

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 093**

51 Int. Cl.:

A61K 31/702	(2006.01)
C07H 1/00	(2006.01)
C07H 3/06	(2006.01)
C12P 19/18	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2016 PCT/IB2016/051823**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16157108**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2016 E 16771503 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2023 EP 3277287**

54 Título: **Mezclas de oligosacáridos de la leche humana que comprenden 3'-O-sialilactosa**

30 Prioridad:

31.03.2015 EP 15162014
31.03.2015 EP 15162024

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CHAMPION, ELISE;
MCCONNELL, BRUCE y
DEKANY, GYULA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 971 093 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

Mezclas de oligosacáridos de la leche humana que comprenden 3'-O-sialilactosa

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a mezclas ternarias de Oligosacáridos de la Leche Humana ("HMO"), particularmente mezclas de 3'-O-sialilactosa (3'-SL), un componente A que es 3-O-fucosilactosa (3-FL) o lacto-N-tetraosa (LNT), y un
10 componente B que es 3-O-fucosil-3'-O-sialilactosa (FSL) cuando el componente A es 3-FL, o sialilacto-N-tetraosa a (LST-a) cuando el componente A es LNT, a un procedimiento para obtener mezclas ternarias, y a aplicaciones de las mezclas ternarias en la salud humana.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Los HMO se han convertido en objeto de gran interés en los últimos años debido a su papel en numerosos procesos biológicos que ocurren en el organismo humano. La leche de mamífero contiene al menos 130 de estos oligosacáridos complejos (Urashima et al: Milk Oligosaccharides, Nova Biomedical Books, Nueva York, 2011, ISBN: 978-1-61122-831-1).

20 Hasta ahora, la única fuente de HMO era la leche de mamíferos, que contiene principalmente agua, junto con 55-70 g/l de lactosa, 24-59 g/l de lípidos, aprox. 13 g/l de proteínas, 5-15 g/l de los HMO, y aprox. 1,5 g/l de minerales.

Sin embargo, los esfuerzos para desarrollar procedimientos para sintetizar estos oligosacáridos han aumentado significativamente en los últimos diez años debido a su papel en numerosos procesos biológicos humanos. En este
25 sentido, se han desarrollado procedimientos para producir HMO mediante fermentaciones microbianas, procedimientos enzimáticos, síntesis químicas, o combinaciones de estas tecnologías. Por ejemplo, mediante procedimientos químicos, LNnT se puede obtener como se describe en los documentos WO 2011/100980 y WO 2013/044928, LNT se puede sintetizar como se describe en los documentos WO 2012/155916 y WO 2013/044928, una mezcla de LNT y LNnT se puede obtener como se describe en el documento WO 2013/091660, 2'-FL se puede
30 obtener como se describe en los documentos WO 2010/115934 y WO 2010/115935, 3-FL se puede obtener como se describe en el documento WO 2013/139344, y 6'-SL y sus sales se pueden obtener como se describe en el documento WO 2010/100979. Como ejemplos de procedimientos biotecnológicos, los documentos WO 01/04341 y WO 2007/101862 describen cómo obtener oligosacáridos centrales de la leche humana opcionalmente sustituidos con fucosa o ácido siálico usando *E. coli* genéticamente modificada. Como ejemplo de procedimientos enzimáticos, los
35 oligosacáridos sialilados se pueden obtener como se describe en el documento EP-A-577580.

También se han realizado esfuerzos para desarrollar procedimientos para sintetizar enzimáticamente mezclas de oligosacáridos de HMO, sin tener que sintetizar todos los oligosacáridos componentes de la mezcla como se describe en los documentos WO 2012/156897 y WO 2012/156898. Tales procedimientos han proporcionado mezclas de
40 reacción que contienen una pluralidad de oligosacáridos diferentes.

Sin embargo, se han buscado mejores procedimientos para la síntesis de mezclas de HMO, especialmente mezclas que comprenden tres HMO, particularmente 3'-SL, 3-FL y FSL, o 3'-SL, LNT y LST-a.

45 Se están acumulando pruebas de que la comunidad de microbios residentes, llamada microbioma, en el tubo digestivo humano desempeña un papel importante en la salud y la enfermedad. Cuando la composición normal del microbioma se desequilibra, el hospedante humano puede sufrir consecuencias. Investigaciones recientes han implicado desequilibrios del microbioma en trastornos tan diversos como el cáncer, la obesidad, la enfermedad inflamatoria intestinal, la psoriasis, el asma, y posiblemente incluso el autismo. Se cree que los HMO modulan positivamente el
50 microbioma, y son de creciente interés para este propósito. Sin embargo, la notable diversidad de los HMO, junto con su falta de disponibilidad, ha dificultado los estudios de las funciones específicas de los HMO individuales. Existe una clara necesidad de HMO específicos o combinaciones de HMO para modular el microbioma de la manera deseada, a fin de abordar problemas de salud humana específicos.

55 SUMARIO DE LA INVENCION

Un aspecto de esta invención se refiere a una primera mezcla de HMO que consiste esencialmente en 3'-O-sialilactosa (3'-SL), un componente A que es 3-O-fucosilactosa (3-FL) o lacto-N-tetraosa (LNT), y un componente B que es 3-O-fucosil-3'-O-sialilactosa (FSL) cuando el componente A es 3-FL, o sialilacto-N-tetraosa a (LST-a) cuando el
60 componente A es LNT.

Otro aspecto de esta invención se refiere a un procedimiento para preparar la primera mezcla de HMO haciendo reaccionar un dador de 3'-SL y un aceptor del componente A en presencia de una α 2,3-transsialidasa, y eliminando después la lactosa y la α 2,3-transsialidasa del medio de reacción.

65

Otro aspecto de esta invención se refiere a una segunda mezcla de HMO que consiste esencialmente en 3'-SL, un componente A que es 3-FL o LNT, un componente B que es FSL cuando el componente A es 3-FL, o LST-a cuando el componente A es LNT, y lactosa.

5 Otro aspecto de esta invención se refiere a un procedimiento para obtener la segunda mezcla de HMO haciendo reaccionar un dador de 3'-SL y un aceptor del componente A en presencia de una α 2,3-transsialidasa, y eliminando después la α 2,3-transsialidasa de la medio de reacción. La mezcla resultante es la segunda mezcla de HMO de esta invención.

