

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 773**

51 Int. Cl.:

A61K 31/07 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 31/4415 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/593 (2006.01)
A61K 31/714 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2017 PCT/NL2017/050380**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017 WO17213504**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2017 E 17732600 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2023 EP 3468543**

54 Título: **Método para controlar la neuroinflamación**

30 Prioridad:
10.06.2016 WO PCT/NL2016/050419

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2024

73 Titular/es:
**N.V. NUTRICIA (100.0%)
 Eerste Stationsstraat 186
 2712 HM Zoetermeer, NL**

72 Inventor/es:
**LOPES DA SILVA, SOFIA;
 BROERSEN, LADISLAUS MARIA;
 HAGEMAN, ROBERT JOHAN JOSEPH y
 VERKUIJL, JAN MAARTEN**

74 Agente/Representante:
TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 966 773 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

Método para controlar la neuroinflamación

5 [0001] La invención pertenece al campo de la nutrición médica y, más particularmente, se refiere a composiciones para uso en el tratamiento o control y/o la prevención y/o reducción del riesgo de inflamación (crónica o excesiva) del sistema nervioso central (SNC).

10 **Antecedentes a la invención**

[0002] La neuroinflamación es una respuesta del sistema inmunitario innato del SNC, que está asociada a muchos trastornos, incluida la depresión, la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple (EM), la disfunción cognitiva postoperatoria (DCPO), la lesión de la médula espinal (LME), el complejo demencia-sida (CDS), la isquemia, el accidente cerebrovascular, la lesión cerebral traumática (LCT), la infección del cerebro o del sistema nervioso central o los tumores cerebrales. Se cree que las células de microglía son el principal tipo de célula importante implicada en la neuroinflamación. La microglía son las células inmunitarias innatas del sistema nervioso central, que actúan rápidamente sobre la neuroinflamación. Sin embargo, la activación prolongada de la microglía, como en la neuroinflamación crónica o aguda, causa daño al tejido cerebral y a la barrera hematoencefálica, lo que provoca trastornos neurodegenerativos.

[0003] El posible efecto de la dieta sobre la incidencia de enfermedades cerebrales en las que interviene la neuroinflamación lo exponen Lourida *et al.* (*Epidemiology*, 2013, 24, 479-489), Skarupski *et al.* (*J. Nutr. Health Aging*, 2013, 17, 441-445) y Jacka *et al.* (*Am. J. Psychiatry*, 2010, 167, 305-311). También se han investigado los posibles efectos protectores de nutrientes específicos, por ejemplo, para AGPICL n-3 (US 2003/0050341; Labrousse *et al.*, *PLoS One*, 2012, 7, e36861; Laye *et al.*, *OCL*, 2011, 18, 301-306; Lalancette-Hébert, *Stroke*, 2011, 42, 2903-2909) o para vitamina D (US 2012/0128711; Adzemovic *et al.*, *Exp. Neurol.* 2013, 249, 39-48; Amor, *CNS and Neurological Disorders*, 2010, 9, 524). Por ejemplo, se ha sugerido que el DHA proporciona un efecto profiláctico para reducir las consecuencias del accidente cerebrovascular isquémico (Lalancette-Hébert *Stroke*, 2011, 42, 2903-2909). La eficacia de la vitamina D en el tratamiento de la neuroinflamación inducida por la esclerosis múltiple se estudió en ratas jóvenes/adolescentes (Adzemovic *et al.*, *Exp. Neurol.* 2013, 249, 39-48).

[0004] Por otro lado, se ha sugerido que la vitamina A aumenta el contenido del receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) en cortezas cerebrales de ratas (Roberto de Oliveira, *An. Acad. Bras. Cienc.* 2015, 87(2 Supl.), 1361-1373). También se hace referencia al documento WO 2007/104030.

[0005] Por último, la uridina y la citidina, con la adición opcional de DHA, EPA, o DPA, pueden prevenir o reducir la aparición de demencia frontotemporal conductual (WO 2016/072842).

40 [0006] En la técnica existe una necesidad continua de mejorar el tratamiento y el control de la neuroinflamación.

Resumen de la invención

45 [0007] Sorprendentemente, los inventores descubrieron que una combinación de (i) vitamina A, (ii) vitamina D e (iii) DHA y EPA es eficaz para tratar (controlar) reducir y/o prevenir la neuroinflamación perjudicial. En comparación con los ingredientes individuales, la combinación reduce la activación de la microglía y trata, reduce o previene los síntomas asociados con la activación excesiva de la microglía, y reduce la secreción de citocinas inflamatorias. Se han observado reducciones sorprendentes utilizando la combinación incluso en dosificaciones en las que los componentes individuales no muestran ningún efecto. Por lo tanto, uno de los beneficios es que se pueden reducir las dosificaciones (por ejemplo, la dosis diaria) de los componentes individuales sin comprometer la efectividad terapéutica de la combinación según la invención.

50 [0008] En el contexto de la invención, los efectos logrados por los inventores se consideraron ventajosos para tratar terapéuticamente o prevenir la neuroinflamación que se considera perjudicial para la salud del sujeto, por lo que generalmente se denomina "neuroinflamación perjudicial". De este modo, la neuroinflamación se controla terapéuticamente para que no provoque daños a la salud del sujeto.

55 [0009] Estos hallazgos son particularmente relevantes para la neuroinflamación inducida por un accidente cerebrovascular o asociada a un accidente cerebrovascular. En una forma de realización preferida, las vitaminas A y D, incluidos sus equivalentes, y DHA y EPA, forman parte de una composición. Estos componentes (i), (ii) e (iii) están presentes en cantidades terapéuticamente eficaces.

60 [0010] Más en particular, se ha descubierto que la combinación o composición para uso según la invención para su uso tal y como se define en reivindicación 1 o 2 es sorprendentemente eficaz para reducir la liberación de NO e IL-6 de la microglía activada, lo que es una indicación directa de neuroinflamación reducida. Se descubrió que la combinación terapéutica de (i) vitamina A, (ii) vitamina D e (iii) DHA y EPA actúa sinérgicamente, lo que

proporciona una marcada reducción de la liberación de NO e IL-6, donde los componentes individuales en la misma concentración no mostraron dicha reducción. Se observó una clara tendencia a la reducción al evaluar la liberación de IL-6 y se descubrió una reducción significativa de la liberación de NO. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, los inventores creen que cada uno de los nutrientes individuales (i) vitamina A, (ii) vitamina D e (iii) DHA y EPA actúan sobre vías convergentes involucradas en la neuroinflamación, y la combinación produce un efecto sinérgico.

[0011] La invención se refiere a una composición para uso terapéutico en el tratamiento, la reducción y/o prevención de la neuroinflamación en un sujeto que lo necesita, donde dicha composición comprende cantidades terapéuticamente eficaces de (i) vitamina A, (ii) vitamina D e (iii) DHA y EPA. La invención también se refiere a una combinación de (i) vitamina A y/o equivalentes funcionales, (ii) vitamina D y/o equivalentes funcionales, e (iii) DHA y EPA, donde (i), (ii) e (iii) se encuentran en cantidades terapéuticamente eficaces, para uso terapéutico en el tratamiento, la reducción y/o prevención de la neuroinflamación en un sujeto que lo necesita. La combinación está preferiblemente comprendida en una composición y/o se administra en forma de composición. El tratamiento (profiláctico) implica preferiblemente reducir la activación de la microglía y/o reducir la secreción de citocinas inflamatorias, preferiblemente IL-6.

[0012] En una forma de realización preferida, la presente combinación o composición para su uso implica tratar, reducir y/o prevenir la neuroinflamación en un sujeto que lo necesita, preferiblemente tratar la neuroinflamación en un sujeto que lo necesita, particularmente la neuroinflamación en un sujeto que sufre un accidente cerebrovascular o que tiene un mayor riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular, incluidos los sujetos que tienen un mayor riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular recurrente.

