

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 053**

51 Int. Cl.:

A61K 31/702 (2006.01)

A61K 31/716 (2006.01)

A61K 31/7004 (2006.01)

A61K 31/7012 (2006.01)

A61K 31/7016 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61K 35/20 (2006.01)

A23L 33/125 (2006.01)

A23L 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2015** **PCT/DK2015/050331**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016** **WO16066174**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2015** **E 15855329 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020** **EP 3212198**

54 Título: **Composición sintética y procedimiento para promover la cicatrización de la mucosa**

30 Prioridad:

29.10.2014 DK 201470662

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

27.09.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HENNET, THIERRY;
MCCONNELL, BRUCE;
ELISON, EMMA y
VIGSNÆS, LOUISE KRISTINE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 856 053 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

Composición sintética y procedimiento para promover la cicatrización de la mucosa

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a composiciones sintéticas y a procedimientos para promover la cicatrización de la mucosa en el tracto gastrointestinal de los seres humanos.

Antecedentes de la invención

La cicatrización de la mucosa inflamada (cicatrización de la mucosa) de los seres humanos es un nuevo objetivo emergente para la terapia de muchas afecciones inflamatorias del tracto gastrointestinal (GI). Además, la cicatrización de la mucosa se considera cada vez más un factor de predicción de la remisión clínica en las afecciones inflamatorias del tracto gastrointestinal. Esto es especialmente cierto en el caso de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII), como la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Sin embargo, es igualmente aplicable a muchas otras afecciones inflamatorias del tracto gastrointestinal en las que se produce ulceración, como la ulceración inducida por la quimioterapia en pacientes con cáncer.

Las EII son enfermedades crónicas recidivantes que provocan daños estructurales con destrucción de la pared intestinal (Baumgart et al. Lancet 380, 1590 (2012)). Por lo general, el tratamiento de estas enfermedades sigue un enfoque escalonado en el que el primer paso es la administración de 5-aminosalicilatos, que son antiinflamatorios de acción local. Estos agentes parecen tener una mayor eficacia para el tratamiento de la colitis ulcerosa que para la enfermedad de Crohn, para la que los datos de eficacia son limitados.

Si el estado del paciente no responde a una dosis adecuada de 5-aminosalicilatos, el segundo paso suelen ser los corticosteroides, que suelen proporcionar un alivio rápido de los síntomas y una disminución significativa de la inflamación (Ford et al. Am. J. Gastroenterol. 106, 590 (2011)). En general, uno de los principales objetivos es retirar al paciente los esteroides lo antes posible para evitar los efectos adversos a largo plazo de estos agentes. La mayoría de los pacientes pueden tolerar una reducción relativamente rápida de la dosis después de lograr una respuesta. Sin embargo, ocasionalmente es necesaria una reducción muy prolongada de los esteroides para evitar recaídas en pacientes que han tenido una exposición prolongada a los esteroides en el pasado.

Si la terapia con corticosteroides orales falla, el tercer paso suele ser la terapia con inmunomoduladores o anti-TNF (Papi et al. Dig. Liver Dis. 45, 978 (2013)). Las terapias con anticuerpos monoclonales anti-TNF en particular son muy eficaces; al menos inicialmente. En particular, los anticuerpos anti-TNF-a adalimumab, certolizumab pegol e infliximab son eficaces para la inducción y el mantenimiento de la remisión tanto en la EC como en la CU. Sin embargo, hay subgrupos de pacientes que no responden al tratamiento y otros subgrupos desarrollan anticuerpos neutralizantes. Estos pacientes muestran poco o ningún cambio en los síntomas clínicos. Además, todos los pacientes están expuestos a los efectos secundarios de este tipo de terapia, como infecciones, reactivación de la tuberculosis, reacciones alérgicas, trastornos cutáneos, trastornos desmielinizantes y autoinmunidad de tipo lúpico. Por esta razón, estas terapias suelen administrarse sólo a pacientes graves; o a pacientes moderados con un mal pronóstico.