10 Un aspecto de esta invención se refiere a composiciones antiinfecciosas para tratar infecciones bacterianas, en el que dichas composiciones comprenden 3'-SL, 3-FL y FSL, o 3'-SL, LNT y LST-a. Estas composiciones contienen mezclas de una pluralidad de diferentes HMO con propiedades y actividades biológicas nuevas. Específicamente, las composiciones aumentan la abundancia de Bifidobacterium y Barnesiella del microbioma en un ser humano. Además, las composiciones inhiben la unión del patógeno al hospedante, y por tanto protegen al hospedante de la infección.
 15 Las composiciones también se pueden usar para tratar y/o reducir el riesgo de una amplia gama de infecciones bacterianas en un ser humano. La composición antiinfecciosa es ventajosamente la primera o segunda mezcla de esta invención, más ventajosamente la primera mezcla, como se describió anteriormente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que una mezcla de 3'-SL, 3-FL y FSL, y una mezcla de 3'-SL, LNT y LST-a, poseen actividad antiinfecciosa, y por lo tanto se pueden usar como composiciones antiinfecciosas, por ejemplo para tratar infecciones bacterianas. Las mezclas pueden aumentar la abundancia de Bifidobacterium y Barnesiella del microbioma. Las mezclas también pueden reducir la abundancia de Firmicutes del microbioma,
 25 especialmente las especies de Clostridia. Los seres humanos que tienen una mayor abundancia de Bifidobacterium y Barnesiella en su microbioma son más resistentes a una amplia gama de infecciones, y se recuperan más rápidamente de ellas. En particular, las presentes mezclas de HMO son eficaces para la protección y la recuperación frente a infecciones resistentes a los antibióticos. Se cree que esta mejora de la resistencia y la recuperación es atribuible a los cambios que promueven la salud en el microbioma causados por esos HMO. La capacidad de inhibir la unión de patógenos al cuerpo del hospedante imparte beneficios adicionales para la salud.

1. Mezclas de HMO

35 La presente invención se refiere a mezclas sintéticas de HMO. La expresión "mezcla sintética" o "composición sintética" designa una mezcla o composición que se prepara artificialmente, y preferiblemente significa una mezcla o 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 este sentido, "sintética" se usa en contraposición a "natural", y significa que una mezcla o composición sintética de la invención no es idéntica a una composición o mezcla natural, como la leche humana, o al menos un HMO de la mezcla o la composición no proviene
 40 de una fuente natural, como por ejemplo la leche humana.

En una realización, la mezcla de HMO puede ser una primera mezcla de los HMO que consiste esencialmente en tres HMO diferentes, en particular 3'-SL, un componente A de HMO que es 3-FL o LNT, y un componente B de HMO que es FSL cuando el componente A es 3-FL, o LST-a cuando el componente A es LNT. En otra realización, la mezcla de
 45 HMO de la invención es una segunda mezcla que consiste esencialmente en 3'-SL, un componente A que es 3-FL o LNT, un componente B que es FSL cuando el componente A es 3-FL, o LST-a cuando el componente A es LNT, y lactosa.

1.1. La primera mezcla de HMO

50 En una realización preferida, la primera mezcla de HMO consiste esencialmente en 3'-SL, 3-FL y FSL (primera mezcla I). La relación molar de los HMO en la primera mezcla I puede variar. En una realización, la relación molar de FSL con respecto a una combinación 3'-SL + 3-FL es al menos 1:20. En otra realización, esta relación puede ser al menos 1:12. En algunas realizaciones pueden preferirse ciertas relaciones de FSL con respecto a una combinación 3'-SL + 3-FL
 55 en la primera mezcla I, tales como al menos 1:5 o al menos 1:3. En algunas otras realizaciones, la primera mezcla I puede tener una relación molar de 3'-SL con respecto a LNT de 0,05-5,3 o 0,17-3, preferiblemente alrededor de 1.

En otra realización preferida, la primera mezcla de los HMO consiste esencialmente en 3'-SL, LNT y LST-a (primera mezcla II). La relación molar de los HMO en la primera mezcla II puede variar. En una realización, la relación molar de LST-a con respecto a una combinación 3'-SL + LNT es al menos 1:10. En otra realización, esta relación puede ser al
 60 menos 1:7. En algunas realizaciones pueden preferirse ciertas relaciones de LST-a con respecto a una combinación 3'-SL + LNT en la primera mezcla II, tales como al menos 1:5 o alrededor de 1:3. La primera mezcla II también puede tener una relación molar de 3'-SL con respecto a LNT de 0,05-11 o 0,13-7,7. En una realización preferida, la relación molar 3'-SL:LNT es alrededor de 1.

65

Cualquiera de las primeras mezclas de HMO descritas anteriormente se puede obtener fácilmente mediante un procedimiento que implica tratar un dador de 3'-SL y un aceptor del componente A con una α 2,3-transsialidasa, y después eliminar la lactosa y la α 2,3-transsialidasa del medio de reacción.

5 En una realización preferida, el procedimiento para preparar la primera mezcla I comprende una etapa de poner en contacto 3'-SL y 3-FL en una relación molar de preferiblemente 1:3 a 3:1 o 1:2 a 2:1, tal como alrededor de 1:1, con una α 2,3-transsialidasa que tiene una tasa de conversión para la reacción de 3'-SL y 3-FL de al menos 20 %, hasta alrededor de 90 %, preferiblemente al menos 30 %, tal como de al menos 30 % a alrededor de 80 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 % o al menos 70 %. El medio de reacción que sigue a esta última reacción, que normalmente contiene FSL, lactosa, 3'-SL y 3-FL sin reaccionar, y α 2,3-transsialidasa, se somete después a etapas de purificación convencionales para eliminar sustancias distintas de 3'-SL, FSL y 3-FL, por ejemplo α 2,3-transsialidasa y lactosa. Si esta última mezcla se obtiene mediante una reacción enzimática *in situ*, la α 2,3-transsialidasa puede inactivarse y eliminarse, por ejemplo, mediante desnaturalización, seguido de centrifugación o ultrafiltración, para producir una mezcla que consiste esencialmente en 3'-SL, 3-FL, FSL y lactosa. La lactosa en esta mezcla se puede separar después de las 3'-SL, 3-FL y FSL, por ejemplo, mediante ultrafiltración y/o nanofiltración en cascada, o la lactosa se puede tratar primero con lactasa para degradarla a glucosa y galactosa, que después se puede separar de 3'-SL, 3-FL y FSL mediante ultrafiltración y/o nanofiltración. En caso de producir la última mezcla de HMO de forma recombinante, es decir, mediante un procedimiento de fermentación usando un microorganismo modificado genéticamente, tal como una bacteria, que expresa una α 2,3-transsialidasa recombinante, la purificación de la mezcla de HMO se puede realizar usando etapas de eliminación de la material celular del caldo de fermentación, seguido de la eliminación de partículas que no sean hidratos de carbono y contaminantes como sales, moléculas cargadas, proteínas, ADN, colorantes/cuerpos de caramelo, etc., para producir una mezcla que consiste esencialmente en 3'-SL, 3-FL, FSL y lactosa. La separación de lactosa se puede realizar como se describe anteriormente.

