

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 975 018**

51 Int. Cl.:

A61K 31/702 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2016 PCT/DK2016/050371**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17084673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2016 E 16865816 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024 EP 3377071**

54 Título: **Oligosacáridos de la leche humana para el tratamiento de complicaciones asociadas a antibióticos**

30 Prioridad:

17.11.2015 US 201562256170 P

24.02.2016 US 201662299186 P

06.06.2016 US 201662345959 P

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

02.07.2024

73 Titular/es:

GLYCOM A/S (100.0%)

Kogle Allé 4

2970 Hørsholm, DK

72 Inventor/es:

MCCONNELL, BRUCE;

VIGSNÆS, LOUISE KRISTINE y

KRONLAGE, DAVID PAUL

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 975 018 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

Oligosacáridos de la leche humana para el tratamiento de complicaciones asociadas a antibióticos

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

Esta invención se refiere a oligosacáridos de la leche humana (HMO) y a una composición sintética para uso en la profilaxis o el tratamiento de efectos adversos asociados a un tratamiento antibiótico, por ejemplo la profilaxis o el tratamiento de la infección por *Clostridium difficile*.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se estima que el intestino humano alberga 10^{13} a 10^{14} células bacterianas, y el número de bacterias supera en número al número total de células del cuerpo de 10 (Gill et al, Science 312, 1355 (2006)). La microbiota del intestino humano es un ecosistema microbiano complejo y muy dinámico, que se considera que cumple numerosas funciones importantes para su huésped humano, incluida la protección contra patógenos, la inducción de funciones inmunorreguladoras, el procesamiento de nutrientes y las funciones metabólicas (Tojo et al, World J. Gastroenterol. 20, 15163 (2014)).

15

Investigaciones recientes han podido relacionar los desequilibrios de la microbiota intestinal con enfermedades intestinales y extraintestinales (Guinane et al, Ther. Adv. Gastroenterol. 6, 295 (2013)). Los antibióticos, especialmente los antibióticos de amplio espectro, tienen un impacto drástico en la microbiota y su equilibrio y se han implicado en la patogénesis de muchas condiciones de salud. Dado el uso extensivo de antibióticos, esto tiene un gran impacto sanitario y económico sanitario. Por ejemplo, un análisis de las tasas de prescripción de antibióticos de los EE. UU. en 2010 demostró el uso generalizado de antibióticos en niños (Hicks et al, New Engl. J. Med. 368, 1461 (2013)). Un niño promedio en los EE. UU. Ha recibido casi aproximadamente tres cursos de antibióticos a la edad de 2 años, alrededor de diez cursos a la edad de 10 años y alrededor de 17 cursos a la edad de 20 años.

20

Un impacto perjudicial común del uso excesivo de antibióticos es el desarrollo de resistencia a los antibióticos de bacterias patógenas. Sin embargo, el impacto perjudicial que los antibióticos causan en las poblaciones microbianas intestinales al contribuir a la disbiosis intestinal podría ser un problema más importante. La diarrea es uno de los efectos adversos más importantes a corto plazo relacionados con la disbiosis de la terapia antibiótica. Cuando se produce junto con el uso de antibióticos, en ausencia de cualquier otra causa, se denomina diarrea asociada a antibióticos (AAD). El espectro de AAD oscila de heces blandas sintomáticas leves a colitis potencialmente mortal. El mecanismo más comúnmente citado para la AAD es el sobrecrecimiento de microorganismos patógenos, especialmente *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella* como consecuencia de disbiosis intestinal inducida por antibióticos, especialmente penicilinas, cefalosporinas y clindamicina (Song et al, Korean J. Intern. Med. 23, 9 (2008)). Como ejemplo, *C. difficile* forma esporas que ayudan a la bacteria a resistir el tratamiento con antibióticos. En un intestino disbiótico, las esporas pueden germinar y *C. difficile* puede colonizar y crecer. Después de la colonización, *C. difficile* media su efecto sobre el desarrollo de la enfermedad a través de dos toxinas, TcdA y TcdB. Estas toxinas causan un aumento de la permeabilidad y la inflamación. La infección con *C. difficile* es un desafío cada vez mayor a nivel mundial. La tasa de hospitalización debida a *C. difficile* se ha duplicado de 2000 a 2005. La infección ha demostrado ser difícil de manejar, con una mortalidad relativamente alta (estimada en 1-25% en los EE. UU.) y 15-35 % de los pacientes experimentan al menos una infección recurrente por *C. difficile* después del final del tratamiento (Antharam et al, J. Clin. Microb. 51, 2884 (2013)).

35

40

45

50

55

Sin embargo, no todos los pacientes con AAD presentan signos de bacterias patógenas y también se cree que otros mecanismos están implicados. Por ejemplo, diversos antibióticos (incluyendo ampicilina) pueden causar un desequilibrio en bacterias sacarolíticas y proteolíticas en el colon, lo que conduce a una reducción de la fermentación de carbohidratos no digeribles. Como resultado, se produce un aumento de los hidratos de carbono no fermentados en el colon, que provoca una diarrea osmótica. Además, debido a la reducción de la actividad sacarolítica, se ha observado una deficiencia en metabolismos bacterianos, como los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) acetato, propionato y butirato. Los SCFA estimulan normalmente la reabsorción de sal y agua en el colon, por lo que la falta de SCFA puede provocar diarrea profusa. También se ha demostrado que el desequilibrio de la microbiota intestinal con antibióticos aumenta la permeabilidad intestinal, reduce la producción de MUC2 en células calciformes y debilita la capa de moco, lo que da lugar a una integridad alterada de la función barrera de la mucosa.

60

65

Además, la microbiota intestinal no se recupera necesariamente del tratamiento con antibióticos. En un estudio con humanos adultos que consumieron antibióticos durante 5 días, las concentraciones totales de bacterias fecales, así como las concentraciones de bifidobacterias, se redujeron significativamente en comparación con antes de la terapia antibiótica. Además, dos meses después de la exposición no se pudo observar resiliencia para las bifidobacterias y para las bacterias totales en la mayoría de los sujetos (Mangin et al, PLoS One 7, e50257 (2012)). Otro estudio en humanos con voluntarios sanos que consumieron antibióticos durante 10 días reveló un gran efecto sobre la diversidad microbacteriana fecal y un cambio en la composición microbiana que duró un año, con el desplazamiento microbiano más pronunciado después de un mes (Rashid et al, Clin. Infect. Dis. 60, S77 (2015)). Conjuntamente, estos resultados

sugieren que la terapia antibiótica induce alteraciones a corto y largo plazo en la microbiota intestinal humana (Jernberg et al. *Microbiology* 156, 3216 (2010)).

Aparte de los efectos secundarios a corto plazo del tratamiento con antibióticos, existe el problema de que el impacto en la microbiota intestinal tenga repercusiones en la salud a largo plazo. Por ejemplo, la incidencia de enfermedades autoinmunes y metabólicas ha aumentado considerablemente en los países occidentalizados en las últimas seis décadas. El aumento de estas condiciones ha dado lugar a la especulación de que la llegada de los antibióticos en la década de 1940, junto con el aumento de los nacimientos por cesárea, los cambios en hábitos alimentarios y la urbanización, pueden haber alterado la microbiota asociada al ser humano para hacer que las personas sean más susceptibles a estas enfermedades. Además, los cambios en la microbiota intestinal mediados por antibióticos se han asociado al desarrollo de asma, eccema, dermatitis atópica y otras sensibilizaciones alérgicas, encefalitis autoinmune, candidiasis, cólera y colitis inducida por patógenos. También se cree que amplifican la obesidad inducida por la dieta y los efectos sobre la expresión génica hepática, los niveles de hormonas metabólicas y la acumulación de grasa visceral (Blaser, *Nature* 476, 393 (2011); Nobel et al, *Nat. Commun.* 6:7486 doi: 10.1038/ncomms8486 (2015)).

