

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 964**

51 Int. Cl.:

A61K 31/702 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61K 35/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2018 PCT/IB2018/059497**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2019 WO19106618**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2018 E 18883241 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024 EP 3716984**

54 Título: **Mezcla de HMO para tratar la sensibilidad al trigo**

30 Prioridad:

30.11.2017 DK PA201700680

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

18.11.2024

73 Titular/es:

**GLYCOM A/S (100.0%)
Kogle Allé 4
2970 Hørsholm, DK**

72 Inventor/es:

**VIGSNÆS, LOUISE KRISTINE y
MCCONNELL, BRUCE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 987 964 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

Mezcla de HMO para tratar la sensibilidad al trigo

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

Esta invención se refiere a un oligosacárido de leche humana (HMO) o a una composición sintética que comprende un HMO, para su uso en la reducción de síntomas de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en un humano no lactante, la prevención secundaria de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en un humano no lactante, y/o la inducción de tolerancia al trigo y/o al gluten en un paciente humano no lactante que sufre sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La sensibilidad al trigo no celíaca, que se conoce también como sensibilidad al gluten no celíaca, es un trastorno relacionado con el gluten junto con la enfermedad celíaca y la alergia al trigo (Leccioli *et al. Nutrients* 9, 1203 (2017)). La sensibilidad al trigo no celíaca es un estado no alérgico y no autoinmune en el que el consumo de trigo y/o gluten puede conducir a síntomas similares a los observados en otros trastornos relacionados con el gluten. El estado se considera sensibilidad al trigo y/o al gluten, porque los síntomas se alivian mediante la retirada de trigo y/o de gluten y vuelven a aparecer tras la reintroducción del trigo y/o del gluten. Sin embargo, los pacientes que tienen el estado no presentan los marcadores autoinmunes o de alergia característicos asociados con la enfermedad celíaca o la alergia al gluten. A pesar de esto, los síntomas clínicos son similares a los de la enfermedad celíaca y la alergia al gluten. Los síntomas gastrointestinales más frecuentes incluyen hinchazón, dolor abdominal, dolor epigástrico, diarrea y estreñimiento. Los síntomas no gastrointestinales incluyen cansancio, cefalea, ansiedad, "mente nublada" o dificultad para concentrarse, depresión y erupción cutánea. Estos síntomas pueden producirse en el plazo de horas a días tras la exposición al trigo y/o al gluten, y pueden disiparse entonces tras la retirada del trigo y/o del gluten.

La etiología de la sensibilidad al trigo no celíaca se desconoce. El estado implica potencialmente muchos desencadenantes como los que se observan en la enfermedad celíaca y la alergia al gluten. El desencadenante iniciador implica principalmente la exposición del epitelio intestinal al trigo y/o al gluten, que conduce a respuestas medidas de manera inmune y/o mediadas de manera no inmune. Debido a la falta de evidencia de la implicación de células T y la implicación aparente de receptores de tipo toll (TLR), el estado puede ser más de una respuesta inmunitaria innata en vez de una respuesta inmunitaria adaptativa.

35 Dado que no se han identificado desencadenantes específicos, el estado podría implicar diferentes mecanismos de la enfermedad celíaca y la alergia al gluten. El gluten, el desencadenante en la enfermedad celíaca, puede ser un desencadenante significativo en el estado, pero hay cada vez más dudas sobre si es el desencadenante principal o si acaso es un desencadenante. Otros diversos estímulos derivados de los alimentos pueden ser también desencadenantes importantes. Estos incluyen inhibidores de alfa-amilasa/tripsina (ATI), oligo-, di-, monosacáridos y polioles fermentables (FODMAP) y otros fructanos de cadena corta. Los ATI, en particular, se han implicado en la patología. El papel de los ATI en el montaje de una respuesta inmunológica se ha mostrado en modelos de investigación animales y humanos y se cree que son un antígeno oral importante tanto en la enfermedad celíaca como en la sensibilidad al trigo no celíaca. Los ATI desencadenan predominantemente respuestas inmunitarias innatas que implican macrófagos, neutrófilos y células dendríticas intestinales por medio de la activación de los complejos de TLR. Por el contrario, la gliadina no parece ser un desencadenante principal, porque no se observan de manera característica respuestas entéricas inducidas por gliadina típicas y, además, la gliadina activa principalmente marcadores de inmunidad adaptativa (por ejemplo, IL-6, IL-21 e INF- γ), lo cual no se ha encontrado en pacientes que tienen sensibilidad al trigo no celíaca.

50 Los pacientes que tienen sensibilidad al trigo no celíaca muestran niveles aumentados de expresión de TLR2, un número aumentado de linfocitos intraepiteliales α y β , y un número reducido de células T reguladoras. Además, estos pacientes tienen niveles aumentados de proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP) y proteínas CD14 solubles. Además, estos pacientes tienen niveles en circulación elevados de proteína de unión a ácidos grasos 2 (FABP2), un marcador de daño de células epiteliales intestinales (Uhde *et al. Gut* 65, 1930 (2016)). Se acepta ahora que los pacientes que tienen sensibilidad al trigo no celíaca muestran una permeabilidad intestinal aumentada, lo que permite a los antígenos atravesar al interior de la lámina propia.

Los cambios en la microbiota intestinal pueden desempeñar también un papel en la sensibilidad al trigo no celíaca. Los marcadores inmunes observados en los pacientes son predominantemente marcadores de respuesta inmunitaria innata y esto proporciona evidencia de que la microbiota tiene un papel. Sin embargo, la evidencia del papel de la microbiota no está aún clara. Desde una perspectiva composicional, parece que los pacientes pueden tener una menor abundancia de bacterias productoras de butirato y bifidobacterias.

Adicionalmente, hay alguna evidencia de que el estado se desarrolla en individuos con algunas predisposiciones genéticas. La predisposición genética es mayor que en la población general, pero menor que en pacientes con

enfermedad celíaca, que tienen una fuerte componente genética. Sin embargo, esta asociación con genes no está clara actualmente.

El diagnóstico del estado es complejo y muchos pacientes no están dispuestos a pasar por el proceso. La 1ª etapa en un diagnóstico es la exclusión de enfermedad celíaca y alergia al trigo y/o al gluten. Esto se realiza poniendo al paciente en una dieta que contiene gluten durante un periodo de 6 semanas. Se realizan varias pruebas durante este periodo para excluir la alergia al trigo, concretamente prueba de punción cutánea y de IgE específica de trigo, y la enfermedad celíaca, concretamente IgA-tTG, IgG-DGP e IgA-EMA. Si es necesario puede tomarse una biopsia duodenal para la confirmación. La 2ª etapa consiste en que el paciente empiece una dieta libre de gluten durante un periodo de 6 semanas y monitorizar la respuesta de síntomas. Esta respuesta de síntomas se evalúa usando la escala de clasificación de síntomas gastrointestinales (GSRS) y una escala de clasificación numérica (NRS). Si el paciente no muestra una mejora en los síntomas en 6 semanas tras el comienzo de la dieta, se descarta el diagnóstico del estado y es necesario explorar otros diagnósticos tales como IBS y otros trastornos intestinales funcionales. La 3ª etapa implica la reintroducción de la dieta que contiene gluten. En esta etapa, el paciente se asigna aleatoriamente a uno de dos protocolos. El paciente se expone a o bien una dieta libre de gluten + placebo o bien una dieta libre de gluten + gluten durante una semana. El paciente se pone entonces en un periodo de lavado de 1 semana de una dieta libre de gluten estricta, seguido de un híbrido durante 1 semana. Una mejora sintomática del 30% tras la introducción de la dieta libre de gluten o una aparición sintomática del 30% tras la introducción de la dieta que contiene gluten indica un resultado positivo. Por debajo de este valor del 30%, se considera un resultado negativo.