25 En otra realización preferida, el procedimiento para obtener la primera mezcla II comprende la etapa de poner en contacto una mezcla de 3'-SL y LNT, en la que la relación molar de 3'-SL a LNT está en el intervalo de 1:5 a 5:1, tal como de 1:3 a 3:1, de 1:2 a 2:1, o 1:1, con una α 2,3-transsialidasa que tiene una tasa de conversión de al menos 30 % a alrededor de 80 % para la reacción de 3'-SL y LNT, preferiblemente al menos 40 %, tal como al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 60 % o más. El medio de reacción que sigue a esta última reacción, que normalmente contiene LST-a, lactosa, 3'-SL y LNT sin reaccionar, y α 2,3-transsialidasa, se somete después a etapas de purificación convencionales para eliminar sustancias distintas de 3'-SL, LNT y LST, por ejemplo α 2,3-transsialidasa y lactosa. Si esta última mezcla se obtiene mediante una reacción enzimática *in situ*, la α 2,3-transsialidasa puede inactivarse y eliminarse, por ejemplo, mediante desnaturalización, seguido de centrifugación o ultrafiltración, para producir una mezcla que consiste esencialmente en 3'-SL, LNT, LST-a y lactosa. La lactosa en esta mezcla se puede separar de 3'-SL, LNT y LST-a usando procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo mediante ultrafiltración y/o nanofiltración en cascada, o la lactosa se puede tratar primero con lactasa para degradarla a glucosa y galactosa, que después se pueden separar ambas de 3'-SL, LNT y LST-a mediante ultrafiltración y/o nanofiltración. En caso de producir la última mezcla de HMO de forma recombinante, es decir, mediante un procedimiento de fermentación usando un microorganismo modificado genéticamente, tal como una bacteria, que expresa una α 2,3-transsialidasa recombinante, la purificación de la mezcla de HMO se puede realizar usando etapas de eliminación de la material celular del caldo de fermentación, seguido de la eliminación de partículas que no sean hidratos de carbono y contaminantes como sales, moléculas cargadas, proteínas, ADN, colorantes/cuerpos de caramelo, etc., para producir una mezcla que consiste esencialmente en 3'-SL, LNT, LST-a y lactosa. La separación de lactosa se puede realizar como se describe anteriormente.

45 1.2. La segunda mezcla de HMO

Las segundas mezclas de HMO de la invención se pueden obtener llevando a cabo el procedimiento de esta invención, como se describe anteriormente, que no comprende una etapa de eliminar lactosa de las mezclas de HMO obtenidas.

50 En una realización, la segunda mezcla de HMO consiste esencialmente en 3'-SL, 3-FL, FSL y lactosa (segunda mezcla I). Preferiblemente, en esta segunda mezcla I:

- la relación molar de (3'-SL + 3-FL) con respecto a FSL es 1-18, y
- la relación molar de lactosa con respecto a FSL es alrededor de 1.

Más preferiblemente, una de las relaciones molares 3'-SL a FSL y 3-FL a FSL no es mayor que 3.

60 Esta segunda mezcla de HMO I se puede obtener llevando a cabo el procedimiento de esta invención con 3'-SL y 3-FL en una relación molar de preferiblemente 1:3 a 3:1, más preferiblemente 1:2 a 2:1, incluso más preferiblemente 1:1, y con una α 2,3-transsialidasa que tiene una tasa de conversión de al menos 20 %, hasta alrededor de 90 %, preferiblemente al menos 35 %, más preferiblemente al menos 50 %. Preferiblemente, en la segunda mezcla de HMO, la relación molar de 3'-SL a 3-FL es 0,17-3.

65

En otra realización, la segunda mezcla de esta invención consiste esencialmente en 3'-SL, LNT, LST-a y lactosa (segunda mezcla II). Preferiblemente, en esta segunda mezcla II:

- 5 • la relación molar de (3'-SL + LNT) con respecto a LST-a es 0,8-9,5, y
- la relación molar de lactosa con respecto a LST-a es alrededor de 1.

Más preferiblemente, una de las relaciones molares 3'-SL a LST-a y LNT a LST-a no es mayor que 2.

10 Esta segunda mezcla II de HMO se puede obtener llevando a cabo el procedimiento de esta invención con 3'-SL y LNT en una relación molar de preferiblemente 1:5 a 5:1, más preferiblemente 1:3 a 3:1, incluso más preferiblemente 1:2 a 2:1, aún todavía más preferiblemente 1:1, y con una α 2,3-transialidasa que tiene una tasa de conversión de al menos 35 %, hasta alrededor de 80 %, preferiblemente al menos 40 %, más preferiblemente al menos 50 %. Preferiblemente, en la segunda mezcla II de HMO, la relación molar de 3'-SL a LNT es 0,09-11.

15 **1.3. Realizaciones de la primera y segunda mezclas de HMO**

 Cuando el procedimiento de esta invención se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 2:1 a 1:2 y a una tasa de conversión de 20-50 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 2-13 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 0,33-3.

 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 1:1 y a una tasa de conversión de 20-50 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 2-8 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 1.

 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 3:1 a 1:3 y a una tasa de conversión de 30-50 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 2-12 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 0,2-5.

30 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 2:1 a 1:2 y a una tasa de conversión de 30-50 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 2-8 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 0,33-3.

 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 1:1 y a una tasa de conversión de 30-50 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 2-5 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 1.

 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 3:1 a 1:3 y a una tasa de conversión de 30-60 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 2-12 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 0,17-6.

 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 2:1 a 1:2 y a una tasa de conversión de 30-60 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 2-8 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 0,29-3,5.

 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 1:1 y a una tasa de conversión de 30-60 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 2-4,67 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 1.

50 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 3:1 a 1:3 y a una tasa de conversión de 25-35 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 3,7-14 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 0,25-4,1.

 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 2:1 a 1:2 y a una tasa de conversión de 25-35 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 3,7-10 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 0,39-2,54.

 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 1:1 y a una tasa de conversión de 25-35 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 3,7-6 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 1.

 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 3:1 a 2:1 y a una tasa de conversión de 30-60 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 3-12 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 2,43-6.

65

ES 2 971 093 T3

Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 2:1 a 1:1 y a una tasa de conversión de 20-50 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 2-13 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 1-3.

5 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 1:1 a 1:2 y a una tasa de conversión de 30-60 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 2-8 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 0,29-1.

10 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 1:2 a 1:3 y a una tasa de conversión de 40-90 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 1,75-8 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 0,05-0,38.

15 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a 3-FL de 2:1 a 1:3 y a una tasa de conversión de 20-50 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + 3-FL) a FSL de 2-18 y una relación molar de 3'-SL a 3-FL menor que 3,5.

20 Cuando el procedimiento de esta invención se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 2:1 a 1:2 y a una tasa de conversión de 35-70 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 0,8-6,6 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 0,2-4,5.

Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 1:1 y a una tasa de conversión de 35-70 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 0,8-3,8 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 1.

25 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 3:1 a 1:3 y a una tasa de conversión de 40-80 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 0,5-8 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 0,09-11.

30 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 2:1 a 1:2 y a una tasa de conversión de 40-70 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 0,8-5,5 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 0,2-4,5.

35 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 1:1 y a una tasa de conversión de 40-70 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 0,8-3 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 1.

40 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 3:1 a 1:3 y a una tasa de conversión de 50-80 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 0,5-6 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 0,09-11.

45 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 2:1 a 1:2 y a una tasa de conversión de 50-70 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 0,8-4 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 0,2-4,5.

50 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 1:1 y a una tasa de conversión de 50-70 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 0,8-2 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 1.

