



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 336 015**

(51) Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A23L 1/308 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61K 31/201 (2006.01)

A61K 31/202 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/702 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05755280 .4**

(96) Fecha de presentación : **22.06.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1758469**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

(54) Título: **Mejora de la integridad de la barrera en pacientes de VIH mediante el uso de ácidos grasos.**

(30) Prioridad: **22.06.2004 PCT/NL2004/000444**
21.04.2005 EP 05103257
21.04.2005 EP 05103260

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2010

(73) Titular/es: **N.V. Nutricia**
Eerste Stationsstraat 186
2712 HM Zoetermeer, NL

(72) Inventor/es: **Van Tol, Eric, Alexander, Franciscus;**
Willemsen, Linette, Eustachia, Maria;
Koetsier, Marleen, Antoinette;
Beermann, Christopher y
Stahl, Bernd

(74) Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

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

Mejora de la integridad de la barrera en pacientes de VIH mediante el uso de ácidos grasos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de una composición para la producción de un medicamento para mejorar la integridad de la barrera intestinal de pacientes de VIH y una composición adecuada para el uso en un método de este tipo.

10 Antecedentes de la invención

El epitelio gastrointestinal normalmente funciona como una barrera selectiva que permite la absorción de nutrientes, electrolitos y agua y la prevención de la exposición a antígenos dietéticos y microbianos, incluyendo alérgenos alimentarios. El epitelio gastrointestinal limita el paso de antígenos a la circulación sistémica que puede causar reacciones inflamatorias, p. ej. reacciones alérgicas. Como la incidencia de alergia, particularmente la alergia a los alimentos, está en aumento, muchos grupos de investigación están en búsqueda de una curación (preventiva) para estas dolencias.

EP1272058 describe una composición que contiene oligosacáridos indigeribles para mejorar la unión estrecha para reducir la permeabilidad intestinal y para reducir la reacción alérgica. La composición puede comprender LC-PUFA's (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga).

EP 745001 describe una combinación de oligosacáridos indigeribles y n-3 y n-6 ácidos grasos para el tratamiento de colitis ulcerosa.

Usami *et al* (Nutrición Clínica 2001, 20(4): 351-359) describen el efecto de ácido eicosapentanoico (EPA) en la permeabilidad de unión estrecha en las monocapas de células intestinales. En sus manos, se descubrió que EPA aumenta la permeabilidad, lo que indica que EPA no es adecuado para mejorar la integridad de la barrera intestinal.

Las formulaciones de la técnica anterior no son óptimamente adecuadas para mejorar la integridad de barrera.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona una combinación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga seleccionados (LC-PUFA's) y oligosacáridos seleccionados. La combinación presente de LC-PUFA's y oligosacáridos efectivamente mejora la integridad de la barrera, por mejorar sinérgicamente la permeabilidad intestinal, la producción de moco, y por reducir la producción mucosa de mediadores inflamatorios que podrían comprometer la integridad de la barrera intestinal. Una combinación de estos compuestos en una fórmula nutritiva o farmacéutica es particularmente adecuada para mejorar la integridad intestinal de pacientes de VIH y de SIDA.

Sorprendentemente, fue descubierto que los LC-PUFA's seleccionados reducen efectivamente la permeabilidad epitelial paracelular. A diferencia de lo que Usami *et al* (Nutrición Clínica 2001, 20(4): 351-359) han comunicado, los inventores presentes han descubierto que los ácidos grasos poliinsaturados C18 y C20, particularmente el ácido eicosapentanoico (EPA), el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (ARA), son capaces de reducir efectivamente la permeabilidad intestinal de unión estrecha.

Además de los LC-PUFA's, la composición presente contiene oligosacáridos. Los oligosacáridos seleccionados mejoran la integridad de la barrera por estimular la producción del moco, lo que resulta en un aumento del espesor de la capa de moco. Se cree que este efecto es causado por los efectos de los oligosacáridos distintos en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA). Por lo tanto, cuando se la administra por vía enteral a un mamífero, la combinación presente de LC-PUFA y oligosacáridos indigeribles sinérgicamente mejora la integridad de la barrera y/o sinérgicamente reduce la permeabilidad intestinal por reducir simultáneamente la permeabilidad de unión estrecha y por estimular la producción de moco.

En otro aspecto, la composición presente mejora la calidad de la capa de moco intestinal. La capa de moco comprende mucinas. Las mucinas son glicoproteínas de masa molecular alta que son sintetizadas y segregadas por las células caliciformes. Forman una capa gelatinosa en la superficie mucosa, mejorando así la integridad de la barrera. La capa de moco comprende diferentes tipos de mucinas, p. ej. mucinas ácidas, neutras y sulfonadas. Se cree que una heterogeneidad aumentada de la capa de moco mejora la funcionalidad de la barrera.

La composición presente preferiblemente comprende al menos dos oligosacáridos diferentes que influyen en la arquitectura mucosa e influyen ventajosamente en la heterogeneidad de mucina en la capa de moco, bien directamente, bien por cambiar la flora intestinal. Se cree que cada oligosacárido diferente seleccionado tiene un efecto diferente en la cantidad de moco y en la calidad. Además, los dos oligosacáridos distintos también son capaces de estimular la calidad del moco como reflejado por el grado de sulfatación a través de su estimulación sinérgica de la producción de SCFA. Sorprendentemente, fue descubierto por los inventores presentes que una mezcla de dos diferentes oligosacáridos según la presente invención estimula de manera sinérgica la producción de acetato. Fue también descubierto por los inventores presentes que la producción de moco depende de la producción de acetato.

Además, fue descubierto que el precursor de ARA, el ácido gamma-linolénico (GLA), puede ser ventajosamente combinado en la presente composición para el tratamiento de pacientes de VIH. Pacientes de VIH frecuentemente sufren de enfermedades inflamatorias intestinales, lo que hace un alto consumo de ARA indeseable, porque ARA aumenta la respuesta inflamatoria. Se descubrió que una parte de ARA puede ser sustituida por GLA sin tener un efecto negativo en la eficacia de la mezcla de grasa. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende los oligosacáridos, EPA, DHA, ARA y GLA y su uso en el tratamiento y/o la prevención de VIH o SIDA.

La composición presente es preferiblemente mejorada aún más por suministrar tanto oligosacáridos de cadena larga como oligosacáridos de cadena corta. El suministro de diferentes longitudes de cadena resulta en la estimulación de la producción de moco en partes diferentes del íleon y del colon. Los oligosacáridos de cadena corta (típicamente con un grado de polimerización (DP) de 2,3,4 o 5) estimulan la producción de mucina en el colon proximal y/o íleon distal, mientras los oligosacáridos con longitudes de cadena más largas (preferiblemente con un grado de polimerización (DP) superior a de 5 a 60) se cree que estimulan la producción de mucina en las partes más distales del colon.

Incluso más mejoras pueden ser conseguidas por el suministro de al menos dos oligosacáridos diferentes ambos como oligosacáridos de cadena corta y de cadena larga. Estas formas de realización preferidas contribuyen todas a la integridad de la barrera aún más mejorada en todas las partes del íleon y/o del colon.

Además, sorprendentemente se ha descubierto que EPA, DHA, y ARA fueron capaces de reducir los efectos nocivos de interleuquina 4 (IL-4) en la permeabilidad intestinal. IL-4 es una citoquina que se segrega en cantidades aumentadas por células T mucosas en pacientes determinados y que induce la permeabilidad intestinal. Por lo tanto la presente invención también proporciona un método para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades donde la concentración intestinal IL-4 es aumentada, tal como la alergia, particularmente la dermatitis atópica.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una composición nutritiva que comprende:

- a) EPA, DHA y ARA, donde el contenido de ácido graso poliinsaturado de cadena larga con 20 y 22 átomos de carbono es al menos 15% y no exceda de 85% en peso del contenido de grasa total; y
- b) al menos dos oligosacáridos diferentes, donde los dos diferentes oligosacáridos tienen una homología en unidades de monosa debajo del 90%.

Esta composición puede ser usada ventajosamente en un método para estimular la integridad de la barrera intestinal, comprendiendo dicho método la administración de dicha composición a un mamífero.