Por lo tanto, sería ventajoso poder prevenir o reducir las consecuencias perjudiciales del tratamiento con antibióticos reduciendo o previniendo la disbiosis y restaurando la microbiota intestinal preferiblemente promoviendo una composición beneficiosa de la microbiota intestinal después del tratamiento con antibióticos. Además, sería ventajoso prevenir o reducir los efectos negativos del tratamiento con antibióticos sobre la función barrera intestinal y/o restaurar la función barrera intestinal después del tratamiento con antibióticos.

Un enfoque que se ha investigado es minimizar las consecuencias negativas de la terapia antibiótica mediante el uso de probióticos. Una revisión que analizó dieciséis estudios, que comprendían 3,432 participantes, indicó que los probióticos tenían un efecto protector con respecto a la prevención de AAD pediátrica (Johnston et al. *Cochrane Database Syst. Rev.* doi: 10.1002/14651858.CD004827.pub3 (2011)). Sin embargo, es poco probable que la adición de un número reducido de diferentes probióticos al intestino restaure y promueva completamente una composición beneficiosa de la microbiota intestinal después del tratamiento con antibióticos.

Otro enfoque ha sido el uso de prebióticos. Los prebióticos se han definido como:

"Ingredientes fermentados selectivamente que permiten cambios específicos, tanto en la composición como en la actividad de la microbiota gastrointestinal que confieren beneficios sobre el bienestar y la salud del huésped" (Gibson et al, *Nutr. Res. Rev.* 17, 259 (2004)). Por ejemplo, un estudio en humanos ha demostrado que la administración conjunta de 12 g de oligofruktosa al día durante el tratamiento con antibióticos redujo la aparición de recaídas de diarrea asociada a *C. difficile* en 8 %, en comparación con 34 % en controles (Lewis et al, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 21, 469 (2005)), sin embargo, la misma cantidad de oligofruktosa no protegió a los sujetos de edad avanzada que recibían antibióticos de amplio espectro de AAD (Lewis et al, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 442 (2005)).

El documento WO 2010/065652 describe el uso de permeados de leche materna para tratar la colitis relacionada con *C. difficile*, una complicación común del tratamiento prolongado con antibióticos de amplio espectro. Sin embargo, el uso de leche humana no es comercialmente realista como una opción de tratamiento general.

El documento WO 2013/032674 describe el uso de oligosacáridos de la leche humana (HMO) para tratar lesiones gastrointestinales debidas a diversas causas, incluyendo el tratamiento con antibióticos.

Banerjee et al. (*Anti-Infective Agents* 12, 139 (2014)) concluyen que es muy pronto para suponer que los prebióticos cambiarán notablemente el destino de la diarrea asociada a antibióticos (AAD), aunque su potencial para restaurar el equilibrio microbiano intestinal es definitivo.

El documento WO 2012/158517 divulga que 2'-FL, 3-FL o lactodifucotetraosa (LDFT) estimula el crecimiento de bacterias en el tracto gastrointestinal y que se inhibe el crecimiento de bacterias patógenas, por ejemplo *C. difficile*.

Sin embargo, sigue siendo necesario contar con opciones seguras para la prevención o el tratamiento de consecuencias negativas de la terapia con antibióticos en seres humanos, como las infecciones por *C. difficile*, diarrea, disbiosis, depleción de SCFAs y aumento en el nivel de toxinas producido por bacterias enterotoxigénicas.

SUMARIO DE LA INVENCION

Un primer aspecto de esta invención se refiere a oligosacáridos de la leche humana (HMO) para uso en:

- la profilaxis o el tratamiento de diarrea asociada a antibióticos y/o
- la profilaxis o el tratamiento de infección primaria o recurrente por *Clostridium difficile*,

en un paciente humano que se someta o se haya sometido a terapia antibiótica, en donde se administran al menos 2 g de HMO diariamente al ser humano, en donde los HMO son una mezcla que consiste en 2'-fucosilactosa (2'-FL) y

lacto-N-neotetraosa (LNnT), y en donde los HMO contienen alrededor de 1,5:1 a alrededor de 5:1 de 2'-FL:LNnT en peso.

Un segundo aspecto de esta invención es una composición sintética para uso en:

- la profilaxis o el tratamiento de diarrea asociada a antibióticos y/o
- la profilaxis o el tratamiento de infección primaria o recurrente por *Clostridium difficile*,

en un paciente humano que se someta o se haya sometido a terapia antibiótica, en donde la composición sintética comprende al menos 2 g de HMO y se administra diariamente, en donde los HMO son una mezcla que consiste en 2'-FL y LNnT, y en donde los HMO contienen alrededor de 1,5:1 a alrededor de 5:1 de 2'-FL:LNnT en peso.

En algunas realizaciones del primer o segundo aspecto, el uso comprende además la profilaxis o el tratamiento de disbiosis del tracto gastrointestinal inferior. La profilaxis o el tratamiento de la disbiosis puede incluir además el aumento de la abundancia de las bifidobacterias y/o la reducción de la abundancia de bifidobacterias y/o la reducción de la abundancia de proteobacterias y/o bacterias enterotoxigénicas en dicho paciente humano.

En algunas realizaciones del primer o segundo aspecto, el uso comprende además la estimulación de la producción de ácidos grasos de cadena corta.

Preferiblemente se administran al paciente los HMO en forma pura (es decir, no diluida) o diluida con agua antes de la administración o en forma de una composición sintética, más preferiblemente en una o más formas farmacéuticas unitarias, incluso más preferiblemente en una forma de dosificación unitaria sencilla.

La composición sintética para uso según el segundo aspecto puede ser en una forma de dosificación unitaria que contenga de alrededor de 2 g a alrededor de 10 g de HMO, preferiblemente de alrededor de 3,5 g a alrededor de 7,5 g de HMO.

Preferiblemente se administran al paciente los HMO o la composición durante al menos 14 días después de la finalización de la terapia con antibióticos del paciente. Más preferiblemente se administra al paciente una composición sintética que comprende 2 g a alrededor de 10 g, particularmente alrededor de 3,5 g a alrededor de 7,5 g al día de HMO. Se puede administrar al paciente una dosis inicial de tratamiento más elevada, de alrededor de 5 g a 10 g/día durante un periodo de hasta alrededor de 30 días, por ejemplo alrededor de 14 días. A partir de entonces, se puede administrar al paciente una dosis baja de mantenimiento de alrededor de 2 g a 5 g/día. La dosis de mantenimiento se puede administrar de forma crónica durante un periodo prolongado. El antibiótico puede ser un antibiótico de amplio espectro.