55 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 3:1 a 1:3 y a una tasa de conversión de 40-60 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 1,3-8 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 0,17-6.

60 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 2:1 a 1:2 y a una tasa de conversión de 40-60 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 2-6,6 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 0,25-3,5.

Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 1:1 y a una tasa de conversión de 40-60 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 1,3-3 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 1.

Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 5:1 a 3:1 y a una tasa de conversión de 50-80 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 3-10 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 5-21.

Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 3:1 a 2:1 y a una tasa de conversión de 40-80 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 1,75-8 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 2,5-11.

5 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 2:1 a 1:1 y a una tasa de conversión de 35-70 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 0,86-6,6 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 1-4,3.

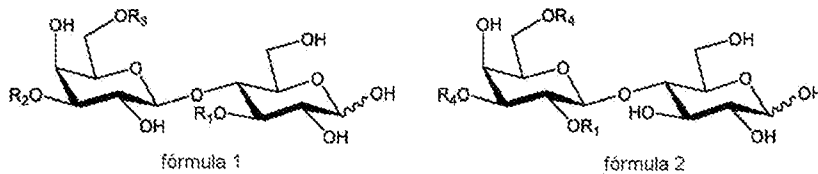
10 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 1:1 a 1:2 y a una tasa de conversión de 35-70 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 0,86-6,6 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 0,23-1.

15 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 1:2 a 1:3 y a una tasa de conversión de 40-80 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 1,75-8 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 0,09-0,4.

20 Cuando el procedimiento se lleva a cabo con una relación molar de 3'-SL a LNT de 1:3 a 1:5 y a una tasa de conversión de 50-80 %, se puede obtener una primera o una segunda mezcla de HMO que tiene una relación molar de (3'-SL + LNT) a LST-a de 3-10 y una relación molar de 3'-SL a LNT de 0,05-0,2.

1.4. Producción enzimática de mezclas de HMO de la invención

25 Según esta invención , el término "α2,3-transialidasa" significa cualquier sialidasa de tipo salvaje o modificada genéticamente que sea capaz de transferir un resto de sialilo a la posición 3 de la glucosa en un aceptor de fórmula 2, a la posición 3 de la N-acetil-glucosamina en un grupo N-acetil-lactosaminilo, preferiblemente terminal, en un aceptor de fórmula 1, 1a o 1b, o a la posición 4 de la N-acetil-glucosamina en un grupo lacto-N-biosilo, preferiblemente terminal, en un aceptor de fórmula 1, 1a o 1b, en el que los compuestos de fórmulas 1 y 2 son los siguientes:



30 en los que R₁ es fucosilo o H,

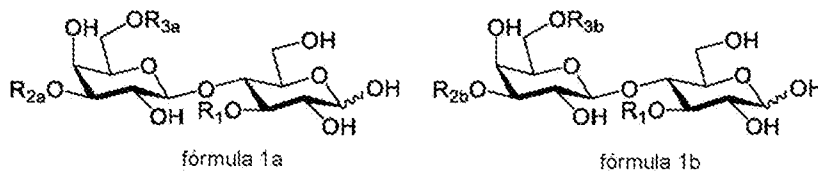
35 R₂ se selecciona de grupos N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo, en el que el grupo N-acetil-lactosaminilo puede portar un resto de glicosilo que comprende uno o más grupos N-acetil-lactosaminilo y/o uno o más grupos lacto-N-biosilo; cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo puede estar sustituido con uno o más restos de sialilo y/o fucosilo,

40 R₃ es H o un grupo N-acetil-lactosaminilo opcionalmente sustituido con un resto de glicosilo que comprende uno o más grupos N-acetil-lactosaminilo y/o uno o más grupos lacto-N-biosilo; cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo puede estar sustituido con uno o más restos de sialilo y/o fucosilo, y

cada R₄ independientemente es sialilo o H,

45 con la condición de que al menos uno de R₁ o R₄ no sea H;

y los compuestos de fórmulas 1a y 1b son los siguientes:



50 en los que R₁ es como se define anteriormente,

55 R_{2a} es un grupo N-acetil-lactosaminilo opcionalmente sustituido con un resto de glicosilo que comprende uno o más grupos N-acetil-lactosaminilo y/o uno o más grupos lacto-N-biosilo; cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo puede estar sustituido con uno o más restos de sialilo y/o fucosilo, pero preferiblemente está desprovisto de un resto de sialilo y/o fucosilo,

R_{3a} es H o un grupo N-acetil-lactosaminilo opcionalmente sustituido con un grupo lacto-N-biosilo; cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo puede estar sustituido con uno o más restos de sialilo y/o fucosilo, pero preferiblemente está desprovisto de un resto de sialilo y/o fucosilo,

R_{2b} es un grupo lacto-N-biosilo opcionalmente sustituido con un resto de sialilo y/o fucosilo, pero preferiblemente está desprovisto de un resto de sialilo y/o fucosilo, y

R_{3b} es H o un grupo N-acetil-lactosaminilo opcionalmente sustituido con uno o dos grupos N-acetil-lactosaminilo y/o un grupo lacto-N-biosilo; cualquier grupo N-acetil-lactosaminilo y lacto-N-biosilo puede estar sustituido con uno o más restos de sialilo y/o fucosilo, pero preferiblemente está sin un resto de sialilo y/o fucosilo.

Preferiblemente, los compuestos de fórmulas 1a y 1b tienen uno o más de los siguientes enlaces y modificaciones:

- el grupo N-acetil-lactosaminilo en el resto de glicosilo de R_{2a} en la fórmula 1a está unido al otro grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglucosídico 1-3,
- el grupo lacto-N-biosilo en el resto de glicosilo de R_{2a} en la fórmula 1a está unido al grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglucosídico 1-3,
- el grupo lacto-N-biosilo en el resto de glicosilo de R_{3a} en la fórmula 1a está unido al grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglucosídico 1-3,
- el grupo N-acetil-lactosaminilo en el resto de glicosilo de R_{3b} en la fórmula 1b está unido a otro grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglucosídico 1-3 o 1-6, y
- el grupo lacto-N-biosilo en el resto de glicosilo de R_{3b} en la fórmula 1b está unido al grupo N-acetil-lactosaminilo mediante un enlace interglucosídico 1-3.

La α 2,3-transialidasa usada en los procedimientos de esta invención es preferiblemente α 2,3-transialidasa (TcTS) de *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, se pueden usar las α 2,3-transialidasas de otros microorganismos, tales como *T. rangeli*, *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*, *T. brucei brucei*, *T. congolense* y *Corynebacterium diphtheriae*, como se describe en el documento WO 2012/156898, así como las α 2,3-transialidasas de *Salmonella typhimurium*, *Bacteroides fragilis*, el virus de la enfermedad de Newcastle y *Vibrio cholerae*. Además, también se pueden usar otras α 2,3-transialidasas que tengan al menos 60 %, preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 80 %, en particular al menos 90 %, de identidad con la α 2,3-transialidasa de *T. cruzi*.