Descripción detallada

[0013] Sorprendentemente, los inventores descubrieron que la combinación de vitamina A, vitamina D, EPA y DHA es eficaz para atenuar la liberación de NO de las células BV-2 estimuladas por LPS. En las células inmunitarias activadas, el NO se produce a partir de L-arginina mediante una reacción catalizada por iNOS. La expresión de iNOS es activada principalmente por el factor de transcripción NF-kappaB. Se ha demostrado que la producción excesiva de NO provoca un efecto neurotóxico. El NO media en la neurotoxicidad del glutamato y se ha demostrado que está presente en varias patologías cerebrales, incluidas las enfermedades neurodegenerativas. La capacidad de suprimir la liberación excesiva de NO por parte de las células inmunitarias activadas se utiliza ampliamente como indicador de la eficacia antiinflamatoria. Los inventores también descubrieron que la combinación de vitamina A, vitamina D, EPA y DHA es eficaz para atenuar la liberación de IL-6 de las células BV-2 estimuladas por LPS. Los niveles aumentados de IL-6 se han correlacionado con la gravedad de la enfermedad y se están desarrollando nuevas estrategias de tratamiento para enfermedades inflamatorias centradas en bloquear la señalización de IL-6.

Composición

[0014] La combinación o composición para su uso según la invención implica la administración de la composición según la invención. La composición según la invención se puede usar como un producto farmacéutico o un producto nutricional, preferiblemente la composición es un producto o suplemento nutricional.

[0015] En un aspecto, la composición según la invención se puede usar como un producto farmacéutico que comprende uno o más materiales portadores farmacéuticamente aceptables. Dicho producto puede contener las dosificaciones diarias definidas a continuación en una o más unidades de dosificación. La unidad de dosificación puede estar en forma líquida o en forma sólida, donde, en el último caso, la dosificación diaria puede proporcionarse mediante una o más unidades de dosificación sólidas, por ejemplo, en una o más cápsulas o en uno o más comprimidos. El producto farmacéutico, preferiblemente para aplicación por vía enteral, puede ser una formulación galénica sólida o líquida. Los ejemplos de formulaciones galénicas sólidas son comprimidos, cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda), píldoras, sobres, polvos, gránulos y similares que contienen los ingredientes activos junto con portadores galénicos convencionales. Se puede utilizar cualquier material portador convencional. El material portador puede ser un material portador inerte orgánico o inorgánico adecuado para la administración por vía oral. Los portadores adecuados incluyen agua, gelatina, goma arábiga, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales y similares. Además, se pueden añadir aditivos, tales como agentes aromatizantes, conservantes, estabilizadores, agentes emulsionantes, tampones y similares de acuerdo con las prácticas aceptadas de combinación farmacéutica. Si bien los ingredientes activos individuales se administran adecuadamente en una única composición, también se pueden administrar en unidades de dosificación individuales.

[0016] En un aspecto preferido, la composición según la invención puede ser (usarse como) un producto nutricional, por ejemplo, un suplemento nutricional, que puede ser (puede usarse como), por ejemplo, un aditivo para una dieta normal, un fortificante o una nutrición completa. El producto nutricional comprende preferiblemente al menos un componente, preferiblemente todos los componentes, seleccionados del grupo que consta de grasas, proteínas y carbohidratos. Se entiende que un producto nutricional se diferencia de un

producto farmacéutico por la presencia de nutrientes que proporcionan nutrición al sujeto al que se le administra la composición, en particular la presencia de proteína, grasas, carbohidratos digeribles y/o fibra dietética.

[0017] En una forma de realización, el producto comprende, además, carbohidratos y/o proteínas, donde la fracción lipídica proporciona entre el 10 y el 95 % de energía del producto alimenticio, preferiblemente entre el 20 y el 50 % de energía, más preferiblemente entre el 20 y el 45 % de energía, incluso más preferiblemente entre el 25 y el 45 % de energía, de la manera más preferible, entre el 30 y el 40 % de energía. En una forma de realización, el producto alimenticio es una composición líquida que contiene más de 0,5 kcal por ml, preferiblemente más de 0,8 kcal por ml, preferiblemente 1,0 kcal por ml o más o 1,5 kcal por ml o más, o incluso 2 kcal por ml o más. En una forma de realización, el producto alimenticio es una composición líquida que contiene entre 0,5 kcal por ml y 2,5 kcal, preferiblemente entre 0,5 kcal por ml y 2,5 kcal.

[0018] La composición de la invención suele ser una composición enteral, es decir, está destinada a la administración oral. Preferiblemente, se administra en forma líquida. Preferiblemente, la composición comprende agua en la que están disueltos y/o suspendidos los componentes.

[0019] La composición es preferiblemente un líquido. Alternativamente, la composición es un sólido (normalmente un polvo o un comprimido, preferiblemente un polvo) que posiblemente sea reconstituible con un líquido, preferiblemente con agua, para obtener una composición líquida.

[0020] Las dosificaciones de los componentes definidos en ella pueden ser, por ejemplo, en dosis diaria o en una concentración por 100 ml. La última definición también se aplica a los polvos para reconstitución, en cuyo caso estas cantidades deben determinarse después de la reconstitución con el líquido.

Vitamina A

[0021] La presente composición o combinación para uso tal y como se define en la reivindicación 1 o 2 implica (i) vitamina A, incluidos los equivalentes funcionales de la misma. Cualquier forma funcional de vitamina A conocida en la técnica es adecuada para su uso, incluidos retinol (en particular ésteres de retinol), retinal, ácido retinoico, betacaroteno, provitamina A o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, la composición comprende retinol, en particular acetato de retinilo y/o palmitato de retinilo.

[0022] La vitamina A se administra ventajosamente en una dosis diaria de 0,05 - 3 mg/día, preferiblemente de 0,1 - 2,5 mg/día, más preferiblemente de 0,1 - 2 mg/día, incluso más preferiblemente de 0,5 - 1,5 mg/día, o de 0,1 - 1 mg/día, incluso más preferiblemente de 0,2 - 0,8 mg/día, de la manera más preferible, de 0,2 - 0,5 mg/día. Las dosis se administran en base a los equivalentes de actividad de retinol (EAR), en particular para adultos, y el experto es capaz de determinar la dosis para niños. Además, el experto es capaz de determinar la dosis de un equivalente de retinol. El equivalente de actividad de retinol se define normalmente como 1 microgramo de EAR equivalente a 1 microgramo de retinol o 12 microgramos de betacaroteno. La cantidad de vitamina A en la composición o combinación según la invención es preferiblemente tal que se obtengan las dosis diarias mencionadas anteriormente. Dicho contenido de vitamina A es especialmente adecuado para conseguir los efectos según la invención ingiriendo cantidades relativamente bajas de la composición. La vitamina A se utiliza normalmente en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Vitamina D

[0023] La presente composición o combinación para uso tal y como se define en la reivindicación 1 o 2 implica (ii) vitamina D, incluidos los equivalentes funcionales de la misma. La vitamina D es un grupo de secoesteroides liposolubles responsables de mejorar la absorción intestinal de calcio, hierro, magnesio, fosfato y zinc. En los seres humanos, los compuestos más importantes de este grupo son la vitamina D3 (también conocida como colecalciferol) y la vitamina D2 (ergocalciferol). El colecalciferol y el ergocalciferol, conocidos colectivamente como "calciferol", pueden ingerirse a través de la dieta y de los suplementos. El organismo también puede sintetizar vitamina D (en concreto colecalciferol) en la piel, a partir de colesterol, cuando la exposición solar es la adecuada. Cualquier forma funcional de vitamina D conocida en la técnica es adecuada para su uso, incluidas la vitamina D1, la vitamina D2, la vitamina D3, la vitamina D4, la vitamina D5 o cualquier combinación de las mismas.