La dificultad en el diagnóstico significa que la prevalencia del estado no está clara. Sin embargo, el estado está pasando a ser un diagnóstico más común. Como resultado, se ha notificado que la prevalencia del estado varía enormemente entre el 0,6-6% en poblaciones occidentales. Esta falta de capacidad para diagnosticar da como resultado que pacientes empiecen una dieta libre de gluten tras un autodiagnóstico sin ninguna prueba clínica formal ni recomendación de gestión por parte de su médico. Debido a esto, el consumo de alimento libre de gluten se ha vuelto cada vez más popular en el mundo occidental. Una encuesta Gallup llevada a cabo en julio de 2015 mostró que el 20% de los estadounidenses opta por una dieta libre de gluten, mientras que el 17% dice que evitan alimentos libres de gluten.

Actualmente no hay ninguna cura para el estado y el único tratamiento aceptado es poner al paciente en una dieta libre de gluten y esto a menudo ayuda a solucionar los síntomas intestinales y extraintestinales. Sin embargo, la recomendación es continuar entonces con la dieta libre de gluten durante toda la vida. Las consecuencias nutricionales de esto no están claras, porque los granos que contienen gluten contienen también muchos nutrientes esenciales; especialmente fibras. Además, la retirada de alimentos que contienen gluten puede tener un impacto significativo sobre la calidad de vida del paciente. Sería mejor ser capaz de proporcionar al paciente una intervención que reduzca al menos suficientemente los síntomas o prevenga la nueva aparición del estado incluso si se consume trigo y/o gluten.

El documento US 2012/172319 A1 se refiere al uso de oligosacáridos de leche humana seleccionados preferiblemente del grupo que consiste en 6'-sialil-lactosa, 2'-fucosil-lactosa y lacto-N-neotetraosa, y combinaciones de las mismas, para mejorar la función gastrointestinal y la tolerancia a las fórmulas en lactantes, niños pequeños y niños.

Por tanto, sigue existiendo una necesidad de compuestos para su uso en la gestión de la sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en humanos que permitan un consumo de trigo y/o de gluten.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Un primer aspecto de la invención se refiere a un oligosacárido de leche humana (HMO) para su uso en:

- la reducción de síntomas de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en un humano no lactante,
 - la inducción de tolerancia al trigo y/o al gluten en un paciente humano no lactante que sufre sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca, y/o
 - la prevención secundaria de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en un humano no lactante,
- comprendiendo el oligosacárido de leche humana comprende 2'-fucosil-lactosa (2'-FL), 3-fucosil-lactosa (3-FL), difucosil-lactosa (DFL), lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (LNnT), 3'-sialil-lactosa (3'-SL), 6'-sialil-lactosa (6'-SL), lacto-N-fucopentaosa I (LNFP-I) o una mezcla de las mismas, y siendo el humano no lactante un humano de 3 años de edad y mayor.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición sintética para su uso en:

- la reducción de síntomas de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en un humano no lactante,
 - la inducción de tolerancia al trigo y/o al gluten en un paciente humano no lactante que sufre sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca, y/o
 - la prevención secundaria de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en un humano no lactante,
- comprendiendo la composición al menos un oligosacárido de leche humana (HMO), comprendiendo el oligosacárido de leche humana 2'-fucosil-lactosa (2'-FL), 3-fucosil-lactosa (3-FL), difucosil-lactosa (DFL), lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (LNnT), 3'-sialil-lactosa (3'-SL), 6'-sialil-lactosa (6'-SL), lacto-N-fucopentaosa I (LNFP-I) o una mezcla de las mismas, y siendo el humano no lactante un humano de 3 años de edad y mayor.

Preferiblemente, la composición sintética contiene una cantidad de 1 g a 15 g del HMO; más preferiblemente de 2 g a 10 g. Por ejemplo, la composición sintética puede contener de 3 g a 7 g del HMO.

5 La composición sintética puede contener una bifidobacteria, por ejemplo, *Bifidobacterium longum* y/o *Bifidobacterium bifidum*.

Preferiblemente, al paciente se le administra el HMO mientras consume cereales que contienen gluten.

10 La cantidad del HMO administrada es preferiblemente efectiva para aumentar la abundancia de bacterias productoras de butirato y/o bifidobacteria en el intestino del humano. Además, la cantidad del HMO administrada es preferiblemente efectiva para mejorar las propiedades de barrera intestinal del humano, particularmente en el colon.

15 Preferiblemente, al humano se le administra una cantidad de 1 g a 15 g por día del HMO, más preferiblemente de 2 g a 10 g por día. Por ejemplo, al humano se le pueden administrar de 3 g a 7 g por día. Preferiblemente, al humano se le administra el HMO durante un periodo de al menos 7 días consecutivos (1 semana), más preferiblemente durante al menos 14 días consecutivos (2 semanas).

20 Al paciente se le pueden administrar dosis mayores durante la reducción de los síntomas de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca y dosis menores para inducir tolerancia al trigo y/o al gluten o como prevención secundaria. Preferiblemente, al humano se le administra el HMO durante un periodo de al menos 1 semana, más preferiblemente durante al menos 2 semanas durante el tratamiento. Al humano se le puede administrar el HMO durante un periodo de al menos 4 semanas, más preferiblemente durante al menos 8 semanas para inducir tolerancia al trigo y/o al gluten o como prevención secundaria. La dosis administrada durante una fase de reducción de síntomas es preferiblemente de aproximadamente 3 g a aproximadamente 15 g por día (por ejemplo, de aproximadamente 4 g a aproximadamente 7,5 g por día) y la dosis administrada durante la inducción de tolerancia al trigo y/o al gluten o la fase de prevención secundaria es preferiblemente de aproximadamente 2 g a aproximadamente 7,5 g por día (por ejemplo, de aproximadamente 2 g a aproximadamente 5 g por día). En una realización, el HMO o la composición sintética es para su uso en un método de la invención que comprende una primera fase para reducir los síntomas de la sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca que va seguida de una segunda fase para inducir la tolerancia al trigo y/o al gluten o la prevención secundaria. Preferiblemente, en la primera fase, al humano se le administra el HMO durante un periodo de al menos 7 días consecutivos (1 semana), más preferiblemente durante al menos 14 días consecutivos (2 semanas) hasta que mejora la sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca (normalmente 2-3 meses) seguida de la segunda fase para inducir tolerancia al trigo y/o al gluten o como prevención secundaria, en la que al humano se le administra el HMO durante un periodo de al menos 4 semanas (consecutivas), más preferiblemente durante al menos 8 semanas.

35 En determinadas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el HMO puede ser un HMO neutro o un HMO ácido. El HMO neutro puede ser uno o más HMO fucosilados o uno o más HMO no fucosilados. El HMO se selecciona de 2'-FL, 3-FL, DFL, LNT, LNnT, 3'-SL, 6'-SL, LNFP-I o una mezcla de las mismas. Preferiblemente, el HMO comprende, consiste en o consiste esencialmente en 2'-FL y al menos una de LNnT y LNT; al menos una de 2'-FL y DFL y al menos una de LNnT y LNT (por ejemplo, 2'-FL, DFL y al menos una de LNnT y LNT); 2'-FL y 6'-SL; DFL y 6'-SL; 2'-FL, DFL y 6'-SL; 2'-FL, 6'-SL y al menos una de LNnT y LNT; y 2'-FL, DFL, 6'-SL y al menos una de LNnT y/o LNT.