Preferiblemente, la actividad de transialidasa de la α 2,3-transialidasa es mayor que su actividad hidrolítica. En el transcurso de la reacción de 3'-SL + 3-FL



FSL + Lac o 3'-SL + LNT



LST-a + Lac, la hidrólisis de FSL o LST-a puede volverse significativa en un momento determinado, debido al aumento de la concentración de FSL o LST-a, que entonces se degrada a 3-FL o LNT, respectivamente, y ácido siálico. Para preparar las mezclas de HMO de la invención, la reacción debe detenerse antes de que se produzca una hidrólisis significativa del producto. Este momento puede determinarse fácilmente mediante medidas cinéticas enzimáticas bien conocidas.

Las α 2,3-transialidasas para obtener las mezclas de HMO de esta invención se seleccionan preferiblemente de las α 2,3-transialidasas que carecen de actividad hidrolítica, o al menos tienen una actividad hidrolítica significativamente reducida. Tales enzimas se pueden obtener alterando la secuencia de aminoácidos de una α 2,3-transialidasa principalmente de tipo salvaje en una o más posiciones de aminoácidos, de modo que la secuencia de aminoácidos mutada dé como resultado una actividad de transialidasa mejorada y/o una actividad hidrolítica reducida.

Al llevar a cabo el procedimiento de esta invención, las concentraciones relativas particulares del dador de 3'-SL, del aceptor de 3-FL o LNT, de la α 2,3-transialidasa, del disolvente acuoso y del amortiguador de incubación (por ejemplo, Na₃PO₄ 50 mM o KHPO₄ 100 mM) no son críticos. A este respecto, el procedimiento se puede llevar a cabo adecuadamente a temperatura ambiente (por ejemplo, 15-50, preferiblemente 20-37°C) a un pH de 6-8, preferiblemente 6,5-7, durante 15 minutos a 24 horas.

En una realización preferida, cualquiera de las mezclas de HMO de la invención se produce mediante un microorganismo modificado genéticamente para expresar una α 2,3-transsialidasa como se describe anteriormente. Los métodos de modificaciones genéticas de microorganismos para la producción recombinante de moléculas biológicamente activas, y la manipulación molecular de moléculas enzimáticas, son bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Green MR & Sambrook J: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4^a ed, 2012, CSHL PRESS.

2. Uso de las mezclas de HMO de la invención

Sorprendentemente, las mezclas de HMO que contienen 3'-SL, un componente A que es 3-FL o LNT, y un componente B que es FSL cuando el componente A es 3-FL, o LST-a cuando el componente A es LNT, como cualquiera de las descritas aquí, son composiciones antiinfecciosas, y por lo tanto se pueden usar ventajosamente para tratar infecciones bacterianas. Preferiblemente, la composición antiinfecciosa comprende una mezcla de HMO que consiste esencialmente en 3'-SL, un componente A que es 3-FL o LNT, y un componente B que es FSL cuando el componente A es 3-FL, o LST-a cuando el componente A es LNT. También preferiblemente, la composición antiinfecciosa comprende una mezcla de HMO que consiste esencialmente en 3'-SL, un componente A que es 3-FL o LNT, un componente B que es FSL cuando el componente A es 3-FL, o LST-a cuando el componente A es LNT, y lactosa.

Por consiguiente, en una realización, las composiciones antiinfecciosas de esta invención pueden ser composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden contener además un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo disolución salina amortiguada con fosfato, mezclas de etanol en agua, agua, y emulsiones tales como una emulsión aceite/agua o agua/aceite, así como diversos agentes humectantes o excipientes. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden contener otros materiales que no produzcan una reacción adversa, alérgica o no deseada de otro modo cuando se administran a un paciente. Los vehículos y otros materiales pueden incluir disolventes, dispersantes, revestimientos, agentes promotores de la absorción, agentes de liberación controlada, y uno o más excipientes inertes, tales como almidones, polioles, agentes granulantes, celulosa microcristalina, diluyentes, lubricantes, aglutinantes, y agentes disgregantes. Si se desea, las dosis de comprimidos de las composiciones antiinfecciosas pueden revestirse mediante técnicas acuosas o no acuosas estándar.

En otra realización, las composiciones antiinfecciosas de esta invención pueden ser composiciones nutricionales. Por ejemplo, una composición nutricional de la invención se puede formular como una disolución de rehidratación, o un mantenimiento o suplemento dietético para personas de edad avanzada o personas inmunocomprometidas. En tales composiciones nutricionales, también se pueden incluir macronutrientes tales como grasas comestibles, hidratos de carbono y proteínas. Las grasas comestibles incluyen, por ejemplo, aceite de coco, aceite de soja, y monoglicéridos y diglicéridos. Los hidratos de carbono incluyen, por ejemplo, glucosa, lactosa comestible, y almidón de maíz hidrolizado. Las proteínas incluyen, por ejemplo, proteína de soja, suero, y leche desnatada. También se pueden incluir en tales composiciones nutricionales, vitaminas y minerales (por ejemplo, calcio, fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, selenio, yodo, y vitaminas A, E, D, C, y complejo B).

Las composiciones antiinfecciosas de esta invención se pueden administrar por vía oral, por ejemplo como un comprimido, cápsula o pelete que contiene una cantidad predeterminada de la primera o segunda mezcla, o como un polvo o gránulos que contienen una concentración predeterminada de la primera o segunda 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 primera o segunda mezcla. 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, se pueden revestir opcionalmente, y se pueden formular para proporcionar una liberación sostenida, retardada o controlada de la primera o segunda mezcla que contienen.

Las composiciones antiinfecciosas de esta invención, ventajosamente una composición farmacéutica, también se pueden administrar mediante supositorio rectal, tubo de aerosol, tubo nasogástrico, o infusión directa en el tubo gastrointestinal o el estómago.

Las composiciones farmacéuticas antiinfecciosas de esta invención pueden comprender adicionalmente otros agentes terapéuticos tales como agentes antivirales, antibióticos, probióticos, analgésicos, y agentes antiinflamatorios.

La dosificación adecuada de las composiciones antiinfecciosas para un paciente se puede determinar de manera convencional, basándose en factores tales como el estado inmunológico, el peso corporal y la edad del paciente. En algunos casos, la dosis estará en una concentración similar a la encontrada para 3'-SL, 3-FL y/o FSL, o 3'-SL, LNT y/o LST-a, en la leche materna humana. La cantidad requerida generalmente estaría en el intervalo de alrededor de 200 mg a alrededor de 20 g por día, en ciertas realizaciones de alrededor de 300 mg a alrededor de 15 g por día, de alrededor de 400 mg a alrededor de 10 g por día, en ciertas realizaciones de alrededor de 500 mg a alrededor de 10 g por día, en ciertas realizaciones de alrededor de 1 g a alrededor de 10 g por día. Los regímenes de dosis apropiados pueden determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

"Humano no lactante", "individuo no lactante" o "no lactante" significa preferiblemente un ser humano de 3 años de edad y mayor. Un ser humano no lactante puede ser un niño, un adolescente, un adulto, o un anciano.