En otro aspecto la presente invención proporciona el uso de ácidos grasos poliinsaturados para la producción de una composición para el uso en un método para el tratamiento de un paciente infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), comprendiendo dicho método la administración a dicho paciente infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) de una composición que comprende:

- a. ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (ARA), donde el contenido del ácido graso poliinsaturado de cadena larga con 20 y 22 átomos de carbono es al menos 15% y no exceda de 85% en peso del contenido de grasa total; y
- b. al menos dos oligosacáridos distintos (OL1 y OL2), donde los dos oligosacáridos distintos tienen una homología en unidades de monosa debajo de 90%.

Una forma de realización particular del tratamiento de un paciente infectado con VIH es el tratamiento nutritivo. Otras formas de realización de la presente invención son el uso de la composición definida arriba para suministrar la nutrición a un paciente infectado con VIH, por la administración a dicho paciente infectado con VIH de dicha composición y también el uso de la composición definida arriba para estimular la integridad de la barrera intestinal en un paciente infectado con VIH, comprendiendo la administración a dicho paciente infectado con VIH de dicha composición.

Ácidos grasos poliinsaturados

Los inventores presentes sorprendentemente han descubierto que el ácido eicosapentanoico (EPA, n-3), el ácido docosahexaenoico (DHA n-3) y el ácido araquidónico (ARA, n-6) reducen eficazmente la permeabilidad intestinal de unión estrecha. GLA (n-6) también reduce eficazmente la permeabilidad de la barrera. Por lo tanto la composición presente que es particularmente adecuada para mejorar la integridad de la barrera intestinal, comprende EPA, DHA y ARA opcionalmente en combinación con AGL.

ES 2 336 015 T3

Los inventores presentes han descubierto que los LC-PUFA's seleccionados fueron eficaces en la reducción de la permeabilidad de unión estrecha (véase ejemplos vs. Usami *et al*). El contenido de LC-PUFA con 20 y 22 átomos de carbono en la composición presente preferiblemente no excede de 85% en peso del contenido de grasa total, preferiblemente no excede de 35% en peso del contenido de grasa total. La composición presente comprende al menos 15% en peso y lo más preferiblemente al menos 25% en peso LC-PUFA con 20 y 22 átomos de carbono del contenido de grasa total. Por la misma razón, el contenido de EPA preferiblemente no excede de 55% en peso de la grasa total, preferiblemente no excede de 35% en peso, más preferiblemente no excede de 25% en peso, pero es preferiblemente al menos 0,05% en peso, más preferiblemente al menos 0,1% en peso y lo más preferiblemente al menos 1% de la grasa total. El contenido de DHA preferiblemente no excede de 15% en peso, más preferiblemente no exceda de 10% en peso, pero es al menos 0,1% en peso de la grasa total. Como ARA resultó ser particularmente eficaz en reducir la permeabilidad de unión estrecha, la composición presente comprende cantidades relativamente altas, preferiblemente al menos 0,1% en peso, aún más preferiblemente al menos 0,25% en peso, lo más preferiblemente al menos 0,5% en peso de la grasa total. El Contenido de ARA preferiblemente no exceda de 15% en peso, preferiblemente no excede de 5% en peso, más preferiblemente no excede de 1% en peso de la grasa total. En el ARA presente que contiene la composición enteral, EPA y DHA son ventajosamente añadidos para equilibrar la acción de ARA, p. ej. reducir la acción proinflamatoria potencial de metabolitos de ARA. El exceso de metabolitos de ARA puede causar inflamación. La composición nutritiva presente preferiblemente también contiene el ácido gamma-linolénico (GLA, C18). El GLA actúa como un precursor del ARA, para reemplazar al menos una parte del contenido de ARA de la composición para reducir aún más el efecto proinflamatorio de ARA.

Por lo tanto, la composición presente preferiblemente comprende ARA, GLA, EPA y DHA, donde la proporción de peso (ARA+GLA)/DHA preferiblemente es superior a 0,10, preferiblemente superior a 0,25 y más preferiblemente superior a 0,5. La proporción es preferiblemente debajo de 25 y lo más preferiblemente debajo de 3. La composición presente preferiblemente comprende entre 15 y 75% en peso de ácidos grasos poliinsaturados basados en grasa total, preferiblemente entre 15 y 50% en peso.

El LC-PUFA con 20 y 22 átomos de carbono puede ser proporcionado como ácidos grasos libres, en forma de triglicéridos, en forma de fosfolípidos, o como una mezcla de uno o más de lo anterior. La composición presente preferiblemente comprende al menos uno de ARA y de DHAs en forma de fosfolípidos.

La composición nutritiva presente preferiblemente también proporciona omega-9 (n-9) ácido graso (preferiblemente ácido oleico, 18:1), para proporcionar una nutrición suficiente. Preferiblemente la composición presente proporciona al menos 1% en peso n-9 ácido graso basado en el peso de los ácidos grasos totales, más preferiblemente al menos 5% en peso. El contenido de ácidos grasos n-9 está preferiblemente debajo de 80% en peso.

La cantidad diaria adecuada puede ser al menos 0,1 gramos de EPA y 0,05 gramos de ARA o ARA + GLA, o entre 0,1 y 5 gramos de EPA y entre 0,05 y 2,5 gramos de ARA o ARA + GLA, o entre 0,5 y 2,5 gramos de EPA y entre 0,25 y 1,25 gramos de ARA o ARA + GLA o una cantidad de entre 0,75 y 1,5 gramos de EPA y entre 0,37 y 0,75 gramos de ARA o ARA + GLA. Cantidades diarias adecuadas para DHA siguen de la proporción (ARA + GLA)/DHA dada anteriormente.

Oligosacáridos

Oligosacáridos adecuados según la invención son sacáridos que tienen un grado de polimerización (DP) de al menos 2 unidades de monosa, que no son o solamente son digeridos parcialmente en el intestino por la acción de ácidos o enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo superior humano (intestino delgado y estómago), pero que son fermentables por la flora intestinal humana. El término de unidades de monosa se refiere a las unidades que tienen una estructura anular cerrada, preferiblemente hexosa, p. ej. las formas piranosas o las formas furanosas. El grado de polimerización del oligosacárido está normalmente debajo de 60 unidades de monosa, preferiblemente debajo de 40, aún más preferiblemente debajo de 20.

La composición presente comprende al menos dos oligosacáridos diferentes, donde los oligosacáridos tienen una homología en unidades de monosa debajo de 90%, preferiblemente debajo de 50%, aún más preferiblemente debajo de 25%, aún más preferiblemente debajo de 5%. El término "homología" como usado en la presente invención es el acumulativo del porcentaje de las mismas unidades de monosa en los oligosacáridos diferentes. Por ejemplo, oligosacárido 1 (OL1) tiene la estructura de fruc-fruc-glu-gal, y así comprende 50% de fruc, 25% de gal y 25% de glu. Oligosacárido 2 (OL2) tiene la estructura de fruc-fruc-glu, y así comprende 66% de fruc, 33% de glu. Los oligosacáridos diferentes así tienen una homología de 75% (50% de fruc + 25% de glu).

En una forma de realización preferida, la composición presente comprende galactooligosacáridos y al menos uno seleccionado del grupo que consiste en fructooligosacáridos e inulina.

Cada uno de los oligosacáridos presentes preferiblemente comprende al menos 66%, más preferiblemente al menos 90% de unidades de monosa seleccionadas del grupo que consiste en mañosa, arabinosa, fructosa, fucosa, ramnosa, galactosa, β -D-galactopiranososa, ribosa, glucosa, xilosa, ácido urónico y derivados de esos calculado sobre el número total de unidades de monosa contenidas dentro.

Según otra forma de realización al menos uno de los oligosacáridos de la composición presente es seleccionado del grupo que consiste en fructanos, fructooligosacáridos, dextrinas indigeribles, galactooligosacáridos (incluyendo transgalactooligosacáridos), xilooligosacáridos, arabinooligosacáridos, glucooligosacáridos, mananoligosacáridos, fucosacáridos, oligosacáridos ácidos (véase abajo, p. ej. oligosacáridos de ácido urónico tal como hidrolizado de pectina) y sus mezclas. Preferiblemente la composición presente comprende al menos uno, preferiblemente al menos dos, de los oligosacáridos seleccionados del grupo que consiste en fructooligosacáridos o inulina, galactooligosacáridos e hidrolizado de pectina.