La mezcla o la composición sintética contiene (en peso) alrededor de 1,5:1 a alrededor de 5:1 de 2'-FL:LNnT, preferiblemente alrededor de 2:1 a 4:1. Además, la composición sintética puede contener una fuente de glutamina, treonina, cisteína, serina, prolina o una combinación de dos o más de estos aminoácidos. La composición sintética puede contener una bacteria probiótica capaz de metabolizar HMO, por ejemplo una bifidobacteria.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con esta invención, los siguientes términos tienen preferiblemente los siguientes significados:

"oligosacárido de la leche humana" o "HMO" significa un carbohidrato complejo que se encuentra en la leche materna humana (Urashima et al.: Milk Oligosaccharides, Nova Biomedical Books, New York, 2011, Chen Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 72, 113 (2015)). Los HMO tienen una estructura central que comprende una unidad de lactosa en el extremo reductor que puede ser alargada por una o más unidades de β -N-acetil-lactosaminilo y/o una o más unidades de β lacto-N-biosilo, y cuya estructura central puede ser sustituida por una fracción α L-fucopiranosilo y/o una fracción α -N-acetil-neuraminilo (sialilo). En este sentido, los HMO no ácidos (o neutros) están desprovistos de un residuo de sialilo y los HMO ácidos tienen al menos un residuo de sialilo en su estructura. Los HMO no ácidos (o neutros) pueden estar fucosilados o no fucosilados (HMO centrales).

"Oligosacárido básico de la leche humana" o "HMO central" significa un HMO, cuya estructura central no está sustituida por una fracción α L-fucopiranosilo y/o α -N-acetil-neuraminilo (sialilo). Los ejemplos de HMO centrales 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).

"Oligosacárido fucosilado de la leche humana" o "HMO central fucosilado" significa un HMO, cuya estructura central está sustituida por una fracción α L-fucopiranosilo. Los ejemplos de HMO fucosilados incluyen 2'-fucosilactosa (2'-FL), lacto-N-fucopentaosa I (LNFP-I), lacto-N-difucohexaosa I (LNDFH-I), 3-fucosilactosa (3-FL), fucosilactosa (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-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*). "Bifidobacteria del grupo filogenético de *B. adolescentis*" significa una bacteria seleccionada a partir 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)).

"Microbiota", "microflora" y "microbioma" significa una comunidad de microorganismos vivos que habita normalmente en un órgano o parte del cuerpo, en particular en órganos gastrointestinales de humanos no lactantes. Los miembros más dominantes de la microbiota gastrointestinal incluyen microorganismos de los filos de *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Synergistetes*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, and *Euryarchaeota*; at genus level *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Roseburia*, *Alistipes*, *Collinsella*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* and *Dorea*; at species level *Bacteroides uniformis*, *Alistipes pui-redinis*, *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 la mucosa, que se encuentra en la capa mucosa que recubre el epitelio del tracto gastrointestinal o está unida a ella, y la microbiota asociada a luminal, que se encuentra en el lumen del tracto gastrointestinal.

"Proteobacterias" son un filo de bacterias gramnegativas e incluyen una amplia variedad de bacterias patógenas, como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Yersinia* y muchos otros géneros notables.

"Bacterias enterotoxigénicas" significa bacterias que producen enterotoxinas. Una enterotoxina es una proteína exotoxina liberada por un microorganismo que se dirige a los intestinos, como las exotoxinas producidas por las siguientes bacterias *V. cholerae*, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), algunas cepas de *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, *Y. enterocolitica*, especies de *Aeromonas* y *C. perfringens*.

"Disbiosis del tracto gastrointestinal inferior" significa una condición del tracto gastrointestinal asociada a una microbiota alterada, en la que las especies bacterianas normalmente dominantes están infrarrepresentadas o superadas por especies anómalas o patógenas.

"Paciente" significa un humano de 3 años de edad o mayor, que es un niño, un adolescente, un adulto o un anciano, a quien se diagnostica una enfermedad. En una realización preferida, un paciente es un anciano de 60 años de edad o mayor.

"Profilaxis" significa el tratamiento administrado o las medidas adoptadas para prevenir la aparición de una enfermedad o condición patológica, incluyendo la reducción de riesgos o amenazas para la salud. Los ejemplos no limitantes de condiciones patológicas incluyen diarrea, disminución de la cantidad de ácidos grasos de cadena corta o aumento de la cantidad de enterotoxinas en el tracto gastrointestinal, disbiosis del tracto gastrointestinal, etc.

"Infección primaria" se refiere a la primera vez que un huésped, por ejemplo un paciente humano, está expuesto a un patógeno, por ejemplo una bacteria patógena, y es infectado por este patógeno, es decir, el patógeno ha completado un periodo de reposo o inactividad en el huésped. "Infección recurrente" en el presente contexto es una segunda, tercera, cuarta, etc. infección por el mismo patógeno o uno similar en cierto periodo de tiempo después de que se haya curado la infección primaria.

"Terapia" significa el tratamiento administrado o las medidas tomadas para reducir o eliminar los síntomas de una enfermedad o condición patológica.

"Tracto gastrointestinal inferior" en el presente contexto incluye el yeyuno y el íleon del intestino delgado y el intestino grueso. "Administración enteral" significa cualquier forma convencional de administración de una composición que provoca el depósito de la composición en el tracto gastrointestinal (incluyendo el estómago). Los métodos de administración enteral incluyen la administración a través de una sonda nasogástrica o una sonda yeyunal, oral, sublingual y rectal.

"Administración oral" significa cualquier forma convencional de administración de una composición por vía oral. En consecuencia, la administración oral es una forma de administración enteral.

"Cantidad efectiva" significa una cantidad de una composición que proporciona un HMO en una cantidad suficiente para obtener el resultado de tratamiento deseado. Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más dosis para obtener el resultado de tratamiento deseado.

"Antibiótico de amplio espectro" significa un antibiótico que actúa contra una amplia gama de bacterias causantes de enfermedades, incluyendo bacterias grampositivas y gramnegativas. Son ejemplos de antibióticos de amplio espectro vancomicina, ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, carbapenémicos, piperacilina/tazobactam, levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina, ciprofloxacina, estreptomycin, tetraciclina, cloranfenicol, ticarcilina.

"Riesgo para la salud a largo plazo asociado al tratamiento con antibióticos" significa una condición fisiológica o enfermedad que se desarrolla y se diagnostica en un paciente que ha recibido previamente un antibiótico como parte de un tratamiento terapéutico o de otro tipo y que ha interrumpido este tratamiento antes de la primera aparición de dicha condición fisiológica o enfermedad en el paciente. Los ejemplos de riesgos para la salud a largo plazo asociados al tratamiento con antibióticos incluyen, entre otros, enfermedades autoinmunes o metabólicas, diarrea, colitis ulcerativa, función inmunitaria alterada, obesidad, absorción de alimentos, depresión, sepsis, asma y alergias.

El término "más adelante en la vida" se refiere a los efectos observados y/o medidos por primera vez en un paciente después de un cierto periodo de tiempo después de la finalización del tratamiento con antibióticos de este paciente, es decir, después de un periodo de tiempo durante el cual el paciente no tomó un antibiótico como parte de un tratamiento terapéutico o de otro tipo, como 1-3 meses después de la finalización del tratamiento con antibióticos, como después de 3-6 meses o 6-12 meses o 1-2 años o 2-5 años o 5-10 años o incluso más de 10 años después de la finalización del tratamiento con antibióticos.