[0024] Preferiblemente, la composición comprende vitamina D2 y/o vitamina D3, más preferiblemente vitamina D3.

[0025] La vitamina D, también conocida como calciferol, comprende un grupo de secoesteroides liposolubles responsables de mejorar la absorción intestinal de calcio, hierro, magnesio, fosfato y zinc. En los seres humanos, los compuestos más importantes de este grupo son la vitamina D3 (también conocida como colecalciferol) y la vitamina D2 (ergocalciferol). El colecalciferol y el ergocalciferol pueden ingerirse a través de la dieta y de suplementos. El organismo también puede sintetizar vitamina D (en concreto colecalciferol) en la piel, a partir de colesterol, cuando la exposición solar es la adecuada. Cualquier forma funcional de vitamina D conocida en la

técnica es adecuada para su uso, incluidas la vitamina D1, la vitamina D2, la vitamina D3, la vitamina D4, la vitamina D5 o cualquier combinación de las mismas. Preferiblemente, la composición comprende vitamina D2 y/o vitamina D3, más preferiblemente vitamina D2. La vitamina D se administra ventajosamente en una dosis diaria de 0,1 - 100 µg/día, preferiblemente de 1 - 50 µg/día, más preferiblemente de 1 - 25 µg/día, más preferiblemente de 1 - 20 µg/día, más preferiblemente de 5 - 15 µg/día. La cantidad de vitamina D en la composición según la invención es preferiblemente tal que se obtengan las dosis diarias mencionadas anteriormente. La cantidad de vitamina D en la composición utilizada según la invención es preferiblemente de 1,3 a 40, más preferiblemente de 1,8 a 34, de la manera más preferible, de 2,0 a 28 microgramos por 100 g de la composición. Dicho contenido de vitamina D es especialmente adecuado para conseguir los efectos según la invención ingiriendo cantidades relativamente bajas de la composición. La vitamina D se utiliza normalmente en cantidades terapéuticamente eficaces.

AGPI

[0026] La presente composición o combinación comprende (iii) al menos los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de cadena larga omega-3, el ácido docosahexaenoico (22:6; DHA) y el ácido eicosapentaenoico (20:5; EPA). En el contexto de la presente invención, los AGPICL (AGPI de cadena larga) tienen una longitud de cadena de 18 o más átomos de carbono. La presente composición o combinación contiene al menos cantidades terapéuticamente eficaces de DHA y de EPA. Se descubrió que el DHA tenía un efecto significativo en la reducción de la liberación de NO, pero este efecto se mejoró aún más cuando el DHA se combinó con EPA. Los AGPI se utilizan en combinación con las vitaminas A y la vitamina D, incluidos sus equivalentes funcionales.

[0027] Los AGPI se proporcionan preferiblemente como triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres o sus sales o ésteres, fosfolípidos, lisofosfolípidos, éteres de glicerol, lipoproteínas, ceramidas, glicolípidos o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, la presente composición comprende al menos DHA en forma de triglicéridos. Las fuentes adecuadas de AGPI (n-3) incluyen aceite marino (por ejemplo, aceite de pescado, aceite de algas o aceite de krill), ésteres alquílicos ricos en DHA, yema de huevo o fosfolípidos enriquecidos con AGPICL (n-3), por ejemplo, fosfatidilserina-DHA. Preferiblemente, una fuente de AGPI (n-3) es aceite de pescado o aceite de algas.

[0028] La proporción de DHA+EPA de los ácidos grasos totales es preferiblemente del 5 al 95 % en peso, más preferiblemente del 10 al 80 % en peso, de la manera más preferible, del 15 al 70 % en peso. La presente composición comprende preferiblemente del 5 al 95 % en peso de DHA en base a los ácidos grasos totales, preferiblemente del 10 al 75 % en peso de DHA en base a los ácidos grasos totales, más preferiblemente del 10 al 60 % en peso de DHA en base a los ácidos grasos totales. La presente composición comprende preferiblemente del 5 al 95 % en peso de EPA en base a los ácidos grasos totales, preferiblemente del 10 al 75 % en peso de EPA, de la manera más preferible, del 15 al 60 % en peso, en base a los ácidos grasos totales. En una forma de realización, DHA y EPA son los únicos ácidos grasos presentes y, por lo tanto, forman el 100 % en peso de los ácidos grasos totales.

[0029] En términos de dosificación diaria, el DHA se administra ventajosamente en una dosis diaria de 0,05 - 5 g/día, preferiblemente de 0,1 - 4 g/día, más preferiblemente de 0,5 - 2 g/día, de la manera más preferible, de 0,5 - 1,5 g/día. La cantidad de DHA en la composición o combinación según la invención es preferiblemente tal que se obtengan las dosis diarias mencionadas anteriormente. El EPA se administra ventajosamente en una dosis diaria de 0,1 - 5 g/día, preferiblemente de 0,5 - 4 g/día, más preferiblemente de 1 - 3 g/día, de la manera más preferible, de 1,3 - 1,8 g/día. La cantidad de EPA en la composición o combinación según la invención es preferiblemente tal que se obtengan las dosis diarias mencionadas anteriormente.

[0030] La composición proporciona preferiblemente la administración de 500 a 5000 mg de DHA+EPA al día, más preferiblemente de 750 a 4000 mg al día, de la manera más preferible, de 1000 a 3000 mg al día. La proporción en peso de DHA a EPA está comprendida preferiblemente entre aproximadamente 1:4 y aproximadamente 10:1, preferiblemente es superior a 1, más preferiblemente entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 10:1, más preferiblemente entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 8:1.

[0031] Además de los AGPI n-3, la composición puede comprender AGPI n-6 o AGPICL n-6 (tales como ácido alfa-linolénico (ALA), ácido linoleico (LA)). La concentración de ALA se mantiene preferiblemente en niveles inferiores al 2,0 % en peso, más preferiblemente por debajo del 1,5 % en peso, particularmente por debajo del 1,0 % en peso, en base al peso de todos los ácidos grasos. Las concentraciones de LA se pueden mantener del 20 al 30 % en peso, en base al peso de todos los ácidos grasos, aunque, en una forma de realización, la concentración de LA se reduce significativamente a una cantidad por debajo del 15 % en peso e incluso inferior al 10 % en peso, en base a los ácidos grasos totales. Las concentraciones de LA son preferiblemente al menos 1 % en peso de los ácidos grasos.

[0032] En una forma de realización, la proporción en peso de AGPI n-3 : AGPI n-6 en la composición según la invención está preferiblemente en el rango de 0,3 a 7, preferiblemente en el rango de 1,4:1 a 5,9:1, más preferiblemente en el rango de 3:1 a 5,5:1, de la manera más preferible, en el rango de 3:1 a 5:1, en particular es

inferior a 5:1. La cantidad de AGPICL n-6 es preferiblemente inferior al 50 % en peso, preferiblemente está en el rango del 5 al 40 % en peso, más preferiblemente del 8 al 30 % en peso, en base al peso total de los ácidos grasos en la composición.

5 Componentes adicionales

[0033] La composición según la invención puede comprender componentes adicionales, por ejemplo, uno o más seleccionados de entre fosfolípidos, colina y vitamina(s) B, preferiblemente los tres y más preferiblemente también antioxidantes. Se prefiere la presencia de (cantidades terapéuticamente eficaces de) una o más de, preferiblemente todas, colina, vitamina(s) B, especialmente ácido fólico y vitamina B6, y antioxidantes, especialmente vitamina C y/o E, ya que se ha sugerido que el daño cerebral conduce a deficiencias nutricionales en estos componentes. Como tal, la presencia de colina, vitamina(s) B, especialmente vitaminas B12, y antioxidantes, especialmente vitamina C y/o E, puede contribuir a la salud general de los pacientes que padecen neuroinflamación. Estos componentes suelen estar presentes en cantidades terapéuticamente eficaces. En una forma de realización, no hay componentes activos adicionales y la composición o combinación consta de (i) vitamina A, (ii) vitamina D e (iii) DHA y EPA.