Hasta hace poco, la mayoría de los tratamientos se centraban en inducir la remisión clínica, reducir la diarrea y disminuir el dolor abdominal. Sin embargo, la cicatrización de la mucosa, visible por endoscopia, ha surgido recientemente como un objetivo clave del tratamiento (Neurath et al. Gut 61, 1619 (2012)). Así, el término "cicatrización de la mucosa en la endoscopia" se ha desarrollado para referirse a la resolución visible de las úlceras en la EC y a las erosiones y úlceras en la CU (Frosliet al. Gastroenterology 133, 412 (2007)). La cicatrización de la mucosa se ha asociado con un control más eficaz de la enfermedad, una remisión más frecuente de la enfermedad sin esteroides, menores tasas de hospitalización y cirugía, y una mejor calidad de vida en comparación con los objetivos del tratamiento convencional. Estos resultados ponen de relieve el papel de la cicatrización de la mucosa en el tratamiento de la EII y de las enfermedades gastrointestinales inflamatorias en general.

Aunque la cicatrización de la mucosa mediante diversas terapias farmacológicas ha sido un objetivo atractivo para el tratamiento de la EII (véase Vaughn et al. Curr. Treat. Options Gastroenterol. 12, 103 (2014) y sus referencias), no siempre ha sido alcanzable y ha expuesto a algunos pacientes a riesgos innecesarios, sobre todo cuando ha llevado a escalar las terapias farmacológicas. Por lo tanto, se ha intentado tratar a los pacientes que padecen afecciones gastrointestinales inflamatorias con composiciones nutricionales; por ejemplo, que contengan TGF-beta derivado de la caseína (Documentos US 5952295, WO 2014/020004), galactooligosacáridos (Documento WO 2013/016111) u oligosacáridos de leche humana seleccionados (Documento WO 2013/032674). Las composiciones nutricionales han ofrecido la ventaja de ser más seguras y adecuadas para el uso crónico a largo plazo. Sin embargo, faltan pruebas sólidas de su eficacia y no está claro que promuevan la cicatrización de la mucosa.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de terapias que promuevan la cicatrización de la mucosa en las afecciones GI inflamatorias de los seres humanos, y que sean eficaces y seguras con pocos o ningún efecto secundario adverso.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición sintética para su uso en:

- promover la cicatrización de la mucosa en un paciente, ventajosamente un ser humano, que tenga una ulceración debido a una afección gastrointestinal inflamatoria,
- 5 - inducir la cicatrización de la mucosa en un paciente, ventajosamente un ser humano, que tenga una ulceración debida a una afección gastrointestinal inflamatoria,
- tratar a un paciente con EII, preferentemente un paciente con EII de moderada a grave que está recibiendo un tratamiento inmunomodulador, ventajosamente un ser humano, que tenga una ulceración, para inducir la remisión induciendo y/o promoviendo la cicatrización de la mucosa en el paciente, y/o
- 10 - mantener en remisión a un paciente con EII, preferentemente un paciente con EII de moderada a grave que está recibiendo tratamiento inmunomodulador, ventajosamente un ser humano, induciendo/promoviendo la cicatrización de la mucosa en el paciente y manteniendo la integridad de la mucosa,

caracterizada porque la composición sintética contiene una cantidad efectiva de uno o más monosacáridos de la leche humana o de uno o más oligosacáridos de la leche humana o de ambos. La composición sintética es preferentemente una composición nutricional. El paciente puede ser un paciente pediátrico o adulto. La composición puede comprender además una fuente de treonina, serina y/o prolina. Preferiblemente, los oligosacáridos de la leche humana incluyen tanto HMO ucosilo como sialilo. Los oligosacáridos de la leche humana también pueden incluir oligosacáridos del esqueleto, como LNT y LNnT.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para