En esta memoria descriptiva, a menos que se indique expresamente lo contrario, la palabra 'o' se usa en el sentido de un operador que devuelve un valor verdadero cuando se cumple una o ambas de las condiciones establecidas, a diferencia del operador 'exclusivo o', que requiere que sólo se cumpla una de las condiciones. La palabra "que comprende" se usa en el sentido de "que incluye" en lugar de "que consiste en".

En los ejemplos siguientes, se usó la α 2,3-transialidasa de *T. cruzi* (TcTS) para obtener mezclas de esta invención.

Ejemplo 1

3'-SL + 3-FL



FSL + Lac

La prueba se realizó en amortiguador de Gibco PBS 1-X (pH = 7,5, 25°C, 200 μ l), extracto enzimático = 0,05 mg/ml. Condiciones de HPLC: Se usó TSK Gel amide 80 (Tosoh, 3 μ m, 150 x 4,6 mm) con un caudal de 1,1 ml/min usando 70 % de acetonitrilo y 30 % de formiato de amonio (8 mM). La elución de sustratos y productos se detectó mediante CAD y/o detección UV a 195 nm.

Las tablas siguientes muestran la composición de las mezclas obtenidas. La lactosa es equimolar a FSL.

Relación 3'-SL/3-FL: 3/4

tiempo (horas)	Conversión de FSL	3'-SL (% en moles)	3-FL (% en moles)	FSL (% en moles)
1.5	12 %	38 %	52 %	5 %
2.5	18 %	35 %	49 %	8 %
5	25 %	32 %	46 %	11 %
21	36 %	27 %	42 %	15 %

Relación 3'-SL/3-FL: 1/2

tiempo (horas)	Conversión de FSL	3'-SL (% en moles)	3-FL (% en moles)	FSL (% en moles)
21	23 %	26 %	59 %	8 %

Ejemplo 2

3'-SL + 3-FL



FSL + Lac

La prueba se realizó en amortiguador de Gibco PBS 1-X (pH = 7,5, 25°C, 200 μ l), extracto enzimático = 1 mg/ml. Condiciones de HPLC: Se usó TSK Gel amide 80 (Tosoh, 3 μ m, 150 x 4,6 mm) con un caudal de 1,1 ml/min usando 70 % de acetonitrilo y 30 % de formiato de amonio (8 mM). La elución de sustratos y productos se detectó mediante CAD y/o detección UV a 195 nm.

Las tablas siguientes muestran la composición de las mezclas obtenidas. La lactosa es equimolar a FSL.

Relación 3'-SL/3-FL: 1/1

tiempo (horas)	Conversión de FSL	3'-SL (% en moles)	3-FL (% en moles)	FSL (% en moles)
0,25	9 %	46 %	45 %	5 %
0,50	13 %	44 %	44 %	6 %
0,75	16 %	48 %	39 %	7 %

ES 2 971 093 T3

tiempo (horas)	Conversión de FSL	3'-SL (% en moles)	3-FL (% en moles)	FSL (% en moles)
1,00	17 %	42 %	41 %	9 %
1,67	23 %	39 %	39 %	12 %
2,67	28 %	36 %	38 %	15 %
4,5	34 %	32 %	35 %	18 %
6	39 %	31 %	33 %	21 %
9	40 %	28 %	31 %	21 %

Relación 3'-SL/3-FL: 2/1

tiempo (horas)	Conversión de FSL	3'-SL (% en moles)	3-FL (% en moles)	FSL (% en moles)
0,25	10 %	60 %	31 %	4 %
0,50	16 %	59 %	29 %	5 %
0,75	21 %	57 %	28 %	7 %
1,00	22 %	57 %	28 %	8 %
1,67	28 %	53 %	26 %	10 %
2,67	35 %	50 %	24 %	13 %
4,5	41 %	48 %	22 %	15 %
6	47 %	46 %	21 %	18 %
9	51 %	39 %	20 %	21 %

5

Relación 3'-SL/3-FL: 3/1

tiempo (horas)	Conversión de FSL	3'-SL (% en moles)	3-FL (% en moles)	FSL (% en moles)
0,25	11 %	68 %	24 %	3 %
0,50	18 %	67 %	22 %	5 %
0,75	22 %	65 %	22 %	6 %
1,00	24 %	67 %	21 %	7 %
1,67	32 %	61 %	20 %	9 %
2,67	39 %	59 %	18 %	12 %
4,5	45 %	56 %	16 %	13 %
6	51 %	54 %	15 %	16 %
9	53 %	47 %	16 %	17 %

Relación 3'-SL/3-FL: 1/2

tiempo (horas)	Conversión de FSL	3'-SL (% en moles)	3-FL (% en moles)	FSL (% en moles)
0,25	17 %	30 %	59 %	6 %
0,50	24 %	27 %	57 %	9 %
0,75	27 %	26 %	56 %	9 %
1,00	32 %	25 %	55 %	11 %
1,67	41 %	21 %	52 %	14 %
2,67	48 %	18 %	49 %	17 %
4,5	59 %	14 %	49 %	19 %

ES 2 971 093 T3

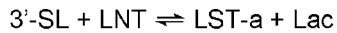
tiempo (horas)	Conversión de FSL	3'-SL (% en moles)	3-FL (% en moles)	FSL (% en moles)
6	64 %	13 %	46 %	23 %
9	73 %	9 %	40 %	24 %

Relación 3'-SL/3-FL: 1/3

tiempo (horas)	Conversión de FSL	3'-SL (% en moles)	3-FL (% en moles)	FSL (% en moles)
0,25	25 %	20 %	67 %	7 %
0,50	33 %	18 %	67 %	9 %
0,75	41 %	16 %	63 %	11 %
1,00	45 %	15 %	63 %	12 %
1,67	58 %	11 %	61 %	15 %
2,67	68 %	8 %	58 %	17 %
4,5	78 %	6 %	55 %	20 %
6	80 %	6 %	54 %	22 %
9	84 %	4 %	54 %	20 %

5

Ejemplo 3



10 La prueba se realizó en amortiguador de Gibco PBS 1-X (pH = 7,5, 25°C, 200 µl), extracto enzimático = 0,05 mg/ml. Condiciones de HPLC: Se usó TSK Gel amide 80 (Tosoh, 3 µm, 150 x 4,6 mm) con un caudal de 1,1 ml/min usando 70 % de acetonitrilo y 30 % de formiato de amonio. La elución de sustratos y productos se detectó mediante CAD y/o detección UV a 195 nm.