[0034] La presente composición puede comprender cantidades terapéuticas de fosfolípidos. Preferiblemente, uno o más fosfolípido(s) está(n) presente(s) en la composición según la invención, preferiblemente uno o más fosfolípido(s) seleccionado(s) del grupo que consta(n) de ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) y fosfoinositida (PI). La presente composición comprende preferiblemente al menos un fosfolípido en una cantidad de 0,01 a 1 gramo por 100 ml, más preferiblemente entre 0,05 y 0,5 gramos por 100 ml, de la manera más preferible, de 80 a 600 mg por 100 ml. El al menos un fosfolípido lo proporciona preferiblemente la lecitina.

[0035] La presente composición puede comprender cantidades terapéuticas de colina. La colina puede estar presente como tal, o como equivalente de colina en forma de, por ejemplo, forma de sal o éster, o cualquier combinación de los mismos. La sal de colina se selecciona preferiblemente de entre cloruro de colina, bitartrato de colina o estearato de colina. El éster de colina se selecciona preferiblemente de entre fosfatidilcolina y lisofosfatidilcolina. La presente composición proporciona preferiblemente la administración de más de 50 mg de colina al día, preferiblemente de 80 a 3000 mg de colina al día, más preferiblemente de 100 a 2000 mg de colina al día, de la manera más preferible, de 150 a 1000 mg de colina al día. La presente composición comprende preferiblemente de 80 mg a 3000 gramos de colina por 100 ml de la composición líquida, preferiblemente de 100 mg a 2000 mg de colina por 100 ml, preferiblemente de 200 a 1000 mg de colina por 100 ml de composición, de la manera más preferible, de 200 mg a 600 mg de colina por 100 ml. Los números anteriores se basan en la colina, las cantidades de equivalentes o fuentes de colina se pueden calcular teniendo en cuenta el equivalente molar de colina.

[0036] La presente composición puede comprender una o más vitamina(s) B, preferiblemente al menos una, más preferiblemente al menos dos, seleccionadas del grupo de vitamina B6, vitamina B12 y vitamina B9. Más preferiblemente, la composición comprende al menos vitamina B6 y/o B9, de la manera más preferible, vitamina B6, B9 y B12. Dentro de estos términos se incluyen los equivalentes funcionales. Por ejemplo, el término "vitamina B12" incorpora todos los equivalentes de cobalamina conocidos en la técnica. La vitamina B debe administrarse en una dosis terapéuticamente efectiva.

[0037] La vitamina B6 está preferiblemente presente en una cantidad para proporcionar una dosificación diaria en el rango de 0,1 a 100 mg, en particular en el rango de 0,5 a 25 mg, más en particular en el rango de 0,5 a 5 mg. La presente composición comprende preferiblemente de 0,1 a 100 mg de vitamina B6 por 100 g de producto (líquido), más preferiblemente de 0,5 a 5 mg de vitamina B6 por 100 g de producto (líquido), más preferiblemente de 0,5 a 5 mg de vitamina B6 por 100 g de producto (líquido). La vitamina B9 está preferiblemente presente en una cantidad para proporcionar una dosificación diaria en el rango de 50 a 5000 µg, en particular en el rango de 100 a 1000 µg, más en particular en el rango de 200 a 800 µg. La presente composición comprende preferiblemente de 50 a 5000 µg de vitamina B9 por 100 g de producto (líquido), más preferiblemente de 100 a 1000 µg de vitamina B9 por 100 g de producto (líquido), más preferiblemente de 200 a 800 µg de ácido fólico por 100 g de producto (líquido). La vitamina B9 puede estar presente como folato, que incluye ácido fólico, ácido folínico, metilado, formas meteniladas y formiladas de folatos, sus sales o ésteres (por ejemplo, éster alquílico C1-6), así como sus derivados con uno o más ácidos glutámicos, y todos en forma reducida u oxidada. Preferiblemente, la vitamina B9 se proporciona en forma de ácido fólico. La vitamina B12 está preferiblemente presente en una cantidad para proporcionar una dosificación diaria en el rango de 0,5 a 100 µg, en particular en el rango de 1 a 10 µg, más en particular en el rango de 1,5 a 5 µg. La presente composición comprende preferiblemente de 0,5 a 100 µg de vitamina B12 por 100 g de producto (líquido), más preferiblemente de 1 a 10 µg de vitamina B12 por 100 g de producto (líquido), más preferiblemente de 1,5 a 5 µg de vitamina B12 por 100 g de producto (líquido).

[0038] La presente composición puede comprender, además, antioxidantes, preferiblemente seleccionados de entre vitamina C, vitamina E y selenio, preferiblemente al menos vitamina E. Se prefiere especialmente que la

composición comprenda tanto vitamina C como vitamina E, de la manera más preferible, que la composición según la invención comprenda vitamina C, vitamina E y selenio. Preferiblemente se incluyen antioxidantes en la composición según la invención, ya que pueden prevenir el daño oxidativo resultante de los AGPI dietéticos.

5 [0039] La vitamina C incluye equivalentes funcionales de la misma y puede estar presente en una cantidad para proporcionar una dosificación diaria en el rango de 20 a 2000 mg, en particular en el rango de 30 a 500 mg, más en particular en el rango de 75 a 150 mg. En una forma de realización, la vitamina C está presente en una cantidad en el rango de 20 a 2000 mg, en particular en el rango de 30 a 500 mg, más en particular en el rango de 75 a 150 mg por 100 ml de la composición.

10 [0040] La vitamina E se refiere a compuestos que tienen actividad de vitamina E como se conoce en la técnica, normalmente tocoferol y/o un equivalente del mismo. La vitamina E puede estar presente en una cantidad para proporcionar una dosificación diaria en el rango de 10 a 300 mg, en particular en el rango de 30 a 200 mg, más en particular en el rango de 35 a 100 mg. Dichas cantidades de vitamina E previenen el daño oxidativo en el sitio de la lesión resultante de los AGPI dietéticos presentes en la composición según la invención. En una forma de realización, el tocoferol y/o el equivalente está presente en una cantidad en el rango de 10 a 300 mg, en particular en el rango de 30 a 200 mg, más en particular en el rango de 35 a 100 mg por 100 ml de la composición. El término "tocoferol" y/o un equivalente del mismo, como se usa en esta descripción, comprende tocoferoles (por ejemplo, alfa- y gamma-), tocotrienoles, derivados aceptables farmacéuticos y/o nutricionales de los mismos y cualquier combinación de los mismos. Los números anteriores se basan en equivalentes de alfa-tocoferol (alfa-TE), como se reconoce en la técnica.

15 [0041] La presente composición contiene preferiblemente selenio. La actividad antioxidante del selenio previene y/o inhibe ventajosamente los daños en las áreas del cerebro. Preferiblemente, la composición comprende 0,01 y 5 mg de selenio por 100 ml de producto líquido, preferiblemente 0,02 y 0,1 mg de selenio por 100 ml de producto líquido. La cantidad de selenio administrada al día es preferiblemente superior a 0,01 mg, más preferiblemente de 0,01 a 0,5 mg.

20 Aplicación

30 [0042] La combinación o composición para uso según la invención está destinada a tratar, reducir y/o prevenir la neuroinflamación en un sujeto que lo necesita. En el contexto de la invención, el tratamiento profiláctico incluye reducir el riesgo o la aparición de neuroinflamación. En el contexto de la presente invención, "neuroinflamación" también puede denominarse inflamación del sistema nervioso central (SNC). En el presente documento, SNC se refiere al cerebro y a la médula espinal, preferiblemente la presente invención está dirigida a la inflamación del cerebro. En el contexto de la presente invención, "secreción" (como en "secreción de citocinas inflamatorias") y "liberación" (como en "liberación de citocinas inflamatorias") son sinónimos y se usan indistintamente.