- 20 - inducir/promover la cicatrización de la mucosa en un paciente, ventajosamente un ser humano, que tenga una ulceración debida a una afección gastrointestinal inflamatoria,
- tratar a un paciente con EII, preferentemente un paciente con EII de moderada a grave que está recibiendo un tratamiento inmunomodulador, ventajosamente un ser humano, que tenga una ulceración, para inducir la remisión induciendo y/o promoviendo la cicatrización de la mucosa en el paciente, y/o
- 25 - mantener en remisión a un paciente con EII, preferentemente un paciente con EII de moderada a grave que está recibiendo tratamiento inmunomodulador, ventajosamente un ser humano, induciendo/promoviendo la cicatrización de la mucosa en el paciente y manteniendo la integridad de la mucosa,

el procedimiento comprende la administración oral al paciente de una cantidad eficaz de uno o varios monosacáridos de la leche humana o de uno o varios oligosacáridos de la leche humana, o de ambos, preferentemente en forma de composición sintética. El paciente puede ser un paciente pediátrico o adulto.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un uso de uno o más monosacáridos de la leche humana o de uno o más oligosacáridos de la leche humana o de ambos, preferentemente en forma de composición sintética, para

- inducir/promover la cicatrización de la mucosa en un paciente, ventajosamente un ser humano, que tenga una ulceración debida a una afección gastrointestinal inflamatoria,
- 35 - tratar a un paciente con EII, preferentemente un paciente con EII de moderada a grave que está recibiendo un tratamiento inmunomodulador, ventajosamente un ser humano, que tenga una ulceración, para inducir la remisión induciendo y/o promoviendo la cicatrización de la mucosa en el paciente, y/o
- mantener en remisión a un paciente con EII, preferentemente un paciente con EII de moderada a grave que está recibiendo un tratamiento inmunomodulador, ventajosamente un ser humano, induciendo/promoviendo la cicatrización de la mucosa en el paciente y manteniendo la integridad de la mucosa.
- 40

El paciente puede ser un paciente pediátrico o adulto.

Se ha encontrado sorprendentemente que los monosacáridos de la leche humana, ventajosamente el ácido siálico, y los oligosacáridos de la leche humana, ventajosamente el 2'-FL, el 3-FL, el LNT, el LNnT, el 3'-SL, el 6'-SL, el DFL, el DSLNT y/o el LNFP-I no sólo modulan la inflamación y la microbiota en el tracto gastrointestinal, sino que también mejoran la cicatrización de la mucosa y ayudan a mantener la integridad de la misma en los pacientes humanos.

Descripción detallada de la invención

El término "administración oral" se refiere preferentemente a cualquier forma convencional de administración oral de una composición a un paciente que provoque el depósito de la composición en el tracto gastrointestinal (incluido el estómago) del paciente. En consecuencia, la administración oral incluye la deglución de la composición por parte del paciente, la alimentación enteral a través de una sonda nasogástrica, y similares.

El término "cantidad eficaz" significa preferentemente una cantidad de una composición que proporciona un monosacárido de la leche humana o un oligosacárido de la leche humana en una cantidad suficiente para obtener un resultado de tratamiento deseado en un paciente. Una cantidad efectiva puede ser administrada en una o más dosis al paciente para lograr el resultado del tratamiento deseado.

- 5 El término "monosacárido de la leche humana" o "HMS" significa preferentemente un monosacárido que se encuentra en la leche materna humana. Los ejemplos incluyen el ácido siálico y la L-fucosa. En la leche humana, el ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico.