De acuerdo con esta invención, se ha descubierto que la administración de al menos 2 g al día de HMO, que es una mezcla que consiste en 2'-FL y LNnT y contiene alrededor de 1,5:1 a alrededor de 5:1 de 2'-FL:LNnT en peso, a un paciente humano que está recibiendo o ha recibido tratamiento con antibiótico:

- restaura al menos parcialmente la microbiota digestiva comensal del paciente y, en particular, aumenta la abundancia de bifidobacterias y/o reduce la abundancia de proteobacterias y/o bacterias enterotoxigénicas en el tracto gastrointestinal del paciente y/o
- aumenta la producción de SCFA, especialmente acetato, propionato y/o butirato, en el colon del paciente y/o
- disminuye la producción de enterotoxinas y/o
- previene o mitiga la diarrea asociada a antibióticos en el paciente.

Este tratamiento puede evitar parcialmente o incluso prevenir las consecuencias de la terapia con antibióticos. Tales consecuencias pueden implicar cambios profundos en la microbiota intestinal del paciente, que no necesariamente vuelve a un estado sano una vez completada la terapia con antibióticos. La disbiosis resultante puede afectar negativamente la salud del paciente. La modulación de la microbiota en el tracto gastrointestinal del paciente para aumentar específicamente las bifidobacterias puede prevenir o al menos tratar la disbiosis, restaurar los niveles de SCFA y reducir las bacterias enterotoxigénicas y sus toxinas. En particular, el aumento de la abundancia de bifidobacterias, por ejemplo *Bifidobacterium adolescentis*, puede reducir la adherencia de bacterias enterotoxigénicas como *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* a células epiteliales intestinales. Las bacterias enterotoxigénicas pueden ser resistentes a antibióticos. Este tratamiento también puede mejorar la función intestinal del paciente. Además, el tratamiento también puede reducir los riesgos de desarrollar infección por *Clostridium difficile* en un paciente humano que se someta o se haya sometido a terapia con antibióticos y/o la aparición de recaídas en un paciente humano que se someta o se haya sometido a terapia con antibióticos para tratar la infección por *Clostridium difficile*.

Los HMO fucosilados y los HMO centrales se pueden aislar mediante procesos bien conocidos a partir de leche(s) secretada(s) por mamíferos, incluyendo especies humanas, bovinas, ovinas, porcinas, entre otras. Estos HMO también se pueden producir mediante procesos bien conocidos que utilizan fermentación microbiana, procesos enzimáticos, síntesis química o combinaciones de estas tecnologías. Por ejemplo, utilizando la química, se puede sintetizar LNnT como se describe en el documento WO 2011/100980 y el documento WO 2013/044928, se puede sintetizar LNT como se describe en el documento WO 2012/155916 y el documento WO 2013/044928, se puede hacer una mezcla de LNT y LNnT como se describe en el documento WO 2013/091660, se puede hacer 2'-FL como se describe en el documento WO 2010/115934 y el documento WO 2010/115935, se puede hacer 3-FL como se describe en el documento WO 2013/139344, se pueden hacer 6'-SL y sales del mismo como se describe en el documento WO 2010/100979 y se pueden hacer mezclas de HMO como se describe en el documento WO 2012/113405. Como ejemplos de producción enzimática, se pueden hacer HMO fucosilados como se describe en el documento WO 2012/127410, y se pueden hacer mezclas de HMO ventajosamente diversificadas como se describe en el documento WO 2012/156897 y el documento WO 2012/156898. Con respecto a métodos biotecnológicos, los documentos WO 01/04341, WO 2007/101862, WO 2015/032412 y WO 2015/032413 describen como hacer HMO centrales y fucosilados utilizando *E. coli* modificada genéticamente.

Los HMO, que son una mezcla que consiste en 2'-FL y LNnT, se administran en una composición sintética que puede tomar cualquier forma apropiada. La expresión "composición sintética" designa una composición que se prepara artificialmente, y preferiblemente significa una composición que contiene al menos un compuesto que se produce *ex vivo* química y/o biológicamente, por ejemplo mediante reacción química, reacción enzimática, o de forma recombinante. En algunas realizaciones, una composición sintética de la invención puede ser, pero preferiblemente no es idéntica a una composición de origen natural. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de composición nutricional que contiene otros macronutrientes, como proteínas, lípidos u otros carbohidratos o micronutrientes. La composición sintética también puede estar en formas de dosificación unitaria, como suplementos y composiciones farmacéuticas.

Composiciones nutricionales

La composición sintética que contiene los HMO, que es una mezcla que consiste en 2'-FL y LNnT, puede ser una composición nutricional. Puede contener fuentes de una o más proteínas, lípidos y/o carbohidratos digeribles y puede estar en forma de polvo o líquido. La composición puede diseñarse para ser la única fuente de nutrición o un suplemento nutricional.

Fuentes de proteínas adecuadas incluyen proteínas lácteas, proteína de soja, proteína de arroz, proteína de guisante y proteína de avena, o mezclas de las mismas. Las proteínas lácteas pueden estar en forma de concentrados de proteínas lácteas, aislados de proteínas lácteas, proteína de trigo o caseína o mezclas de ambas. La proteína puede ser proteína entera o proteína hidrolizada, ya sea parcialmente hidrolizada o extensamente hidrolizada. La proteína hidrolizada ofrece la ventaja de una digestión más fácil, lo que puede ser importante para no lactantes con tracto gastrointestinal inflamado. La proteína también se puede presentar en forma de aminoácidos libres. La proteína puede comprender alrededor de 5 % a alrededor de 30 % de la energía de la composición nutricional; normalmente alrededor de 10 % a 20 %.

Además, la fuente de proteínas puede ser una fuente de glutamina, treonina, cisteína, serina, prolina o una combinación de dos o más de estos aminoácidos. La glutamina puede ser L-glutamina, un dipéptido de glutamina y/o una proteína enriquecida con glutamina. La glutamina puede estar incluida debido al uso de glutamina por enterocitos como fuente de energía. Treonina, serina y prolina son aminoácidos importantes para la producción de mucina. La cisteína es un importante precursor de glutatión, que es clave para las defensas antioxidantes del cuerpo.

Carbohidratos digeribles adecuados incluyen maltodextrina, almidón hidrolizado o modificado o almidón de maíz, polímeros de glucosa, jarabe de maíz, sólidos de jarabe de maíz, jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, carbohidratos derivados de arroz, carbohidratos derivados de guisante, carbohidratos derivados de patata, tapioca, sacarosa, glucosa, fructosa, lactosa, miel, alcoholes sacáricos (por ejemplo maltitol, eritritol, sorbitol) o mezclas de los mismos. Preferiblemente, la composición está exenta de lactosa. Los carbohidratos digeribles generalmente proporcionan alrededor de 35 % a alrededor de 55 % de la energía de la composición nutricional. Preferiblemente, la composición nutricional está exenta de lactosa. Un hidrato de carbono digerible particularmente adecuado es una maltodextrina con bajo equivalente de dextrosa (DE).

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 alrededor de 30 % a alrededor de 70 % en peso de lípidos, más específicamente alrededor de 50 % a alrededor de 60 % en peso. Los MCT ofrecen la ventaja de una digestión más fácil, lo que puede ser importante para no lactantes con tracto GI inflamado. Los lípidos generalmente proporcionan alrededor de 35 % a alrededor de 50 % de la energía de la composición nutricional. Los lípidos pueden contener ácidos grasos esenciales (ácidos grasos omega-3 y omega-6). Estos ácidos grasos poliinsaturados proporcionan preferiblemente menos de alrededor de 30 % de la energía total de la fuente de lípidos. Se cree que la disminución de los niveles de estos ácidos grasos poliinsaturados disminuye la sensibilidad a la peroxidación; lo que puede ser beneficioso para los no lactantes con condiciones inflamatorias.