40 [0043] Los "síntomas asociados con la neuroinflamación" pueden denominarse síntomas de neuroinflamación, y está dentro del alcance del experto apreciar cuáles son los síntomas de la neuroinflamación.

45 [0044] A lo largo de la especificación y las reivindicaciones, el término "tratamiento de la neuroinflamación" incluye profilaxis y normalmente implica controlar la neuroinflamación, preferiblemente en la medida en que la neuroinflamación (patológica o perjudicial) esté contenida, confinada o reducida. La neuroinflamación (patológica o perjudicial) puede ser neuroinflamación aguda o crónica. En el contexto de la invención, tratar y/o reducir la neuroinflamación incluye reducir la intensidad de la neuroinflamación (perjudicial) y/o reducir la duración de la neuroinflamación (perjudicial). En una forma de realización, la reducción de la duración de la neuroinflamación corresponde a una reducción de la duración en comparación con la administración con los componentes individuales vitamina A, vitamina D o AGPI, como al menos una reducción de la duración del 10 %, preferiblemente al menos una reducción del 25 %. En una forma de realización, la reducción de la intensidad de la neuroinflamación corresponde a una reducción de la secreción de citocinas inflamatorias, preferiblemente de IL-6, como al menos una reducción de la secreción del 10 %, preferiblemente al menos una reducción del 20 % en comparación con la administración solo de vitamina A, y/o al menos una reducción de la secreción del 10 %, preferiblemente al menos una reducción del 20 % en comparación con la administración solo con vitamina D, y/o al menos una reducción de la secreción del 10 %, preferiblemente al menos una reducción del 20 % en comparación con la administración solo con AGPI. En una forma de realización, la reducción de la intensidad de la neuroinflamación corresponde a una reducción de la liberación de NO, como al menos una reducción de la expresión del 10 %, preferentemente al menos una reducción del 30 % en comparación con la administración solo con vitamina A, y/o al menos una reducción de la expresión del 10 %, preferentemente al menos una reducción del 30 % en comparación con la administración solo con vitamina D, y/o al menos una reducción de la expresión del 10 %, preferiblemente al menos una reducción del 30 % en comparación con la administración solo con AGPI.

60 [0045] Los niveles aumentados de IL-6 y NO en el tejido cerebral o el líquido cefalorraquídeo se han asociado a trastornos neuroinflamatorios, como depresión, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple (EM), disfunción cognitiva posoperatoria (DCPO), lesión de la médula espinal

(LME), complejo demencia-sida (CDS), isquemia, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática (LCT), infección del cerebro o del sistema nervioso central y tumores cerebrales. Por lo tanto, en una forma de realización, la neuroinflamación está asociada a trastornos seleccionados de entre depresión, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple (EM), disfunción cognitiva posoperatoria (DCPO), lesión de la médula espinal (LME), complejo demencia-sida (CDS), isquemia, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática (LCT), infección del cerebro o del sistema nervioso central y tumores cerebrales. Asimismo, en una forma de realización, el sujeto padece uno o más trastornos seleccionados de entre depresión, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple (EM), disfunción cognitiva posoperatoria (DCPO), lesión de la médula espinal (LME), complejo demencia-sida (CDS), isquemia, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática (LCT), infección del cerebro o del sistema nervioso central y tumores cerebrales. En una forma de realización, el presente uso, la presente combinación o composición para su uso está destinada a tratar y/o prevenir un trastorno seleccionado de entre depresión, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple (EM), disfunción cognitiva posoperatoria (DCPO), lesión de la médula espinal (LME), complejo demencia-sida (CDS), isquemia, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática (LCT), infección del cerebro o del sistema nervioso central y tumores cerebrales. Los trastornos preferidos en el contexto de la presente invención son la enfermedad de Alzheimer (EA), la disfunción cognitiva postoperatoria (DCPO) y el accidente cerebrovascular.

[0046] En una forma de realización, la neuroinflamación es neuroinflamación crónica o neuroinflamación prolongada, neuroinflamación considerada perjudicial para el estado de salud del sujeto. El sujeto que padece neuroinflamación perjudicial o activación de la microglía padece preferiblemente un trastorno neurodegenerativo, como depresión, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple (EM), disfunción cognitiva postoperatoria (DCPO), lesión de la médula espinal (LME), complejo demencia-sida (CDS), isquemia, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática (LCT), infección del cerebro o del sistema nervioso central, tumores cerebrales. En una forma de realización, la composición según la invención está destinada a tratar y/o prevenir la neuroinflamación, preferiblemente tratar la neuroinflamación, particularmente reducir la duración y/o el alcance de la neuroinflamación.

[0047] En una forma de realización, la neuroinflamación es neuroinflamación del sistema nervioso central. Además, en el contexto de la invención, la activación de la microglía y/o la secreción de citocinas inflamatorias se reduce normalmente en el sistema nervioso central. La activación excesiva de la microglía causa daño al tejido cerebral y a la barrera hematoencefálica, lo que provoca trastornos neurodegenerativos.

[0048] La invención se refiere particularmente a la neuroinflamación causada por toxinas o metabolitos tóxicos, autoinmunidad, envejecimiento, infección (por ejemplo, bacteriana o viral), lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, de la manera más preferible, neuroinflamación asociada a un accidente cerebrovascular o inducida por un accidente cerebrovascular. En una forma de realización preferida, el sujeto objetivo sufre un accidente cerebrovascular, ha sufrido un accidente cerebrovascular, tiene un mayor riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular o tiene un mayor riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular recurrente. En una forma de realización, la presente combinación o composición para su uso está destinada a prevenir y/o reducir el riesgo de accidente cerebrovascular recurrente o una segunda o más apariciones de accidente cerebrovascular. Asimismo, en una forma de realización preferida, el sujeto objetivo ha sufrido un accidente cerebrovascular.

[0049] En una forma de realización, la combinación o composición para su uso según la invención, tal como se define en la reivindicación 1 o 2, está destinada a reducir terapéuticamente la secreción de citocinas inflamatorias y/o a tratar, reducir y/o prevenir los síntomas asociados a la misma. La reducción o disminución de la secreción de citocinas inflamatorias puede adoptar la forma de una cantidad (alcance) reducida de citocinas inflamatorias expresadas (excesivamente) y/o una duración reducida de la secreción (excesiva) de citocinas inflamatorias. Dicha reducción de la secreción de citocinas inflamatorias suele producirse en el sistema nervioso central. En una forma de realización preferida de este uso, la citocina inflamatoria es al menos una de IL-4, IL-6, IL-10 y TNF α , preferiblemente al menos una de IL-6 y TNF α , de la manera más preferible, al menos IL-6. Las citocinas inflamatorias, como IL-6, suelen expresarse mediante microglía activada durante la neuroinflamación y conducen a un estado prolongado de aumento de estrés oxidativo.

[0050] En una forma de realización, la combinación o composición para su uso según la invención, tal y como se define en la reivindicación 1 o 2, está destinada a reducir terapéuticamente la liberación de NO y/o a tratar, reducir y/o prevenir los síntomas asociados con la misma. La reducción o disminución de la liberación de NO puede adoptar la forma de una cantidad (alcance) reducida de NO liberado (excesivo) y/o una duración reducida de la liberación (excesiva) de NO. Dicha reducción de la liberación de NO suele ocurrir en el sistema nervioso central. Se ha demostrado que la liberación excesiva de NO provoca un efecto neurotóxico. En el contexto de la presente invención, la "liberación de NO" también puede denominarse "producción de NO".