El término "oligosacárido de la leche humana" o "HMO" significa preferentemente un carbohidrato complejo que se encuentra en la leche materna humana y que puede estar en forma ácida o neutra. Se sabe que existen más de
10 unas 200 estructuras diferentes de HMO en la leche materna humana (Urashima et al: Milk Oligosaccharides, Nova Biomedical Books, New York, 2011). Los HMO pueden ser oligosacáridos de esqueleto, fucosilados y sialilados. Los HMO de esqueleto están formados por Glu, Gal y GlcNAc y carecen de Fuc y ácido siálico. Ejemplos de HMO de esqueleto son lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (LNnT), lacto-N-neohexaosa (LNnH) y lacto-N-hexaosa (LNH). Los HMO fucosilos son lactosas fucosiladas o HMO de esqueleto fucosilo, como la 2'-fucosilactosa (2'-FL),
15 lacto-N-fucopentaosa I (LNFP-I) lacto-N-difucohexaosa I (LNDFH-I), 3-fucosilactosa (3-FL), difucosilactosa (DFL), lacto-N-fucopentaosa III (LNFP-III), fucosil-para-lacto-N-neohexaosa (F-pLNnH), lacto-N-difucohexaosa I (LNDFH-I), fucosil-lacto-N-hexaosa II (FLNH-II), lacto-N-fucopentaosa V (LNFP-V), lacto-N-difucohexaosa II (LNDFH-II), fucosil-lacto-N-hexaosa I (FLNH-I), fucosil-lacto-N-hexaosa III (FLNH-III) y fucosil-para-lacto-N-neohexaosa (F-pLNnH). Los HMO sialilo son lactosas sialiladas o HMO de esqueleto sialilado, como la 3',6'-disialilacto-N-tetraosa (DSLNT), la 6'-sialilactosa (6'-SL), 3'-sialilactosa (3'-SL), 6'-sialilacto-N-neotetraosa (LST c), 3'-sialilacto-N-tetraosa (LST a) y 6'-sialilacto-N-tetraosa (LST b). Los HMO que contienen tanto grupos sialilo como fucosilo pueden considerarse pertenecientes a cualquiera de estos dos últimos grupos. Algunos ejemplos de HMO sialilo y fucosilo son la disialil-fucosil-lacto-N-hexaosa II (DSFLNH-II), la fucosil-sialil-lacto-N-neohexaosa I (FSLNH-I), la fucosil-sialil-lacto-N-hexaosa I (FSLNH-I) y la 3-fucosil-3'-sialilactosa (FSL).

- 25 El término " cicatrización de la mucosa" significa preferentemente una reducción del número o la concentración de úlceras visibles en la evaluación endoscópica de una afección gastrointestinal inflamatoria o una EII. Se han desarrollado varias pruebas para evaluar la cicatrización de la mucosa. Por ejemplo, en el caso de la CU, para evaluar la cicatrización de la mucosa se pueden utilizar pruebas como el índice colonoscópico de gravedad de la colitis ulcerosa (UCCIS) y el índice endoscópico de gravedad de la colitis ulcerosa (UCEIS). Del mismo modo, en el caso de la EC, pueden utilizarse pruebas como el Índice Endoscópico de Gravedad de la Enfermedad de Crohn (CDEIS) y la Puntuación Endoscópica Simplificada - Enfermedad de Crohn (SES-CD) para evaluar la cicatrización de la mucosa. También pueden utilizarse procedimientos de diagnóstico que utilicen biomarcadores, por ejemplo, como se divulga en el documento WO 2014/054013.

Los HMO pueden ser aislados o enriquecidos mediante procesos bien conocidos a partir de leche(s) secretada(s)
35 por mamíferos, incluyendo, pero no limitándose a las especies humana, bovina, ovina, porcina o caprina. Los HMO también pueden ser producidos por procesos bien conocidos utilizando la fermentación microbiana, procesos enzimáticos, síntesis química, o combinaciones de estas tecnologías. Como ejemplos, mediante procedimientos químicos se puede hacer LNnT como se describe en el documento WO 2011/100980 y el documento WO 2013/044928 , se puede sintetizar LNT como se describe en el documento WO 2012/155916 y el documento WO 2013/044928 , se puede hacer una mezcla de LNT y LNnT como se describe en el documento WO 2013/091660 , se puede hacer 2'-FL como se describe en el documento WO 2010/115934 y el documento WO 2010/115935 , El 3-FL puede fabricarse como se describe en el documento el documento WO 2013/139344 , el 6'-SL y sus sales pueden fabricarse como se describe en el documento WO 2010/100979 , los oligosacáridos sialilados pueden fabricarse como se describe en el documento WO 2012/113404 y las mezclas de oligosacáridos de leche humana pueden fabricarse como se describe en el documento WO 2012/113405 . Como ejemplos de producción enzimática, los oligosacáridos sialilados pueden realizarse como se describe en el documento WO 2012/007588, los oligosacáridos fucosilados pueden realizarse como se describe en el documento WO 2012/127410, y las mezclas ventajosamente diversificadas de oligosacáridos de leche humana pueden realizarse como se describe en los documentos WO 2012/156897 y WO 2012/156898. Con respecto a los procedimientos biotecnológicos, los documentos WO 01/04341 y WO 2007/101862 describen cómo fabricar oligosacáridos de leche humana centrales opcionalmente sustituidos por fucosa o ácido siálico utilizando *E. coli* modificada genéticamente.