Las fuentes adecuadas de triglicéridos de cadena larga son aceite de colza, aceite de semilla de girasol, aceite de palma, aceite de soja, grasa de leche, aceite de maíz, aceites oleicos superiores, 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 se designa preferiblemente para tener una relación de ácido graso poliinsaturado omega-6 (n-6) respecto a omega-3 (n-3) de alrededor de 4:1 a alrededor de 10:1. Por ejemplo, la relación de ácido graso n-6 respecto a n-3 puede ser alrededor de 6:1 a alrededor de 9:1.

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

La composición nutricional también puede incluir un carotenoide tal como luteína, licopeno, zeaxantina, y betacaroteno. La cantidad total de carotenoide incluida puede variar de alrededor de 0,001 µg/ml a alrededor de 10 µg/ml. La luteína

5 puede estar incluida en una cantidad de alrededor de 0,001 µg/ml a alrededor de 10 µg/ml, preferiblemente de alrededor de 0,044 µg/ml a alrededor de 5 µg/ml de luteína. El licopeno puede estar incluidos en una cantidad de alrededor de 0,001 µg/ml a alrededor de 10 µg/ml, preferiblemente de alrededor de 0,0185 µg/ml a alrededor de 5 µg/ml de licopeno. El betacaroteno puede comprender de alrededor de 0,001 µg/ml a alrededor de 10 µg/ml, por ejemplo alrededor de 0,034 µg/ml a alrededor de 5 µg/ml de betacaroteno.

10 La composición nutricional también contiene preferiblemente concentraciones reducidas de sodio; por ejemplo de alrededor de 300 mg/l a alrededor de 400 mg/l. Los electrolitos remanentes pueden estar presentes en concentraciones establecidas para satisfacer las necesidades sin proporcionar una carga indebida de solutos renales sobre la función renal. Por ejemplo, el potasio está presente preferiblemente en un intervalo de concentración de alrededor de 1180 a alrededor de 1300 mg/l; y el cloruro está presente preferiblemente en un intervalo de alrededor de 680 a alrededor de 800 mg/l.

15 La composición nutricional también puede contener otros componentes convencionales como conservantes, agentes emulsionantes, agentes espesantes, tampones, fibras y prebióticos (por ejemplo fructooligosacáridos, galactooligosacáridos), probióticos (por ejemplo *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *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 de crecimiento, citocinas, TFG-β), colorantes, saborizantes y estabilizantes, lubricantes, etc. El probiótico incluye preferiblemente un *Bifidobacterium*.

25 La composición nutricional puede estar en forma de un polvo soluble, un concentrado líquido o una formulación lista para uso. La composición se puede administrar a un paciente a través de una sonda nasogástrica o por vía oral. También pueden estar presentes diversos sabores, fibras y otros aditivos.

30 Las composiciones nutricionales se pueden preparar mediante técnicas de fabricación comúnmente utilizadas para la preparación de composiciones nutricionales en forma sólida o líquida. Por ejemplo, la composición se puede preparar mediante combinación de diversas soluciones de alimentación. Se puede preparar una solución de alimento de proteína en grasa mediante calentamiento y mezclado de la fuente de lípidos y después adición de un emulsionantes (por ejemplo lecitina), vitaminas liposolubles y al menos una fuente de proteína mientras se calienta y se agita. Después se prepara una solución de alimentación de carbohidratos mediante adición de minerales, oligoelementos y ultraminerales, agentes espesantes o de suspensión a agua mientras se calienta y se agita. La solución resultante se mantiene durante 10 minutos con calor y agitación constantes antes de la adición de carbohidratos (por ejemplo los HMO y fuentes de carbohidratos digeribles). Las soluciones de alimentación resultantes se mezclan mientras se calienta y se agita y el pH se ajusta a 6,6-7,0, después de lo cual la composición se somete a procesamiento a alta temperatura de corta duración, durante el cual la composición se trata térmicamente, se emulsiona y se homogeneiza, y después se deja enfriar. Se añaden vitaminas hidrosolubles y ácido ascórbico, se ajusta el pH al intervalo necesario si es necesario, se añaden saborizantes y se añade agua para obtener el nivel de sólidos total deseado.

45 Para un producto líquido, la solución resultante puede envasarse asépticamente para formar una composición nutricional envasada asépticamente. En esta forma, la composición nutricional puede estar en forma líquida lista para alimentación o concentrada. Alternativamente, la composición se puede secar por pulverización y procesar y envasar como un polvo reconstituible.

50 Cuando el producto nutricional es un líquido nutricional listo para alimentación, la concentración total de HMO en el líquido en peso de líquido es de alrededor de 0,2 % a alrededor de 4,0 %, incluyendo de alrededor de 0,4 % a alrededor de 3 %, incluyendo de alrededor de 0,8 % a alrededor de 2,0 %. Cuando el producto nutricional es un líquido nutricional concentrado, la concentración total de los HMO en el líquido, en peso del líquido, es alrededor de 0,4 % a alrededor de 8,0 %, incluyendo de alrededor de 0,8 % a alrededor de 6,0 %, incluyendo de alrededor de 1,6 % a alrededor de 4,0 %. Cuando está en forma sólida para reconstitución en líquido, la cantidad de HMO en el sólido dependerá del nivel de reconstitución recomendado. Preferiblemente, se administra una dosis de 2 g de HMO en no más de alrededor de 1 litro de líquido reconstituido, más preferiblemente alrededor de 250 ml de líquido reconstituido.

55 **Formas de dosificación unitarias**

60 Preferiblemente, la composición sintética que contiene los HMO, que es una mezcla que consiste en 2'-FL y LNnT, está en una forma de dosificación unitaria como una cápsula, comprimido o sobre. En cada dosis unitaria, la composición sintética contiene 2 g a alrededor de 10 g, preferiblemente alrededor de 3,5 g a alrededor de 7,5 g de los HMO.

65 La forma de dosificación unitaria también puede contener portadores, diluyentes, excipientes, lubricantes, colorantes, aglutinantes y disgregantes farmacéuticamente aceptables. Los portadores, diluyentes, excipientes, lubricantes, colorantes, aglutinantes y disgregantes adecuados incluyen solución salina tamponada con fosfato, mezclas de etanol en agua, agua y emulsiones como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, polietileno, cloruro de polivinilo,

etilcelulosa, polímeros de acrilato y sus copolímeros, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa sódica, metacrilato de polihidroxietilo (PHEMA), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), óxido de polietileno (PEO) o poliacrilamida (PA), carragenina, alginato sódico, policarbófilo, ácido poliacrílico, tragacanto, metilcelulosa, pectina, gomas naturales, goma xantana, goma guar, goma karaya, hipromelosa, estearato de magnesio, celulosa microcristalina y dióxido de silicio coloidal. La forma de dosificación unitaria también puede incluir antioxidantes como vitamina A, carotenoides, vitamina C, vitamina E, selenio, flavonoides, polifenoles, licopeno, luteína, lignano, coenzima Q10 ("CoQ10") y glutatión.

La forma de dosificación unitaria también puede incluir agentes terapéuticos como agentes antivirales, antibióticos, probióticos, analgésicos y agentes antiinflamatorios.