[0051] Las combinaciones o composiciones para su uso, tal y como se ha descrito anteriormente, se pueden usar como parte de una terapia nutricional, un apoyo nutricional, como alimento médico, como alimento para fines médicos especiales o como suplemento nutricional. La administración de la composición según la invención normalmente se produce durante la recuperación y/o rehabilitación después de la aparición de neuroinflamación,

y puede continuarse mientras se prolonguen los efectos negativos de la misma. Aunque ya se observan efectos positivos durante la primera semana de administración, la administración continúa preferiblemente durante al menos 2 semanas, más preferiblemente al menos 4 semanas. La administración comienza preferiblemente el primer día después de la aparición de la neuroinflamación. La composición según la invención se puede consumir varias veces al día, preferiblemente en una, dos o tres porciones de 50 - 250 ml al día, normalmente de 125 ml o 200 ml al día durante la recuperación y/o rehabilitación después de la aparición de un accidente cerebrovascular. Las dosificaciones diarias preferidas están en el rango de 100 a 500 ml, más preferiblemente de 125 a 375 ml, de la manera más preferible, de 125 a 300 ml.

[0052] Preferiblemente, la composición se administra por vía enteral. La administración se produce preferiblemente al menos una vez al día, aunque a partir de estos números se pueden determinar regímenes de dosificación alternativos.

Lista de figuras

[0053]

La figura 1 representa el efecto de nutrientes individuales sobre la liberación de NO e IL-6 inducida por LPS, como se demuestra en el ejemplo 1. La liberación de NO (figura 1A) e IL-6 (figura 1B) de la microglía activada por LPS tras la incubación con diferentes nutrientes (I = vitamina A; II = vitamina D; III = DHA; IV = EPA) se da como porcentaje de liberación de NO de la microglía activada por LPS no incubada con un nutriente (control), que se establece en 100 %. En comparación con el control, los nutrientes I - III mostraron una liberación significativamente reducida de NO e IL-6 ($p < 0,001$).

La figura 2 representa el efecto de nutrientes individuales y de la combinación de nutrientes sobre la liberación de NO e IL-6 inducida por LPS, como se demuestra en el ejemplo 2. La liberación de NO (figura 2A) e IL-6 (figura 2B) de la microglía activada por LPS tras la incubación con diferentes nutrientes (I = vitamina A; II = vitamina D; III = DHA; IV = EPA; V = vitamina A + vitamina D + DHA + EPA) se da como porcentaje de liberación de NO de la microglía activada por LPS no incubada con un nutriente (control), que se establece en 100 %. La combinación de nutrientes V mostró una liberación de NO significativamente reducida en comparación con los ingredientes individuales I - IV ($p < 0,001$).

Ejemplos

Materiales y métodos para los ejemplos 1 y 2

[0054] **Reactivos:** Las siguientes sustancias se adquirieron de Sigma Aldrich y se usaron sin purificación adicional: lipopolisacárido (LPS, de *Escherichia coli* 055:B5), vitamina B6, B9 (ácido fólico), vitamina B12, vitamina A, vitamina D3 en una forma de 7-dehidrocolesterol/25-OH, vitamina D3 (100 µg/ml en etanol), ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA), ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA).

[0055] **Cultivos de células BV-2:** Las células BV-2 se obtuvieron del Hospital Universitario de San Martino (IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino - IST Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italia). Las líneas celulares BV-2 son líneas celulares inmortalizadas derivadas del ratón C57bl/6. Se considera que se parecen mucho a la fisiología de las células de microglía primarias y forman un modelo bien establecido para la investigación *in vitro* (Henn *et al.*, *ALTEX*, 2009, 26, 83-94). El lipopolisacárido (LPS), una endotoxina derivada de la pared celular de bacterias gramnegativas, es el agente más utilizado para activar células inmunitarias. Las células se cultivaron en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen), 10.000 unidades/ml de penicilina (Gibco), 10.000 µg/ml de estreptomina (Gibco) y 200 mM de L-glutamina (Gibco) y se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO₂. Veinticuatro horas antes del experimento, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Corning) a una densidad celular de aproximadamente 20.000 células/pocillo y se mantuvieron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 2 %, 10.000 unidades/ml de penicilina, 10.000 µg/ml de estreptomina y 200 mM de L-glutamina, durante la duración del experimento.

[0056] **Viabilidad celular:** La proliferación y la viabilidad celular se evaluaron con la sal interna de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT, Sigma) a una concentración de 1 mg/ml. Se añadió metosulfato de fenazina (PMS, Sigma) a una concentración de 200 mg/ml como reactivo de acoplamiento de electrones. Se añadió a cada pocillo la solución XTT/PMS en agua estéril (100 µl). Después de 2 h, se midió la absorbancia a 450 nm (y 690 nm como referencia). La absorbancia se corrigió para el número de células. La prueba de viabilidad se repitió para cada experimento como control dentro de la placa. Los resultados de los experimentos, en los que la viabilidad celular era inferior al 85 % de la de las células de control no tratadas se excluyeron del análisis de datos.

[0057] **Ensayo de Griess** (liberación de óxido nítrico): Las células se trataron durante 24 h con diferentes combinaciones de nutrientes. A este tratamiento le siguió el intercambio del medio por medio fresco con LPS (50

ng/ml) combinado con los mismos nutrientes. Después de la incubación durante 24 h, se recogieron medios para medir la liberación de NO. El producto estable del NO liberado por las células BV-2 es el NO_2^- . La concentración de NO_2^- se midió con un kit de ensayo de Griess (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los datos se corrigieron según la viabilidad celular (la viabilidad de las células de control no tratadas representó el 100 % de viabilidad). Los datos se representan como porcentaje del NO liberado por células estimuladas solo con LPS. Para evaluar la variabilidad entre las pruebas, se combinaron los datos del tratamiento con LPS solo y se calculó una liberación promedio entre experimentos para NO. Para el tratamiento con LPS solo, la liberación de NO se representa como el porcentaje de la liberación promedio entre experimentos.

[0058] ELISA (IL-6): Las células se trataron durante 24 h con diferentes combinaciones de nutrientes. Posteriormente, se eliminó el medio y las células se incubaron durante 24 h en un medio fresco con LPS (50 ng/ml) combinado con los mismos nutrientes. Los medios se recogieron para medir la liberación de IL-6. Las muestras recogidas se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Los niveles de citocinas se evaluaron utilizando ELISA MAX™ Deluxe de Biologend según el protocolo del fabricante. Los datos se corrigieron según la viabilidad celular. Los datos se representan como porcentaje de la liberación de IL-6 por células estimuladas con LPS solo. Para evaluar la variabilidad entre las pruebas, se combinaron los datos del tratamiento con LPS solo y se calculó una liberación promedio entre experimentos para IL-6. Para el tratamiento con LPS solo, la liberación de IL-6 se representa como el porcentaje de la liberación promedio entre experimentos.

[0059] Análisis estadístico: Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado. Los datos se presentan como puntos que representan medios y barras que representan el error estándar de la media (SEM). Debido al pequeño tamaño de la muestra, se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas. Los datos se analizaron con la prueba H de Kruskal-Wallis y, si se alcanzó significación estadística, se realizó la prueba U de Mann Whitney con corrección *post hoc* de Bonferroni-Holm para permitir múltiples comparaciones. Una diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando la probabilidad (p) era $<0,05$.

Ejemplo comparativo 1: Efecto de los nutrientes individuales

[0060] Las células BV-2 se trataron previamente durante 24 h con diferentes nutrientes: (I) vitamina A (1,75 μM); (II) vitamina D (1 $\mu\text{g/ml}$); (III) DHA (20 μM); (IV) EPA (20 μM); (V) vitamina B6 (29 μM , incluidos 19 μM ya presentes en el medio de cultivo); (VI) ácido fólico (24 μM , incluidos 9 μM ya presentes en el medio de cultivo); (VII) vitamina B12 (0,2 μM).