La composición sintética de la presente invención que comprende uno o varios monosacáridos de leche humana o uno o varios oligosacáridos de leche humana, o ambos, puede adoptar cualquier forma adecuada. Por ejemplo, la composición puede adoptar la forma de una composición nutricional que contenga otros macronutrientes como proteínas, lípidos u otros hidratos de carbono. La composición sintética también puede ser una composición farmacéutica. En una realización, la composición sintética contiene uno o más HMO de esqueleto y uno o más HMO fucosilo. En otra realización, la composición sintética contiene uno o más HMO de esqueleto y uno o más HMO sialilo. En otra realización, la composición sintética comprende uno o más HMO fucosilo y uno o más HMO sialilo. En una realización preferida, la composición sintética contiene uno o más HMO de esqueleto, uno o más HMO sialilo y uno o más HMO fucosilo.

Composiciones nutricionales

Una composición nutricional de la presente invención puede contener fuentes de proteínas, lípidos y/o carbohidratos digeribles y puede estar en forma de polvo o líquido. La composición puede estar diseñada para ser la única fuente de nutrición o un suplemento nutricional.

- 5 Las fuentes de proteínas adecuadas incluyen las proteínas de la leche, la proteína de la soja, la proteína del arroz, la proteína del guisante y la proteína de la avena, o sus mezclas. Las proteínas lácteas pueden presentarse en forma de concentrados de proteínas lácteas, aislados de proteínas lácteas, proteínas de suero o caseína, o mezclas de ambas. La proteína puede ser una proteína entera o hidrolizada, ya sea parcialmente hidrolizada o extensamente hidrolizada. La proteína hidrolizada ofrece la ventaja de una digestión más fácil, lo que puede ser importante para los
- 10 pacientes con el tracto gastrointestinal inflamado. La proteína también puede suministrarse en forma de aminoácidos libres. La proteína puede comprender entre aproximadamente 5 % y aproximadamente 30 % de la energía de la composición nutricional, normalmente entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 20 %.

- La fuente de proteínas puede ser una fuente de glutamina, treonina, cisteína, serina, prolina o una combinación de estos aminoácidos. La fuente de glutamina puede ser un dipéptido de glutamina y/o una proteína enriquecida con glutamina. La glutamina puede incluirse debido al uso de la glutamina por los enterocitos como fuente de energía. La
- 15 treonina, la serina y la prolina son aminoácidos importantes para la producción de mucina. La mucina recubre el tracto gastrointestinal y puede mejorar la cicatrización de la mucosa. La cisteína es un importante precursor del glutatión, que es clave para las defensas antioxidantes del organismo.

- Entre los hidratos de carbono digeribles adecuados se encuentran la maltodextrina, el almidón hidrolizado o modificado o el almidón de maíz, los polímeros de glucosa, el jarabe de maíz, los sólidos de jarabe de maíz de alta fructosa, los hidratos de carbono derivados del arroz, los hidratos de carbono derivados del guisante, los hidratos de carbono derivados de la patata, la tapioca, la sacarosa, la glucosa, la fructosa, la sacarosa, la lactosa, la miel, los
- 20 alcoholes de azúcar (p. ej. maltitol, eritritol, sorbitol), o mezclas de ellos. Preferiblemente, la composición no contiene lactosa. En general, los hidratos de carbono digeribles aportan entre aproximadamente 35 % y aproximadamente 55 % de la energía de la composición nutricional. Preferiblemente, la composición nutricional no contiene lactosa. Un hidrato de carbono digerible especialmente adecuado es una maltodextrina de bajo equivalente en dextrosa (DE).