La forma de dosificación unitaria, especialmente aquellas en forma de sobre, pueden incluir también diversos macronutrientes o micronutrientes. Por ejemplo, pueden estar incluidas glutamina, treonina, cisteína, serina, prolina o una combinación de dos o más de estos aminoácidos.

La forma de dosificación unitaria se puede administrar por vía oral, por ejemplo como un comprimido, cápsula o sobre que contiene una cantidad predeterminada, o como un polvo o gránulos que contienen una concentración predeterminada o un gel, pasta, solución, suspensión, emulsión, jarabe, bolo, electuario o lodo, en un líquido o no acuoso, que contiene una concentración predeterminada. Las formas administradas por vía oral pueden incluir aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes, agentes saborizantes y humectantes. Las formas administradas por vía oral, como comprimidos, pueden estar recubiertas opcionalmente y pueden estar formuladas de manera que proporcionen una liberación sostenida, retardada o controlada de HMO.

La forma de dosificación unitaria también se puede administrar mediante supositorio rectal, sonda de aerosol, sonda nasogástrica o infusión directa en el tracto gastrointestinal o el estómago.

Administración

La cantidad de HMO, que es una mezcla que consiste en 2'-FL y LNnT, que se requiere administrar en la composición sintética a un paciente variará dependiendo de factores como la edad del paciente, el peso, la dieta y otros medicamentos que se administran, pero es al menos 2 g de HMO por día. Sin embargo, la cantidad requerida puede ser fácilmente establecida por un médico y generalmente estaría en el intervalo de 2 g a alrededor de 20 g por día, en ciertas realizaciones de alrededor de 3 g a alrededor de 15 g por día, de alrededor de 4 g a alrededor de 10 g por día, en ciertas realizaciones de alrededor de 5 g a alrededor de 10 g por día, en ciertas realizaciones de alrededor de 6 g a alrededor de 7,5 g por día. Se puede determinar una dosis adecuada en función de diversos factores, entre ellos, por ejemplo, edad, peso corporal, otras dolencias y/o enfermedades, la incidencia y/o gravedad de los efectos laterales y la manera de administración. Los intervalos de dosis apropiados se pueden determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Durante una fase de tratamiento inicial, la dosificación puede ser más elevada (por ejemplo 3 g a 20 g por día, preferiblemente 3 g a 15 g por día, más preferiblemente 5 g a 10 g por día, en ciertas realizaciones 6 g a 7,5 g por día). Durante una fase de mantenimiento, la dosificación puede reducirse (por ejemplo 2 g a 10 g por día, preferiblemente 3 g a 7,5 g por día, más preferiblemente 3 g a 5 g por día).

Si bien la invención se ha descrito con referencia a una realización preferida, se apreciará que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Un total de 100 hombres y mujeres adultos sanos son reclutados para participar en el estudio. Después de una visita de selección y un período de rodaje de 1-2 semanas, los participantes se seleccionan y se asignan aleatoriamente a diez grupos, cada uno de 10 sujetos. A un grupo se administra diariamente un producto placebo que contiene 2 gramos de glucosa. A los 9 grupos restantes se administra diariamente un producto de tratamiento que contiene uno de los siguientes elementos: a) 20 g de 2'-FL, b) 10 g de 2'-FL, c) 5 g de 2'-FL, d) 20 g de LNnT, e) 10 g de LNnT, f) 5 g de LNnT, g) 20 g de una mezcla 2:1 de 2'-FL y LNnT, h) 10 g de una mezcla de 2:1 de 2'-FL y LNnT, e i) 5 g de una mezcla de 2:1 de 2'-FL y LNnT durante 2 semanas. El placebo y los productos de tratamiento están en forma de polvo en un envase de dosificación unitaria.

Los adultos sanos son aptos para participar si tienen una edad entre 18 y 60 años. Todos los participantes reclutados son capaces y están dispuestos a comprender y cumplir los procedimientos del estudio. Se excluyen participantes si: han participado en un estudio clínico un mes antes de la visita de selección; tuvieron resultados anómalos en los ensayos de selección que eran relevantes clínicamente para la participación en el estudio; padecen una enfermedad severa como neoplasia maligna, diabetes, enfermedad coronaria severa, enfermedad renal, enfermedad neurológica o enfermedad psiquiátrica grave o cualquier condición que podría confundir los resultados del estudio; han utilizado suplementos probióticos en dosis elevadas (se permite el yogur) durante 3 meses antes del estudio; consumieron

fármacos antibióticos 6 meses antes del estudio; consumieron de forma regular cualquier medicación que pueda haber interferido con la evaluación de síntomas 2 semanas antes del estudio; y están embarazadas o en periodo de lactancia.

5 En la visita de selección, se registra la anamnesis y la medicación concomitante, y se recoge una muestra de sangre para análisis de seguridad. Se distribuye un kit de muestra de heces. Se indica a los participantes que guarden sus muestras en el congelador hasta la próxima visita.

10 En la segunda visita, se comprueban los criterios de aptitud y los sujetos aptos se asignan aleatoriamente a los diez grupos de ensayo (grupos de tratamiento y grupos placebo). Se recolectan las muestras fecales, y se distribuyen equipos para nuevas muestras. Los participantes están familiarizados con un sistema interactivo habilitado para Internet que registra datos diariamente y a estos se proporciona productos de tratamiento o control. Se recuerda a los sujetos que no cambien su dieta habitual durante el estudio. Se recolectan muestras de sangre para estudios de biomarcadores. Las muestras fecales se almacenan a -80°C hasta su análisis.

15 El estudio tiene una duración de 2 semanas y los participantes consumen un placebo o un producto de tratamiento diariamente. Se indica a los participantes que consuman los productos por la mañana con el desayuno. El cumplimiento se monitoriza a través del sistema interactivo habilitado para Internet.

Los participantes también utilizan el sistema para registrar:

- 20
- información de la Escala de Forma de Heces de Bristol (BSFS).
 - Información de síntomas como dolor abdominal, malestar abdominal, calambres abdominales, hinchazón abdominal y plenitud abdominal.
 - 25 · Información adicional de la Escala de Calificación de Síntomas Gastrointestinales (GSRS).

Este cuestionario incluye 15 apartados que cubren cinco dimensiones (dolor abdominal, indigestión, reflujo, diarrea, estreñimiento), y usa una escala Likert de siete grados.

30 Al final del estudio, cada participante tiene una visita de salida con el equipo médico. Se recogen muestras fecales y muestras de sangre.

35 Las muestras de sangre se analizan simultáneamente en formato de multiplexación en una plataforma de electroquimioluminiscencia. En el panel se incluyen los siguientes analitos: BUN, colesterol LDL, colesterol HDL, hierro, triglicéridos, ApoA1, ApoB, insulina, FFAs, glucagón, IL-10, IL-6 y TNF- α .