45 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que la administración oral o enteral de uno o más oligosacáridos de leche humana (HMO) a pacientes que sufren sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca reduce los síntomas del estado. Además, los HMO inducen sorprendentemente tolerancia al trigo y/o al gluten en pacientes que sufren sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca, permitiendo a los pacientes consumir trigo y/o gluten con síntomas reducidos o sin síntomas. Por tanto, los oligosacáridos de leche humana pueden usarse como prevención secundaria dietética de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca. Los HMO aumentan también preferentemente la abundancia de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal, en particular bifidobacterias del grupo filogenético *B. adolescentis*, *Bifidobacterium longum* y/o *Bifidobacterium bifidum*. Estas bacterias producen lactato y acetato, que a su vez pueden convertirse en butirato por parte de bacterias productoras de butirato.

60 Los oligosacáridos de leche humana son una mezcla heterogénea de glicanos solubles encontrados en la leche humana. Son el tercer componente sólido más abundante tras la lactosa y los lípidos en la leche humana y están presentes en concentraciones de 5-25 g/l (Bode: *Human milk oligosaccharides and their beneficial effects*, en: Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk (Zibadi *et al.*, eds.), págs. 515-31, Wageningen Academic Publishers (2013)). Los HMO son resistentes a la hidrólisis enzimática en el intestino delgado y por tanto en gran medida no se digieren y no se absorben y alcanza el colon intactos. La mayoría de los HMO que alcanza el colon sirven como sustratos para conformar el ecosistema intestinal estimulando selectivamente el crecimiento de bacterias específicas. Se cree que los HMO modulan sustancialmente la microbiota intestinal de los lactantes y que desempeñan un papel decisivo en las diferencias en la microbiota de lactantes alimentados con fórmula y alimentados con leche materna. Estas diferencias incluyen la predominancia de *Bifidobacterium* en el intestino de lactantes alimentados con

leche materna en comparación con una microbiota intestinal más diversa en lactantes alimentados con fórmula. Esto se considera beneficioso para los lactantes, porque se cree que cepas de especies de *Bifidobacterium* tienen un efecto positivo sobre la salud intestinal.

- 5 Los HMO también aumentan preferentemente la abundancia de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal, en particular bifidobacterias del grupo filogenético *B. adolescentis*, *Bifidobacterium longum* y/o *Bifidobacterium bifidum*.

En esta memoria descriptiva, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

- 10 “La sensibilidad al trigo no celiaca” significa es un síndrome caracterizado por síntomas intestinales y extraintestinales relacionados con la ingesta de alimento que contiene gluten, en sujetos que no están afectados por ya sea enfermedad celiaca o alergia al trigo. “Sensibilidad al gluten no celiaca” tiene el mismo significado y los dos términos se usan de manera intercambiable. El alimento que contiene gluten contiene habitualmente un cereal que contiene gluten tal como trigo, cebada y centeno.

- 15 “Humano no lactante” o “no lactante” significa un humano de 3 años de edad y mayor. Un humano no lactante puede ser un niño, un adolescente, un adulto o una persona anciana.

- 20 “Oligosacárido de leche humana” o “HMO” significa un carbohidrato complejo encontrado en la leche materna humana (Urashima *et al.*: Milk Oligosaccharides. Nova Science Publisher (2011); Chen *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 72, 113 (2015)). Los HMO tienen una estructura de núcleo que comprende una unidad de lactosa en el extremo reductor que puede alargarse con una o más unidades de β -N-acetil-lactosaminilo y/o una o β -más de lacto-N-biosilo, y estructura de núcleo que puede estar sustituida por un radical α -L-fucopiranosilo y/o uno α -N-acetil-neuraminilo (sialilo). A este respecto, los HMO no ácidos (o neutros) carecen de un residuo sialilo, y los HMO ácidos tienen al menos un residuo sialilo en su estructura. Los HMO no ácidos (o neutros) pueden ser fucosilados o no fucosilados. Los ejemplos de tales HMO no fucosilados neutros incluyen lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (LNnT), lacto-N-neohexaosa (LNnH), para-lacto-N-neohexaosa (pLNnH), para-lacto-N-hexaosa (pLNH) y lacto-N-hexaosa (LNH). Los ejemplos de HMO fucosilados neutros incluyen 2'-fucosil-lactosa (2'-FL), lacto-N-fucopentaosa I (LNFP-I), lacto-N-difucohexaosa I (LNDFH-I), 3-fucosil-lactosa (3-FL), difucosil-lactosa (DFL), lacto-N-fucopentaosa II (LNFP-II), lacto-N-fucopentaosa III (LNFP-III), lacto-N-difucohexaosa III (LNDFH-III), fucosil-lacto-N-hexaosa II (FLNH-II), lacto-N-fucopentaosa V (LNFP-V), lacto-N-fucopentaosa VI (LNFP-VI), lacto-N-difucohexaosa II (LNDFH-II), fucosil-lacto-N-hexaosa I (FLNH-I), fucosil-para-lacto-N-hexaosa I (FpLNH-I), fucosil-para-lacto-N-neohexaosa II (FpLNnH II) y fucosil-lacto-N-neohexaosa (FLNnH). Los ejemplos de HMO ácidos incluyen 3'-sialil-lactosa (3'-SL), 6'-sialil-lactosa (6'-SL), 3-fucosil-3'-sialil-lactosa (FSL), LST a, fucosil-LST a (FLST a), LST b, fucosil-LST b (FLST b), LST c, fucosil-LST c (FLST c), sialil-LNH (SLNH), sialil-lacto-N-hexaosa (SLNH), sialil-lacto-N-neohexaosa I (SLNH-I), sialil-lacto-N-neohexaosa II (SLNH-II) y disialil-lacto-N-tetraosa (DSLNT).

- 35 “Composición sintética” significa una composición que se prepara artificialmente y significa preferiblemente una composición que contiene al menos un compuesto que se produce *ex vivo* química y/o biológicamente, por ejemplo, por medio de reacción química, reacción enzimática o recombinantemente. En algunas realizaciones, una composición sintética para el uso de la invención puede ser, pero preferiblemente no es, idéntica a una composición que se produce de manera natural. La composición sintética comprende normalmente uno o más compuestos, incluyendo uno o más HMO, que son capaces de reducir los síntomas de sensibilidad al trigo y/o al gluten en un humano o de inducir tolerancia. Además, en algunas realizaciones, las composiciones sintéticas pueden comprender uno o más componentes nutricional o farmacéuticamente activos que no afectan de manera adversa a la eficacia de los compuestos mencionados anteriormente. Algunas realizaciones de una composición sintética para el uso de la invención se describen también más adelante.

- 50 “Microbiota”, “microflora” y “microbioma” significan una comunidad de microorganismos vivos que habita normalmente un órgano o una parte del cuerpo, particularmente los órganos gastrointestinales de humanos. Los miembros más dominantes de la microbiota gastrointestinal incluyen microorganismos de los filos de *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Synergistetes*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* y *Euryarchaeota*; a nivel de género *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Roseburia*, *Alistipes*, *Collinsella*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* y *Dorea*; a nivel de especie *Bacteroides uniformis*, *Alistipes putredinis*, *Parabacteroides merdae*, *Ruminococcus bromii*, *Dorea longicatena*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Eubacterium hallii*, *Ruminococcus torques*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus lactaris*, *Collinsella aerofaciens*, *Dorea formicigenerans*, *Bacteroides vulgatus* y *Roseburia intestinalis*. La microbiota gastrointestinal incluye la microbiota asociada a mucosa, que está ubicada en o unida a la capa mucosa que cubre el epitelio del tracto gastrointestinal, y la microbiota asociada a la luz, que se encuentra en la luz del tracto gastrointestinal.

- 60 “Administración enteral” significa cualquier forma convencional para la administración de una composición a un no lactante que provoca la deposición de la composición en el tracto gastrointestinal (incluyendo el estómago). Los métodos de administración enteral incluyen alimentación a través de un tubo nasogástrico o tubo de yeyuno, oral, sublingual y rectal.

