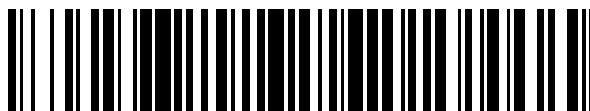


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 490 269**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/29** (2006.01)

**A61K 31/702** (2006.01)

**A61P 1/12** (2006.01)

**A23L 1/308** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2011 E 11720600 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2563166**

54 Título: **Uso de oligosacáridos de leche humana en la nutrición de bebés**

30 Prioridad:

**11.05.2010 EP 10162530**  
**27.04.2010 WO PCT/NL2010/050240**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.09.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STAHL, BERND**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 490 269 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

5 Uso de oligosacáridos de leche humana en la nutrición de bebés

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se encuentra en el campo de la nutrición para niños y bebés hecha a medida, dependiendo del grupo sanguíneo o tipo de sangre de la madre y del bebé.

Antecedentes de la invención

15 [0002] El sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis distingue los antígenos Lewis a y Lewis b (Le a y Le b) y Lewis x y Lewis y (Le x y Le y). La estructura central de Lewis x e y se construye de forma diferente en comparación con Lewis a y b, pero en cuanto a unidades de carbohidratos Le a corresponde a Le x y Le b corresponde a Le y. Estos antígenos son antígenos solubles que pueden estar presentes en los fluidos biológicos, incluyendo la leche humana. Hay tres fenotipos: Le(a-/b-), Le(a+/b-) y Le(a-/b+). La presencia de fucosiltransferasa convierte al antígeno Lewis a en Lewis b. La misma enzima también convierte Lewis x en Lewis y. Las personas con antígenos Lewis a son normalmente

20 no secretoras, y la presencia del antígeno Lewis b hace que una persona sea secretora. Lewis negativo (Le a-, Le b-) puede ser secretor o no secretor.

25 [0003] La base para la diferencia fenotípica entre las subpoblaciones secretoras y las no secretoras se deriva de los polimorfismos genéticos que dan como resultado la expresión de una alfa-1,2-fucosiltransferasa funcional específica en caso de los secretores, mientras que los no secretores no expresan esta alfa-1,2-fucosiltransferasa funcional. Por consiguiente, los antígenos del grupo 2-fucosilados solubles no se sintetizan y por lo tanto no se segregan en los fluidos biológicos de los no secretores. No obstante, sus epitelios y otras superficies puede contener estas estructuras que también sirven como puntos de adhesión para la microbiota, incluyendo patógenos. Así una madre no secretora carece de sustancias en su leche que pueden o no ser necesarias basadas en las estructuras receptoras respectivas del bebé

30 como receptor de la leche.

[0004] La WO 2009/033011 se refiere a un método de diagnóstico para identificar una persona que está en riesgo de padecer enterocolitis necrotizante y trastornos relacionados midiendo el nivel de antígenos secretores, en particular antígenos H y antígenos Lewis, en la saliva.

35

[0005] Hasta el momento, diferentes funciones biológicas de los oligosacáridos de la leche humana se han postulado. Los oligosacáridos de la leche humana se considera que protegen a los bebés amamantados de bacterias patógenas, virus, toxinas, protozoos y hongos al actuar como análogos receptores solubles que previenen la interacción de patógenos con células epiteliales en las etapas iniciales de las infecciones. Además, tales oligosacáridos pueden actuar como prebióticos, por lo tanto para promover el crecimiento de *Bifidobacterium bifidum* mientras se suprime así el crecimiento de bacterias indeseables.

40

[0006] Dependiendo del grupo sanguíneo, se producen variaciones y modelos diferentes de oligosacáridos en la leche humana (Thurl *et al.* 1997, Glycoconjugate J. 14:795-799). Hechos más detallados acerca de estos componentes importantes de la leche humana serán de ayuda para el desarrollo de mejores fórmulas de leche adaptada.

45

[0007] La WO 98/43494 se refiere al análisis de un gran número de muestras de leche humana para determinar los niveles medios apropiados de nueve oligosacáridos de leche importantes y para llegar a la preparación de una formulación infantil sintética o fabricada/artificial que contenga estos oligosacáridos cerca de los niveles de origen natural encontrados en la leche materna.

50

Resumen de la invención

55 [0008] Se acaba de descubrir que la nutrición infantil se puede adaptar de forma más adecuada tomando en cuenta el grupo sanguíneo del bebé. Los presentes inventores descubrieron que los bebés no secretores obtienen un beneficio limitado o ningún beneficio de su nutrición suplementada con oligosacáridos de leche humana para los que no hay análogos (epítomos) de superficie genéticamente basados expresados. Por otro lado, no obstante, los bebés secretores tienen los epítomos correspondientes en particular en sus secreciones. Es importante que la nutrición de estos bebés secretores contenga todos los homólogos solubles para estos receptores, en particular porque estos receptores están previstos, por ejemplo, por patógenos tales como *E. coli*. Así, si no están adecuadamente alimentados, los bebés secretores tienen un riesgo aumentado de infección bacteriana.

60

[0009] Además, las leches de tipo secretor ofrecen sustratos más específicos para la microbiota beneficiosa tales como bacterias de *bifidus* especializadas en la fermentación de estos compuestos de los epitelios y en solución.

65

[0010] Consecuentemente, la presente invención proporciona nutrición infantil individualizada o hecha a medida, específicamente con respecto al grupo sanguíneo del bebé y ventajosamente teniendo en cuenta el grupo sanguíneo de la madre.

5 Descripción detallada

[0011] Los bebés secretores se caracterizan por tener el grupo sanguíneo de Lewis Le(a-/b+) o Le(a-/b-), según el sistema de grupo sanguíneo de Lewis. En aras de la claridad, cabe señalar que los bebés secretores que tienen el grupo sanguíneo de Lewis Le(a-/b-) tienen la enzima secretora activa (FucT II).

10

[0012] En una forma de realización, los bebés secretores se caracterizan por tener grupo sanguíneo A, B o AB, según el sistema de grupo sanguíneo ABO.

15

[0013] Las madres no secretoras se caracterizan por el hecho de que tienen el grupo sanguíneo de Lewis Le(a+/b-) según el sistema de tipo de sangre de Lewis.

[0014] En una forma de realización, las madres no secretoras se caracterizan por el hecho de que tienen el grupo sanguíneo O del sistema de grupo sanguíneo ABO.

20

[0015] La presente invención se refiere así a un método para alimentar a un bebé que tiene: a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a-/b+) o Le(a-/b-), según el sistema de tipo de sangre de Lewis y/o b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x-/y+) o Le(x-/y-), según el sistema de tipo de sangre de Lewis, dicho método comprende la administración de una composición nutricional que incluye oligosacáridos 2-fucosilados.

25

[0016] En una forma de realización, la presente invención se refiere a un método para alimentar a un bebé que tiene el grupo sanguíneo A, B o AB, según el sistema de grupo sanguíneo ABO, dicho método comprende la administración de una composición nutricional que incluye oligosacáridos 2-fucosilados.

30

[0017] En otras palabras, la invención se refiere al uso de una composición que incluye oligosacáridos 2-fucosilados para la preparación de una composición nutricional para alimentar a un bebé, dicho bebé tiene: a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a-/b+) o Le(a-/b-), según el sistema de tipo de sangre de Lewis y/o b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x-/y+) o Le(x-/y-), según el sistema de tipo de sangre de Lewis.

35

[0018] En una forma de realización, la invención se refiere al uso de una composición que incluye oligosacáridos 2-fucosilados para la preparación de una composición nutricional para alimentar a un bebé, dicho bebé tiene un grupo sanguíneo A, B o AB, según el sistema de grupo sanguíneo ABO.

40

[0019] La composición nutricional puede ser una fórmula infantil completa como tal. En una forma de realización, la composición nutricional también puede ser un suplemento nutricional o puede ser una leche humana suplementada. En esta forma de realización, el suplemento nutricional comprende oligosacáridos 2-fucosilados o la leche humana está suplementada con una composición que incluye oligosacáridos 2-fucosilados. Según la presente invención, es especialmente ventajoso suplementar la leche humana de una madre no secretora.

45

[0020] En una forma de realización, la presente invención se refiere al uso de oligosacáridos 2-fucosilados para la preparación de un suplemento nutricional para suplementar leche humana para alimentar a un bebé que tiene: a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a-/b+) o Le(a-/b-), según el sistema de tipo de sangre de Lewis y/o b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x-/y+) o Le(x-/y-), según el sistema de tipo de sangre de Lewis.

50

[0021] En una forma de realización, la presente invención se refiere al uso de oligosacáridos 2-fucosilados para la preparación de un suplemento nutricional para suplementar leche humana para alimentar a un bebé que tiene grupo sanguíneo A, B o AB, según el sistema de grupo sanguíneo ABO.

55

[0022] Preferiblemente, la leche humana que necesita suplementación, o la leche humana que es suplementada, es la leche humana de una madre que tiene: a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a+/b-), según el sistema de tipo de sangre de Lewis y/o b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x+/y-), según el sistema de tipo de sangre de Lewis.

60

[0023] En una forma de realización, la leche humana que necesita suplementación, o la leche humana que es suplementada, es la leche humana de una madre que tiene grupo sanguíneo O, según el sistema de grupo sanguíneo ABO.

65

[0024] La invención también se refiere a un suplemento nutricional que incluye oligosacáridos 2-fucosilados para usar en la suplementación de una fórmula infantil o una leche humana para alimentar a un bebé, donde el bebé tiene: a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a-/b+) o Le(a-/b-), según el sistema de tipo de sangre de Lewis y/o b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x-/y+) o Le(x-/y-) según el sistema de tipo de sangre de Lewis. Preferiblemente, el suplemento nutricional es para suplementar leche humana de una madre que tiene: a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a+/b-), según el sistema de

determinación del grupo sanguíneo de Lewis y/o b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x+/y-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis.

5 [0025] En una forma de realización, la invención también se refiere a un suplemento nutricional que comprende oligosacáridos 2-fucosilados para su uso en la suplementación de una fórmula infantil o una leche humana para alimentar a un bebé, donde el bebé tiene el grupo sanguíneo A, B o AB, según el sistema de grupo sanguíneo ABO. Preferiblemente, el suplemento nutricional es para suplementar leche humana de una madre que tiene grupo sanguíneo O, según el sistema de grupo sanguíneo ABO.

10 [0026] La invención también se refiere a un método para preparar una composición nutricional que comprende leche de suplementación de una madre que tiene: a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a+/b-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis y/o b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x+/y-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis, con una composición que incluye oligosacáridos 2-fucosilados. Preferiblemente en este método, la composición nutricional es para un bebé que tiene: a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a- /b+) o Le(a-/b-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis y/o b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x-/y+) o Le(x-/y-) según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis.