Para alcanzar una cantidad y calidad de moco buena, la composición presente preferiblemente comprende al menos un oligosacárido que comprende al menos 66% de galatosa o fructosa como una unidad de monosa. En una forma de realización preferida la composición comprende al menos un oligosacárido que comprende al menos 66% de galatosa como una unidad de monosa y al menos un oligosacárido que comprende al menos 66% de fructosa como una unidad de monosa. En una forma de realización particularmente preferida, la composición presente comprende galactooligosacárido y un oligosacárido seleccionado del grupo que consiste en fructooligosacáridos e inulina. Fructooligosacáridos estimulan la producción de sulfomucina en el colon distal de ratas con flora humana asociada (Kleessen *et al*, (2003) Brit J Nutr 89:597-606) y galactooligosacáridos estimulan la producción de mucina ácida (Meslin *et al*, Brit. J. Nutr (1993), 69: 903-912)).

Para mejorar aún más el espesor de la capa de moco por el área total del colon, al menos 10% en peso de los oligosacáridos en la composición presente tiene un DP de 2 a 5 (es decir 2, 3, 4 y/o 5) y al menos 5% en peso tiene un DP de 10 a 60. Preferiblemente al menos 50% en peso, más preferiblemente al menos 75% en peso de los oligosacáridos tienen un DP de 2 a 9 (es decir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y/o 9), porque se cree que éstos trabajan en todas las partes del íleon y partes proximales y partes medias del colon, y porque el porcentaje de peso de oligosacáridos que tiene que ser incorporado en la composición para conseguir el efecto deseado es reducido.

Preferiblemente las proporciones de peso:

a. (oligosacáridos con DP de 2 a 5): (oligosacáridos con DP 6,7,8 y/o 9) > 1; y

b. (oligosacáridos con DP de 10 a 60): (oligosacáridos con DP 6,7,8 y/o 9) > 1 son ambos superiores a 1.

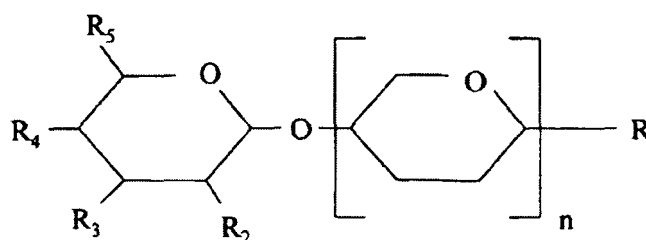
Preferiblemente ambas proporciones de peso son superiores a 2, aún más preferiblemente superiores a 5.

Para mejorar aún más el espesor de la capa de moco y la calidad por el área total del colon, preferiblemente cada uno de los al menos dos diferentes oligosacáridos se proveen en longitudes de cadena diferentes, preferiblemente al menos 10% en peso de cada oligosacárido basado en el peso total del oligosacárido respectivo tiene un DP de 2 a 5 (es decir 2, 3, 4 y/o 5) y al menos 5% en peso tiene un DP de entre 10 y 60. Preferiblemente al menos 50% en peso, más preferiblemente al menos 75% en peso del oligosacárido basado en el peso total de estos oligosacáridos tiene un DP de entre 2 y 10, porque se cree que éstos trabajan en todas las partes del íleon y partes proximales y partes medias del colon.

Oligosacáridos acídicos

Para mejorar aún más la integridad de la barrera, la composición presente preferiblemente incluye oligosacáridos acídicos con un DP de entre 2 y 60. El término oligosacárido ácido se refiere a oligosacáridos que comprenden al menos un grupo ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido N-acetilneuramínico, ácido N-glicolilneuramínico, ácido carboxílico libre o esterificado, grupo de ácido sulfúrico y grupo de ácido fosfórico. El oligosacárido ácido preferiblemente comprende unidades de ácido urónico (es decir, polímero de ácido urónico), más preferiblemente unidades de ácido galacturónico. El oligosacárido ácido puede ser un carbohidrato homogéneo o heterogéneo. Ejemplos adecuados son hidrolizados de pectina y/o alginato. En el tracto intestinal, los polímeros de ácido urónico se hidrolizan a monómeros de ácido urónico que estimulan la producción de acetato intestinal, que a su vez estimula la secreción de moco intestinal (Barcelo *et al.*, Gut 2000, 46:218-224). Preferiblemente el oligosacárido ácido tiene la estructura I abajo, donde la hexosa terminal (izquierda) preferiblemente comprende un doble enlace. Las unidades de hexosa distintas de la(s) unidad(es) de hexosa terminal son preferiblemente unidades de ácido urónico, aún más preferiblemente unidades de ácido galacturónico. Los grupos de ácido carboxílico en estas unidades pueden ser libres o (parcialmente) esterificados, y preferiblemente al menos un 10% es metilado (véase abajo).

Estructura I

Oligosacárido de ácido polimérico

donde

R es preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, grupo hidroxilo o ácido, preferiblemente hidroxilo; y al menos uno seleccionado del grupo que consiste en R₂, R₃, R₄ y R₅ representa el ácido N-acetilneuramínico, el ácido N-glicolilneuramínico, el ácido carboxílico libre o esterificado, el grupo de ácido sulfúrico y el grupo de ácido fosfórico, y el resto de R₂, R₃, R₄ y R₅ representando el hidroxilo y/o el hidrógeno. Preferiblemente uno seleccionado del grupo que consiste en R₂, R₃, R₄ y R₅ representa el ácido N-acetilneuramínico, el ácido N-glicolilneuramínico, el ácido carboxílico libre o esterificado, el grupo de ácido sulfúrico o el grupo de ácido fosfórico, y el resto representa el hidroxilo y/o el hidrógeno. Aún más preferiblemente uno seleccionado del grupo que consiste en R₂, R₃, R₄ y R₅ representa el ácido carboxílico libre o esterificado y el resto de R₂, R₃, R₄ y R₅ representando el hidroxilo y/o el hidrógeno; y n es un número entero y se refiere a un número de unidades de hexosa (véase también grado de polimerización, abajo), que puede ser cualquier unidad de hexosa. Adecuadamente n es un número entero entre 1-5000. Preferiblemente la(s) unidad(es) de hexosa es/son una unidad de ácido urónico.

De la forma más preferible R₁, R₂ y R₃ representan el hidroxilo, R₄ representa el hidrógeno, R₅ representa el ácido carboxílico, n es cualquier número entre 1 y 250, preferiblemente entre 1 y 10 y la unidad de hexosa es un ácido galacturónico.

La detección, la medición y la análisis de los oligosacáridos ácidos preferidos como usados en la presente invención se dan en solicitudes de patente anteriores del solicitante en lo que se refiere a los oligosacáridos ácidos, es decir WO 0/160378.

Para mejorar la estimulación del espesor de capa de moco por el área total del colon, la composición presente comprende preferiblemente al menos 10% en peso de oligosacáridos ácidos con un DP de 2 a 5 (es decir, 2, 3, 4 y/o 5) y al menos 5% en peso de oligosacáridos ácidos con un DP de entre 10 y 60, estando basado dicho % en el peso total de los oligosacáridos.

Los oligosacáridos ácidos usados en la invención son preparados a partir de pectina, pectato, alginato, condroitín, ácidos hialurónicos, heparina, heparana, sialoglicanos, fucoidano, fucooligosacáridos o carragenina, preferiblemente de pectina y/o alginato.

Contenido de oligosacárido

Cuando en forma de líquido listo para el consumo, la composición presente preferiblemente comprende de 0,1 a 100 gramos de oligosacárido indigerible por litro, más preferiblemente entre 0,5 y 50 gramos por litro aún más preferiblemente entre 1 y 25 gramos por litro. Un contenido demasiado alto de oligosacáridos puede causar incomodidad debido a la fermentación excesiva, mientras un contenido muy bajo puede resultar en una capa de moco insuficiente. La proporción de peso de los al menos dos oligosacáridos diferentes es preferiblemente entre 1 y 10, más preferiblemente entre 1 y 5. Estas proporciones de peso estimulan la producción de mucina de diferentes tipos en diferentes sitios en el intestino óptimamente.

El oligosacárido es preferiblemente incluido en la composición presente según la invención en una cantidad que excede de 0,1% en peso, preferiblemente excede de 0,2% en peso, más preferiblemente excede de 0,5% en peso y aún más preferiblemente excede de 1% en peso basado en el peso seco total de la composición. La composición presente preferiblemente tiene un contenido de oligosacárido debajo del 20% en peso, más preferiblemente debajo del 10% en peso aún más preferiblemente debajo del 5% en peso.