15 Las tablas siguientes muestran la composición de las mezclas obtenidas. La lactosa es equimolar a LST-a.

Relación 3'-SL/LNT: 1/1

tiempo (horas)	Conversión de LST-a	3'-SL (% en moles)	LNT (% en moles)	LST-a (% en moles)
0	0	51 %	49 %	0 %
0,25	13 %	44 %	44 %	6 %
0,5	16 %	41 %	41 %	8 %
2	38 %	30 %	31 %	19 %
3	43 %	29 %	28 %	21 %
4	46 %	28 %	25 %	22 %
5	47 %	27 %	26 %	23 %
6	49 %	26 %	23 %	22 %

20 Relación 3'-SL/LNT: 2/1

tiempo (horas)	Conversión de LST-a	3'-SL (% en moles)	LNT (% en moles)	LST-a (% en moles)
0	0	68 %	32 %	0 %
0,25	21 %	59 %	26 %	7 %

ES 2 971 093 T3

tiempo (horas)	Conversión de LST-a	3'-SL (% en moles)	LNT (% en moles)	LST-a (% en moles)
0,5	27 %	58 %	24 %	9 %
2	53 %	51 %	15 %	16 %
3	58 %	48 %	13 %	19 %
4	65 %	47 %	11 %	20 %
5	67 %	46 %	11 %	22 %
6	66 %	48 %	9 %	17 %
7	64 %	47 %	10 %	18 %

Relación 3'-SL/LNT: 3/1

tiempo (horas)	Conversión de LST-a	3'-SL (% en moles)	LNT (% en moles)	LST-a (% en moles)
0	0	73 %	27 %	0 %
0,25	23 %	66 %	20 %	6 %
0,5	34 %	63 %	17 %	9 %
2	60 %	58 %	10 %	15 %
3	66 %	56 %	9 %	17 %
4	70 %	56 %	7 %	16 %
5	66 %	54 %	8 %	15 %
6	77 %	56 %	5 %	17 %
24	73 %	53 %	7 %	19 %

5

Relación 3'-SL/LNT: 1/2

tiempo (horas)	Conversión de LST-a	3'-SL (% en moles)	LNT (% en moles)	LST-a (% en moles)
0	0 %	31 %	69 %	0 %
0,25	23 %	24 %	61 %	7 %
0,5	33 %	20 %	59 %	10 %
2	62 %	11 %	49 %	19 %
3	67 %	10 %	48 %	21 %
4	68 %	10 %	47 %	22 %
5	66 %	10 %	47 %	20 %
6	63 %	10 %	46 %	16 %
7	64 %	11 %	44 %	19 %

Relación 3'-SL/LNT: 1/3

tiempo (horas)	Conversión de LST-a	3'-SL (% en moles)	LNT (% en moles)	LST-a (% en moles)
0	0 %	41 %	59 %	0 %

tiempo (horas)	Conversión de LST-a	3'-SL (% en moles)	LNT (% en moles)	LST-a (% en moles)
0,25	24 %	22 %	61 %	7 %
0,5	40 %	18 %	56 %	12 %
2	72 %	9 %	45 %	22 %
3	73 %	7 %	53 %	19 %
4	71 %	7 %	56 %	17 %
5	71 %	5 %	63 %	13 %
6	73 %	7 %	46 %	19 %
7	70 %	9 %	46 %	20 %

Ejemplo 4

5 Se recluta un total de 30 pacientes masculinos y femeninos para participar en el estudio. Después de una visita de selección y un período de preinclusión de 1-2 semanas, los pacientes se seleccionan y se asignan al azar en tres grupos, cada uno de 10 pacientes. A dos grupos se les administra un producto de tratamiento que contiene 5 gramos de una combinación de 3-FL, 3'-SL y FSL, y 3'-SL, LNT y LST-a, respectivamente, y a un grupo el producto de placebo (2 gramos de glucosa), durante 8 semanas. Los productos y el placebo están en forma de polvo en un recipiente de dosificación unitaria.

10 Los pacientes son elegibles para participar si tienen al menos 18 años de edad. Todos los pacientes reclutados son capaces y están dispuestos a comprender y cumplir con los procedimientos del estudio. Se excluyen los pacientes si: han participado en un estudio clínico un mes antes de la visita de selección; tienen resultados anormales en las pruebas de detección que son clínicamente relevantes para la participación en el estudio; padecen una enfermedad grave tal como cáncer, diabetes, enfermedad coronaria grave, nefropatía, enfermedad neurológica, o enfermedad psiquiátrica grave, o cualquier afección que pueda confundir los resultados del estudio; usó suplementos probióticos en dosis altas (se permite yogur) durante 3 meses antes del estudio; consumió antibióticos 3 meses antes del estudio; consumió regularmente cualquier medicamento que pudiera interferir con la evaluación de los síntomas 2 semanas antes del estudio; y embarazadas o lactantes.

15 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 pacientes que mantengan sus muestras en el congelador hasta la próxima visita.

25 En la segunda visita, se verifican los criterios de elegibilidad, y los sujetos elegibles se asignan al azar a los tres brazos del ensayo. Se recolectan las muestras fecales, y se distribuyen equipos para nuevas muestras. Los pacientes están familiarizados con un sistema interactivo habilitado para Internet que registra datos diariamente, y reciben 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. Las muestras fecales se someten a un análisis de secuenciación de ARN 16 S.

30 El estudio dura 8 semanas, consumiendo los pacientes un placebo o un producto de tratamiento diariamente. Se indica a los pacientes que consuman los productos por la mañana con el desayuno. El cumplimiento se monitoriza a través del sistema interactivo habilitado para Internet. Los pacientes también usan el sistema para registrar:

- 35 • Información de la Escala de la Forma de Heces de Bristol (BSF),
- 40 • información de síntomas tales como dolor abdominal, malestar abdominal, calambres abdominales, hinchazón abdominal, y distensión abdominal,
- información adicional sobre la Escala de Calificación de Síntomas Gastrointestinales (GSRS).

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

Al finalizar el estudio, cada paciente tiene una visita de salida con el equipo médico. Las muestras fecales y de sangre se recogen y analizan como antes.

El análisis de heces indica que los pacientes en tratamiento tienen una mayor abundancia de *Bifidobacterium* y *Barnesiella*.

Ejemplo 5

5 Se alojan individualmente treinta ratones hembra C57BL/6J de 7 semanas para evitar la contaminación entre ratones, y se les proporciona agua y alimento irradiados. Los ratones se separan en 3 grupos de 10 ratones, 2 grupos de tratamiento y un grupo de placebo.

10 Los ratones se tratan con ampicilina (0,5 g/litro) en el agua de bebida, que se cambia cada 3 días. Después de 1 semana, se finaliza la adición de ampicilina al agua de bebida. Después, se añaden 3-FL, 3'-SL y FSL, y 3'-SL, LNT y LST-a al agua de bebida de los grupos de tratamiento, respectivamente, en una concentración total de 40 mg/ml. El grupo de control recibe agua corriente. Se administra agua reciente diariamente, y todos los ratones tienen libre acceso al agua de bebida. Los ratones se alimentan con comida para roedores, y se les da comida reciente diariamente.

15 Dos días después de la finalización del tratamiento con ampicilina, los ratones de cada grupo se infectan mediante sonda oral con una cepa de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VRE). Los niveles de VRE se determinan en diferentes momentos sembrando diluciones seriadas de peletes fecales en placas de agar Enterococcosel con vancomicina. Las colonias de VRE se identifican por su aspecto, y se confirman mediante tinción de Gram. La PCR del gen *vanA*, que confiere resistencia a la vancomicina, se usa para confirmar la presencia de VRE en ratones infectados.