20 [0027] En una forma de realización, la invención también se refiere a un método para preparar una composición nutricional que comprende leche de suplementación de una madre que tiene grupo sanguíneo O, según el sistema de grupo sanguíneo ABO, con una composición que incluye oligosacáridos 2-fucosilados. Preferiblemente en este método, la composición nutricional es para un bebé que tiene grupo sanguíneo A, B o AB, según el sistema de grupo sanguíneo ABO.

25 [0028] Preferiblemente, los oligosacáridos 2-fucosilados comprenden oligosacáridos alfa-1,2-fucosilo, preferiblemente 2'-fucosillactosa y/o lacto-N-fucopentaosa 1. 2'-Fucosillactosa se abrevia también como 2'-FL y pueden también estar representada por Fuc- $\alpha$ -(1 $\square$ 2)Gal- $\beta$ -(1 $\square$ 4)-Glc. Lacto-N-fucopentaosa I se abrevia también como LNFP I y pueden también ser representadas por Fuc- $\alpha$ -(1 $\square$ 2)Gal- $\beta$ -(1 $\square$ 3)-GlcNAc- $\beta$ -(1 $\square$ 3)-Gal- $\beta$ -(1 $\square$ 4)-Glc. Ambas sustancias están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Sigma-Aldrich. Alternativamente, se pueden aislar de leche humana, por ejemplo como se describe en Andersson & Donald, 1981, J Chromatogr. 211:170-1744, o producir por microorganismos genéticamente modificados, por ejemplo como se describe en Albermann *et al.*, 2001, Carbohydrate Res. 334:97-103.

35 [0029] Preferiblemente, la composición nutricional que se le da al bebé comprende de 100 mg a 2 g de oligosacáridos 2-fucosilados por 100 ml, más preferiblemente de 150 mg a 1,8 g, incluso más preferiblemente de 200 mg a 1,5 g, incluso más preferiblemente de 400 mg a 1 g, incluso más preferiblemente de 500 mg a 1 g de oligosacáridos 2-fucosilados por 100 ml. Basada en el peso en seco, la composición preferiblemente comprende de 0,6% en peso a 15% en peso de oligosacáridos 2-fucosilados, más preferiblemente de 1% en peso a 12% en peso, incluso más preferiblemente de 1,3% en peso a 10% en peso, incluso más preferiblemente de 2,5% en peso a 6,5% en peso, incluso más preferiblemente de 3,3% en peso a 6,5% en peso. Una cantidad inferior de oligosacáridos 2-fucosilados será menos eficaz en la prevención de infecciones por patógenos, mientras que una cantidad demasiado alta supondrá altos costes innecesarios del producto.

40 [0030] El suplemento nutricional preferiblemente comprende al menos 10% en peso de oligosacáridos 2-fucosilados basados en peso en seco del suplemento. No se necesitan otros compuestos, pero podrían estar permitidos. En un suplemento nutricional, los oligosacáridos 2-fucosilados se mezclan preferiblemente con un portador inerte o agente de carga, por ejemplo maltodextrina. Preferiblemente, el suplemento nutricional comprende de 10% en peso a 90% en peso de oligosacáridos 2-fucosilados, preferiblemente de 15% en peso a 80% en peso, preferiblemente de 25% en peso a 75% en peso, preferiblemente de 30% en peso a 65% en peso, preferiblemente de 40% en peso a 55% en peso. Preferiblemente el suplemento nutricional es en forma de polvo. Preferiblemente tal cantidad del suplemento nutricional en polvo se añade a la leche humana para llegar a una leche humana suplementada que contenga de 100 mg a 2 g de oligosacáridos 2-fucosilados por 100 ml, más preferiblemente de 150 mg a 1,8 g, incluso más preferiblemente de 200 mg a 1,5 g, incluso más preferiblemente de 400 mg a 1 g, incluso más preferiblemente de 500 mg a 1 g de oligosacáridos 2-fucosilados por 100 ml. Por ejemplo, el suplemento nutricional se envasa en un sobre, preferiblemente de aproximadamente 2 g por sobre. Preferiblemente 1, 2, 3 o 4 sobres se agregan por 100 ml de leche materna.

55 Oligosacáridos no digeribles diferentes de los oligosacáridos 2-fucosilados

[0031] La composición nutricional preferiblemente comprende oligosacáridos no digeribles (NDO) diferentes de los oligosacáridos 2-fucosilados. Preferiblemente los NDO diferentes de los oligosacáridos 2-fucosilados estimulan el crecimiento de las bifidobacterias y/o los lactobacilos, más preferiblemente de las bifidobacterias. Un contenido aumentado de bifidobacterias y/o lactobacilos estimula la formación de una microbiota intestinal saludable. Los NDO preferiblemente no son digeridos o son sólo parcialmente digeridos en el intestino por la acción de los ácidos o enzimas digestivos presentes en el tracto digestivo superior humano, en particular en el intestino delgado y estómago, y son principalmente fermentados por la microbiota intestinal humana. Por ejemplo, sacarosa, lactosa, maltosa y las maltodextrinas comunes son consideradas digeribles.

65

[0032] Preferiblemente, la presente composición comprende oligosacáridos no digeribles con un DP en el rango de 2 a 250, más preferiblemente de 2 a 60. El oligosacárido no digerible es preferiblemente al menos uno, más preferiblemente al menos dos, preferiblemente al menos tres seleccionados del grupo que consiste en fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, arabino-oligosacáridos, arabinogalacto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, chito-oligosacáridos, glucomanno-oligosacáridos, galactomanno-oligosacáridos, manano-oligosacáridos, ácido siálico que comprende oligosacáridos y oligosacáridos de ácido urónico. El grupo de fructo-oligosacáridos incluye inulinas, el grupo de galacto-oligosacáridos incluye transgalacto-oligosacáridos o beta-galacto-oligosacáridos, el grupo de gluco-oligosacáridos incluye ciclodextrinas, gentio- y nigero-oligosacáridos y polidextrosa no digerible, el grupo de galactomanno-oligosacáridos incluye goma guar parcialmente hidrolizada, y el grupo de oligosacáridos de ácido urónico incluye oligosacáridos de ácido galacturónico y productos de degradación de pectina.

[0033] Más preferiblemente, la presente composición comprende al menos uno, más preferiblemente al menos dos, de la forma más preferible tres seleccionados del grupo que consiste en fructo-oligosacáridos, beta-galacto-oligosacáridos y oligosacáridos de ácido urónico. Más preferiblemente la composición comprende beta-galacto-oligosacáridos.

[0034] En una forma de realización preferida la composición comprende una mezcla de inulina y fructo-oligosacáridos de cadena corta. En una forma de realización preferida, la composición comprende una mezcla de galacto-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos seleccionada del grupo que consiste en fructo-oligosacáridos de cadena corta e inulina, más preferiblemente inulina. Una mezcla de al menos dos oligosacáridos no digeribles diferentes estimula ventajosamente las bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal en mayor medida. Preferiblemente, la proporción en peso en una mezcla de los dos oligosacáridos no digeribles diferentes, preferiblemente galacto-oligosacáridos y fructo-oligosacárido, es de entre 25 y 0,05, más preferiblemente entre 20 y 1. Galacto-oligosacáridos, preferiblemente beta-galacto-oligosacáridos, son más capaces de estimular las bifidobacterias. Preferiblemente, la presente composición comprende galacto-oligosacáridos, preferiblemente beta-galacto-oligosacáridos, con un grado de polimerización (DP) de 2 a 10 y/o fructo-oligosacáridos con un DP de 2 a 60.

[0035] Los galacto-oligosacáridos preferiblemente son beta-galacto-oligosacáridos. En una forma de realización particularmente preferida, la presente composición comprende beta-galacto-oligosacáridos ([galactosa]<sub>n</sub>-glucosa; donde n es un número entero que varía de 2 a 60, es decir 2, 3, 4, 5, 6..., 59, 60; preferiblemente n se selecciona de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10), donde las unidades de galactosa están en su mayoría enlazadas entre sí a través de una conexión beta. A los beta-galacto-oligosacáridos también se los denomina trans-galacto-oligosacáridos (TOS). Los beta-galacto-oligosacáridos se venden, por ejemplo, bajo la marca registrada Vivinal<sup>™</sup> (Borculo Domo Ingredients, Países Bajos). Otra fuente adecuada es Bi2Munno (Classado). Preferiblemente, los TOS comprenden al menos 80% de enlaces beta-1,4 y beta-1,6 basados en enlaces totales, más preferiblemente al menos 90%.

[0036] El fructo-oligosacárido es un NDO que comprende una cadena de unidades de fructosa beta-enlazadas con un DP o DP medio de 2 a 250, más preferiblemente de 2 a 100, incluso más preferiblemente de 10 a 60. Los fructo-oligosacáridos incluyen inulina, levano y/o un tipo mezclado de polifrufructano. Un fructo-oligosacárido especialmente preferido es inulina. Fructo-oligosacárido adecuado para su uso en las composiciones está también disponible comercialmente, por ejemplo, de Raffiline®HP (Orafti). Preferiblemente, el fructo-oligosacárido tiene un DP medio por encima de 20.

[0037] Los oligosacáridos de ácido urónico se obtienen preferiblemente de productos de degradación de pectina. Por lo tanto, la presente composición preferiblemente comprende un producto de degradación de pectina con un DP de 2 a 100. Preferiblemente, el producto de degradación de pectina se obtiene a partir de pectina de manzana, pectina de remolacha y/o pectina cítrica. Preferiblemente, el oligosacárido de ácido urónico es un oligosacárido de ácido galacturónico. Preferiblemente, la composición comprende FL y uno del grupo seleccionado de galacto-oligosacárido y oligosacárido de ácido urónico.

[0038] Además de los oligosacáridos 2-fucosilados, de la forma más preferible, la composición comprende beta-galacto-oligosacárido, fructo-oligosacárido y un oligosacárido de ácido urónico. Se ha observado que tal combinación actúa sinérgicamente con fucosilactosa, en particular 2'-fucosilactosa. La proporción en peso de beta-galacto-oligosacárido: fructo-oligosacárido: oligosacárido de ácido urónico es preferiblemente (20 a 2):1:(1 a 20), más preferiblemente (20 a 2):1:(1 a 10), incluso más preferiblemente (20 a 2):1:(1 a 3), incluso más preferiblemente (12 a 7):1:(1 a 2). De la forma más preferible la proporción en peso es de aproximadamente 9:1:1,1.