La adición de nucleótidos y/o nucleósidos a la composición presente mejora aún más la función de la barrera mucosa intestinal, particularmente porque inhibe y/o reduce la incidencia de la translocación bacteriana y reduce la lesión intestinal. Por lo tanto, la composición presente preferiblemente también comprende entre 1 y 500 mg de nucleósidos y/o nucleótidos por 100 gramos de la fórmula seca, aún más preferiblemente entre 5 y 100 mg.

Aplicación

La composición presente puede ser usada ventajosamente para mejorar la integridad de la barrera en mamíferos, particularmente seres humanos. La composición presente puede también ser usada ventajosamente para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas a la integridad de la barrera reducida. La composición presente es preferiblemente administrada oralmente.

Para los enfermos y los niños, la composición presente es preferiblemente combinada con la nutrición completa, incluyendo proteína, carbohidrato y grasa. La composición presente es ventajosamente administrada a niños de la edad de entre 0 y 2 años. La composición puede ser administrada a pacientes que sufren de un deterioro de la integridad de la barrera y pacientes sanos. La composición presente es ventajosamente usada en un método para proporcionar las necesidades nutricionales de un niño prematuro (un niño nacido antes de 37 semanas de gestación).

La composición presente puede también ser ventajosamente usada para el tratamiento y/o la prevención del daño intestinal por la administración de la composición presente al paciente antes de o después de un tratamiento médico que puede causar un daño intestinal. El tratamiento médico de este tipo puede por ejemplo ser la cirugía o el tratamiento de medicina enteral (p. ej., antibióticos, analgésicos, NSAID, agentes quimioterapéuticos etc).

La composición presente puede también ser ventajosamente usada para tratar o prevenir enfermedades donde la alteración de la barrera intestinal está subyacente en el desarrollo del curso de la enfermedad, p. ej. en el tratamiento o la prevención de enfermedades crónicas inflamatorias, particularmente la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), el síndrome de intestino irritable (IBS), la enfermedad celíaca, la pancreatitis, la hepatitis, la artritis o la diabetes. Además, la invención puede ser usada para suministrar la nutrición a pacientes que han sido sometidos en van a ser sometidos a una cirugía abdominal y pacientes que sufren de una disfunción postoperatoria del intestino y/o pacientes desnutridos.

En una forma de realización de la invención la composición presente es ventajosamente administrada a pacientes que sufren del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y/o pacientes que están infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), p. ej. en el tratamiento de una infección de SIDA y/o de VIH. Dicho tratamiento comprende la administración oral de la composición presente, preferiblemente combinada con nutrientes seleccionados del grupo que consiste en carbohidrato, proteína y grasa. Las composiciones según la invención son particularmente útiles para pacientes con un recuento de células CD4⁺ T que está debajo del nivel crítico de alrededor de 700 células/ μ l de sangre, cuando una Terapia Antirretroviral Altamente Activa (HAART) ya no es necesaria, pero cuando los pacientes ya corren el riesgo de desarrollar o incluso sufrir de uno o más problemas que pueden ser relacionados con la integridad de la barrera intestinal, en particular la disfunción de la integridad de la barrera intestinal. Por lo tanto, en otro aspecto la presente invención ayuda a parar o desacelerar la reducción en el recuento de células CD4⁺ T o a mejorar el recuento de células CD4⁺ T en pacientes que sufren de VIH y/o SIDA. En una forma de realización la invención comprende la administración de la composición presente a un paciente, dicho paciente siendo un sujeto humano que tiene un recuento de células CD4⁺ linfocitos T de entre 200 y 700 células/ μ l de sangre. En aún otra forma de realización la invención comprende la administración de la composición presente a un paciente, dicho paciente no estando tratado por la terapia antiretroviral altamente activa. En una forma de realización particular el paciente tiene un recuento de células de CD4⁺ linfocitos T de entre 200 y 700 células/ μ l de sangre y no está siendo tratado por la Terapia Antirretroviral Altamente Activa.

Además, la invención puede también ser usada para tratar o prevenir complicaciones que resultan de la integridad de la barrera reducida, particularmente en el tratamiento y/o la prevención de la diarrea, particularmente la diarrea infantil. Debido a la incidencia reducida en la diarrea infantil, la composición presente puede también ser ventajosamente usada para reducir la dermatitis del pañal.

La administración de la composición presente reduce el paso de antígenos dietéticos y microbianos, particularmente alérgenos alimentarios, desde el lumen intestinal hasta la circulación mucosa o sistémica, y por lo tanto puede ser ventajosamente usada en el tratamiento o la prevención de alergia y/o reacción alérgica, particularmente en el tratamiento o la prevención de alergia alimentaria, p. ej. una reacción alérgica que resulte de la ingestión de productos alimenticios.

Fue también descubierto por los inventores presentes que EPA, DHA y/o ARA son capaces de reducir los efectos de IL-4 en la permeabilidad intestinal. Por lo tanto, la composición presente puede ser usada para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades donde la concentración intestinal de IL-4 es aumentada (p. ej. enfermedades alérgicas), tal como la dermatitis atópica. La composición presente es preferiblemente proporcionada como un polvo envasado o una fórmula envasada lista para el consumo. Para prevenir la alteración del producto, el tamaño de envases de la fórmula lista para el consumo preferiblemente no excede de una porción, p. ej. preferiblemente no excede de 500 ml; y el tamaño de envases de la composición presente en forma de polvo preferiblemente no excede de 250 porciones. Tamaños de envases adecuados para el polvo son 2000 gramos o menos, preferiblemente por 1000 gramos o menos.

Los productos envasados provistos de etiquetas que dirigen al consumidor explícitamente o implícitamente hacia el uso de dicho producto conforme a uno o más de los objetivos anteriores o siguientes están abarcados por la presente invención. Etiquetas de este tipo pueden por ejemplo hacer referencia al método presente para prevenir la reacción alérgica a los alérgenos alimentarios por incluir frases como “sensibilidad a alimentos reducida”, “mejorando la to-

lerabilidad intestinal”, “tolerancia a alimentos mejorada” o frases similares. De forma similar, referencia al método presente para tratar y/o prevenir alergia puede ser hecha por incorporar la terminología equivalente a “resistencia mejorada” o “sensibilidad reducida”.

5 Fórmulas

Se descubrió que la composición presente podía ser ventajosamente aplicada en alimentos, tal como alimentos infantiles y alimentos clínicos. Alimentos de este tipo preferiblemente comprenden lípidos, proteína y carbohidrato y son preferiblemente administrados en forma líquida. El término “alimentos líquidos” como usado en la presente invención incluye alimentos secos (p. ej. polvos), que se acompañan con instrucciones en cuanto a mezclar dicha mezcla de alimentos secos con un líquido adecuado (p. ej. agua).

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición nutritiva que preferiblemente comprende entre 5 y 50 en % de lípidos, entre 5 y 50 en % de proteína, entre 15 y 90 en % de carbohidrato y la combinación presente de oligosacáridos y LC-PUFA's. Preferiblemente la composición nutritiva presente preferiblemente contiene entre 10 y 30 en % de lípidos, entre 7,5 y 40 en % de proteína y entre 25 y 75 en % de carbohidrato (en% es el porcentaje de energía de forma abreviada y representa la cantidad relativa que cada constituyente contribuye al valor calórico total de la preparación).

Preferiblemente se usa una combinación de lípidos vegetales y al menos un aceite seleccionado del grupo que consiste en aceite de pescado y aceite vegetal omega-3, de algas o bacteriano.

Las proteínas usadas en la preparación nutritiva son preferiblemente seleccionadas del grupo de proteínas no humanas de animal (tales como proteínas lácteas, proteínas cárnicas y proteínas de huevo), proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz, y proteína de guisante), aminoácidos libres y sus mezclas. Fuente de nitrógeno derivada de leche de vaca, particularmente proteínas de proteínas de la leche de vaca tales como caseína y proteínas de suero de leche son particularmente preferidas.

Irregularidades intestinales (p. ej. heces duras, volumen de las heces insuficiente, diarrea) es un problema más importante en muchos bebés y sujetos enfermos que reciben alimentos líquidos. Se descubrió que los problemas de heces pueden ser reducidos administrando los oligosacáridos presentes en alimentos líquidos que tienen una osmolalidad de entre 50 y 500 mOsm/kg, más preferiblemente de entre 100 y 400 mOsm/kg.