65

“Administración oral” significa cualquier forma convencional para la administración de una composición a un humano a través de la boca. Por consiguiente, la administración oral es una forma de administración enteral.

5 “Cantidad efectiva” significa una cantidad de una composición que proporciona un HMO en una cantidad suficiente para proporcionar un desenlace de tratamiento deseado en un humano. Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más dosis para conseguir el desenlace de tratamiento deseado.

10 “Abundancia relativa de una bifidobacteria” significa la abundancia de una especie de bifidobacteria en relación con otras bifidobacterias en la microbiota del tracto gastrointestinal de humanos.

15 “Crecimiento relativo de una bifidobacteria” significa el crecimiento de una especie de *Bifidobacterium* en relación con otras bifidobacterias en la microbiota en el tracto gastrointestinal de humanos.

20 “*Bifidobacterium* del grupo filogenético *B. adolescentis*” significa una bacteria seleccionada de un grupo que consiste en *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium kashiwanohense*, *Bifidobacterium dentum* y *Bifidobacterium stercoris* (Duranti et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 336 (2013), Bottacini et al. *Microbial Cell Fact.* 13:S4 (2014)). Preferiblemente, una *Bifidobacterium* del grupo filogenético *B. adolescentis* es *Bifidobacterium adolescentis* y/o *Bifidobacterium pseudocatenulatum*.

25 “Tratar” significa abordar un estado médico o enfermedad con el objetivo de mejorar o estabilizar un desenlace en la persona que se está tratando o abordar una necesidad nutricional subyacente. Por tanto, tratar incluye la gestión dietética o nutricional del estado médico o de la enfermedad abordando necesidades nutricionales de la persona que se está tratando. “Tratar” y “tratamiento” tienen significados gramaticalmente correspondientes.

30 “Gestión dietética” significa la alimentación exclusiva o parcial de pacientes que, debido a una enfermedad, un trastorno o un estado médico sufren:

- o bien tienen una capacidad limitada, alterada o perturbada para tomar, digerir, absorber, metabolizar o excretar alimento ordinario o ciertos nutrientes contenidos en el mismo, o metabolitos, o bien

- tienen otros requisitos de nutrientes determinados médicamente

(véase: Comunicación de la Comisión sobre la clasificación de los alimentos para usos médicos especiales de la Comisión Europea, *Boletín Oficial de la Unión Europea* C 401, 25/11/2017, págs. 10-11).

35 “Modular la microbiota” significa ejercer una influencia de modificación o de control sobre microbiota, por ejemplo, una influencia que conduce a un aumento en la abundancia intestinal nativa de *Bifidobacterium*, *Barnesiella*, *Faecalibacterium* y/u otras bacterias productoras de butirato. En otro ejemplo, la influencia puede conducir a una reducción de la abundancia intestinal de *Ruminococcus gnavus* y/o proteobacterias. Las “proteobacterias” son un filo de bacterias gram-negativas e incluyen una amplia variedad de bacterias patógenas, tal como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Yersinia* y muchos otros géneros notables.

40 “Terapia” significa un tratamiento proporcionado o una acción tomada para reducir o eliminar síntomas de una enfermedad o un estado patológico.

45 “Tratamiento preventivo” o “prevención” en el presente contexto significa un tratamiento proporcionado o una acción tomada para disminuir el riesgo de aparición o recurrencia de una enfermedad.

50 “Prevención secundaria” significa una prevención de la aparición del estado en un paciente que corre un alto riesgo, o una prevención de la reaparición de síntomas en un paciente que ya tiene el estado. Un paciente “que corre un alto riesgo” es un individuo que tiene predisposición a desarrollar el estado; por ejemplo, una persona con un historial familiar del estado.

55 Los HMO pueden aislarse o enriquecerse mediante procesos ampliamente conocidos a partir de leche(s) secretada(s) por mamíferos que incluyen, pero no se limitan a, humano, especies bovinas, ovinas, porcinas o caprinas. Los HMO pueden producirse también mediante procesos ampliamente conocidos usando fermentación microbiana, procesos enzimáticos, síntesis química o combinaciones de estas tecnologías. Como ejemplos, que usan química, puede elaborarse LNnT tal como se describe en los documentos WO 2011/100980 y WO 2013/044928, puede sintetizarse LNT tal como se describe en los documentos WO 2012/155916 y WO 2013/044928, puede elaborarse una mezcla de LNT y LNnT tal como se describe en el documento WO 2013/091660, puede elaborarse 2'-FL tal como se describe en los documentos WO 2010/115934 y WO 2010/115935, puede elaborarse 3-FL tal como se describe en el documento

60 WO 2013/139344, pueden elaborarse 6'-SL y sales de la misma tal como se describe en el documento WO 2010/100979, pueden elaborarse oligosacáridos sialilados tal como se describe en el documento WO 2012/113404 y pueden elaborarse mezclas de oligosacáridos de leche humana tal como se describe en el documento WO 2012/113405. Como ejemplos de producción enzimática, pueden elaborarse oligosacáridos tal como se describe en el documento WO 2012/007588, pueden elaborarse oligosacáridos fucosilados tal como se describe en el documento

65 WO 2012/127410 y pueden elaborarse combinaciones diversificadas ventajosamente de oligosacáridos de leche humana tal como se describe en los documentos WO 2012/156897 y WO 2012/156898. Métodos biotecnológicos que

describen cómo elaborar oligosacáridos de leche humana (neutros no fucosilados) de núcleo sustituidos opcionalmente con fucosa o ácido siálico usando *E. coli* modificada genéticamente pueden encontrarse en los documentos WO 01/04341 y WO 2007/101862.

5 El HMO para su uso en cualquiera de los aspectos anteriores puede ser un único HMO o una mezcla de cualquier HMO adecuado para los fines de la invención y se selecciona de 2'-FL, 3-FL, DFL, LNT, LNnT, 3'-SL, 6'-SL, LNFP-I o una mezcla de las mismas. El HMO puede ser un HMO neutro o un HMO ácido. El HMO neutro es, en una realización, uno o más HMO fucosilados; en otra realización, el HMO neutro es uno o más HMO no fucosilados. Particularmente, el HMO neutro fucosilado es preferiblemente 2'-FL, y el HMO neutro no fucosilado es, por ejemplo, LNnT. El uno o más HMO fucosilados pueden ser, por ejemplo, una mezcla que contiene, consiste o consiste esencialmente en 2'-FL y DFL.

15 En una realización, la mezcla comprende, consiste en o esencialmente consiste en, HMO neutros, preferiblemente al menos un primer HMO neutro y al menos un segundo HMO neutro, siendo el primer HMO neutro un HMO neutro fucosilado y siendo el segundo HMO neutro un HMO neutro no fucosilado. El/Los HMO neutro(s) fucosilado(s) y el/los HMO neutro(s) no fucosilado(s) puede(n) estar presente(s) en una relación en masa de aproximadamente 4:1 a 1:1. Más preferiblemente, la mezcla de HMO neutros contiene, consiste en o esencialmente consiste en, un HMO fucosilado seleccionado de la lista que consiste en 2'-FL, 3-FL y DFL, y un HMO neutro no fucosilado seleccionado de la lista que consiste en LNT y LNnT; ventajosamente la mezcla comprende, consiste en o esencialmente consiste en, 2'-FL y al menos una de LNnT y LNT; o al menos una de 2'-FL y DFL y al menos una de LNnT y LNT; o 2'-FL, DFL y al menos una de LNnT y LNT.