[0039] Preferiblemente, la composición nutricional comprende de 200 mg a 4 g de oligosacáridos no digeribles, incluyendo oligosacáridos 2-fucosilados, por 100 ml, más preferiblemente de 400 mg a 3,5 g, incluso más preferiblemente de 500 mg a 3 g, incluso más preferiblemente de 800 mg a 2,5 g, incluso más preferiblemente de 1 g a 2 g de oligosacáridos no digeribles por 100 ml. Basada en el peso en seco, la composición preferiblemente comprende de 1% en peso a 25% en peso de oligosacáridos no digeribles, incluyendo oligosacáridos 2-fucosilados, más preferiblemente de 2,5% en peso a 20% en peso, incluso más preferiblemente de 3,3% en peso a 18% en peso, incluso más preferiblemente de 5% en peso a 15% en peso, incluso más preferiblemente de 6,5% en peso a 13% en peso. Una cantidad inferior de oligosacáridos no digeribles será menos eficaz en la estimulación de las bacterias beneficiosas en la microbiota, mientras que una cantidad demasiado alta provocará efectos secundarios de hinchazón y molestias abdominales.

## Composición nutricional

- 5 [0040] La composición nutricional de la presente invención no es leche humana. La presente composición nutricional se administra preferiblemente de forma enteral, más preferiblemente por vía oral.
- 10 [0041] La presente composición nutricional es preferiblemente una fórmula para bebés o una fórmula para niños, preferiblemente para su administración desde el nacimiento hasta los 6 años, más preferiblemente desde el nacimiento hasta los 36 meses de edad. La presente composición nutricional se puede aplicar ventajosamente como una nutrición completa para bebés. La presente composición comprende preferiblemente un componente lipídico, componente de proteína y componente de carbohidrato y se administra preferiblemente en forma líquida. La presente invención incluye alimento seco, preferiblemente un polvo, que se acompaña con instrucciones para mezclar dicha mezcla de alimento seco con un líquido adecuado, preferiblemente con agua.
- 15 [0042] La presente composición nutricional preferiblemente comprende lípido, proteína y carbohidrato digerible, donde el componente lipídico proporciona de 5 a 50% de las calorías totales, el componente de proteína proporciona de 5 a 50% de las calorías totales y el componente de carbohidrato digerible proporciona de 15 a 85% de las calorías totales. Ventajosamente, el componente lipídico proporciona de 20 a 50% de las calorías totales, el componente de proteína proporciona de 5 a 30% de las calorías totales y el componente de carbohidrato digerible proporciona de 30 a 70% de las calorías totales. Preferiblemente, el componente lipídico proporciona de 35 a 50% de las calorías totales, el componente de proteína proporciona de 7,5 a 12,5% de las calorías totales y el componente de carbohidrato digerible proporciona de 40 a 55% de las calorías totales. Para calcular el % de calorías totales para el componente de proteína, hay que tener en cuenta el total de energía que aportan las proteínas, péptidos y aminoácidos.
- 20 [0043] La composición nutricional preferiblemente comprende al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en lípidos animales, excluyendo lípidos humanos, y lípidos vegetales. Preferiblemente, la presente composición comprende una combinación de lípidos vegetales y al menos un aceite seleccionado del grupo que consiste en aceite de pescado, aceite animal, aceite de algas, aceite fúngico y aceite bacteriano. La presente composición preferiblemente comprende ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA). Los LC- PUFA son ácidos grasos o cadenas de acilo graso con una longitud de 20 a 24 átomos de carbono, preferiblemente de 20 o 22 átomos de carbono que comprenden dos o más enlaces insaturados. Más preferiblemente, la presente composición comprende ácido eicosapentanoico (EPA, n-3), ácido docosahexaenoico (DHA, n-3) y/o ácido araquidónico (ARA, n-6).
- 25 [0044] Preferiblemente, la presente composición comprende al menos 0,1% en peso, preferiblemente al menos 0,25% en peso, más preferiblemente al menos 0,6% en peso, incluso más preferiblemente al menos 0,75% en peso de LC-PUFA con 20 y 22 átomos de carbono basados en el contenido de lípidos total.
- 30 [0045] El contenido de LC-PUFA, particularmente los LC-PUFA con 20 y 22 átomos de carbono, preferiblemente no excede 6% en peso, más preferiblemente no excede 3% en peso del contenido de lípidos total ya que es deseable imitar la leche humana lo más posible. Los LC-PUFA se pueden proporcionar como ácidos grasos libres, en forma de triglicéridos, en forma de diglicéridos, en forma de monoglicéridos, en forma de fosfolípidos o como una mezcla de uno o más de los anteriores. La presente composición preferiblemente comprende entre 5 y 75% en peso de ácidos grasos poliinsaturados basados en la grasa total, preferiblemente entre 10 y 50% en peso.
- 35 [0046] La proteína de la composición nutricional se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en las proteínas animales no humanas (preferiblemente proteínas de leche), proteínas vegetales (preferiblemente proteína de soja y/o proteína de arroz), hidrolizados de las mismas, aminoácidos libres de las mismas y sus mezclas derivadas. La composición nutricional contiene preferiblemente caseína, lactosuero, caseína hidrolizada y/o proteína de lactosuero hidrolizada. Preferiblemente, la proteína comprende proteínas intactas, más preferiblemente proteínas de lactosuero bovino intactas y/o proteínas de caseína bovina intactas.
- 40 [0047] La composición nutricional contiene preferiblemente carbohidratos digeribles seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, almidón y maltodextrinas, más preferiblemente lactosa.
- 45 [0048] En vista de lo anterior, también es importante que el alimento líquido no tenga una densidad calórica excesiva, aunque debe aportar las calorías suficientes para alimentar al bebé. Por lo tanto, el alimento líquido tiene preferiblemente una densidad calórica de entre 0,1 y 2,5 kcal/ml, incluso más preferiblemente una densidad calórica de entre 0,5 y 1,5 kcal/ml, de la forma más preferible entre 0,6 y 0,8 kcal/ml.
- 50 [0049] Preferiblemente la composición nutricional comprende nucleótidos y/o nucleósidos, más preferiblemente nucleótidos. Preferiblemente, la composición comprende citidina 5'-monofosfato, uridina 5'-monofosfato, adenosina 5'-monofosfato, guanosina 5'-monofosfato y/o inosina 5'-monofosfato, más preferiblemente citidina 5'-monofosfato, uridina 5'-monofosfato, adenosina 5'-monofosfato, guanosina 5'-monofosfato e inosina 5'-monofosfato. Preferiblemente la composición comprende de 5 a 100, más preferiblemente de 5 a 50 mg, de la forma más preferible de 10 a 50 mg de nucleótidos y/o nucleósidos por 100 gramos de peso en seco de la composición.
- 55
- 60
- 65

Bebé

5 [0050] El presente método se aplica ventajosamente a un bebé humano de 0-36 meses, más preferiblemente a un bebé humano de 0-18 meses, más preferiblemente a un bebé humano de 0-12 meses, incluso más preferiblemente a un bebé humano de 0-6 meses. Un bebé de 0-36 meses incluye un niño. En una forma de realización, un niño tiene una edad superior que 12 meses a 36 meses o más de 18 meses a 36 meses. Para reducir el riesgo de infección por patógenos al mínimo, es ventajoso suplementar la nutrición con oligosacáridos 2-fucosilados lo antes posible.

10 [0051] Preferiblemente, el grupo sanguíneo del bebé se determina basándose en los antígenos Lewis a y Lewis b. En caso de que el grupo sanguíneo del bebé se determine basándose en los antígenos Lewis x y Lewis y, preferiblemente el bebé tiene grupo sanguíneo de Lewis Le(x-/y+).

Figuras

15 [0052]

20 La fig. 1 muestra la variación de los oligosacáridos ácidos y neutros dentro de los grupos de leche 1-3. Todos los puntos de datos representan valores medios de las concentraciones de oligosacáridos correspondientes a siete veces posparto. No obstante, los cálculos estadísticos se basan en valores individuales. Las líneas rectas indican tendencias significativas ( $P < 5\%$ ); la línea de tendencia punteada indica variaciones no significativas en el tiempo.

25 La fig. 2 muestra la variación de fracciones de fructosa  $\alpha 1,2-$ ,  $\alpha 1,4-$  y  $\alpha 1,3-$ enlazadas. Todos los puntos de datos representan valores medios de las concentraciones de oligosacáridos correspondientes a siete veces posparto. No obstante, los cálculos estadísticos se basan en valores individuales. Fuca $\alpha 1-2$ Gal: fracciones de fucosil  $\alpha 1,2-$ enlazadas según se detectan en los grupos de leche 1 o 3; Fucal-4GlcNAc: fracciones de fucosil  $\alpha 1,4-$ enlazadas según se detectan en los grupos de leche 1 o 2; Fuca $\alpha 1-3$ Glc: fracciones de  $\alpha 1,3-$ fucosil enlazadas a glucosa subterminal según se detectan en los grupos de leche 1, 2, 3; Fuca $\alpha 1-3$ GlcNAc: fracciones de  $\alpha 1,3-$ fucosil enlazadas a GlcNAc según se detectan en los grupos de leche 1, 2, 3. No se encontraron tendencias significativas ( $P > 5\%$ ) con Fucal-4GlcNAc: grupos de leche 1 y 2, Fuca $\alpha 1-3$ Glc: grupo de leche 3, Fuca $\alpha 1-3$ GlcNAc: grupos de leche 1 y 3.

30 Las figuras 3-9 muestran las tablas 1-7 a las que se hace referencia en los ejemplos.

Ejemplos

35 **Ejemplo 1**

**Materiales y métodos**

40 Pruebas serológicas

45 [0053] Los grupos sanguíneos de Lewis de las mujeres se determinaron dentro de los 3 días postparto en el día de la muestra de sangre mediante una prueba de tubo de hemaglutinación. La hemaglutinación se examinó utilizando suspensiones de eritrocito correspondientes (3%-5% de eritrocitos suspendidos en 0,9% de NaCl) y anticuerpos anti-Le<sup>a</sup> y anti-Le<sup>b</sup> monoclonales (Immucor, Rödermark, Germany and BAG, Lich, Alemania). La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 15 min. Debido a las discrepancias entre las pruebas serológicas y los perfiles cromatográficos, algunas pruebas de hemaglutinación se repitieron 18-25 meses postparto. Las mujeres no estaban embarazada en ese momento.