En vista de lo anterior, también es importante que los alimentos líquidos no tengan una densidad calórica excesiva, no obstante todavía proporcionen suficientes calorías para alimentar al sujeto. Por lo tanto, los alimentos líquidos preferiblemente tienen una densidad calórica de entre 0,1 y 2,5 kcal/ml, aún más preferiblemente una densidad calórica de entre 0,5 y 1,5 kcal/ml, lo más preferiblemente de entre 0,6 y 0,8 kcal/ml.

Ejemplos

Ejemplo 1

Efecto del LC-PUFA en la integridad de la barrera

Monocapas (MC) de líneas de células epiteliales intestinales T84 (Colección de Cultivos Tipo Americana (ATTC), Manassas, EEUU) fueron cultivadas en filtros transwell (Corning, Costar BV, los Países Bajos) permitiendo tanto el muestreo mucosal como el muestreo serosal y la estimulación de células epiteliales intestinales humanas. Dos semanas posteriores a la confluencia las monocapas fueron incubadas en el compartimiento luminal con ácidos grasos poliinsaturados ARA (ácido araquidónico; 5,8,11,14-ácido eicosatetraenoico), DHA (cis-4,7,10,13,16,19 ácido docosahexaenoico), EPA (ácido eicosapentanoico) o control palmítico (C 16:0) ácido (Palm) (Sigma, St. Louis, EEUU). Éste último procedimiento fue elegido para imitar la vía de administración *in vivo* de los compuestos dietéticos. Células fueron incubadas con ARA, DHA, EPA, GLA o ácido palmítico durante 0, 24, 48 y 72 horas a concentraciones diferentes (10 μ M y 100 μ M). Experimentos fueron realizados para evaluar la integridad de la barrera basal. La función de la barrera epitelial fue determinada midiendo la resistencia transepitelial (TER, $\Omega \cdot \text{cm}^2$) fue medida por un medidor epitelial de voltio-ohmio (EVOM; World Precisión Instruments, Alemania) y la permeabilidad para el FITC - dextrano de 4 kD (marcador de la permeabilidad paracelular, Sigma, EEUU). La resistencia (permeabilidad epitelial para el FITC-dextrano de 4 kDa fue determinada de la siguiente manera. Antes de los flujos de dextrano el medio fue refrescado con un medio de cultivo sin fenol rojo durante una hora seguido de la adición de 5 μ l (stock 100 mg/ml) FITC-dextrano de 4 kDa al compartimiento lumenal. Después de 30 min de incubación una muestra de 100 μ l fue recogida del compartimiento serosal y la señal fluorescente medida a la longitud de onda de excitación de 485 nm y la emisión de 520 nm (FLUOstar Galaxy[®], BMG Labtechnologies, EEUU). Flujos de FITC-dextrano fueron calculados como pmol pmol FITC-dextrano/cm². Análisis estadísticos fueron realizados usando el ANOVA (SPSS versión 10). Los resultados del efecto de ácidos grasos (100 μ M) en la integridad de la barrera espontánea después de 72 horas de incubación se dan en la tabla 1. La tabla 1 muestra que los LC-PUFA's ARA, EPA, GLA y DHA reducen el flujo molecular y mejoran la resistencia epitelial. Por el contrario los experimentos de control muestran que el ácido palmítico tiene los efectos opuestos, es decir compromete a la integridad de la barrera. Estos resultados son indicativos para el uso ventajoso de EPA, DHA, GLA y ARA, y particularmente ARA en la composición según la presente invención y para el uso en un método según la presente invención, p. ej. en un método para mejorar la integridad de la barrera.

Estos resultados apoyan más los efectos sinérgicos de la combinación presente de ácidos grasos y oligosacáridos indigeribles. La figura 1 muestra los efectos dependientes del tiempo y de la dosis (10 μ M y 100 μ M) de diferentes ácidos grasos (ácido palmítico, DHA, GLA, y AA) en la integridad de la barrera basal (TER). La figura 1 muestra que los LC-PUFA's AA, DHA, y GLA, mejoran la integridad de la barrera epitelial como reflejado por la resistencia aumentada (TER). Estos resultados son indicativos para el uso ventajoso de EPA, DHA, GLA y ARA, particularmente ARA, en la composición según la presente invención y para mejorar la integridad de la barrera. Estos resultados apoyan más los efectos sinérgicos de la combinación presente de ácidos grasos y oligosacáridos indigeribles.

TABLA 1

<u>Ingrediente (LC-PUFA)</u>	<u>Flujo</u>	<u>Resistencia (TER)</u>
Control	79	1090
Ácido Palmítico	161	831
DHA	72	1574
ARA	28	1816
EPA	65	1493

Ejemplo 2

Efecto de LC-PUFA en la alteración de la barrera mediada IL-4

Monocapas (MC) de líneas de células epiteliales intestinales T84 (ATCC, EEUU) fueron cultivadas en filtros transwell (Corning, Costar BV, Países Bajos) permitiendo tanto el muestreo mucosa como el muestreo serosal y la estimulación de las células epiteliales intestinales humanas. Dos semanas posteriores a la confluencia las monocapas fueron incubadas en presencia de IL-4 (2 ng/ml, compartimento serosal, Sigma, EEUU) con o sin ácidos grasos poliinsaturados ARA, DHA, GLA, EPA, o ácido palmítico de control (10 μ M o 100 μ M, compartimento mucosa, Sigma, St. Louis, EEUU). Las células fueron preincubadas con GLA, ARA, DHA, EPA, o ácido palmítico durante 48 horas antes de la incubación de IL-4. La coincubación de PUFA's y ácido palmítico con IL-4 fue continuada durante 48 horas más; mientras el medio de cultivo y los aditivos fueron cambiados cada 24 horas. La función de la barrera epitelial fue determinada midiendo la resistencia transepitelial (TER) y la permeabilidad como se describe en el ejemplo 1. La evaluación estadística fue realizada como se describe en el ejemplo 1. Resultados del efecto de GLA, ARA, DHA, EPA y ácido palmítico (100 μ M) en la alteración de la barrera mediada IL-4 se dan en la tabla 2. La tabla 2 muestra que los LC-PUFA's GLA, ARA, DHA y EPA inhiben el flujo aumentado causado por IL-4. Por el contrario el ácido palmítico tuvo un efecto perjudicial y redujo la alteración de la barrera en comparación con el control. Estos resultados son indicativos para el uso ventajoso de GLA, ARA, DHA, y EPA en formulaciones de la nutrición clínica e infantil para prevenir o reducir la alteración de la barrera mediada IL-4, p. ej. como ocurre en la alergia a alimentos o a la leche de vacas. Estos resultados apoyan más los efectos sinérgicos de la combinación presente de ácidos grasos y oligosacáridos indigeribles.

La figura 2 da los efectos protectores dependientes del tiempo y de la dosis (10 μ M y 100 μ M) de diferentes FA's (ácido palmítico, DHA, GLA, y ARA) en (el flujo de) la destrucción de la barrera mediada IL-4. La figura 2 muestra que ARA, DHA y GLA protegen contra la alteración de la barrera mediada IL-4 como reflejado por el flujo de dextrano disminuido 4 kD. Estos resultados son indicativos para el uso ventajoso de GLA, ARA, DHA y EPA en las formulaciones de nutrición clínica e infantil para prevenir o reducir la alteración de la barrera mediada IL-4, p. ej. como ocurre en la alergia a los alimentos o a la leche de vacas. Estos resultados apoyan más los efectos sinérgicos de la combinación presente de ácidos grasos y oligosacáridos indigeribles.