[0061] A esto le siguió una incubación de 24 h con LPS (50 ng/ml) combinado con los mismos nutrientes. Se recogieron medios para medir la liberación de NO con el ensayo de Griess (figura 1A) y la liberación de IL-6 con ELISA (figura 1B). Los niveles de NO e IL-6 se presentan como el porcentaje de la concentración producida por las células tratadas con LPS solo (control de LPS, línea discontinua). Todos los gráficos representan los resultados de 4 experimentos independientes (media \pm SEM). Los datos se analizaron estadísticamente con la prueba H de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba *post hoc* de Bonferroni-Holm. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$.

[0062] Los nutrientes se utilizaron en altas concentraciones no tóxicas, obtenidas a partir de curvas de dosis-efecto de sustancias individuales y su mezcla cuando una concentración en la que la viabilidad celular no disminuyó por debajo del 90 % en comparación con los controles no tratados. De una manera similar, se obtuvo una curva dosis-efecto para LPS a partir de mediciones de liberación de NO para seleccionar la mitad de la concentración efectiva máxima (CE50). La liberación del mediador proinflamatorio óxido nítrico (NO) por las células BV-2 activadas se midió con el ensayo de Griess. Las células expuestas únicamente al medio de cultivo o al medio suplementado con nutrientes no mostraron ninguna liberación detectable de NO (datos no mostrados). Un tratamiento de 24 h de células BV-2 con LPS (50 ng/ml) provocó una fuerte liberación de NO. Para investigar la potencia de los nutrientes para inhibir la liberación de NO inducida por LPS, las células BV-2 se pretrataron durante 24 h con nutrientes y posteriormente se cotrataron con LPS y los mismos nutrientes durante otras 24 h. Las vitaminas B6, B9 y B12, así como los aminoácidos L-triptófano y L-cisteína, no causaron ningún efecto significativo sobre la liberación de NO inducida por LPS en estos experimentos (datos no mostrados). El ácido graso DHA provocó una disminución significativa de la liberación de NO, 68 % (RIC, 49-77 %, $p = 0,036$), en comparación con los controles tratados con LPS (figura 1A). El ácido graso EPA provocó una disminución de la liberación de NO al 80 % (RIC, 75-91 %, $p = 0,115$), lo cual no fue estadísticamente significativo, mientras que la mezcla de DHA y EPA provocó una disminución de la liberación de NO al 61 % (RIC 43-66 %, datos no mostrados). Los nutrientes antiinflamatorios más potentes en este ensayo fueron las vitaminas A y D (figura 1A). La vitamina D disminuye significativamente la liberación de NO al 43 % (RIC 36-55 %; $p = 0,032$) en relación con las células de control tratadas con LPS. También se observó un efecto antiinflamatorio significativo con el tratamiento con vitamina A. La vitamina A disminuyó significativamente la liberación de NO al 39 % de los controles tratados con LPS (RIC 20-52,4 % $p = 0,024$). Por lo tanto, se concluyó que, de todos los nutrientes analizados, las vitaminas A, D y DHA son los más potentes para disminuir la liberación de NO inducida por LPS.

[0063] Se investigó mediante ELISA el efecto antiinflamatorio de los nutrientes sobre la producción de IL-6 inducida por LPS por parte de las células BV-2. El tratamiento con LPS provocó un gran aumento de la liberación

de IL-6 de las células BV-2 de manera dependiente de la concentración. La concentración óptima de LPS (que induce aproximadamente el 50 % de la liberación máxima) para nuestros experimentos se seleccionó en función de la curva dependiente de la concentración de liberación de IL-6 (datos no mostrados). De manera similar a los efectos observados sobre la liberación de NO, las vitaminas B6, B9 y B12, así como los aminoácidos L-triptófano y L-cisteína, no causaron ningún efecto significativo sobre la liberación de IL-6 inducida por LPS en estos experimentos (datos no mostrados). La inhibición de la liberación de IL-6 fue más sensible (figura 1B). El DHA disminuyó significativamente la liberación de IL-6 por las células BV-2 estimuladas con LPS al 68 % (RIC 49-77 %, $p = 0,032$, $n = 4$). El ácido graso EPA provocó una disminución de la liberación de IL-6 al 70 % (RIC, 67-96 %, $p = 0,7$, $n=4$) (figura 1B), pero esto no fue estadísticamente significativo. Mientras que la mezcla de DHA y EPA provocó una disminución de la liberación de IL-6 al 51 % (RIC 38-54 %, datos no mostrados). Las vitaminas A y D disminuyeron la liberación de IL-6 al 42 % (RIC 39-58 %, $p = 0,024$, $n=4$) y al 43 % (RIC 21-57 %, $p = 0,024$, $n=4$), respectivamente (figura 1B).

[0064] En conjunto, estos datos muestran que las vitaminas A y D, y en menor medida DHA y EPA, mostraron un efecto antiinflamatorio en las células BV-2 estimuladas por LPS. Las vitaminas B y los aminoácidos L-cisteína y L-triptófano no tuvieron ningún efecto antiinflamatorio sobre las células BV-2 activadas por LPS.

Ejemplo 2: Efecto de los nutrientes combinados

[0065] Las células BV-2 se trataron previamente durante 24 h con diferentes combinaciones de nutrientes: (I) vitamina A (0,583 μM); (II) vitamina D (0,1 $\mu\text{g/ml}$); (III) DHA (6,67 μM); (IV) EPA (20 μM); (V) vitamina A (0,583 μM) + vitamina D (0,1 $\mu\text{g/ml}$) + DHA (6,67 μM) + EPA (20 μM). A esto le siguió una incubación de 24 h con LPS (50 ng/ml) combinado con los mismos nutrientes. Se recogieron medios para medir la liberación de NO con el ensayo de Griess y la liberación de IL-6 con ELISA. Los niveles de NO (figura 2A) e IL-6 (figura 2B) se presentan como el porcentaje de la concentración producida por las células tratadas con LPS solo (control de LPS). El nivel de NO y 6 IL-6 para el control de LPS (100 %) se indica en cada gráfico con la línea discontinua. Todos los gráficos representan los resultados de cinco experimentos independientes (media \pm SEM). Los datos se analizaron estadísticamente con la prueba H de Kruskal-Wallis. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$. Para probar las diferencias entre los nutrientes individuales y la mezcla que contiene vitamina A, D y ácidos grasos DHA y EPA, se realizó una prueba *post hoc* con corrección de Bonferroni-Holm. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$.