50 Muestrario

55 [0054] Todas madres dieron consentimiento escrito para participar en este estudio, cuyo diseño se había aprobado por el comité ético del hospital de la universidad de Dresde, Alemania. Las 30 mujeres caucásicas vivían en la región de Dresde, tenían entre 20 y 35 años de edad y dieron a luz a bebés sanos que fueron exclusivamente amamantados durante el periodo de estudio. En conjunto, se tomaron 175 muestras de leche materna predominantemente tras intervalos de tiempo que incluyeron siete días principales: día 3, 2 - 5 días posparto; día 8, d6 - d9; día 15, d13 - d18; día 22, d20 - d26; día 30, d28 - d33; día 60, d57 - d65; día 90, d88 - d96. En los casos en los que las madres recogieron más de una muestra de leche correspondientes a los intervalos de tiempo anteriormente mencionados, todas las muestras se analizaron con concentraciones de oligosacáridos expresadas como valores medios aritméticos. En un examen previo con seis mujeres caucásicas (grupo sanguíneo de Lewis Le(a-b+)) de la región de Frankfurt/Main, Alemania, no pudimos encontrar ninguna variación de oligosacáridos significativa durante dos periodos de 24 horas en los días 7 y 60 postparto (datos no mostrados). Sin embargo, para evitar incluso pequeños efectos diurnos, el momento de muestreo en este estudio se estableció para la alimentación de mañana. Las muestras de leche generalmente se recogieron durante las horas de la mañana 6-10 am, aplicando la técnica de muestreo a media toma, que ya ha demostrado ser una técnica de muestreo adecuada para el análisis de los carbohidratos. Aproximadamente 5-10 ml de

partes alícuotas se extrajeron manualmente en mitad de la toma en contenedores plásticos. Las muestras de leche se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

#### Análisis cromatográfico de oligosacáridos

5 [0055] Preparación de la muestra incluyendo purificación cromatográfica de permeación sobre gel, al igual que análisis HPAEC se realizaron como ya se ha descrito. En resumen, muestras de leche humana se calentaron durante 30 min a 70°C. Un mililitro de leche humana se añadió a 0,1 ml de una solución acuosa que contenía los estándares internos estaquiosa y ácido galacturónico. Las muestras posteriormente se centrifugaron y ultrafiltraron (Millipore Centrifree, 30 kDa de corte). La proteína y las muestras de lípidos reducidas se fraccionaron en lactosa, oligosacáridos neutros y oligosacáridos ácidos por cromatografía de permeación sobre gel usando columnas de Toyopearl HW 40 (S) (1,6 x 80 cm TosoHaas, Stuttgart, Alemania). Las fracciones de carbohidrato se eluyeron con agua (velocidad de flujo de 1 ml/min) y se monitorizó por detección de índice de refracción. La fracción de lactosa se descartó; las fracciones ácidas y neutras se analizaron por HPAEC-PED. Los eluyentes usados para el análisis de oligosacáridos neutros fueron 0-20 min, 30 mM de NaOH; 20-34 min, 30-100 mM de NaOH; 34-48 min, 100 mM de NaOH / 0-28 mM de NaOAc; 48-55 min, 100 mM de NaOH / 28-200 mM de NaOAc; 55-60 min, 100 mM de NaOH / 200 mM de NaOAc. Las condiciones de elución para los oligosacáridos ácidos fueron 0-8 min, 100 mM de NaOH / 20 mM de NaOAc; 8-30 min, 100 mM de NaOH / 20-80 mM de NaOAc; 30-55 min, 100 mM de NaOH / 80-200 mM de NaOAc; 55-60 min, 100 mM de NaOH / 200 mM de NaOAc.

20 [0056] Además, muchas fracciones de oligosacáridos neutros se analizaron una segunda vez con un gradiente diferente (0- 12 min, 60 mM de NaOH; 12-16 min, 60- 100 mM de NaOH; 16-30 min, 100 mM de NaOH / 0-28 mM de NaOAc; 30-35 min, 100 mM de NaOH / 28-200 mM de NaOAc; 35-40 min, 100 mM de NaOH / 200 mM de NaOAc) lo que permitió la separación y cuantificación de los oligosacáridos neutros de coelución 3'FL y LNDFH I. A diferencia de la publicación anteriormente mencionada, este paso adicional fue necesario debido a los rendimientos alterados de las columnas de CarboPac PA-100 (Dionex, Idstein, Alemania) usadas durante el estudio.

25 [0057] Para controlar la degradación hidrolítica artificial posible de sialiloligosacáridos especialmente susceptibles, ácido neuramínico N-acetil libre (Neu5Ac) se cuantificó junto con oligosacáridos ácidos. Las concentraciones de Neu5Ac fueron relativamente constantes (concentración media de 0,019 g/L en el grupo de leche uno; datos no mostrados). Las cantidades de NeuAc libre fueron de la misma magnitud que las que se han proporcionado y corresponden a aproximadamente 2% y 4% de NeuAc ligado a oligosacárido al principio de la lactancia y después de tres meses, respectivamente. Por lo tanto, la degradación significativa de oligosacáridos ácidos debido a la acción de las sialidasas o al tratamiento térmico se puede excluir.

#### Determinación de lactosa

30 [0058] 250 microlitros de leche humana se mezclaron con agua desionizada y con 1 mL, solución Carrez I (85 mmol/L de potasio hexacianoferrato(II)) y 1 mL de solución Carrez II (250 mmol/L de sulfato de zinc) en un matraz aforado de 25 mL. Después de la filtración, las concentraciones de lactosa de las muestras de leche con menos lípidos y proteínas y diluidas (factor 100) se determinaron utilizando una combinación de prueba de lactosa/D-galactosa de R-Biopharm, Darmstadt, Alemania. La  $\beta$ -galactosidasa liberó galactosa, que posteriormente fue oxidada por galactosa deshidrogenasa. Las concentraciones de lactosa podrían calcularse con las absorbancias ultravioleta del dinucleótido de nicotinamida-adenina cofactor reducido a 340 nm.

#### Análisis estadísticos

35 [0059] Datos que se analizaron por métodos estadísticos, bien consistieron en concentraciones de oligosacáridos individuales, bien en sumas de varios carbohidratos. Además de los oligosacáridos neutros totales y ácidos totales (tablas 1 y 2), después de las estructuras de núcleo totales y los carbohidratos fucosilados se sumaron, respectivamente: Lac de núcleo = Lac + 3- FL + 2'-FL + LDFT + 3'-SL + 6'-SL; LNT de núcleo = LNT + LNFP I + LNFP II + LNDFH I + LNDFH II + LSTa + LSTb + DSLNT; LNnT de núcleo = LNnT + LNFP III + LSTc; LNH de núcleo = LNH + 2'-F-LNH + 3'-F-LNH + 2',3'-DF-LNH; Fuca1-2Gal = 2'-FL + LDFT + LNFP I + LNDFH I + 2'-F-LNH + 2',3'-DF-LNH; Fuca1-4GlcNAc = LNFP II + LNDFH I + LNDFH II; Fuca1-3Glc = 3-FL + LDFT + LNDFH II; Fuca1-3GlcNAc = LNFP III + 3'-F-LNH + 2',3'-DF-LNH.

40 [0060] El conjunto de datos está organizado de forma bifactorial, en tres grupos de leche y siete tiempos de lactancia, respectivamente. Además, el conjunto de datos está muy desequilibrado debido a diferentes números de muestras. En el grupo de leche 1, las 109 muestras en total están asignadas a los tiempos dentro de un rango de 10 a 21 muestras, mientras que en el grupo 2 (28 muestras) un tiempo de lactancia está representado por 3 - 5 muestras y en el grupo 3 (17 muestras) por 2 - 3 muestras. Por lo tanto, se aplicaron diferentes métodos para analizar las medias de concentraciones de oligosacáridos. En el caso del grupo de leche 1, se usó un análisis monofactorial de variación (ANOVA) seguido de una prueba de Student-Newman-Keuls para comparar los valores medios de los tiempos de lactancia. Comparando los promedios de los tres grupos de leche, se aplicó un ANOVA bifactorial con suma de cuadrados de tipo III y luego se calcularon las medias de mínimo cuadrado. Por lo tanto, los promedios de grupo son imparciales y completamente comparables entre sí. Se evaluaron diferencias entre los promedios con el método de



Tukey-Kramer en un nivel de significación de 5%. En ambos modelos de varianza, las diferencias entre las concentraciones de muestra de las mujeres participantes por grupo y tiempo producen el error experimental. Generalmente, las concentraciones de oligosacáridos de las leches de mujeres del mismo grupo de leche en un periodo de lactancia dado fueron altamente variables. Debido a estas grandes variaciones interindividuales, en los mismos casos no se encontraron diferencias significativas entre las medias ( $P > 5\%$ ) a pesar de las diferencias aparentemente claras.

[0061] Las tendencias de las concentraciones de oligosacáridos durante la lactancia fueron modeladas por análisis de regresión. La regresión lineal simple, así como la regresión polinómica de segundo y tercer grado fueron establecidas y evaluadas en coeficientes significativos de regresión. El modelo se aceptó si los coeficientes de regresión fueron significativos ( $P < 5\%$ ). Todos los análisis de regresión fueron efectuados con los valores individuales, aunque en las figuras, para mejor claridad, solo se representan las medias de tiempos de lactancia. Todos los cálculos se realizaron utilizando el sistema SAS (instituto SAS Inc. 2002-2003. SAS/STAT. Release 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## Resultados

### Grupos sanguíneos de Lewis y perfiles de oligosacáridos

[0062] Según las pruebas de hemaglutinación, veintidós donantes (73%) revelaron grupo sanguíneo de Lewis Le(a-b+), cinco donantes (17%) fueron determinadas como grupo sanguíneo de Lewis Le(a+b-), mientras que tres mujeres (10%) fueron donantes Le(a-b-). Estas proporciones estuvieron en un rango similar a las frecuencias de grupos sanguíneos de Lewis entre las poblaciones europeas.

[0063] Aplicando un método HPAEC, se pudieron determinar catorce oligosacáridos neutros catalogados en la tabla 1. Conforme a su grupo sanguíneo de Lewis Le(a-b+), las muestras de leche de veintidós donantes mostraron todas estas catorce estructuras incluyendo  $\alpha 1,2-$ ,  $\alpha 1,4-$  y  $\alpha 1,3-$ fucosiloligosacáridos. Las muestras de leche que revelaron este patrón de oligosacáridos habían sido asignadas al grupo de leche uno. Las muestras de leche de las cinco mujeres no secretoras (grupo sanguíneo de Lewis Le(a+b-)) carecían de 2'-FL, LDFT, LNFP I, LNDFH I, 2'-F-LNH y 2',3'-DF-LNH y se pudieron asignar al segundo grupo de leche, porque no se detectó ningún  $\alpha 1,2-$ fucosiloligosacáridos (Tabla 1). En las muestras de leche de tres madres con grupo sanguíneo de Lewis Le(a-b-) se encontraron  $\alpha 1,2-$  y  $\alpha 1,3-$ fucosiloligosacáridos, mientras que faltaron LNFP II, LNDFH I y LNDFH II con residuos de  $\alpha 1,4$  fucosa. Una de estas mujeres (B.A.) también tenía carencia de LDFT, un componente fucosilado típico de este grupo de leche, y 3-F-LNH, que normalmente se detectó en todas las muestras de leche. A pesar de estas desviaciones menores, las tres madres fueron asignadas al grupo de leche tres (Tabla 1). Ninguna de las treinta mujeres de este estudio mostró un perfil de oligosacáridos sin fucosiloligosacáridos  $\alpha 1,2-$ -enlazados y  $\alpha 1,4-$ -enlazados, que corresponden al grupo de leche cuatro. Esto es conforme a la prevalencia baja (1%) del genotipo se/se y le/le entre las mujeres caucásicas.