TABLA 2

Ingrediente (PUFA)	Permeabilidad (IL-4 Flujo)	Resistencia (IL-4 TER)
Control	573	281
GLA	360 ↓	331 ↑
ARA	273 ↓	337 ↑
EPA	236 ↓	375 ↑
DHA	304 ↓	328 ↑
↓ = la permeabilidad reducida por PUFA; ↑ = la resistencia mejorada por PUFA		

Ejemplo 3

Efecto de los oligosacáridos en la producción de acetato

Microorganismos fueron obtenidos de heces frescas de bebés alimentados a biberón. La materia fecal fresca de bebés de edad que varía entre 1 y 4 meses fue agrupada y puesta en un medio conservante dentro de 2 h. Como sustrato fueron usados o bien prebióticos (TOS; TOS/inulina (HP) mezcla en una proporción de 9/1 (p/p); inulina; mezcla de oligofructosa(OS)/inulina en una proporción de 1/1 (p/p), o ninguno (blanco). Los transgalactooligosacáridos (TOS) fueron obtenidos de Vivinal GOS, Borculo Domo Ingredients, Zwolle, The Netherlands y comprenden como oligosacáridos indigeribles: 33% en peso disacáridos, 39% en peso trisacáridos, 18% en peso tetrasacáridos, 7% en peso pentasacáridos y 3% en peso hexa-, hepta- y octasacáridos. La inulina (HP) de Orafiti active food ingredients, Tienen, Bélgica, es decir Raftiline HP®, con un promedio DP de 23. *Media*: el medio McBain & MacFarlane: agua de peptona tamponada 3,0 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l, mucina (borde en cepillo) 0,8 g/l, triptona 3,0 g/l, L-Cisteína HCl 0,4 g/l, sales de bilis 0,05 g/l, K₂HPO₄·3H₂O 2,6 g/l, NaHCO₃ 0,2 g/l, NaCl 4,5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,5 g/l, CaCl₂ 0,228 g/l, FeSO₄·7H₂O 0,005 g/l. Llenan 500 ml de Scott botellas con el medio y esterilizado 15 minutos a 121°C. *Medio tamponado*: K₂HPO₄·3H₂O 2,6 g/l, NaHCO₃ 0,2 g/l, NaCl 4,5 g/l, MgSO₄·7H₂O, 0,5 g/l, CaCl₂ 0,228 g/l, FeSO₄·7H₂O 0,005 g/l. Ajustan a pH 6.3 ± 0.1 con K₂HPO₄ o NaHCO₃. Llenan las botellas Scott de 500 ml botellas con el medio y esterilizado 15 minutos a 121°C. *Medio de conservación*: peptona tamponada 20,0 g/l, L-Cisteína HCl 0,5 g/l, tioglicolato de sodio 0,5 g/l, pastilla de resazurina 1 por litro, ajustan a pH 6.7 ± 0.1 con 1 M NaOH o HCl. Hervido en microondas. Las botellas de suero fueron llenadas de 25 ml del medio y esterilizadas durante 15 minutos a 121°C. Las muestras fecales frescas fueron mezcladas con el medio de conservación y almacenadas durante varias horas a 4°C. La solución conservada de heces fue centrifugada a 13.000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante fue eliminado y las heces fueron mezcladas con el medio de McBain & Mac Farlane en una proporción de peso de 1:5. De esta suspensión fecal 3 ml fueron combinados con 85 mg de glucosa o prebiótico o sin ninguna adición (blanco) en una botella y mezclados íntegramente. Una muestra de t=0 fue retirada (0,5 ml). 2,5 ml de la suspensión resultante se porta en un tubo de diálisis en una botella de 60 ml llena de 60 ml del medio tamponado. La botella fue cerrada bien e incubada a 37°C. Muestras fueron tomadas del tubo de diálisis (0,2 ml) o del tampón de diálisis (1,0 ml) con una jeringa hipodérmica después de 3, 24, y 48 horas e inmediatamente fueron puestas en hielo para detener la fermentación. El experimento se efectuó usando las muestras siguientes:

- 1) 85 mg de TOS
- 2) 85 mg de inulina
- 3) 85 mg de TOS/inulina en una proporción de 9/1 (p/p) y
- 4) 85 mg de OS/inulina en una proporción de 1/1 (p/p).

SCFA (acetato, propionato, butirato) fueron cuantificados usando un cromatógrafo de gas Varían 3800 (GC) (Varían Inc., Walnut Creek, E.E.U.U.) equipado con un detector de ionización de llamas. 0,5 µl de la muestra fueron inyectados a 80°C en la columna (Stabilwax, 15 x 0,53 mm, espesor de recubrimiento 1.00 µM, Restek Co., E.E.U.U.) usando helio como un gas portador (3.0 psi). Después de la inyección de la muestra, el horno fue calentado a 160°C a una velocidad de 16°C/min, seguido por el calentamiento a 220°C a una velocidad de 20°C/min y finalmente mantenido a 220°C durante 1,5 minutos. La temperatura del inyector y detector era de 200°C. El ácido 2-etilbutírico fue usado como un estándar interno.

La figura 3 representa el perfil de SCFA absoluto (figura 3A) y relativo (figura 3B) que resultan de la fermentación de los diferentes oligosacáridos. La figura 3A muestra que una mezcla de dos oligosacáridos diferentes (TOS/Inulina), donde los dos oligosacáridos distintos tienen una homología en unidades de monosa debajo de 90 y una longitud de cadena diferente resulta en una cantidad de SCFA significativamente y sinérgicamente aumentada (particularmente acetato) por gramo de fibra que componentes individuales. La figura 3B muestra que la adición de una combinación de TOS/Inulina ha favorecido una proporción más elevada del acetato provechoso (B). La producción de acetato *in vivo* se traduce en la producción de moco mejorada por las células caliciformes y una medida para el espesor de la capa de moco intestinal (véase ejemplo 4). Estos resultados son indicativos para el uso ventajoso de la composición presente.

Ejemplo 4

Efectos del SCFA en la producción de moco

Monocapas de células epiteliales intestinales T84 (ATCC, EEUU) fueron cultivadas en placas de 24 o 96 pocillos para cultivo de tejidos (Corning B.V.). Los T84 fueron incubados con el acetato de ácidos grasos de cadena corta, el propionato y el butirato (SCFA, Merck, EEUU) durante 24 horas en una gama de concentración de 0,025-4.0 mM. Los sobrenadantes y/o células fueron recogidos y la expresión de MUC-2 (mucina) determinada. Una técnica de dot blot fue usada para determinar la expresión de MUC-2 en los cultivos de células, porque mucinas son glicoproteínas extremadamente grandes (superior a 500 kDa) lo que las hace difíciles de manejar en las técnicas Western blotting. El método fue validado usando un suero preinmunológico (T84 manchado negativo), CCD-18Co (ATCC, EEUU) células de control negativas y albúmina de suero bovino (BSA). Muestras de células fueron recogidas en Laemmli (tampón de aislamiento de proteína) y la determinación de proteína fue realizada usando un ensayo de microproteína (Biorad, EEUU) según el protocolo de fabricantes. Las muestras (0,3-0,7-1,0 $\mu\text{g}/2\ \mu\text{l}$) fueron punteadas en membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Alemania). Las membranas fueron bloqueadas en TBST/5% Protivar (Nutricia, Países Bajos) seguido por 1 hora de incubación con un anticuerpo anti-MUC-2 (gentilmente donado por Dr. Einerhand, Erasmus Universidad, Rotterdam, Países Bajos). Después de lavar, las manchas fueron incubadas con cabra anti-conejo-HRP (Santacruz Biotechnology, EEUU) y para la detección del sustrato fue usado ECL (Roche Diagnostics, Países Bajos). La densitometría fue realizada usando el Lumi-Imager (Boehringer Mannheim B.V., Países Bajos) y la señal fue expresada en unidades de luz (BLU). BLU's fueron también expresadas en relación al control de las incubaciones (%BLU). Para comparar el efecto estimulador de SCFA en la expresión MUC-2 se dedujeron basales niveles de expresión MUC-2. La figura 4 muestra los efectos diferenciales de SCFA (acetato, propionato, butirato) en la expresión MUC-2 en células intestinales epiteliales (MC T84) y cocultivos de células mesenquimales epiteliales (CC T84). La figura 4 también muestra que el acetato es más potente en estimular la expresión MUC-2 (producción de moco) en comparación con el propionato y el butirato. Por lo tanto, la combinación presente de oligosacáridos (que fue mostrada para aumentar la producción de acetato (véase ejemplo 3)) es particularmente útil para estimular la producción de moco y puede ser ventajosamente usada en un método para estimular la integridad de la barrera.