20 Los ratones se controlan durante 2 semanas, y después se sacrifican. Se obtienen peletes de heces recientes antes de sacrificar a los ratones. Las muestras se congelan inmediatamente y se almacenan a -80°C. El ADN se extrae utilizando un kit de aislamiento de ADN PowerSoil de 96 pocillos (MO-BIO). 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 directo 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 conectados. 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 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 s, 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 %.

35 Los productos de la PCR anidada se normalizan usando el kit de placas de normalización SequalPrep, 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).

40 En los ratones tratados con HMO, la colonización de VRE se reduce a niveles indetectables en 14 días. La densidad de VRE se reduce en 5 días. Los ratones no tratados continúan albergando grandes cantidades de VRE en el colon. Los grupos de tratamiento de ratones también muestran una mayor abundancia de *Porphyromonadaceae*, especialmente *Barnesiella*.

REIVINDICACIONES

1. Mezcla de oligosacáridos de la leche humana (HMO) que consiste esencialmente en:
- 3'-O-sialilactosa (3'-SL),
 - un componente A que es 3-O-fucosilactosa (3-FL) o lacto-N-tetraosa (LNT), y
 - un componente B que es 3-O-fucosil-3'-O-sialilactosa (FSL) cuando el componente A es 3-FL, o sialilacto-N-tetraosa (LST-a) cuando el componente A es LNT.
2. La mezcla de la reivindicación 1, que consiste esencialmente en 3'-SL, 3-FL y FSL, preferiblemente en la que la relación molar de FSL con respecto a (3'-SL + 3-FL) es al menos 1:20, más preferiblemente al menos 1:12, más preferiblemente al menos 1:5, incluso más preferiblemente al menos 1:3; y/o en la que preferiblemente la relación molar de 3'-SL con respecto a 3-FL es 0,05-5,3, más preferiblemente 0,17-3, más preferiblemente alrededor de 1.
3. La mezcla de la reivindicación 1, que consiste esencialmente en 3'-SL, LNT y LST-a, preferiblemente en la que la relación molar de LST-a con respecto a (3'-SL + LNT) es al menos 1:10, más preferiblemente al menos 1:7, más preferiblemente al menos 1:5, incluso más preferiblemente al menos 1:3; y/o en la que preferiblemente la relación molar de 3'-SL con respecto a LNT es 0,05-11, más preferiblemente 0,13-7,7, y más preferiblemente alrededor de 1.
4. Una mezcla de HMO que consiste esencialmente en:
- 3'-SL,
 - un componente A que es 3-FL o LNT,
 - un componente B que es FSL cuando el componente A es 3-FL, o LST-a cuando el componente A es LNT, y
 - lactosa.
5. La mezcla de la reivindicación 4, que consiste esencialmente en 3'-SL, 3-FL, FSL y lactosa, preferiblemente en la que:
- la relación molar de (3'-SL + 3-FL) con respecto a FSL es 1-18, y
 - la relación molar de lactosa con respecto a FSL es alrededor de 1; y/o
- en la que preferiblemente una de las relaciones molares 3'-SL a FSL y 3-FL a FSL no es mayor que 3, y/o en la que preferiblemente la relación molar de 3'-SL a 3-FL es 0,05-5,3.
6. La mezcla de la reivindicación 4, que consiste esencialmente en 3'-SL, LNT, LST-a y lactosa.
7. La mezcla de la reivindicación 6, en la que:
- la relación molar de (3'-SL + LNT) con respecto a LST-a es 0,8-9,50, y
 - la relación molar de lactosa con respecto a LST-a es alrededor de 1, y/o
- en la que preferiblemente una de las relaciones molares 3'-SL a LST-a y LNT a LST-a no es mayor que 2, y/o en la que preferiblemente la relación molar de 3'-SL a LNT es 0,09-11.
8. Un procedimiento para obtener la mezcla de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas de hacer reaccionar 3'-SL, y un componente A que es 3-O-fucosilactosa (3-FL) o lacto-N-tetraosa (LNT), en presencia de una α 2,3-transsialidasa, para producir un medio de reacción, y después eliminar la lactosa y la α 2,3-transsialidasa del medio de reacción.
9. Un procedimiento para obtener la mezcla de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que comprende las etapas de hacer reaccionar 3'-SL, y un componente A que es 3-O-fucosilactosa (3-FL) o lacto-N-tetraosa (LNT), en presencia de una α 2,3-transsialidasa, para producir un medio de reacción, y después eliminar la α 2,3-transsialidasa del medio de reacción.
10. El procedimiento de la reivindicación 9 para obtener la mezcla de la reivindicación 5, que comprende la etapa de hacer reaccionar 3'-SL y 3-FL en una relación molar de 1:3 a 3:1, preferiblemente 1:2 a 2:1, más preferiblemente 1:1, en presencia de una α 2,3-transsialidasa que tiene una tasa de conversión de al menos 20 %, hasta alrededor de 90 %, preferiblemente al menos 30 %, más preferiblemente al menos 40 %, para la reacción de 3'-SL y 3-FL.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, que comprende la etapa de hacer reaccionar 3'-SL y 3-FL en una relación molar de 1:3 a 2:1, en presencia de una α 2,3-transsialidasa que tiene una tasa de conversión de al menos 20 %, hasta alrededor de 50 %, preferiblemente al menos 30 %, más preferiblemente al menos 40 %, para la reacción de 3'-SL y 3-FL.
12. El proceso según la reivindicación 10, que comprende la etapa de hacer reaccionar 3'-SL y 3-FL en una relación molar de 1:2 a 1:3, en presencia de una α 2,3-transsialidasa que tiene una tasa de conversión de 40-90 %, para la reacción de 3'-SL y 3-FL.

- 5 13. El procedimiento de la reivindicación 9 para obtener la mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, que comprende la etapa de hacer reaccionar 3'-SL y LNT en una relación molar de 1:5 a 5:1, preferiblemente 1:3 a 3:1, más preferiblemente 1:2 a 2:1, incluso más preferiblemente 1:1, en presencia de una α 2,3-transsialidasa que tiene una tasa de conversión de al menos 35 %, hasta alrededor de 80 %, preferiblemente al menos 40 %, más preferiblemente al menos el 50 %, para la reacción de 3'-SL y LNT.
- 10 14. El procedimiento según la reivindicación 13, que comprende la etapa de hacer reaccionar 3'-SL y LNT en una relación molar de 1:3 a 3:1, preferiblemente 1:2 a 2:1, más preferiblemente 1:1, en presencia de una α 2,3-transsialidasa que tiene una tasa de conversión de al menos 35 %, hasta alrededor de 80 %, preferiblemente al menos 40 %, más preferiblemente al menos 50 %, para la reacción de 3'-SL y LNT.
15. Una composición antiinfecciosa para uso en el tratamiento de infecciones bacterianas, preferiblemente en un individuo no lactante, que comprende la mezcla de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, preferiblemente la mezcla de la reivindicación 1.