### Fracciones de carbohidratos

[0064] En la tabla 3 se muestran las concentraciones medias de las fracciones de carbohidrato principales. Las concentraciones de lactosa determinadas enzimáticamente fueron similares en las muestras de leche de los tres grupos de leche. Durante el periodo de estudio, las concentraciones permanecieron constantes en la leche madura (grupo de leche uno: 57 - 60 g/L; datos no mostrados), mientras que la leche calostroal a los 3 días posparto contenía cantidades significativamente inferiores de lactosa (concentración media de 50,3 g/L en la leche del grupo uno).

[0065] La suma de los catorce oligosacáridos neutros principales determinada por análisis cromatográfico, representa aproximadamente la fracción de oligosacáridos neutros de la leche humana (Tabla 1). Esta fracción de carbohidratos es relativamente abundante en las leches secretoras, especialmente en la leche del grupo tres, mientras que las no secretoras sólo producen aproximadamente la mitad de cantidad. En la figura 1, se muestra la variación de oligosacáridos neutros durante la lactancia. Las concentraciones de oligosacáridos neutros en las leches secretoras se reduce de forma sostenida durante los primeros 90 días posparto, como indican dos líneas rectas en declinación significativa calculadas por análisis de regresión. En cambio, los oligosacáridos neutros de las leches no secretoras parecen permanecer relativamente constantes durante el periodo de estudio. En contraste con los niveles casi constantes de azúcares neutros de las leches no secretoras, las secretoras producen de forma sostenida cantidades inferiores de estos azúcares durante los tres primeros meses posparto.

[0066] Además de los oligosacáridos neutros, seis oligosacáridos ácidos no fucosilados principales, 3'-SL, 6'-SL, LSTa, LSTb, LSTc, DSLNT, como se muestra en la tabla 2, se pudieron determinar cromatográficamente. La suma de estos carbohidratos representa aproximadamente la fracción de oligosacárido ácido de la leche humana. Debido a la importancia del sistema de grupo sanguíneo de Lewis, estos azúcares también se examinaron por separado según los tres grupos de leche. Muestras de leche de los tres tipos de leche mostraron los seis oligosacáridos ácidos anteriormente mencionados. Las cantidades de las fracciones de oligosacáridos ácidos no difirieron significativamente entre los tres grupos de leche (tabla 3). Además, todos los grupos de leche mostraron una disminución similar de unas tres veces de las concentraciones de azúcares ácidos durante el periodo de estudio.

## Estructuras de núcleo

[0067] Las concentraciones molares de las estructuras de núcleo detectadas en las muestras de los tres grupos de leche, lactosa, LNT, LNnT y LNH, se muestran en la tabla 4. Las estructuras de núcleo totales, incluyendo oligosacáridos inmodificados, fucosilados o sialilados se comparan con las estructuras de núcleo correspondientes no decoradas. La lactosa, que se puede interpretar como análogo de glucosa de cadenas de tipo 2, fue, con mucho, la estructura de núcleo más abundante, por encima de LNT, una estructura de tipo 1, al media 34 veces más (tabla 4). LNnT, una estructura de tipo 2 típica, y LNH se detectaron en cantidades incluso inferiores. La lactosa resultó ser la forma predominante (aproximadamente 95%) de la lactosa de estructura de núcleo. En cambio, LNT, LNnT y LNH inmodificadas varió entre 17% y 31 % con relación a las estructuras de núcleo totales correspondiente. Obviamente, los azúcares sialilados y fucosilados son las formas predominantes de estos tres componentes básicos.

[0068] LNT encontrada en leches no secretoras se expresó en cantidades mayores que en las muestras secretoras, pero al comparar LNT de núcleo total resultó que las madres no secretoras sintetizaban cantidades significativamente inferiores de esta estructura de núcleo (tabla 4). Las mujeres no secretoras también producían concentraciones significativamente inferiores de LNnT y LNH de estructura de núcleo, aproximadamente 80 a 60% de las cantidades detectadas en las leches secretoras. En cambio, la lactosa de núcleo no difirió significativamente entre los tres grupos de leche. Las concentraciones de LNT de núcleo, LNnT de núcleo y LNH de núcleo en el grupo de leche uno disminuyeron significativamente durante el periodo de estudio. No obstante, el calostro mostró cantidades significativamente inferiores LNT de núcleo y LNH de núcleo cuando se comparó con la leche de transición en el día 8 posparto. Por motivos de claridad, los efectos temporales se muestran en la tabla 4 solo dentro del grupo de leche uno. Los grupos de leche dos y tres revelaron tendencias similares a lo largo de lactancia. Debido al bajo número de muestras, estos cambios no siempre se juzgaron como significativos (datos no mostrados).

## Oligosacáridos neutros fucosilados

[0069] Las concentraciones medias de oligosacáridos neutros fucosilados que fueron cuantificadas en este estudio se muestran en la tabla 5. Los carbohidratos principales fucosilados en muestras de grupos de leche uno y tres, es decir leches secretoras, son 2'-FL, LNFP I y, en el caso del grupo de leche uno, LNDFH I. Las no secretoras biosintetizaron predominantemente 3-FL y LNFP II. Estos carbohidratos, al igual que LNDFH II y 3'-F-LNH se expresaron de forma significativamente más alta que en las leches secretoras. Durante el periodo de estudio, las concentraciones de azúcares típicas de las leches secretoras, 2'-FL, LNFP I, 2'-F-LNH y 2',3'-DFLNH, aproximadamente disminuyeron dos veces, con la excepción de LDFT, que no cambió significativamente, y LNDFH I. 3-FL fue el único oligosacárido que aumentó constantemente en todos grupos de leche aproximadamente dos veces durante los primeros tres meses de lactancia. LNFP III también pareció aumentar en las leches secretoras aunque esta variación no fue estadísticamente significativa. Las concentraciones de LNFP II, LNDFH I, LNDFH II y 3'-F-LNH en las muestras de grupo de leche uno parecen aumentar a niveles máximos durante el primer mes posparto. Las leches maduras, después de 3 meses, contenían cantidades inferiores similares de estos azúcares a las leches calostrales.

[0070] La tabla 6 y la figura 2 resumen la variación de oligosacáridos fucosilados durante la lactancia con respecto a los tres grupos de leche. Los oligosacáridos se sumaron en una base molar según cuatro tipos de enlace diferentes:  $\alpha$ 1,2-fucosa enlazada a galactosa terminal (Fuca1-2Gal),  $\alpha$ 1,4-fucosa enlazada a N-acetilglucosamina subterminal (Fuca1-4GlcNAc),  $\alpha$ 1,3-fucosa enlazada a glucosa de reducción (Fuca1-3Glc),  $\alpha$ 1,3-fucosa enlazada a GlcNAc subterminal (Fuca1-3GlcNAc). Las anteriores fracciones de  $\alpha$ 1,2-fucosa, típicas para las leches secretoras se expresaron en el grupo de leche tres en concentraciones significativamente más altas que en el grupo de leche uno. En ambos grupos de leche, estas concentraciones declinaron durante el periodo de estudio como se indica por las líneas rectas significativas de regresión de la figura 2. Las fracciones de fucosa con  $\alpha$ 1,4-enlaces, productos del gen de Lewis, se expresaron igualmente en los grupos uno y dos (tabla 6). En dos y tres semanas después del nacimiento, sus concentraciones parecieron lograr los niveles máximos con concentraciones calostrales similares a la leche madura después de dos y tres meses posparto. No obstante, estas tendencias no fueron significativas y por lo tanto no se muestran en la figura 2. Las fracciones de fucosa que están  $\alpha$ 1,3-enlazadas para reducir la glucosa se detectaron en los tres grupos de leche, especialmente en las muestras de leche de las no secretoras representando la forma predominante de fucosa. Cantidades en aumento de esta fracción de fucosa se encontraron durante el periodo de estudio, siendo significativas en el caso de los grupos de leche uno y dos (figura 2). En todos los grupos de leche se detectaron igualmente bajos niveles de residuos de  $\alpha$ 1,3-fucosa enlazados a GlcNAc, que permanecieron relativamente constantes durante los primeros 90 días de lactancia.

## Oligosacáridos sialilados ácidos

[0071] Las concentraciones medias de los seis oligosacáridos ácidos determinadas en este estudio se muestran en la tabla 7. 6'-SL de forma cuantitativa fue con mucho el carbohidrato ácido más importante en todas leches. Cantidades medias de 3'-SL, LSTc y DSLNT se detectaron, mientras que LSTa y LSTb no se produjeron a niveles concentración por encima de 0,1 g/L. Las concentraciones medias de azúcares ácidos individuales, aunque estadísticamente diferentes en algunos casos, no variaron demasiado entre los tres grupos de leche, confirmando así los resultados de la fracción de carbohidrato entero (tabla 3).

[0072] Análogamente, los efectos temporales, como se muestra en la tabla 7 con el grupo de leche uno, fueron similares a las tendencias de los otros grupos de leche (datos no mostrados y figura 1). Las concentraciones de 6'-SL llegaron a su punto máximo en la leche de transición del día 8, y disminuyeron al menos tres veces hasta 90 días después del nacimiento. LSTc, que también contenían un enlace Neu5Aca2-6Gal, disminuyeron de manera similar aproximadamente cinco veces durante el periodo de estudio. 3'-SL se expresó en la leche madura a un nivel relativamente constante después de una reducción significativa en la primera fase de lactancia. Las concentraciones de LSTa, un azúcar ácido menor que lleva un enlace Neu5Aca2-3Gal, disminuyó después de una semana posparto, de modo que no pudo ser detectado en varias muestras de leche después de un mes. En cambio, las concentraciones de LSTb que mostraron un enlace Neu5Aca2-6GlcNAc aumentaron durante el primer mes y permanecieron relativamente constantes desde entonces. DSLNT, el único carbohidrato disialilado analizado y una especie de estructura híbrida entre LSTa y LSTb, mostraron una curva en función del tiempo máxima.

#### Discusión

[0073] Además de la lactosa, 6 oligosacáridos sialilados ácidos, 3 estructuras de núcleo neutras y 11 carbohidratos fucosilados neutros se pudieron determinar a lo largo de la lactancia aplicando cromatografía de intercambio aniónico de pH alto. En este estudio, encontramos diferencias de oligosacáridos individuales con respecto a los tres grupos de leche principales dependientes de los grupos sanguíneos de Lewis y con periodos de lactancia. Hasta la fecha, solo se han realizado unas pocas comparaciones de varios oligosacáridos entre dos grupos de leche.