Ejemplo 5

Fórmula de leche infantil I

Ingredientes (por litro), energía 672 kcal; proteína 15 g; lactosuero: proporción de caseína 60:40; grasa 36 g; carbohidrato 72 g; vitamina A 750 RE; carótidas mezcladas naturales 400 UI; vitamina D 10,6 mcg; vitamina F 7,4 mg; vitamina K 67,0 mcg; vitamina B.sub.1 (tiamina) 1000 mcg; vitamina B.sub.2 (riboflavina) 1500 mcg; vitamina B.sub.6 (piridoxina) 600 mcg; vitamina B.sub.12 (cianocobalamina) 2,0 mcg; niacina 9,0 mcg; ácido fólico 80 mcg; ácido pantoténico 3000 mcg; biotina 90 mcg; vitamina C (ácido ascórbico) 90 mg; colina 100 mg; inositol 33 mg; calcio 460 mg; fósforo 333 mg; magnesio 64 mg; hierro 8,0 mg; zinc 6.0 mg; manganeso 50 mcg; cobre 560 mcg; yodina 100 mcg; sodio 160 mg; potasio 650 mg; cloruro 433 mg y selenio 14 mcg; donde el contenido de la grasa proporcionado incluye 3 gramos de aceite de pescado y 3 gramos de aceite de ácido araquidónico 40% (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos); comprendiendo además 4 gramos de transgalactooligosacáridos Elix'or™ (Borculo Domo Ingredients, Países Bajos) y 4 gramos de Raftiline™ (Orafti Active Food Ingredients, Bélgica).

ES 2 336 015 T3

Ejemplo 6

Composición de una barra nutritiva para la mejora de síntomas relacionados con VIH/SIDA

5	Materia prima	g/ día	Proteínas	carb	grasa	g/ 100g
	Proteína de leche	20,00	15,00	2,10	0,80	21,04
10	Proteína de huevo	21,09	16,87	0,00	0,00	22,19
	Aceite de borraja	4,00	0,00	0,00	4,00	4,21
15	Aceite de EPA-DHA	6,00	0,00	0,00	6,00	6,31
20	Galacto- oligosacáridos	15,38	0,00	4,78	0,00	16,18
	Inulina	0,79	0,00	0,00	0,00	0,83
25	Hidrol de pectina	8,54	0,11	0,09	0,00	8,98
	Fructosastrop	15,40	0,00	11,92	0,00	16,20
30	Glicerina	3,85	0,00	3,83	0,00	4,05
35	SUMA	95,05	31,98	22,72	10,80	100,00
40				Kcal por día	En %	Kcal por 100 g
	Proteína energética		128		40,5	135
	carbohidratos energéticos		91		28,8	96
45	grasa energética		97		30,8	102

Referencias citadas en la descripción

50 *Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.*

Patentes citadas en la descripción

- 55
- EP 1272058 A [0003]
 - EP 745001 A [0004]
 - 60 • WO 0160378 A [0036]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- 65
- Usami *et al. Clinical Nutrition*, 2001, vol. 20 (4), 351-359 [0005] [0008]
 - Kleessen *et al. Brit J Nutr*, 2003, vol. 89, 597-606 [0030]

ES 2 336 015 T3

- **Meslin** *et al. Brit. J. Nutr.*, 1993, vol. 69, 903-912 [0030]
- **Barcelo** *et al. Gut*, 2000, vol. 46, 218-224 [0035]

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

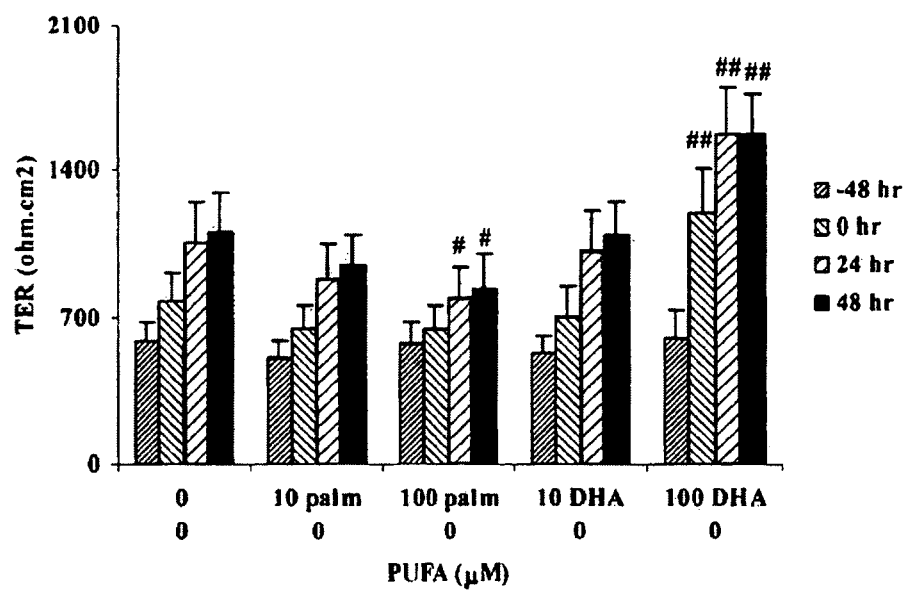
65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de ácidos grasos poliinsaturados para la producción de una composición para el tratamiento de un paciente infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), comprendiendo dicha composición:
- 10 a. ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (ARA), donde el contenido de ácido graso poliinsaturado de cadena larga con 20 y 22 átomos de carbono es al menos 15% en peso y no excede del 85% en peso del contenido de grasa total; y
- 10 b. al menos dos oligosacáridos distintos (OL1 y OL2), donde los dos oligosacáridos distintos tienen una homología en unidades de monosa debajo del 90%.
- 15 2. Uso según la reivindicación 1 donde la composición además comprende ácido gama-linolénico (GLA).
- 15 3. Composición nutritiva que comprende:
- 20 a. EPA, DHA y ARA, donde el contenido de ácido graso poliinsaturado de cadena larga con 20 y 22 átomos de carbono es de al menos 15% en peso y no excede del 85% en peso del contenido de grasa total; y
- 20 b. al menos dos oligosacáridos distintos (OL1 y OL2), donde los dos oligosacáridos distintos tienen una homología en unidades de monosa debajo del 90%.
- 25 c. un oligosacárido ácido obtenido de pectina, pectato, alginato, condroitina, ácidos hialurónicos, heparina, heparana, sialoglicanos, fucoidano, fucooligosacáridos o carragenina, preferiblemente un polímero de ácido uránico con un DP de entre 2 y 60.
- 30 4. Composición según la reivindicación 3, que comprende galactooligosacárido y un fructano seleccionado del grupo que consiste en fructooligosacáridos, inulina y sus mezclas.
- 30 5. Composición según la reivindicación 3 ó 4, donde al menos el 10% en peso del oligosacárido tiene un grado de polimerización (DP) de 2 a 5 y al menos 5% en peso tiene un DP de entre 10 y 60.
- 35 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, que comprende de 7,5 a 12,5 porcentaje energético de proteína; de 40 a 55% carbohidratos; y de 35 a 50 porcentaje energético de grasa, donde dicha proteína comprende un elemento seleccionado del grupo que consiste en proteínas de leche hidrolizadas, proteína vegetal y/o aminoácidos.
- 40 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, teniendo dicha composición un contenido calórico de 0,6 a 0,8 kcal/ml; una osmolalidad de 50 a 500 mOsm/kg; y una viscosidad debajo de 50 mPas.
- 40 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-7, donde la composición además comprende GLA.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-8, para el uso como un medicamento.
- 45 10. Uso según la reivindicación 1, donde el paciente es un sujeto humano que tiene un recuento de células de linfocitos CD4+T de entre 200 y 700 células/ μ l de sangre y donde dicho paciente no está tratado por Terapia antirretrovírica Altamente activa.
- 50 11. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3-9 para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de diarrea en un mamífero.