40 Para evaluar el perfil de la microbiota se extrae ADN de las muestras fecales utilizando un kit de aislamiento de ADN PowerSoil (MO-BIO) de 96 pocillos. Un mínimo de un pocillo de muestra por placa se mantiene vacío para que sirva como control negativo durante la PCR. La PCR se realiza con el cebador delantero S-D-Bact-0341-b-S-17 y el cebador inverso S-D-Bact-0785-a-A-21 con adaptadores Illumina acoplados. Estos son cebadores universales de rADN 16S bacteriano que se dirijan a la región V3-V4. Se usa el siguiente programa de PCR: 98°C durante 30 s, 25x (98°C durante 10 s, 55°C durante 20 s, 72°C durante 20 s), 72°C durante 5 min. La amplificación se verifica haciendo pasar los productos en un gel de agarosa al 1 %. Los códigos de barras se añaden en una PCR anidada usando el kit Nextera Index Kit V2 (Illumina) con el siguiente programa de PCR: 98°C durante 30 segundos, 8x (98°C durante 10 s, 55°C durante 20 s, 72°C durante 20 s), 72°C durante 5 min. La unión de los cebadores se verifica haciendo pasar los productos en un gel de agarosa al 1 %. Los productos de la PCR anidada se normalizan usando el kit de placas de normalización SequalPrep, y se agrupan. Las bibliotecas agrupadas se concentran por evaporación y la concentración de ADN de las bibliotecas agrupadas se mide en un fluorímetro Qubit utilizando el kit de ensayo de alta sensibilidad Qubit (Thermo Fisher Scientific). La secuenciación se realiza en un secuenciador de escritorio MiSeq usando el kit MiSeq Reagent Kit V3 (Illumina) para una secuenciación de extremos emparejados de 2 x 300 pb. Para el análisis bioinformático de los datos de secuencia, se usa la versión de 64 bits de USEARCH (Edgar, 2013).

55 Para evaluar la comunidad de *Bifidobacterium*, se realiza un perfil ITS de muestras de ADN de acuerdo con Milani et al, FEMS Microbiol. Ecol. 90, 493 (2014). La Tabla 1 muestra el aumento porcentual de las especies de *Bifidobacterium* con alta similitud secuencial con *B. adolescentis* en comparación con el de otras especies de *Bifidobacterium* identificadas en heces humanas después del consumo de HMO. Además, el resultado del perfil de la comunidad de *Bifidobacterium* muestra que principalmente la abundancia de *B. adolescentis* aumenta cuando se consume un solo HMO, mientras que la abundancia de *B. pseudocatenulatum* aumenta cuando se consume una mezcla de dos HMO. Tanto *B. adolescentis* como *B. pseudocatenulatum* son miembros del grupo filogenético *B. adolescentis*. Se puede observar que la ingestión oral de HMO aumenta claramente la abundancia de *B. adolescentis* y/o *B. pseudocatenulatum* en la microbiota de adultos sanos, así como su abundancia relativa en comparación con la totalidad de otras especies de *Bifidobacterium*.

65

Tabla 1

	<i>Grupo filogenético B. adolescentis</i>	totalidad de <i>B. longum</i> + <i>B. bifidum</i> + <i>B. animalis lactis</i> + <i>B. angulatum</i>
20 g de LNnT	185	105
10 g de LNnT	195	130
5 g de LNnT	90	50
20 g de 2'-FL	120	15
10 g de 2'-FL	325	20
5 g de 2'-FL	50	0
20 g de mezcla	320	265
10 g de mezcla	190	165
5 g de mezcla	25	20
Placebo	15	-5

La abundancia de proteobacterias se reduce en todos los grupos en comparación con placebo.

5 **Ejemplo 2**

Un total de 40 niños de 5 a 10 años de edad son reclutados para participar en el estudio. Los niños están comenzando una terapia con antibióticos de amplio espectro recetada por un doctor para un trastorno infeccioso. Todos los niños reclutados son capaces y están dispuestos a comprender y cumplir los procedimientos del estudio. Se excluyen niños si: han participado en un estudio clínico un mes antes de la visita de cribado; padecen una enfermedad grave como trastorno gastrointestinal, neoplasia maligna, diabetes, enfermedad coronaria grave, enfermedad renal, enfermedad neurológica o enfermedad psiquiátrica grave o cualquier condición que podría confundir los resultados del estudio; han utilizado suplementos probióticos en dosis elevadas (se permite el yogur) durante 3 meses antes del estudio; consumieron fármacos antibióticos 3 meses antes del estudio y consumieron de forma regular cualquier medicación que pueda haber interferido con la evaluación de síntomas 2 semanas antes del estudio.

En una visita de selección se registra la anamnesis y la medicación concomitante. Además, se comprueban criterios de aptitud y los sujetos aptos se asignan aleatoriamente a dos grupos, cada uno de 20 niños. El periodo de tratamiento (6 semanas) se divide en dos de la siguiente manera:

- Periodo 1 (2 semanas): Grupo 1 (placebo), Grupo 2 (producto de tratamiento).
- Periodo 2 (4 semanas): Grupo 1 (placebo), Grupo 2 (producto de tratamiento).

El producto de tratamiento contiene 5 gramos de una combinación de 2'-FL y LNnT (relación molar 2:1), mientras que el producto de placebo contiene 5 gramos de glucosa. Ambos productos están en forma de polvo en un sobre. Cada uno de los productos se administra diariamente en forma de bolo en el desayuno y la dieta no está controlada; sin embargo, se pide a los participantes que no cambien su dieta normal en el curso del estudio.

En la visita inicial, se distribuyen kits de muestras fecales y productos de tratamiento o placebo. Se indica al cuidador de cada niño que guarde sus muestras fecales en el congelador hasta la próxima visita. Se recuerda a los niños y al cuidador que no cambien la dieta habitual del niño durante el estudio. En esta visita se recoge una muestra fecal y se almacena a -80° C hasta su análisis.

El estudio tiene una duración de dos más cuatro semanas y los niños consumen placebo y/o producto de tratamiento diariamente. El cumplimiento se monitoriza a través del sistema interactivo habilitado para Internet.

Los participantes también utilizan el sistema para registrar:

- información de la Escala de Forma de Hece de Bristol (BSFS).

- Información adicional de la Escala de Calificación de Síntomas Gastrointestinales (GSRS).

Este cuestionario incluye 15 apartados que cubren cinco dimensiones (dolor abdominal, indigestión, reflujo, diarrea, estreñimiento), y usa una escala Likert de siete grados.

Al final del periodo 1 se recogen muestras fecales y se distribuye nuevo tratamiento o productos placebo. Al final del periodo 2 (visita de salida), cada niño tiene una visita al equipo médico y se recogen muestras fecales. Después de 6 meses, se recogen muestras fecales en una visita de seguimiento.

Para evaluar el perfil de la microbiota se extrae ADN de las muestras fecales utilizando un kit de aislamiento de ADN PowerSoil (MO-BIO) de 96 pocillos. Un mínimo de un pocillo de muestra por placa se mantiene vacío para que sirva como control negativo durante la PCR. La PCR se realiza con el cebador delantero S-D-Bact-0341-b-S-17 y el cebador inverso S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth et al., Nucleic Acids Res. 41, e1 (2013)) con adaptadores Illumina acoplados. Se trata de cebadores bacterianos universales de ADNr 16S, que se dirigen contra la región V3-V4. Se usa el siguiente programa de PCR: 98 °C durante 30 segundos, 25x (98° C durante 10 s, 55 °C durante 20 s, 72 °C durante 20 s), 72 °C durante 5 min. Se verifica la amplificación aplicando los productos sobre un gel de agarosa al 1 %. Los códigos de barras se añaden en una PCR anidada usando el kit Nextera Index Kit V2 (Illumina) con el siguiente programa de PCR: 98°C durante 30 segundos, 8x (98°C durante 10 s, 55°C durante 20 s, 72°C durante 20 s), 72°C durante 5 min. La unión de los cebadores se verifica haciendo pasar los productos por un gel de agarosa al 1 %.