- Los lípidos adecuados incluyen triglicéridos de cadena media (MCT) y triglicéridos de cadena larga (LCT). Preferiblemente, el lípido es una mezcla de MCT y LCT. Por ejemplo, los MCT pueden comprender entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 70 % en peso de los lípidos, más concretamente entre
- 30 aproximadamente 50 % y aproximadamente 60 % en peso. Los MCT ofrecen la ventaja de una digestión más fácil, lo que puede ser importante para los pacientes con el tracto gastrointestinal inflamado. Por lo general, los lípidos aportan entre aproximadamente 35 % y aproximadamente 50 % de la energía de la composición nutricional. Los lípidos pueden contener ácidos grasos esenciales (ácidos grasos omega-3 y omega-6). Preferiblemente, estos ácidos grasos poliinsaturados aportan menos de aproximadamente 30 % de la energía total de la fuente de lípidos.
- 35 Se cree que la reducción de los niveles de estos ácidos grasos poliinsaturados disminuye la sensibilidad a la peroxidación, lo que puede ser beneficioso para los pacientes con enfermedades inflamatorias.

- Las fuentes adecuadas de triglicéridos de cadena larga son el aceite de colza, el aceite de semilla de girasol, el aceite de palma, el aceite de soja, la grasa de leche, el aceite de maíz, los aceites de alto contenido oleico y la lecitina de soja. Los aceites de coco fraccionados son una fuente adecuada de triglicéridos de cadena media. El
- 40 perfil lipídico de la composición nutricional está diseñado preferentemente para tener una proporción de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 (n-6) a omega-3 (n-3) de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1. Por ejemplo, la proporción de ácidos grasos n-6 a n-3 puede ser de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 9:1.

- La composición nutricional incluye preferiblemente también vitaminas y minerales. Si la composición nutricional está destinada a ser una fuente única de nutrición, preferiblemente incluye un perfil completo de vitaminas y minerales.
- 45 Los ejemplos de vitaminas incluyen las vitaminas A, del complejo B (como B1, B2, B6 y B12), C, D, E y K, niacina y vitaminas ácidas como el ácido pantoténico, el ácido fólico y la biotina. Entre los minerales se encuentran el calcio, el hierro, el zinc, el magnesio, el yodo, el cobre, el fósforo, el manganeso, el potasio, el cromo, el molibdeno, el selenio, el níquel, el estaño, el silicio, el vanadio y el boro.

- La composición nutricional también puede incluir un carotenoide como luteína, licopeno, zeaxantina y beta-caroteno.
- 50 La cantidad total de carotenoide incluida puede variar desde aproximadamente 0,001 µg/ml hasta aproximadamente 10 µg/ml. La luteína puede incluirse en una cantidad de aproximadamente 0,001 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,044 µg/ml a aproximadamente 5 g/ml de luteína. El licopeno puede incluirse en una cantidad de aproximadamente 0,001 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml, preferentemente de aproximadamente 0,0185 mg/ml a aproximadamente 5 g/ml de licopeno. El betacaroteno puede incluirse en una
- 55 cantidad de aproximadamente 0,001 µg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,034 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml de betacaroteno.

La composición nutricional contiene preferentemente también concentraciones reducidas de sodio; por ejemplo, de aproximadamente 300 mg/l a aproximadamente 400 mg/l. Los electrolitos restantes pueden estar presentes en

concentraciones establecidas para satisfacer las necesidades sin proporcionar una carga renal indebida de solutos en la función renal. Por ejemplo, el potasio está presente preferentemente en un rango de aproximadamente 1180 a aproximadamente 1300 mg/l; y el cloruro está presente preferentemente en un rango de aproximadamente 680 a aproximadamente 800 mg/l.