25 En otra realización, la mezcla comprende, consiste en o esencialmente consiste en, al menos un primer HMO (ácido) y al menos un segundo HMO (neutro), seleccionándose el primer HMO (ácido) de la lista que consiste en 3'-SL y 6'-SL, y seleccionándose el segundo HMO (neutro) de la lista que consiste en 2'-FL, 3-FL, DFL, LNT y LNnT; ventajosamente la mezcla comprende, consiste en o esencialmente consiste en, 2'-FL y 6'-SL; o 6'-SL y al menos una de 2'-FL y DFL; o 2'-FL, 6'-SL y al menos una de LNnT y LNT; o 2'-FL, DFL, 6'-SL y al menos una de LNnT y/o LNT.

30 Además, en una realización, la composición sintética puede estar en forma de una composición nutricional. Por ejemplo, la composición nutricional puede ser una composición alimenticia, una disolución de rehidratación, un alimento médico o un alimento con fines médicos especiales, un suplemento nutricional y similar. La composición nutricional puede contener fuentes de proteína, lípidos y/o carbohidratos digestibles y puede estar en formas en polvo o líquidas. La composición puede estar diseñada para ser la única fuente de nutrición o como suplemento nutricional.

35 Las fuentes de proteína adecuadas incluyen proteínas de leche, proteína de soja, proteína de arroz, proteína de guisante y proteína de avena, o mezclas de las mismas. Las proteínas de leche pueden estar en forma de concentrados de proteína de leche, aislados de proteína de leche, proteína de suero de leche o caseína, o mezclas de ambas. La proteína puede ser proteína completa o proteína hidrolizada, ya sea parcialmente hidrolizada o hidrolizada extensamente. La proteína hidrolizada ofrece la ventaja de una digestión más fácil, lo que puede ser importante para humanos con tractos GI inflamados o comprometidos. La proteína puede proporcionarse también en forma de aminoácidos libres. La proteína puede comprender de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 30% de la energía de la composición nutricional, normalmente de aproximadamente el 10% al 20%.

45 La fuente de proteína puede ser una fuente de glutamina, treonina, cisteína, serina, prolina o una combinación de estos aminoácidos. La fuente de glutamina puede ser un dipéptido de glutamina y/o una proteína enriquecida en glutamina. La glutamina puede incluirse debido al uso de glutamina por enterocitos como fuente de energía. La treonina, la serina y la prolina son aminoácidos importantes para la producción de mucina. La mucina recubre el tracto GI y puede mejorar la función de barrera intestinal y la curación mucosa. La cisteína es un precursor principal de glutatión, que es clave para las defensas antioxidantes del cuerpo.

50 Los carbohidratos digestibles adecuados incluyen maltodextrina, almidón de maíz o almidón hidrolizado o modificado, polímeros de glucosa, jarabe de maíz, sólidos de jarabe de maíz, jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, carbohidratos derivados de arroz, carbohidratos derivados de guisante, carbohidratos derivados de patata, tapioca, sacarosa, glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, miel, alcoholes de azúcar (por ejemplo, maltitol, eritritol, sorbitol) o mezclas de los mismos. Preferiblemente, la composición está reducida en o libre de lactosa añadida u otros carbohidratos de FODMAP. Generalmente, los carbohidratos digestibles proporcionan de aproximadamente el 35% a aproximadamente el 55% de la energía de la composición nutricional. Un carbohidrato digestible particularmente adecuado es una maltodextrina con bajo equivalente de dextrosa (DE).

60 Los lípidos adecuados incluyen triglicéridos de cadena media (MCT) y triglicéridos de cadena larga (LCT). Preferiblemente, el lípido es una mezcla de MCT y LCT. Por ejemplo, los MCT pueden comprender de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 70% en peso de los lípidos, más específicamente de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 60% en peso. Los MCT ofrecen la ventaja de una digestión más fácil, lo que puede ser importante para humanos con tractos GI inflamados o comprometidos. Generalmente, los lípidos proporcionan de aproximadamente el 35% a aproximadamente el 50% de la energía de la composición nutricional. Los lípidos pueden contener ácidos grasos esenciales (ácidos grasos omega-3 y omega-6). Preferiblemente, estos

ácidos grasos poliinsaturados proporcionan menos de aproximadamente el 30% de la energía total de la fuente de lípido.

Fuentes adecuadas de triglicéridos de cadena larga son aceite de colza, aceite de semilla de girasol, aceite de palma, aceite de soja, grasa láctea, aceite de maíz, aceites con alto contenido oleico y lecitina de soja. Los aceites de coco fraccionados son una fuente adecuada de triglicéridos de cadena media. El perfil lipídico de la composición nutricional está diseñado preferiblemente para tener una relación de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 (n-6) con respecto a omega-3 (n-3) de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1. Por ejemplo, la relación de ácidos grasos n-6 a n-3 puede ser de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 9:1.

La composición nutricional puede incluir también vitaminas y minerales. Si se pretende que la composición nutricional esa una fuente única de nutrición, incluye preferiblemente un perfil de vitaminas y minerales completo. Los ejemplos de vitaminas incluyen vitaminas A, complejo B (tal como B1, B2, B6 y B12), C, D, E y K, niacina y vitaminas de ácido tales como ácido pantoténico, ácido fólico y biotina. Los ejemplos de minerales incluyen calcio, hierro, cinc, magnesio, yodo, cobre, fósforo, manganeso, potasio, cromo, molibdeno, selenio, níquel, estaño, silicio, vanadio y boro.

La composición nutricional puede incluir también un carotenoide tal como luteína, licopeno, zeaxantina y beta-caroteno. La cantidad total de carotenoide incluida puede variar desde aproximadamente 0,001 µg/ml hasta aproximadamente 10 µg/ml. La luteína puede estar incluida en una cantidad de desde aproximadamente 0,001 µg/ml hasta aproximadamente 10 µg/ml, preferiblemente desde aproximadamente 0,044 µg/ml hasta aproximadamente 5 µg/ml de luteína. El licopeno puede estar incluido en una cantidad de desde aproximadamente 0,001 µg/ml hasta aproximadamente 10 µg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,0185 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml de licopeno. El beta-caroteno puede comprender desde aproximadamente 0,001 µg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,034 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml de beta-caroteno.

La composición nutricional contiene preferiblemente también concentraciones reducidas de sodio; por ejemplo, desde aproximadamente 300 mg/l hasta aproximadamente 400 mg/l. Los electrolitos restantes pueden estar presentes en concentraciones fijadas para cumplir las necesidades sin proporcionar una carga de soluto renal indebida a la función renal. Por ejemplo, el potasio está presente preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 1180 a aproximadamente 1300 mg/l; y el cloro está presente preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 680 a aproximadamente 800 mg/l.

La composición nutricional puede contener también diversos otros ingredientes convencionales tales como conservantes, agentes emulsionantes, agentes espesantes, tampones, fibras y prebióticos (por ejemplo, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos), probióticos (por ejemplo, *B. animalis* subsp. *Lactis* BB12, *B. lactis* HN019, *B. lactis* Bi07, *B. infantis* ATCC 15697, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* HNOOI, *L. acidophilus* LA-5, *L. acidophilus* NCFM, *L. fermentum* CECT5716, *B. longum* BB536, *B. longum* AH1205, *B. longum* AH1206, *B. breve* M-16V, *L. reuteri* ATCC 55730, *L. reuteri* ATCC PTA-6485, *L. reuteri* DSM 17938), compuestos antioxidantes/antiinflamatorios incluyendo tocoferoles, carotenoides, ascorbato/vitamina C, palmitato de ascorbilo, polifenoles, glutatión y superóxido dismutasa (melón), otros factores bioactivos (por ejemplo, hormonas del crecimiento, citocinas, TFG-β), colorantes, aromas y estabilizadores, lubricantes, etcétera.