#### Fucosiloligosacáridos

[0074] Los oligosacáridos individuales predominantes en las muestras de leche de las madres secretoras son 2'-FL y LNFP I, de acuerdo con los resultados cuantitativos y cualitativos de los informes anteriores. Las concentraciones máximas de fucosiloligosacáridos  $\alpha$ 1,2-enlazados, especialmente de 2'-FL, LNFP I y 2,3-DF-LNH (tabla 5 y figura 2), se encontraron en las muestras del grupo de leche tres (Le(a-b-)). Se reconoce generalmente que estos carbohidratos son sintetizados por la enzima secretora (FucT II) aceptando preferentemente estructuras de tipo 1. LNT, una estructura de tipo 1, representa el precursor de LNFP I al igual que lactosa, que se puede definir como el análogo de glucosa de cadenas de tipo 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc), es el precursor de 2'-FL. Aunque las concentraciones molares de la lactosa de núcleo aceptora prevalecen sobre LNT de núcleo aceptora con un factor de aproximadamente 34 en el grupo de leche uno, la cantidad de 2'-FL y LDFT, los productos de enzima secretora de la lactosa, sobrepasan la cantidad de LNFP I y LNDFH I, los productos correspondientes de LNT, solo 2,3 veces (datos no mostrados); por lo tanto, se puede deducir una preferencia de al menos diez veces para las cadenas de tipo 1. Además, encontramos que la lacto-N-hexaosa se fucosiló en la misma medida que LNT, lo que significa que también fue aceptada por la enzima de Lewis (datos no mostrados). Las cadenas de tipo 2 ordinarias obviamente no están para nada  $\alpha$ 1,2-fucosiladas en la galactosa terminal de los azúcares de la leche, porque los carbohidratos libres que contienen antígenos de H-2, por ejemplo 2'-fucosillacto-N-neotetraosa, no se habían detectado hasta el momento. De acuerdo con los informes precedentes, la concentración de la suma de  $\alpha$ 1,2-fucosiloligosacáridos disminuyó significativamente en los tres primeros meses de lactancia (figura 2). Por lo tanto, se podría llegar a la conclusión de que la actividad de la enzima secretora es generalmente reducida a lo largo de la lactancia. No obstante, dado que las estructuras de núcleo aceptoras LNT y LNH, a excepción de la lactosa, declinaron de manera similar durante el periodo de estudio (tabla 4), sigue siendo habiendo dudas de si FucT II realmente se hizo menos activo en las estructuras de tipo 1.

[0075] La suma de  $\alpha$ 1,4-fucosiloligosacáridos detectados (LNFP II, LNDFH I y LNDFH II) pareció ser ligeramente más alta, aunque no significativa, en las muestras de las no secretoras (grupo de leche dos) en comparación con el grupo de leche uno (tabla 6). Estos carbohidratos son el producto principal de la enzima de Lewis (FucT III), que acepta preferentemente cadenas de tipo 1, dando como resultado los antígenos Le<sup>a</sup> o Le<sup>b</sup>. Sostenemos que las mujeres no secretoras revelan una actividad más alta de enzima de Lewis en comparación con las secretoras, porque aunque LNT de núcleo precursora esté presente en cantidades significativamente inferiores (aproximadamente 80%, tabla 3), los productos de Lewis tendieron a concentraciones aún más altas. La enzima de Lewis resultó ser aproximadamente 100 veces más eficaz en el tipo H 1 en comparación con sustratos de tipo H 2. Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que los antígenos Le<sup>x</sup>, fracciones de  $\alpha$ 1,3-fucosa enlazadas a GlcNAc subterminal de las cadenas de tipo 2, como se encuentran en LNFP III, 3'-F-LNH y 2',3'-DF-LNH, no son o no son solamente productos de extensión menores de la enzima de Lewis (FucT III). El hallazgo de concentraciones similares de estos  $\alpha$ 1,3-fucosiloligosacáridos en las muestras de mujeres Le(a-b-) (tabla 6), que no expresan FucT III, apoya firmemente este argumento. Se puede asumir que estos azúcares son biosintetizados por una tercera fucosiltransferasa, por ejemplo la denominada enzima de plasma (FucT VI) que se detectó en la leche humana (Mollicone *et al.* 1990). Incluso otras fucosiltransferasas podrían estar implicadas, dado que FucTs IV, V, VII, VIII, IX humanos se conocen también por actuar como  $\alpha$ 1,3-fucosiltransferasas. 3-FL, LDFT y LNDFH II, que muestran fracciones de fucosa  $\alpha$ 1,3-enlazadas para reducir la glucosa, se encontraron en muestras del grupo de leche uno en cantidades aproximadamente tres veces más altas en comparación con el grupo de leche tres (tablas 5 y 6). Obviamente, las mujeres con enzima de Lewis no activa producen cantidades solo menores de estos carbohidratos. La enzima de Lewis aislada de la leche humana al igual que una forma soluble de la FucT III recombinante, se ha reportado que enlazan a fucosa también en la posición 3-O de la glucosa de reducción de los oligosacáridos de leche humana en cantidades razonables. Por lo tanto, asumimos que la parte principal de estos  $\alpha$ 1,3-fucosiloligosacáridos son el producto de la enzima de Lewis, también. Una parte más pequeña

debería ser debida a otras fucosiltransferasas. Las cantidades especialmente altas del patrón Fuca1-3Glc en el grupo de leche dos, que están causadas por cantidades altas de 3-FL y LNDFH II, sólo se puede explicar parcialmente con una actividad aumentada de la enzima de Lewis. Asumiendo que hay una enzima común implicada en la biosíntesis de los patrones de Fuca1-4GlcNAc y Fuca1-3Glc, se pueden esperar variaciones similares a lo largo de la lactancia. No obstante,  $\alpha$ 4-fucosiloligosacáridos parecen haber mostrado valores máximos durante el primer mes después del nacimiento, mientras que los azúcares que contenían el enlace Fuca1-3Glc significativamente aumentaron durante el periodo de estudio. Se desconoce si la especificidad aceptora de la enzima de Lewis podría ser desplazada hacia el análogo de glucosa de cadenas de tipo 2 en las madres no secretoras a lo largo de la lactancia.

#### 10 Oligosacáridos ácidos

[0076] A diferencia de los azúcares neutros, los seis oligosacáridos ácidos determinados en este estudio no mostraron diferencias importantes entre los tres grupos de leche. Esto es no inesperado debido a que estas fracciones de fucosa carecían de azúcares. Varios oligosacáridos ácidos  $\alpha$ 1,2- y  $\alpha$ 1,4-fucosilados que han sido detectados en la leche humana deberían variar considerablemente entre los varios grupos de leche, pero tales componentes no se cuantificaron en este estudio. Concentraciones de 6'-SL, el azúcar ácido predominante en nuestro estudio, excedieron las cantidades proporcionadas por otros grupos al menos dos veces, mientras que las concentraciones de DSLNT fueron relativamente bajas. Aunque los resultados cuantitativos de distintos estudios, incluyendo nuestro informe, revelaron grandes diferencias, una reducción significativa de la fracción de azúcar ácido en conjunto y de azúcares más individuales se encontró generalmente durante los primeros meses de lactancia. 6'-SL, al igual que LSTc, disminuyeron de manera similar, un hecho que sostiene la hipótesis de que una única sialiltransferasa, posiblemente ST6Gall, exclusivamente aceptando estructuras de tipo 2, está implicada en la biosíntesis de estos carbohidratos. La reducción más pronunciada de LSTc se puede explicar con una reducción de LNnT de núcleo, precursora de LSTc (tabla 4), mientras que las cantidades de lactosa, precursora de 6'-SL, se mantuvo constante después de una semana posparto. 3'-SL, que disminuyó en pequeña medida durante el periodo de estudio, pudo ser sintetizado por ST3Gal IV o también por ST3Gal VI, dos  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasas que actúan preferentemente en las estructuras de tipo 2, y descubrimos que LSTa, un azúcar ácido menor, disminuyó mucho y no se pudo o no sólo parcialmente detectar después de 2 y 3 meses. Tenemos la hipótesis de que ST3Gal III, una  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasas que actúa preferentemente sobre las estructuras de tipo 1, está implicada en la biosíntesis de LSTa al igual que de DSLNT. LSTb fue el único carbohidrato ácido que aumentó en el primer mes posparto, confirmando los resultados anteriores. La llamada ST6GlcNAc pudo transferir fracciones de ácido siálico a GlcNAc subterminal produciendo LSTb al igual que DSLNT, un oligosacárido que mostró ácido neuramínico  $\alpha$ 2,6-enlazado y  $\alpha$ 2,3-enlazado.

#### 35 Implicaciones biológicas

[0077] Los oligosacáridos de la leche humana, especialmente aquellos compuestos que contienen lacto-N-biosa (estructura de tipo 1) o GlcNAc, están pensados para promover el crecimiento de una flora intestinal favorable en los recién nacidos. Las estructuras de núcleo totales LNT y LNH, que muestran unidades de lacto-N-biosa y representan los principales oligosacáridos que contienen GlcNAc de la leche humana, lograr niveles máximos después de aproximadamente 1 semana posparto y descienden a partir de ahí casi dos veces hasta tres meses posparto. Por lo tanto, podemos concluir que los recién nacidos obtienen la mejor protección de los oligosacáridos de la leche humana durante las primeras semanas de lactancia. Además, hemos descubierto que las mujeres secretoras que corresponden a los grupos de leche uno y tres, producían cantidades significativamente más altas de estas estructuras de núcleo que las no secretoras del grupo de leche dos, con la consecuencia potencial de que la flora intestinal de las madres no secretoras difiere análogamente con una incidencia inferior de especies protectoras, como las bifidobacterias, lactobacilos.

[0078] Diferentes estudios *in vitro* y también un estudio clínico sugieren que la función de especialmente  $\alpha$ 1,2-fucosiloligosacáridos para reducir enfermedades infecciosas, incluyendo diarrea, por inhibición de la adherencia de patógenos a las superficies epidérmicas, debido a que funcionan como inhibidores competitivos solubles de la interacción del ligando de superficie de la célula huésped y del receptor patógeno. Se informó de que los bebés alimentados con leche humana del grupo tres (Le(a-b-)), que muestran una proporción alta de  $\alpha$ 1,2-fucosiloligosacáridos, fueron significativamente menos infectados por toxina estable de *E. coli* que los bebés alimentados con leche de madres Le(a- b+) (grupo de leche uno). Se puede presentar la hipótesis de que los recién nacidos alimentados con leche de madres no secretoras, carentes de azúcares  $\alpha$ 1,2-fucosilados y antígenos de H, son incluso más susceptibles a la toxina estable de *E. coli*. En este contexto las frecuencias relativamente altas de no secretoras (se/se) en Europa (20%), en comparación con la incidencia baja de no secretoras, por ejemplo, en la población mestiza de Méjico (1%) tienen que discutirse. Posiblemente, la alta incidencia de secretoras evolucionó entre la población mexicana también como resultado de estas especies patógenas de *E. coli*. En otras regiones con una presión evolutiva diferente de patógenos, las no secretoras pueden ser más aptas para alimentar a bebés de forma satisfactoria, dando como resultado una incidencia más alta de este grupo sanguíneo de Lewis. Además de los antígenos de H anteriormente mencionados, los oligosacáridos de la leche humana muestran una variedad de otros determinantes antigénicos, como Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Le<sup>x</sup>, que dependen de los grupos sanguíneos de Lewis de las madres como se muestra en la tabla 1.