Fig 1a

Efecto de PUFA (n=3) sobre la integridad de la barrera basal (TER)

**Fig 1b**

Efecto de PUFA (n=3) sobre la integridad de la barrera basal (TER)

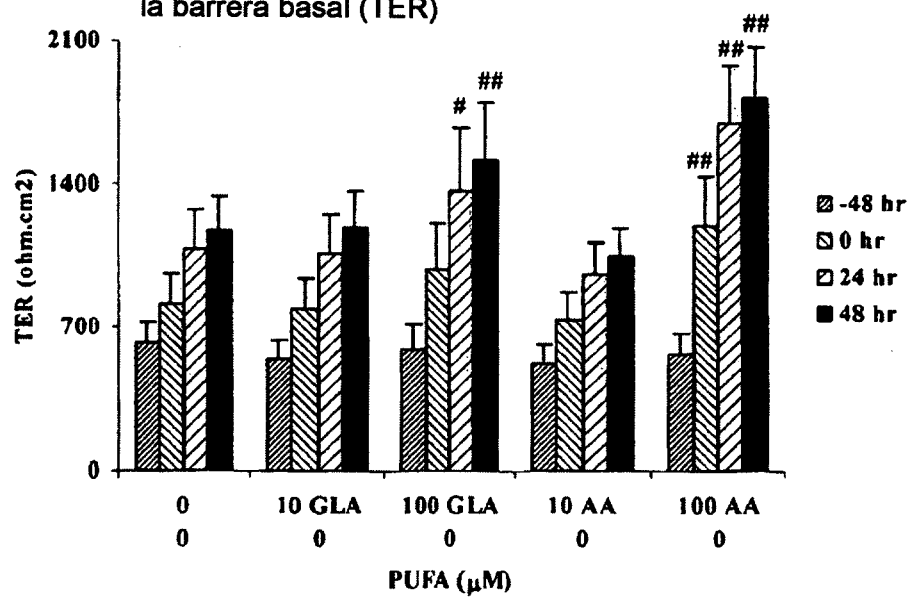


Fig 2a

Efecto de PUFA (n=3) sobre la alteración de la barrera mediada por IL-4 (flujo)

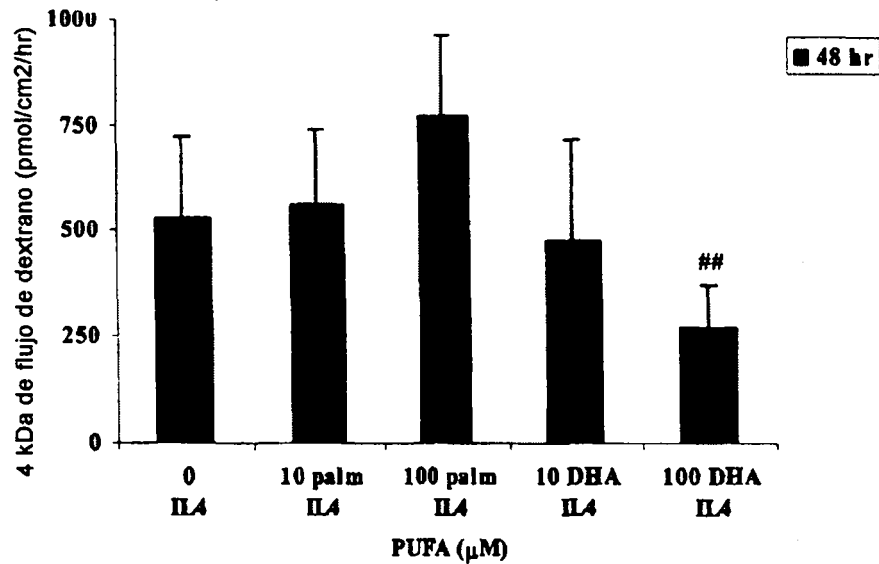


Fig 2b

Efecto de PUFA (n=3) sobre la alteración de la barrera mediada por IL-4

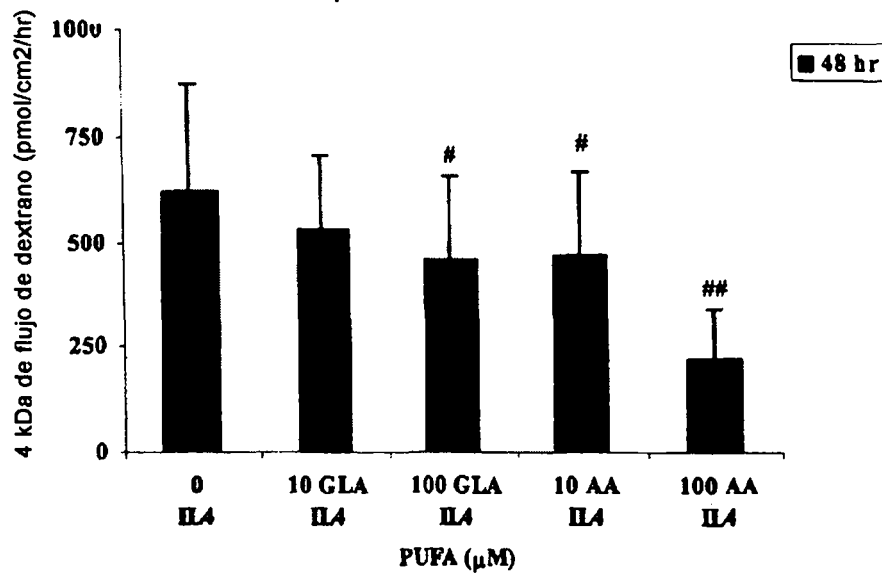


Fig 3a

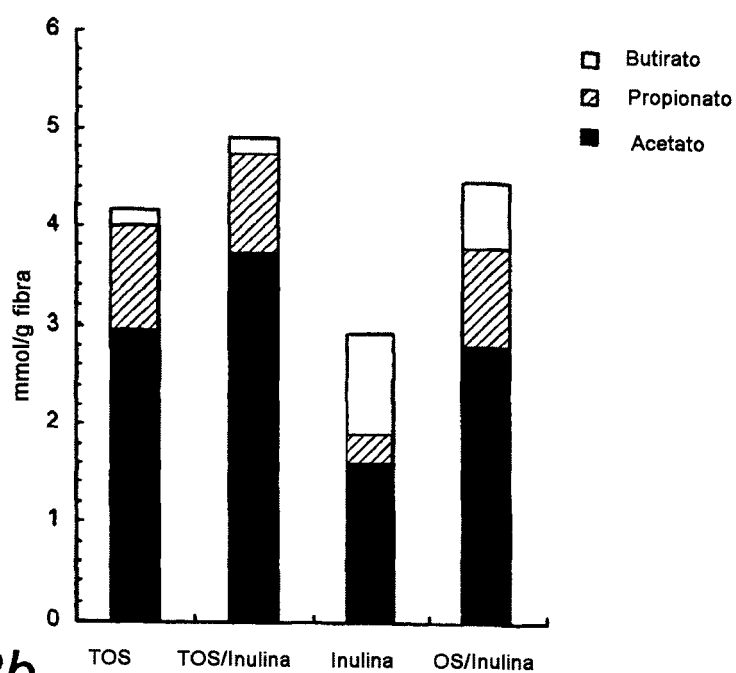


Fig 3b

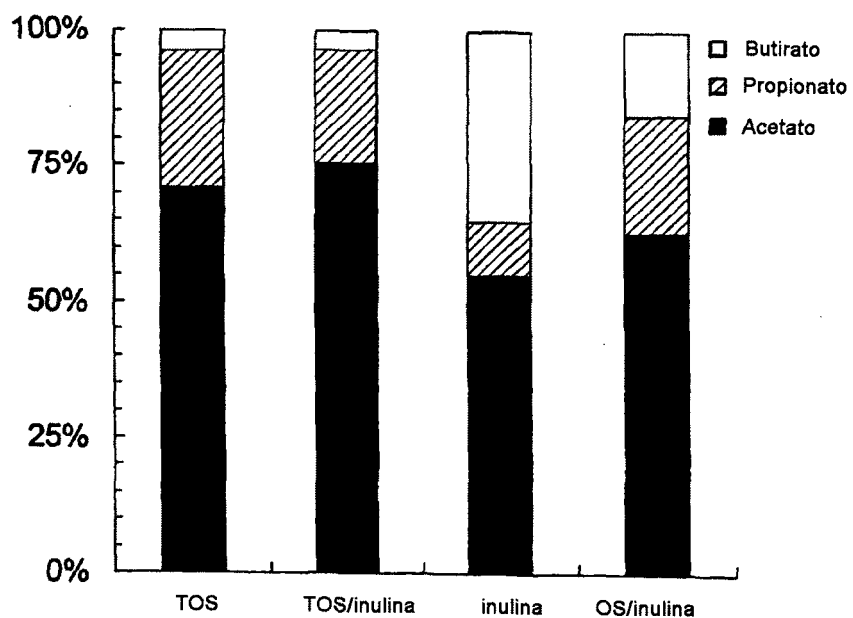


Fig 4