Los productos de la PCR anidada se normalizan usando el kit de placas de normalización SequelPrep, y se agrupan. Las bibliotecas agrupadas se concentran mediante evaporación, y la concentración de ADN de las bibliotecas agrupadas se mide en un fluorómetro Qubit usando el kit Qubit High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). La secuenciación se realiza en un secuenciador de escritorio MiSeq usando el kit MiSeq Reagent Kit V3 (Illumina) para una secuenciación de extremos emparejados de 2 x 300 pb. Para el análisis bioinformático de los datos de secuencia, se usa la versión de 64 bits de USEARCH (Edgar, 2013).

Los análisis fecales revelan que los HMO son capaces de prevenir la disbiosis mitigada por antibióticos y potenciar una composición de microbiota favorable mediante aumento de la abundancia de bifidobacterias, preferiblemente un *Bifidobacterium* dentro del grupo filogenético *B. adolescentis* y especialmente *Bifidobacterium adolescentis* y/o *B. pseudocatenulatum*, durante y después de la terapia con antibióticos. Los niños han reducido la abundancia de proteobacterias y han reducido los niveles de bacterias enterotoxigénicas y sus toxinas, y han reducido la incidencia de diarrea y dolor abdominal.

Ejemplo 3

Se utiliza un sistema intestinal *in vitro* para simular la región del colon en un ser humano infectado con *C. difficile*. Los reactores que simulan las regiones del colon (proximal, transversal y distal) se inoculan con muestras fecales de un individuo sano de edad > 65 años. Después de un periodo de estabilización y control se administran antibióticos al sistema para inducir disbiosis en los reactores de colon. Después del cese de la terapia con antibióticos, las esporas de *C. difficile* se añaden a los reactores de colon para desarrollar una infección por *C. difficile*. Una vez se obtiene una infección estable por *C. difficile* se inicia el tratamiento. Se ejecutan dos tratamientos diferentes (A y B) en paralelo durante 2 semanas. A: 2'-FL y LNnT (ratio 4:1) más antibióticos durante siete días y 2'-FL y LNnT (relación 4:1) por separado en los siguientes siete días, B: antibióticos durante siete días y sin tratamiento durante los siguientes siete días. Después del periodo de tratamiento de dos semanas, el modelo se ejecuta como un seguimiento durante dos semanas para evaluar si la infección se volverá a producir. En diversos momentos (en el periodo de control, tratamiento y seguimiento), la comunidad de microbiota y los metabolitos bacterianos se miden mediante secuenciación 16S y cromatografía de gases, respectivamente. Además, se miden esporas y *C. difficile* viable.

El análisis de la microbiota revela que los HMO son capaces de aumentar el nivel de bifidobacterias incluso en presencia de antibióticos y pueden cambiar la comunidad de la microbiota, incluidos sus metabolitos, hacia un perfil más equilibrado una vez finalizado el tratamiento con antibióticos. Además, los HMO inhiben las esporas y *C. difficile* viable, disminuyendo la recurrencia de la infección.

Ejemplo 4 - Composición nutricional

Se prepara una composición nutricional lista para alimentación a partir de agua, maltodextrina, jarabe de maíz, azúcar, concentrado de proteína láctea, aceite vegetal (canola, girasol alto oleico y maíz), aislado de proteína de soja, goma arábiga, saborizantes, HMO, citrato potásico, fosfato de magnesio, gel y goma de celulosa, carbonato de calcio, ascorbato sódico, lecitina de soja, bitartrato de colina, fosfato cálcico, acetato de alfa-tocoferol, ácido ascórbico, goma carragenina, pirofosfato férrico, saborizantes, edulcorantes (Stevia), palmitato de vitamina A, niacinamida, vitamina D3, pantotenato cálcico, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, betacaroteno, riboflavina, cloruro de cromo, ácido fólico, biotina, yoduro potásico, fitonadiona, selenito sódico, molibdato sódico, vitamina B12.

5 La composición proporciona un suplemento nutricional que es una buena fuente de proteína, es bajo en grasas, contiene vitaminas, minerales y antioxidantes y cumple los criterios FODMAP. Además, la composición contiene una mezcla de dos o más HMO fucosilados y uno o más HMO centrales que son capaces de promover el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas, modular la inflamación crónica, mejorar la barrera mucosa y reducir la ansiedad y la depresión.

Ejemplo 5 - Composición de cápsula

10 Se prepara una cápsula rellenando alrededor de 2 g de una mezcla de uno o más HMO fucosilados y uno o más HMO centrales en una cápsula de gelatina 000 utilizando una máquina llenadora. Después, las cápsulas se cierran.

REIVINDICACIONES

1. Oligosacáridos de la leche humana (HMO) para uso en:
- la profilaxis o el tratamiento de diarrea asociada a antibióticos y/o
5 - la profilaxis o el tratamiento de infección primaria o recurrente por *Clostridium difficile*,
en un paciente humano que se someta o se haya sometido a terapia con antibióticos,
en donde se administran al menos 2 g de HMO diariamente al humano,
en donde los HMO son una mezcla que consiste en 2'-fucosilactosa (2'-FL) y lacto-N-neotetraosa (LNnT), y
en donde los HMO contienen alrededor de 1,5:1 a alrededor de 5:1 de 2'-FL:LNnT en peso.
- 10 2. Una composición sintética para uso en:
- la profilaxis o el tratamiento de diarrea asociada a antibióticos y/o
- la profilaxis o el tratamiento de infección primaria o recurrente por *Clostridium difficile*,
en un paciente humano que se someta o se haya sometido a terapia con antibióticos,
15 en donde la composición sintética
- comprende al menos 2 g de oligosacáridos de la leche humana (HMO) y
- se administra diariamente,
en donde los HMO son una mezcla que consiste en 2'-fucosilactosa (2'-FL) y lacto-N-neotetraosa (LNnT), y
en donde los HMO contienen alrededor de 1,5:1 a alrededor de 5:1 de 2'-FL:LNnT en peso.
- 20 3. HMO para el uso según la reivindicación 1 o la composición sintética para el uso según la reivindicación 2, en donde
el uso comprende además la profilaxis o el tratamiento de disbiosis del tracto gastrointestinal inferior.
- 25 4. HMO o la composición sintética para el uso según la reivindicación 3, en donde la profilaxis o el tratamiento de
disbiosis comprende el aumento de la abundancia de bifidobacterias y/o la reducción de la abundancia de
proteobacterias y/o bacterias enterotoxigénicas en dicho paciente humano.
- 30 5. HMO o la composición sintética para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el uso
comprende además la estimulación de la producción de ácidos grasos de cadena corta.
- 35 6. La composición sintética para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que combina también glutamina,
treonina, cisteína, serina, prolina o una combinación de dos o más de estos aminoácidos.
7. La composición sintética para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 en una forma de dosificación
unitaria que contiene de alrededor de 2 g a alrededor de 10 g de HMO.
- 40 8. La composición sintética para el uso según la reivindicación 7, en donde la dosificación unitaria contiene de
alrededor de 3,5 g a alrededor de 7,5 g de HMO.
9. HMO o la composición sintética para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los
HMO o la composición se administran diariamente durante al menos 14 días después de la finalización de la terapia
con antibióticos.
- 45 10. HMO o la composición sintética para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el
antibiótico es un antibiótico de amplio espectro.