**Ejemplo 2: fórmula de leche infantil**

[0079] Una fórmula infantil para alimentar a un bebé que tiene un grupo sanguíneo de Lewis Le(a-/b+) o Le(a-/b-) o Le(x-/y+) o Le(x-/y-) que comprende por 100 ml (66 kcal):

- 1,3 g de proteína (lactosuero y caseína)
- 7,3 g de carbohidratos digeribles (incluyendo lactosa)
- 3,5 g de grasa (grasa vegetal, aceite de pescado)
- 1,0 g de oligosacáridos no digeribles de los cuales 200 mg de 2'-fucosillactosa, 720 mg de beta-galacto-oligosacáridos y 80 mg de fructo-oligosacáridos

[0080] Además se incluyen: colina, mioinositol, taurina, minerales, oligoelementos y vitaminas como conocidas en la técnica.

**Ejemplo 3: composición de leche de niño**

[0081] Composición de leche de niño (para niños de 1-3 años) para alimentar a un niño que tiene el grupo sanguíneo de Lewis Le(a-/b+) o Le(a-/b-) o Le(x-/y+) o Le(x-/y-) que comprende por 100 ml (67 kcal; 15,1 de peso seco):

- 1,5 g de proteína (proteína/caseína de lactosuero 1/1 p/p)
- 8,5 g de carbohidratos digeribles (de los cuales 6,0 g de lactosa 1,1 g de maltodextrina)
- 3,0 g de grasa (grasas vegetales)
- 1,2 g de oligosacáridos no digeribles, de los cuales 200 mg de 2'-fucosillactosa, 900 mg de beta-galacto-oligosacáridos y 100 mg de fructo-oligosacáridos.

[0082] Minerales, oligoelementos, vitaminas tal y como se conocen en la técnica, incluyendo colina y taurina.

**Ejemplo 4: suplemento nutricional**

[0083] Suplemento nutricional para complementar la leche de una madre que tiene el grupo sanguíneo de Lewis Le(a+/b-), envasado en un sobre con la siguiente composición:

A:

- 500 mg de 2'-fucosillactosa
  - 1,5 g de maltodextrina
- La dosis aconsejada es de 1 a 4 sobres de suplemento A por 100 ml de leche materna.

B:

- 1 g de 2'-fucosillactosa
  - 1 g de maltodextrina
- La dosis aconsejada es de 1 o 2 sobres de suplemento A por 100 ml de leche materna.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una composición que comprende oligosacáridos 2-fucosilados para la preparación de una composición nutricional destinada a alimentar a un bebé, dicho bebé tiene:
- 5 a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a-/b+) o Le(a-/b-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis y/o
- b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x-/y+) o Le(x-/y-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde la composición nutricional es un suplemento nutricional.
3. Uso según la reivindicación 1, donde la madre de dicho bebé tiene
- 15 a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a+/b-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis, y/o
- b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x+/y-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis.
- 20 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la composición nutricional comprende además oligosacáridos no digeribles seleccionados de fructo-oligosacáridos y galacto-oligosacáridos.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la composición nutricional comprende además oligosacáridos de ácido urónico, seleccionados del grupo que consiste en oligosacáridos de ácido galacturónico y productos de degradación de pectina.
- 25 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la composición nutricional que se le da al bebé comprende de 100 mg a 2 g de oligosacáridos 2-fucosilados por 100 ml.
- 30 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la composición comprende lípidos, que proporcionan de 35 a 50% de las calorías totales, proteínas, que proporcionan de 7,5 a 12,5% de las calorías totales, y carbohidratos digeribles, que proporcionan de 40 a 55% de las calorías totales.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde los oligosacáridos 2-fucosilados comprenden alfa-1,2-fucosil-oligosacáridos, preferiblemente 2'-fucosillactosa y/o lacto-N-fucopentaosa I.
- 35 9. Suplemento nutricional que comprende oligosacáridos 2-fucosilados para su uso en la complementación de una fórmula infantil o una leche humana para alimentar a un bebé, que tiene:
- 40 a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a-/b+) o Le(a-/b-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis y/o
- b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x-/y+) o Le(x-/y-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis.
- 45 10. Método para preparar una composición nutricional que comprende leche de complementación de una madre que tiene:
- 50 a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a+/b-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis
- b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x+/y-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis, con oligosacáridos 2-fucosilados.
- 55 11. Método según la reivindicación 10, donde la composición nutricional es para alimentar a un bebé que tiene:
- 60 a) grupo sanguíneo de Lewis Le(a-/b+) o Le(a-/b-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis y/o
- b) grupo sanguíneo de Lewis Le(x-/y+) o Le(x-/y-), según el sistema de determinación del grupo sanguíneo de Lewis.

Fig 1

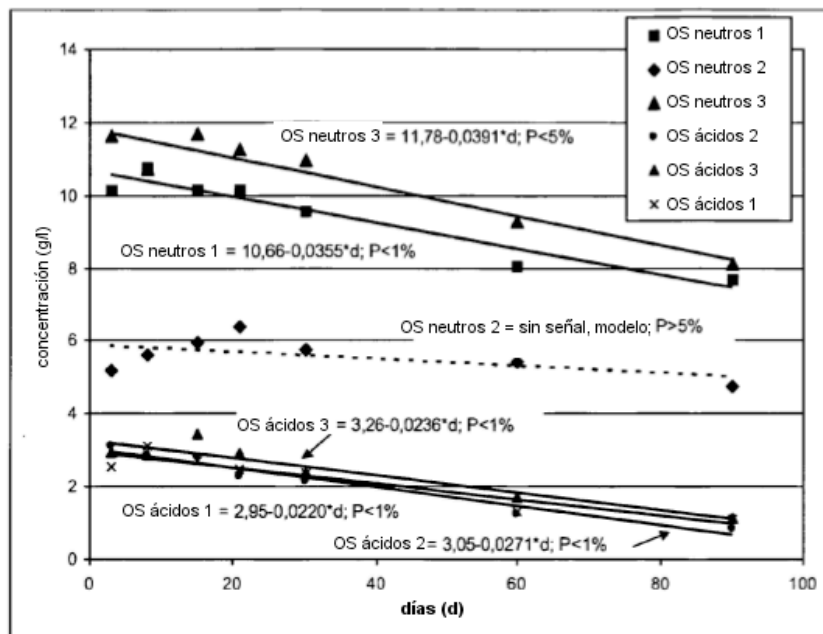


Fig 2

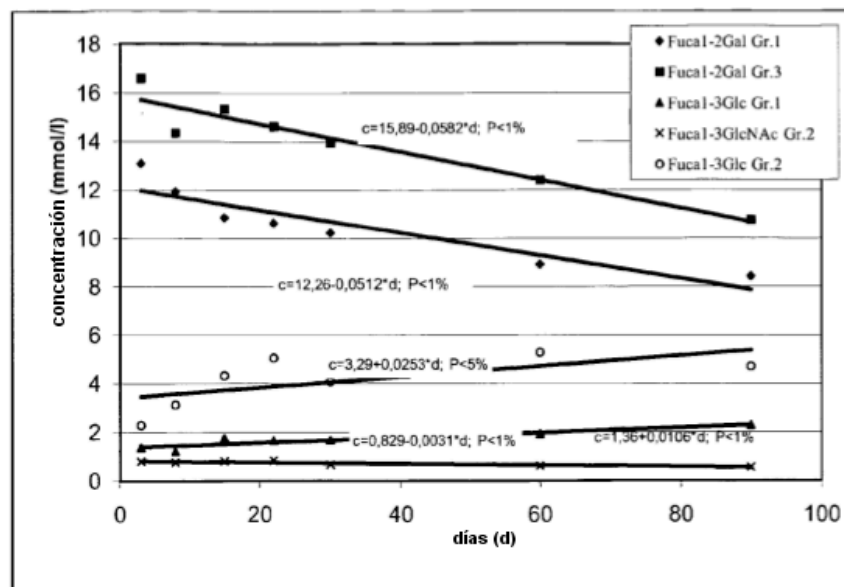




Fig 3

Tabla 1: Estructuras de los oligosacáridos de la leche neutros determinadas en este estudio y su relación con los grupos de leche 1-3

Nombre común (abreviado)	Estructura	Grupo de leche			
		Antígeno	1	2	3
2'-FL	Fuc- $\alpha$ (1→2)Gal- $\beta$ (1→4)Glc	H-2 <sup>ga</sup>	+	-	+
3-FL	Gal- $\beta$ (1→4)Glc Fuc- $\alpha$ (1→3)/	Le <sup>s</sup> <sub>ga</sub>	+	+	+
LDFT	Fuc- $\alpha$ (1→2)Gal- $\beta$ (1→4)Glc Fuc- $\alpha$ (1→3)/	Le <sup>s</sup> <sub>ga</sub>	+	-	+
LNT	Gal- $\beta$ (1→3)GlcNAc- $\beta$ (1→3)Gal- $\beta$ (1→4)Glc		+	+	+
LNnT	Gal- $\beta$ (1→4)GlcNAc- $\beta$ (1→3)Gal- $\beta$ (1→4)Glc		+	+	+
LNFP I	Fuc- $\alpha$ (1→2)Gal- $\beta$ (1→3)GlcNAc- $\beta$ (1→3)Gal- $\beta$ (1→4)Glc	H-I	+	-	+
LNFP II	Gal- $\beta$ (1→3)GlcNAc- $\beta$ (1→3)Gal- $\beta$ (1→4)Glc Fuc- $\alpha$ (1→4)/	Le <sup>s</sup>	+	+	-
LNFP III	Gal- $\beta$ (1→4)GlcNAc- $\beta$ (1→3)Gal- $\beta$ (1→4)Glc Fuc- $\alpha$ (1→3)/	Le <sup>s</sup>	+	+	+
LNDFH I	Fuc- $\alpha$ (1→2)Gal- $\beta$ (1→3)GlcNAc- $\beta$ (1→3)Gal- $\beta$ (1→4)Glc Fuc- $\alpha$ (1→4)/	Le <sup>b</sup>	+	-	-
LNDFH II	Gal- $\beta$ (1→3)GlcNAc- $\beta$ (1→3)Gal- $\beta$ (1→4)Glc Fuc- $\alpha$ (1→4)/	Le <sup>s</sup>	+	+	-
LNH	Gal- $\beta$ (1→4)GlcNAc- $\beta$ (1→6)\ Gal- $\beta$ (1→3)GlcNAc- $\beta$ (1→3)/		+	+	+
2'-F-LNH	Gal- $\beta$ (1→4)GlcNAc- $\beta$ (1→6)\ Fuc- $\alpha$ (1→2)Gal- $\beta$ (1→3)GlcNAc- $\beta$ (1→3)/	H-I	+	-	+
3'-F-LNH	Fuc- $\alpha$ (1→3)\ Gal- $\beta$ (1→4)GlcNAc- $\beta$ (1→6)\	Le <sup>s</sup>	+	+	+
2',3'-DF-LNH	Gal- $\beta$ (1→3)GlcNAc- $\beta$ (1→6)\ Gal- $\beta$ (1→4)GlcNAc- $\beta$ (1→6)\ Fuc- $\alpha$ (1→2)Gal- $\beta$ (1→3)GlcNAc- $\beta$ (1→3)/	H-I / Le <sup>s</sup>	+	-	+