La composición nutricional puede formularse como polvo soluble, un concentrado líquido o una formulación lista para usar. La composición puede alimentarse a un humano que lo necesite por medio de un tubo nasogástrico o por vía oral. Diversos aromas, fibras y otros aditivos pueden estar también presentes.

Las composiciones nutricionales pueden prepararse mediante cualquier técnica de fabricación usada comúnmente para preparar composiciones nutricionales en forma sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede prepararse combinando diversas disoluciones de alimentación. Una disolución de alimentación de proteína en grasa puede prepararse calentando y mezclando la fuente de lípido y añadiendo entonces un emulsionante (por ejemplo, lecitina), vitaminas solubles en grasa y al menos una porción de la fuente de proteína al tiempo que se calienta y se agita. Una disolución de alimentación de carbohidrato se prepara entonces añadiendo minerales, minerales traza y ultratrazas, agentes espesantes o de suspensión a agua al tiempo que se calienta y se agita. La disolución resultante se mantiene durante 10 minutos con calor y agitación continuados antes de añadir carbohidratos (por ejemplo, los HMO y las fuentes de carbohidrato digestible). Las disoluciones de alimentación resultantes se combinan entonces entre sí al tiempo que se calienta y se agita, y el pH se ajusta a 6,6-7,0, tras lo cual la composición se somete a procesamiento de tiempo corto a alta temperatura durante el cual la composición se trata con calor, se emulsiona y se homogeneiza, y entonces se permite que se enfríe. Se añaden vitaminas solubles en agua y ácido ascórbico, el pH se ajusta al intervalo deseado si es necesario, se añaden aromas y se añade agua para conseguir el nivel de sólidos totales deseado.

Para un producto líquido, la disolución resultante pueden envasarse entonces asépticamente para formar una composición nutricional envasada asépticamente. En esta forma, la composición nutricional puede estar en una forma líquida concentrada o lista para alimentar. Alternativamente, la composición pueden secarse por pulverización y procesarse y envasarse como polvo reconstituible.

5 Cuando el producto nutricional es un líquido nutricional listo para alimentar, puede preferirse que la concentración total de HMO en el líquido, en peso del líquido, sea de desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 1,5%, incluyendo desde aproximadamente el 0,2% hasta aproximadamente el 1,0%, por ejemplo, desde aproximadamente el 0,3% hasta aproximadamente el 0,7%. Cuando el producto nutricional es un líquido nutricional concentrado, puede preferirse que la concentración total de HMO en el líquido, en peso del líquido, sea de desde aproximadamente el 0,2% hasta aproximadamente el 3,0%, incluyendo desde aproximadamente el 0,4% hasta aproximadamente el 2,0%, por ejemplo, desde aproximadamente el 0,6% hasta aproximadamente el 1,5%.

10 En otra realización, la composición nutricional está en una forma de dosificación unitaria. La forma de dosificación unitaria puede contener un portador de calidad alimentaria aceptable, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, mezclas de etanol en agua, agua y emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite, así como diversos agentes humectantes o excipientes. La forma de dosificación unitaria puede contener también otros materiales que no producen una reacción adversa, alérgica o no deseada de otro modo cuando se administran a un humano. Los portadores y otros materiales pueden incluir disolventes, dispersantes, recubrimientos, agentes que fomentan la absorción, agentes de liberación controlada, y uno o más excipientes inertes, tales como almidones, polioles, agentes de granulación, celulosa microcristalina, diluyentes, lubricantes, aglutinantes y agentes disgregantes.

15 Una forma de dosificación unitaria para el uso de esta invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, como comprimido, cápsula o microgránulo que contiene una cantidad predeterminada de la mezcla, o como polvo o gránulos que contienen una concentración predeterminada de la mezcla o un gel, pasta, disolución, suspensión, emulsión, jarabe, bolo, electuario o suspensión espesa, en un líquido acuoso o no acuoso, que contiene una concentración predeterminada de la mezcla. Una composición administrada por vía oral puede incluir uno o más aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes, agentes aromatizantes y humectantes. Una composición administrada por vía oral tal como un comprimido puede estar opcionalmente recubierta y puede formularse para proporcionar una liberación sostenida, retardada o controlada del HMO.

Una forma de dosificación unitaria para el uso de esta invención puede administrarse también mediante un tubo nasogástrico o infusión directa al tracto GI o estómago.

30 Una forma de dosificación unitaria para el uso de esta invención puede incluir también agentes terapéuticos tales como antibióticos, probióticos, analgésicos y agentes antiinflamatorios. La dosificación apropiada de una composición de este tipo para un humano puede determinarse de una manera convencional, basándose en factores tales como el estado del humano, el estado inmunitario, el peso corporal y la edad. En algunos casos, la dosificación será a una concentración similar a la encontrada para los HMO de la composición en la leche materna humana. La cantidad requerida estaría generalmente en el intervalo de desde aproximadamente 1 g hasta aproximadamente 15 g por día, en determinadas realizaciones desde aproximadamente 2 g hasta aproximadamente 10 g por día, por ejemplo, de aproximadamente 3 g a aproximadamente 7 g por día. Los regímenes de dosis apropiados pueden determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

40 En una realización adicional, el HMO puede formularse como composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede contener un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, mezclas de etanol en agua, agua y emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite, así como diversos agentes humectantes o excipientes. La composición farmacéutica puede contener también otros materiales que no produzcan una reacción adversa, alérgica o no deseada de otro modo cuando se administran a no lactantes. Los portadores y otros materiales pueden incluir disolventes, dispersantes, recubrimientos, agentes que fomentan la absorción, agentes de liberación controlada, y uno o más excipientes inertes, tales como almidones, polioles, agentes de granulación, celulosa microcristalina, diluyentes, lubricantes, aglutinantes y agentes disgregantes.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, como comprimido, cápsula o microgránulo que contiene una cantidad predeterminada, o como polvo o gránulos que contienen una concentración predeterminada o un gel, pasta, disolución, suspensión, emulsión, jarabe, bolo, electuario o suspensión espesa, en un líquido acuoso o no acuoso, que contiene una concentración predeterminada. Las composiciones administradas por vía oral pueden incluir aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes, agentes aromatizantes y humectantes. Las composiciones administradas por vía oral tales como comprimidos pueden estar opcionalmente recubiertas y pueden formularse para proporcionar una liberación sostenida, retardada o controlada de la mezcla en las mismas.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse también mediante supositorio rectal, tubo de aerosol, tubo nasogástrico o infusión directa al tracto GI o estómago.

60 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también agentes terapéuticos tales como antibióticos, probióticos, analgésicos y agentes antiinflamatorios. La dosificación apropiada de estas composiciones para un humano puede determinarse de una manera convencional, basándose en factores tales como estado, estado inmune, peso corporal y edad. En algunos casos, la dosificación será a una concentración similar a la encontrada para los HMO en la leche materna humana. La cantidad requerida estaría generalmente en el intervalo de desde aproximadamente 1 g hasta aproximadamente 15 g por día, en determinadas realizaciones desde aproximadamente 2 g hasta aproximadamente

10 g por día, por ejemplo, desde aproximadamente 3 g hasta aproximadamente 7 g por día. Los regímenes de dosis apropiados pueden determinarse mediante métodos convencionales.