[0066] Como se muestra en la figura 2A, los nutrientes individuales utilizados en concentraciones más bajas apenas causaron ningún efecto sobre la liberación de NO, mientras que la combinación de estas sustancias en las mismas concentraciones provocó una reducción de la liberación de NO al 37 % (RIC 28,0 - 45,7 %) de la liberación por las células de control estimuladas con LPS no tratadas. La disminución de la liberación de NO observada para la combinación de nutrientes fue significativamente diferente de los efectos observados para cada nutriente utilizado por separado (después de la corrección de Bonferroni-Holm $p = 0,032$). De manera similar, los nutrientes individuales en concentraciones más bajas no provocaron ninguna reducción significativa de la liberación de IL-6. La combinación de las sustancias dio como resultado una disminución de IL-6 al 84 % (RIC, 54,1-88,9) en comparación con los controles estimulados con LPS.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para uso terapéutico en el tratamiento, la reducción y/o prevención de la neuroinflamación en un sujeto que lo necesita, donde dicha composición comprende cantidades terapéuticamente eficaces de (i) vitamina A y/o equivalentes funcionales, (ii) vitamina D y/o equivalentes funcionales, e (iii) DHA y EPA.
- 10 2. Combinación de (i) vitamina A y/o equivalentes funcionales, (ii) vitamina D y/o equivalentes funcionales, e (iii) DHA y EPA, donde (i), (ii) e (iii) están en cantidades terapéuticamente eficaces, para uso terapéutico en el tratamiento, la reducción y/o prevención de la neuroinflamación en un sujeto que lo necesita.
- 15 3. Composición o combinación para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde dicha neuroinflamación está asociada a un trastorno seleccionado de entre depresión, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple (EM), disfunción cognitiva posoperatoria (DCPO), lesión de la médula espinal (LME), complejo demencia-sida (CDS), isquemia, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática (LCT), infección del cerebro o del sistema nervioso central y tumores cerebrales y/o dicho sujeto padece uno o más trastornos seleccionados de entre depresión, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple (EM), disfunción cognitiva posoperatoria (DCPO), lesión de la médula espinal (LME), complejo demencia-sida (CDS), isquemia, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática (LCT), infección del cerebro o del sistema nervioso central y tumores cerebrales.
- 20 4. Composición o combinación para su uso según la reivindicación 3, donde dicho trastorno se selecciona de entre enfermedad de Alzheimer (EA), disfunción cognitiva postoperatoria (DCPO) y accidente cerebrovascular.
- 25 5. Composición o combinación para su uso según la reivindicación 4, donde dicha neuroinflamación es una neuroinflamación asociada a un accidente cerebrovascular y/o dicho sujeto sufre un accidente cerebrovascular o tiene un mayor riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular, preferiblemente un mayor riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular recurrente.
- 30 6. Composición o combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha neuroinflamación es una neuroinflamación crónica.
- 35 7. Composición o combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho tratamiento, dicha reducción y/o dicho tratamiento y/o dicha prevención implica la reducción de la intensidad de la neuroinflamación y/o la reducción de la duración de la neuroinflamación.
- 40 8. Composición o combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho tratamiento, dicha reducción y/o prevención implica la reducción de la activación de la microglía y/o la reducción de la secreción de citocinas inflamatorias, preferiblemente de TNF- α y/o IL-6.
- 45 9. Composición o combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la vitamina A y/o sus equivalentes funcionales se administran en una dosis diaria de 0,05 - 3 mg/día, preferiblemente de 0,5 - 1,5 mg/día.
- 50 10. Composición o combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la vitamina D y/o sus equivalentes funcionales se administran en una dosis diaria de 0,1 - 100 μ g/día, preferiblemente de 5 - 15 μ g/día.
- 55 11. Composición o combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los AGPI omega-3 se administran en una dosis diaria de 500 a 5000 mg.
12. Composición o combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el DHA se administra en una dosis diaria de 0,05 - 5 g/día, preferiblemente de 0,5 - 1,5 g/día.
13. Composición o combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición comprende, además, colina y preferiblemente comprende, además, vitamina(s) B.
14. Composición o combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición comprende, además, fosfolípidos, colina, vitamina(s) B y antioxidantes.

Fig. 1A

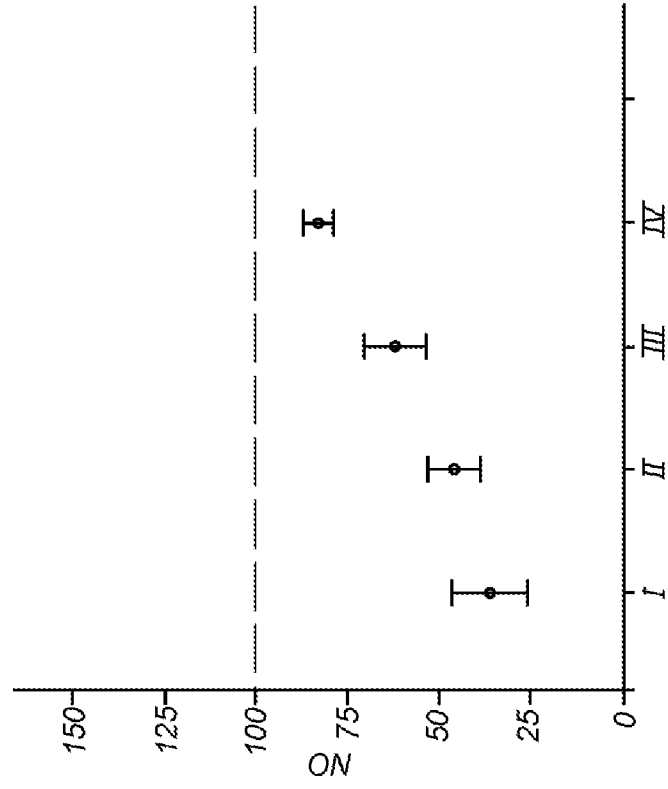


Fig. 1B

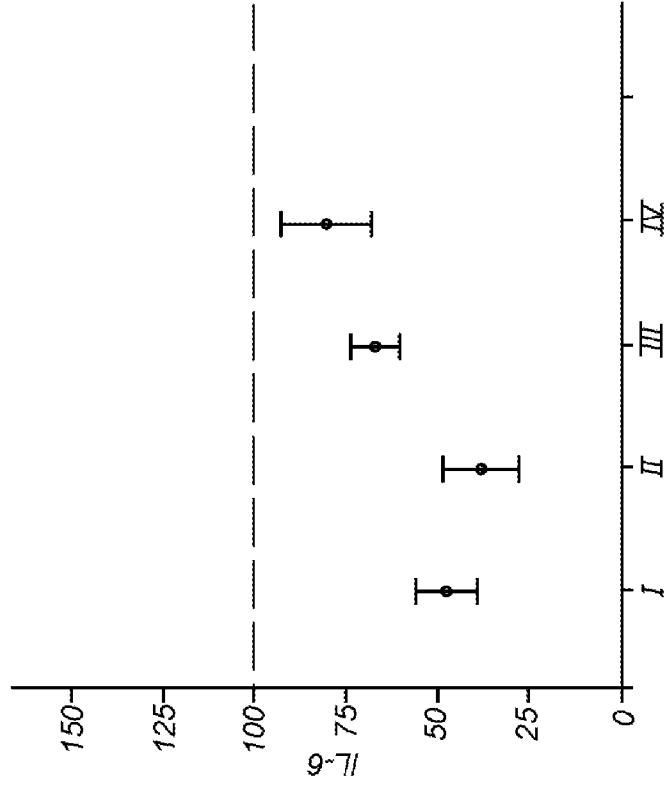


Fig. 2A

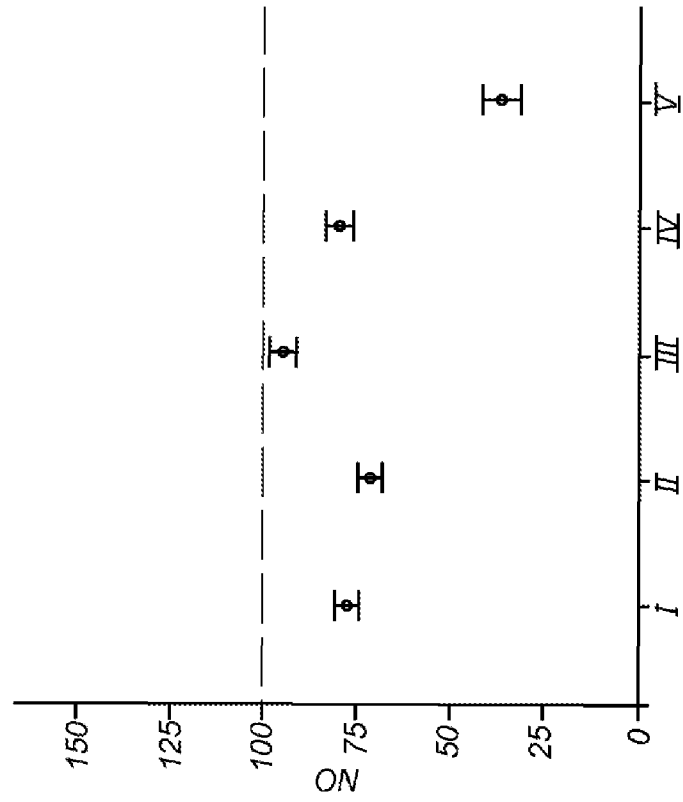


Fig. 2B

