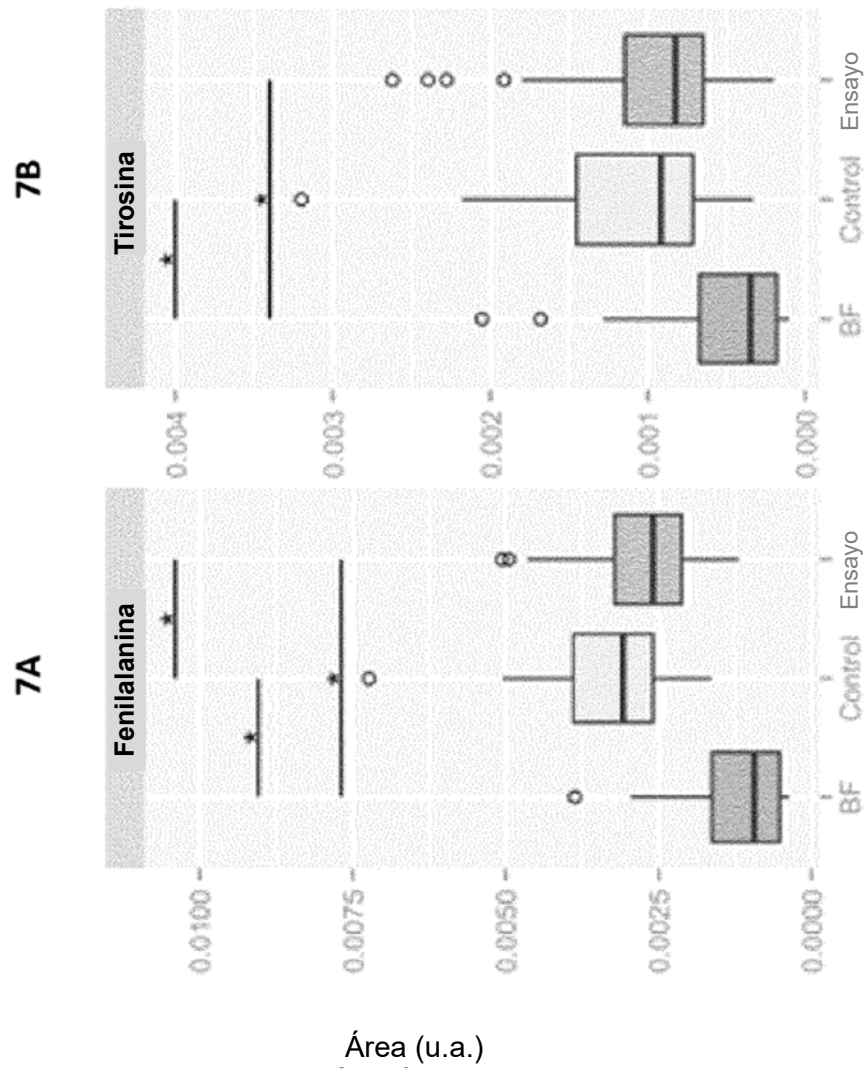


Fig. 7

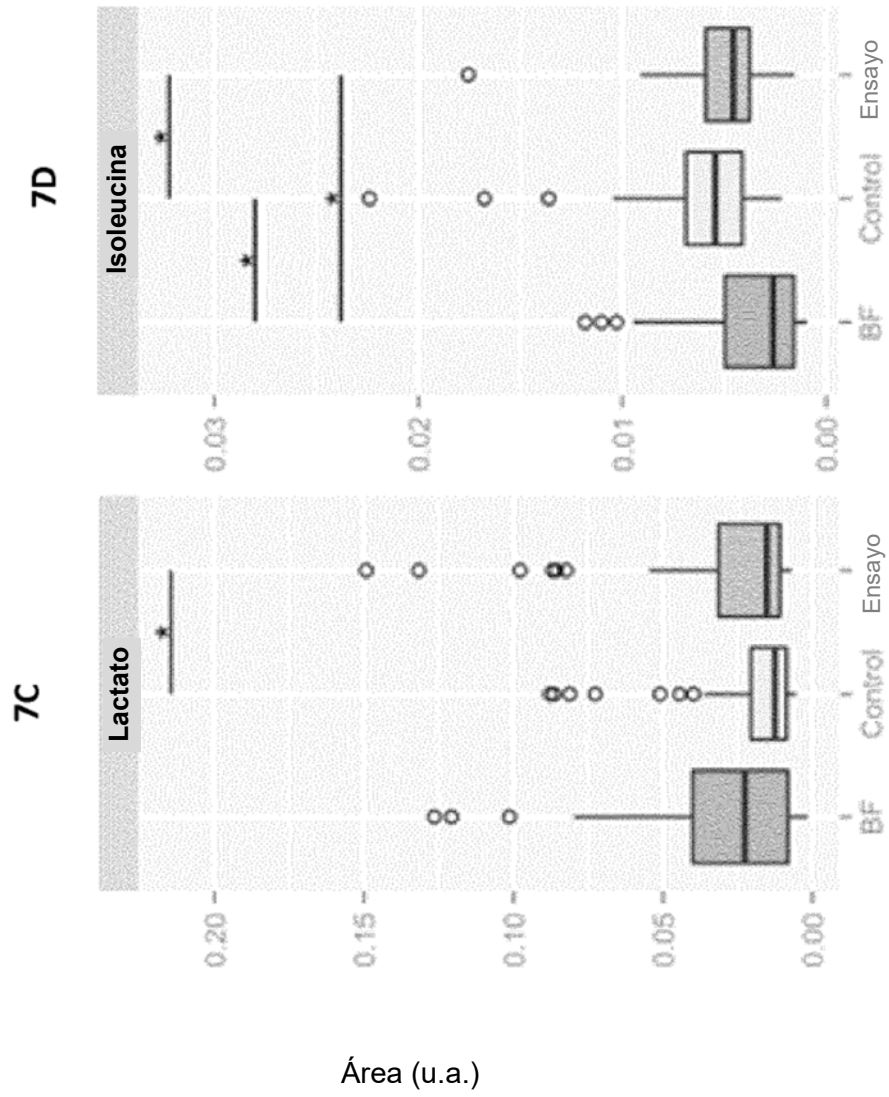


Fig. 7