Para la reducción de los síntomas de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en un humano, la cantidad de HMO(s) que se requiere administrar variará dependiendo de factores tales como el riesgo y la gravedad de la fatiga, cualquier estado médico o enfermedad subyacente, la edad, la forma de la composición, y otras medicaciones que se estén administrando. Además, la cantidad puede variar dependiendo de si los HMO están usándose para reducir síntomas activos (cuando la dosis puede ser mayor) o si los HMO están usándose para inducir tolerancia y/o como prevención secundaria (cuando la dosis puede ser menor). Sin embargo, la cantidad requerida puede fijarse fácilmente por un profesional médico y estaría generalmente en el intervalo de desde aproximadamente 1 g hasta aproximadamente 15 g por día, en determinadas realizaciones desde aproximadamente 2 g hasta aproximadamente 10 g por día, por ejemplo, desde aproximadamente 3 g hasta aproximadamente 7 g por día. Una dosis apropiada puede determinarse basándose en varios factores, incluyendo, por ejemplo, peso corporal y/o estado, la gravedad de los síntomas de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca que se reducen o se previenen, otras dolencias y/o enfermedades, la incidencia y/o gravedad de los efectos secundarios y la manera de administración. Los intervalos de dosis apropiados pueden determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, para reducir los síntomas de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en un humano, la dosificación puede ser de alrededor de 3 g a alrededor de 15 g por día, preferiblemente de 4 g a 10 g por día, mientras que para la inducción de tolerancia al trigo y/o al gluten o en prevención secundaria, la dosificación puede ser de alrededor de 2 g a alrededor de 7,5 g por día, preferiblemente de 2 g a 5 g por día. En un protocolo de tratamiento combinado, durante una fase de tratamiento inicial para reducir los síntomas de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca (primera fase), la dosificación puede ser mayor (por ejemplo, de 3 g a 15 g por día, preferiblemente de 4 g a 7,5 g por día), lo que va seguido de una fase para la inducción de tolerancia al trigo y/o al gluten o prevención secundaria (segunda fase), la dosificación puede reducirse (por ejemplo, de 2 g a 7,5 g por día, preferiblemente de 2 g a 5 g por día).

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Un total de 40 pacientes masculinos y femeninos se reclutaron para participar en el estudio. Cada paciente está autodiagnosticado con sensibilidad al trigo y/o al gluten. Los participantes completan una encuesta de examen de referencia en la que indican cualquier otro estado médico, y la gravedad de diversos síntomas gastrointestinales y de calidad de vida. Para medir los síntomas, se usa una escala de Likert de 5 puntos en la que una puntuación de 1 significa "ningún síntoma" y una puntuación de 5 significa "síntomas graves".

A cada participante se le proporciona una cantidad de HMO suficiente para 3 semanas de una dosis diaria de aproximadamente 4 g de HMO. El HMO se proporciona como o bien 2'-FL sola o una mezcla 4:1 de 2'-FL y LNnT (en peso). Los participantes mantienen su dieta normal.

Tras 3 semanas de ingesta, cada participante completa una segunda encuesta en la que indican la gravedad de diversos síntomas gastrointestinales y de calidad de vida. Se usa la misma escala de Likert de 5 puntos para evaluar los síntomas.

A cada participante se le proporciona entonces una cantidad adicional de HMO suficiente para otras 3 semanas de una dosis diaria de aproximadamente 4 g de HMO. El proceso se repite tras 6 semanas, 9 semanas y 12 semanas.

A lo largo del transcurso de las 12 semanas, los participantes indican una reducción en los síntomas gastrointestinales; especialmente dolor, diarrea, hinchazón y gas. Además, los pacientes indican una mejora en la fatiga.

Ejemplo 2

Los pacientes con sensibilidad al trigo no celíaca de edad entre 18-75 años se reclutan de un centro de pacientes gastroenterológicos externos que usa los criterios de consenso de sensibilidad al gluten no celíaca. Se excluyen los pacientes si son positivos para el anticuerpo anti-TG2 y/o IgA antiendomisial de específico de enfermedad celíaca o si presentan hallazgos histológicos característicos de enfermedad celíaca. Además, se excluyen los pacientes si son positivos para prueba de punción cutánea o serología de IgE específica de alergia al trigo. Otros criterios de exclusión son enfermedades intestinales inflamatorias, trastornos psiquiátricos, cirugía abdominal mayor (en particular resecciones intestinales), diabetes mellitus, enfermedades autoinmunitarias sistémicas, episodios anafilácticos previos, cualquier trastorno sistémico, , mujeres embarazadas o que están amamantando, y pacientes que ya están bajo terapia farmacológica.

En una visita inicial (examen), a cada paciente se le facilita información tanto escrita como oral sobre el estudio y se pide al paciente que firme un formulario de consentimiento informado. Cada paciente se evalúa mediante una revisión completa del historial clínico y se recoge una muestra de sangre para un análisis de elegibilidad. Se distribuye equipo para el muestreo fecal a cada paciente. Se instruye a los pacientes a mantener sus muestras en el congelador hasta la siguiente visita. Se educa a cada paciente en una dieta libre de gluten. La dieta se ilustra mediante personal médico

especializado y se proporciona a cada paciente folletos que describen la dieta, un listado de alimentos permitidos y no permitidos y se les aconseja sobre el modo para leer las etiquetas de los alimentos. A los pacientes se les facilitan también enlaces de contacto directo (por correo electrónico y teléfono) con sus centros de inscripción para cualquier consulta sobre su dieta.

Se incluyen un total de 80 pacientes. Los pacientes se aleatorizan en dos grupos, cada uno de 40 pacientes, consumiendo un grupo el producto de tratamiento y un grupo el producto placebo durante 8 semanas. El producto de tratamiento contiene 5 gramos de una combinación de 2'-FL y LNnT, mientras que el producto placebo contiene 5 gramos de glucosa. Ambos productos están en forma de polvo en un contenedor de dosificación unitaria.

En una segunda visita (inicio de la intervención), se comprueban los criterios de elegibilidad y los sujetos elegibles se aleatorizan en los dos brazos en el ensayo. Se hace una evaluación de síntomas de salud física y mental, síntomas gastrointestinales, calidad de vida y consistencia fecal (tal como se miden mediante cuestionarios de SF36, GSRS, BSFS y QoL). Se distribuye la suplementación de ensayo junto con instrucciones sobre el uso de un diario de cumplimiento electrónico. Se recogen las muestras fecales y se distribuye equipo para recoger nuevas muestras. Los pacientes se ponen en una dieta libre de gluten estricta durante 8 semanas.

Se recogen muestras de sangre para estudios de biomarcadores y de célula inmunitarias y bancos biológicos. El suero de las muestras de sangre se transfiere a tubos de criogenización y se almacenan a -80°C. Se miden los siguientes biomarcadores: TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-12, IL-10, MIP-1 β , hs-CRP, proteína de unión a lipopolisacáridos, proteína de unión a ácidos grasos 2, tripsina, antiflagelina, zonulina, histamina, prostaglandina 2 y cortisol. Se realiza una citometría de flujo en la sangre para determinar el nivel de células inmunitarias.

Las muestras fecales se almacenan a -80°C hasta su análisis. Se realiza un análisis microbiológico en las muestras fecales usando la secuencia génica de ARNr 16S.

En una tercera visita tras 8 semanas, se recogen las muestras fecales, se recogen muestras de sangre y se hace una evaluación de síntomas de salud física y mental, síntomas gastrointestinales, calidad de vida y consistencia fecal (tal como se miden mediante cuestionarios de SF36, GSRS, BSFS y QoL). Se distribuye la suplementación de ensayo y equipo para recoger nuevas muestras. Entonces se pone cada paciente en una dieta que contiene gluten correspondiente a una dosis diaria de 10 g de gluten durante un periodo de 1 semana.

Al final de la intervención (semana 9), cada paciente tiene una visita con el equipo médico. Se hace un examen físico y vuelven a evaluarse los síntomas (tal como se miden mediante escalas de GSRS, IBS-SSS, BSFS y QoL, etc.). Se recogen los productos de suplementación de ensayo para comprobar el cumplimiento. Se recogen muestras fecales y muestras de sangre y se analizan tal como anteriormente.