Tabla 1 continuación

2'-FL, 2'-Fucosillactosa; 3-FL, 3-Fucosillactosa; LDFT, Lactodifucotetraosa; LNT, Lacto-N-tetraosa; LNnT, Lacto-N-neotetraosa; LNFP I-III, Lacto-N-fucopentaosas I-III; LNDFH I-III, Lacto-N-difucohexaosas I-II; LNH, Lacto-N-hexaosa; 2'-F-LNH, 2'-Fucosillactato-N-hexaosa; 3'-F-LNH, 3'-Fucosillactato-N-hexaosa; 2',3'-DF-LNH, 2',3'-Difucosillactato-N-hexaosa  
**H-2<sup>ga</sup>**: análogo de glucosa de estructura tipo 2; **Le<sup>x</sup>**: análogo de glucosa de antígeno **Le<sup>x</sup>**; **Le<sup>y</sup>**: análogo de glucosa de antígeno **Le<sup>y</sup>**, "4" presencia del oligosacárido correspondiente: "-" ausencia del oligosacárido correspondiente,

Fig. 3 continuación

Fig 4

Tabla 2: Estructuras de los oligosacáridos de la leche ácidos determinados en este estudio

Nombre común (abreviado)	Estructura
3'-SL	NeuAc $\alpha$ (2-3)Gal $\beta$ (1-4)Glc
6'-SL	NeuAc $\alpha$ (2-6)Gal $\beta$ (1-4)Glc
LSTa	NeuAc $\alpha$ (2-3)Gal $\beta$ (1-3)GlcNAc $\beta$ (1-3)Gal $\beta$ (1-4)Glc
LSTb	Gal $\beta$ (1-3)GlcNAc $\beta$ (1-3)Gal $\beta$ (1-4)Glc NeuAc $\alpha$ (2-6) /
LSTc	NeuAc $\alpha$ (2-6)Gal $\beta$ (1-4)GlcNAc $\beta$ (1-3)Gal $\beta$ (1-4)Glc
DSLNT	NeuAc $\alpha$ (2-3)Gal $\beta$ (1-3)GlcNAc $\beta$ (1-3)Gal $\beta$ (1-4)Glc NeuAc $\alpha$ (2-6) /

3'-SL, 3'-Sialilactosa; 6'-SL, 6'-Sialilactosa; LSTa-c, Sialilacto-N-tetraosas a-c; DSLNT, Disialilacto-N-tetraosa.

Tabla 3: Concentraciones medias (g/l) de fracciones de oligosacáridos <sup>1)</sup>

Grupo de leche	n	Oligosacáridos		Lactosa <sup>2)</sup>
		neutros	ácidos	
1	109	9,51b	2,23a	56,8a
2	28	5,58c	2,17a	58,2a
3	17	10,53a	2,48a	55,4a

<sup>1)</sup> Medias de mínimos cuadrados (como consecuencia de datos desequilibrados) con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Tukey-Kramer).

<sup>2)</sup> En algunos casos número de muestras ligeramente reducido.

Fig. 5

Fig 6

Tabla 4: Concentraciones (mmol/l) de estructuras de núcleo <sup>1)</sup>

Grupo	Días	n	Lac <sup>2)</sup>	Lac de núcleo <sup>2)</sup>	LNT	LNT de núcleo	LNnT	LNnT de núcleo	LNH	LNH de núcleo
1	3	21	147,0c	159,5c	0,78b	4,84bc	0,49a	1,37a	0,06b	0,52b
1	8	19	157,8b	169,1b	1,55a	6,37a	0,48a	1,41a	0,17a	0,88a
1	15	17	170,9a	181,6a	1,52a	5,94ab	0,28b	1,02b	0,14a	0,81a
1	22	16	175,3a	185,6a	1,59a	6,09ab	0,32b	1,01b	0,13a	0,76a
1	30	14	167,4ab	177,3ab	1,41a	5,46ab	0,23b	0,90b	0,14a	0,79a
1	60	12	175,8a	184,5a	1,00b	3,94c	0,23b	0,81b	0,08b	0,46b
1	90	10	167,9ab	176,2ab	0,86b	3,64c	0,20b	0,81b	0,06b	0,34b
1	<b>media</b>	109	166,0a	176,2a	1,24b	5,18a	0,32a	1,05a	0,11a	0,65b
2	<b>media</b>	28	170,1a	175,9a	1,68a	4,07b	0,11b	0,77b	0,08a	0,37c
3	<b>media</b>	17	161,9a	173,4a	1,20b	5,38a	0,32a	1,00ab	0,09a	0,84a

<sup>1)</sup> Medias con la misma letra no son significativamente diferentes; Prueba de Student-Newman-Keuls para comparaciones dentro del grupo 1, prueba de Tukey-Kramer para comparaciones de medias de mínimos cuadrados ( como consecuencia de datos desequilibrados) de los grupos 1-3.

<sup>2)</sup> En algunos casos número de muestras ligeramente reducido.

Tabla 5: Concentraciones (g/l) de oligosacáridos fucosilados neutros <sup>1)</sup>

Grupo	Días	n	2'-FL	3-FL	LDFT	LNFP I	LNFP II	LNFP III	LNDFH I	LNDFH II	2'-F-LNH	3'-F-LNH	2',3'-DF-LNH
1	3	21	4,13a	0,24d	0,49a	2,00ab	0,14a	0,34a	1,12a	0,10b	0,21b	0,07c	0,35ab <sup>2)</sup>
1	8	19	3,37b	0,26d	0,33a	2,25a	0,23a	0,34a	1,30a	0,17ab	0,35a	0,18b	0,41a <sup>2)</sup>
1	15	17	3,04b	0,38cd	0,48a	1,64abc	0,29a	0,37a	1,46a	0,23a	0,23ab	0,22ab	0,40a
1	22	16	3,02b	0,44bc <sup>2)</sup>	0,36a	1,72abc	0,30a	0,37a	1,55a <sup>2)</sup>	0,26a	0,23ab	0,24a	0,33ab
1	30	14	2,96b	0,42bc	0,37a	1,48bcd	0,24a	0,37a	1,36a	0,24a	0,24ab	0,20ab	0,40a
1	60	12	2,82b	0,56ab	0,38a	1,06cd	0,18a	0,40a	1,02a	0,19a	0,13b	0,12c	0,23bc
1	90	10	2,59b	0,67a	0,48a	0,94d	0,17a	0,44a	1,05a	0,17ab	0,10b	0,09c	0,18c
1	Media	109	3,13b	0,42b	0,41a	1,58b	0,22b	0,38a	1,28	0,20b	0,21a	0,16a	0,33b
2	Media	28	n.d. <sup>3)</sup>	1,79a	n.d.	n.d.	1,25a	0,38a	n.d.	0,45a	n.d.	0,35b	n.d.
3	Media	17	4,57a	0,15c	0,17b	3,18a	n.d.	0,31a	n.d.	n.d.	0,26a	0,13a	0,58a

Fig 7

<sup>1)</sup> Medias con la misma letra no son significativamente diferentes; Prueba de Student-Newman-Keuls para comparaciones dentro del grupo 1., prueba de Tukey-Kramer para comparaciones de medias de mínimos cuadrados (como consecuencia de datos desequilibrados) de los grupos 1-3.

<sup>2)</sup> Número de muestras (n) ligeramente deducidas.

<sup>3)</sup> n.d.: no detectable

Fig 8

Tabla 6: Concentraciones medias (mmol/l) de fracciones de fucosa <sup>1</sup>

Grupo de leche	n	Tipo de enlace				
		Fucα1-2Gal	Fucα1-4GlcNAc	Fucα1-3Glc	Fucα1-3GlcNAc	
1	104-108	10,59b	1,72a	1,71b	0,82a	
2	28	n.d. <sup>2)</sup>	1,92a	4,12a	0,73a	
3	17	13,99a	n.d.	0,57c	0,90a	

<sup>1)</sup> Medias de mínimos cuadrados (como consecuencia de datos desequilibrados) con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Tukey-Kramer)

<sup>2)</sup> n.d.: no detectable

Fig 9

Tabla 7: Concentraciones (g/l) de oligosacáridos ácidos <sup>1)</sup>

Grupo	Días	n	3'-SL	LSTa	DSLNT	LSTb	6'-SL	LSTc
1	3	21	0,35a	0,06b	0,29b	0,05c	1,31b	0,48a
1	8	19	0,30ab	0,09a	0,38a	0,06bc	1,77a	0,53a
1	15	17	0,27ab	0,05cb	0,44a	0,07abc	1,57ab	0,31b
1	22	16	0,26ab	0,03cd	0,41a	0,09ab	1,42b	0,25b
1	30	14	0,27ab	0,03cd	0,41a	0,10a	1,35b	0,24b
1	60	12	0,23b	0,01d	0,23b	0,08abc	0,63c	0,11c
1	90	10	0,24b	0,01d	0,21b	0,08abc	0,49c	0,09c
1	Media	109	0,27ab	0,04a	0,34b	0,08b	1,22a	0,29a
2	Media	28	0,24b	0,04a	0,42a	0,11a	1,14a	0,21b
3	Media	17	0,31a	0,06a	0,41ab	0,08b	1,31a	0,31a

<sup>1)</sup>Medias con la misma letra no son significativamente diferentes; Prueba de Student-Newman-Keuls para comparaciones dentro del grupo 1, prueba de Tukey-Kramer para comparaciones de medias de mínimos cuadrados (como consecuencia de datos desequilibrados) de los grupos 1-3.