Los pacientes que reciben el producto de tratamiento notifican una reducción en la puntuación de GSRS y una mejora en la consistencia fecal en comparación con el grupo placebo. El análisis de la sangre indica que los pacientes de tratamiento tienen niveles reducidos de marcadores inflamatorios, una permeabilidad intestinal reducida que indica una barrera mucosa mejorada y un aumento en las células inmunitarias reguladoras. El análisis fecal indica que los pacientes de tratamiento tienen niveles reducidos de crecimiento excesivo bacteriano/disbiosis y un nivel mayor de bifidobacterias, especialmente miembros del grupo filogenético *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium bifidum*.

Ejemplo 3

Se someten a prueba 2'-FL y LNnT con respecto a su capacidad para inducir expresión de MUC2, TFF3, EIM β , CHST5 y GAL3ST2 en el modelo de cultivo de células LS174T humanas de células calciformes. La línea de células LS174T humana se obtiene de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC). Las células LS174T se mantienen en medio esencial mínimo (MEM) suplementado según las instrucciones a 37°C en aire que contiene un 5% de CO₂. Se disuelven 2'-FL y LNnT en agua de calidad para cultivo celular hasta la concentración requerida. Las células LS174T se tratan con la disolución de HMO que contiene 0 o 5 mg de HMO/ml.

Las células LS174T se recogen y se suspenden en reactivo Trizol y se aísla ARN total usando un kit de análisis de ARN (Qiagen) según las instrucciones del fabricante y se cuantifican los aislados de ARN usando análisis Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Los aislados de ARN se transcriben de manera inversa usando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) para crear ADNc, que se usa entonces para evaluar la expresión génica por medio de RT-PCR cuantitativa.

Para la RT-PCR cuantitativa, se obtienen ensayos de expresión génica TaqMAN específicos de Applied Biosystems, que incluyen ensayos de expresión para MUC2, TFF3, CHST5 y GAL3ST2. Se realiza una PCR en tiempo real cuantitativa usando una mezcla maestra de PCR TaqMAN (Applied Biosystems). Las reacciones se ejecutan por duplicado en una placa de 384 pocillos usando un sistema de PCR en tiempo real rápido 7900HT de Applied Biosystems. Los resultados se analizan usando software SDS 2.3 y se calculan mediante el método delta Ct. Todas las muestras se normaliza con respecto a la expresión de Gus- β y se calcula la inducción en veces con respecto a los

controles no tratados. La expresión génica se expresa como aumento en veces en comparación con células control libres de HMO. El experimente se repite tres veces.

5 Los resultados indican que el tratamiento con 2'-FL y LNnT aumenta la expresión de los genes MUC2 y TFF3 en comparación con los cultivos control. La expresión aumentada de genes de células calciformes es específica y no universal, tal como se evidencia mediante la inducción mínima o la falta de inducción de CHST5 y GAL3ST2, respectivamente. MUC2 y TFF3 son componentes clave de la barrera mucosa y mejoran la función de barrera mucosa.

10 Ejemplo 4

Los HMO 2'-FL y LNnT se introducen en un mezclador rotatorio en una relación en masa de 4:1. Una cantidad del 0,25% en peso de estearato de magnesio se introduce en el mezclado y la mezcla se mezcla durante 10 minutos. La mezcla se aglomera entonces en un lecho fluidizado y se llena en envases tubulares de plástico flexibles de 5 gramos y se sellan los envases.

REIVINDICACIONES

1. Un oligosacárido de leche humana (HMO) para su uso en:
 - la reducción de síntomas de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en un humano no lactante,
 - 5 - la inducción de tolerancia al trigo y/o al gluten en un paciente humano no lactante que sufre sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca, y/o
 - la prevención secundaria de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en un humano no lactante,
 comprendiendo el oligosacárido de leche humana 2'-fucosil-lactosa (2'-FL), 3-fucosil-lactosa (3-FL), difucosil-lactosa (DFL), lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (LNnT), 3'-sialil-lactosa (3'-SL), 6'-sialil-lactosa (6'-SL), lacto-N-fucopentaosa I (LNFP-I) o una mezcla de las mismas, y

10 siendo el humano no lactante un humano de 3 años de edad y mayor.

2. Una composición sintética para su uso en:
 - la reducción de síntomas de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en un humano no lactante,
 - 15 - la inducción de tolerancia al trigo y/o al gluten en un paciente humano no lactante que sufre sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca, y/o
 - la prevención secundaria de sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca en un humano no lactante,
 comprendiendo la composición al menos un oligosacárido de leche humana (HMO), comprendiendo el oligosacárido de leche humana 2'-fucosil-lactosa (2'-FL), 3-fucosil-lactosa (3-FL), difucosil-lactosa (DFL), lacto-N-tetraosa (LNT),

20 lacto-N-neotetraosa (LNnT), 3'-sialil-lactosa (3'-SL), 6'-sialil-lactosa (6'-SL), lacto-N-fucopentaosa I (LNFP-I) o una mezcla de las mismas, y

siendo el humano no lactante un humano de 3 años de edad y mayor.

3. La composición sintética para el uso según la reivindicación 2, que contiene una cantidad de 1 g a 15 g del al menos un HMO, preferiblemente de 2 g a 10 g, más preferiblemente de 3 g a 7 g.

25

4. El oligosacárido de leche humana para el uso según la reivindicación 1, que está contenido en un envase que comprende al menos 14 dosis diarias individuales de una cantidad efectiva de al menos un oligosacárido de leche humana (HMO).

30

5. El oligosacárido de leche humana o la composición sintética para el uso según la reivindicación 4, en el que cada dosis diaria contiene de aproximadamente 1 g a aproximadamente 15 g, preferiblemente de aproximadamente 2 g a aproximadamente 10 g del al menos un HMO.

35

6. El oligosacárido de leche humana o la composición sintética para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo, consistiendo o consistiendo esencialmente el oligosacárido de leche humana en al menos un HMO neutro.

40

7. El oligosacárido de leche humana o la composición sintética para el uso según la reivindicación 6, en el/la que el HMO neutro es una mezcla de un HMO fucosilado y un HMO no fucosilado.

45

8. El oligosacárido de leche humana o la composición sintética para el uso según la reivindicación 7, en el/la que el HMO fucosilado se selecciona de la lista que consiste en 2'-FL, 3-FL y DFL, y el HMO neutro no fucosilado se selecciona de la lista que consiste en LNT y LNnT.

50

9. El oligosacárido de leche humana o la composición sintética para el uso según la reivindicación 8, en el/la que la mezcla comprende, consiste en o consiste esencialmente en al menos una de 2'-FL y DFL, y al menos una de LNnT y LNT.

55

10. El oligosacárido de leche humana o la composición sintética para el uso según la reivindicación 9, en el/la que la mezcla comprende, consiste en o consiste esencialmente en 2'-FL y LNnT, preferiblemente en una relación en masa de aproximadamente 4:1 a 1:1.

60

11. El oligosacárido de leche humana o la composición sintética para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el/la que el HMO se administra al humano no lactante en una primera fase para tratar la sensibilidad al trigo y/o al gluten no celíaca y en una segunda fase para inducir la tolerancia al trigo y/o al gluten o la prevención secundaria.

65

12. El oligosacárido de leche humana o la composición sintética para el uso según la reivindicación 11, en el/la que el HMO se administra al humano no lactante en una dosis mayor durante la primera que durante la segunda fase.

70

13. El oligosacárido de leche humana o la composición sintética para el uso según la reivindicación 11 o 12, en el/la que la duración de la primera fase es de al menos 7 días consecutivos y la duración de la segunda fase es de al menos cuatro semanas consecutivas.

75