- 5 La composición nutricional también puede contener otros ingredientes convencionales como conservantes, agentes emulsionantes, agentes espesantes, tampones, fibras y prebióticos (por ejemplo, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos), probióticos (por ejemplo, *B. animalis* subsp. *por ejemplo, B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *B. lactis* HN019, *B. lactis* Bi07, *B. infantis* ATCC 15697, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* HNOOI, *L. acidophilus* LA-5, *L. acidophilus* NCFM, *L. fermentum* CECT5716, *B. longum* BB536, *B. longum* AH1205, *B. longum* AH1206, *B. breve* M-16V, *L. reuteri* ATCC 55730, *L. reuteri* ATCC PTA-6485, *L. reuteri* DSM 17938), compuestos antioxidantes/antiinflamatorios como tocoferoles, carotenoides, ascorbato/vitamina C, palmitato de ascorbilo, polifenoles, glutatión y superóxido dismutasa (melón), otros factores bioactivos (por ejemplo, hormonas de crecimiento, citoquinas, TFG-β), colorantes, aromatizantes y estabilizadores, lubricantes, etc.

- 10 La composición nutricional puede tener la forma de un polvo soluble, un concentrado líquido o una formulación lista para usar. La composición puede suministrarse al paciente a través de una sonda nasogástrica o de forma bebible. También pueden estar presentes diversos sabores, fibras y otros aditivos.

- 15 Las composiciones nutricionales pueden prepararse mediante cualquier técnica de fabricación comúnmente utilizada para preparar composiciones nutricionales en forma sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede prepararse combinando varias soluciones para alimentación. Se puede preparar una solución de proteínas en grasa para alimentación calentando y mezclando la fuente de lípidos y añadiendo después un emulsionante (por ejemplo, lecitina), vitaminas liposolubles y al menos una parte de la fuente de proteínas mientras se calienta y se agita. A continuación, se prepara una solución de alimentación de carbohidratos añadiendo al agua minerales, oligoelementos y ultraminerales, y agentes espesantes o de suspensión, mientras se calienta y se agita. La solución resultante se mantiene durante 10 minutos con calor y agitación continuos antes de añadir los carbohidratos (por ejemplo, los HMO y las fuentes de carbohidratos digeribles). Las soluciones de alimentación resultantes se mezclan mientras se calientan y agitan y el pH se ajusta a 6,6-7,0, tras lo cual la composición se somete a un procesamiento de corta duración a alta temperatura durante el cual la composición se trata térmicamente, se emulsiona y se homogeniza, y luego se deja enfriar. Se añaden las vitaminas hidrosolubles y el ácido ascórbico, se ajusta el pH al rango deseado si es necesario, se añaden los aromas y se añade agua para conseguir el nivel total de sólidos deseado.

- 20 En el caso de un producto líquido, la solución resultante puede envasarse asépticamente para formar una composición nutricional envasada asépticamente. En esta forma, la composición nutricional puede estar en forma de líquido listo para la alimentación o concentrado. Alternativamente, la composición puede ser secada por pulverización y procesada y envasada como un polvo reconstituible.

- 25 Cuando el producto nutricional es un líquido nutricional listo para la alimentación, la concentración total de HMS/HMO en el líquido, en peso del líquido, es de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 2,0 %, incluyendo de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 1,5 %, incluyendo de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,0 %. Cuando el producto nutricional es un líquido nutricional concentrado, la concentración total de HMS/HMO en el líquido, en peso, es de aproximadamente 0,0002 % a aproximadamente 4,0 %, incluyendo de aproximadamente 0,002 % a aproximadamente 3,0 %, incluyendo de aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 2,0 %.

Formas de dosificación unitaria

- 30 La composición sintética de la presente invención también puede presentarse en una forma de dosificación unitaria, como una cápsula, un comprimido o un sobre. Por ejemplo, la composición puede estar en una forma de comprimido que comprenda los monosacáridos y/u oligosacáridos de la leche humana, y uno o más componentes adicionales para ayudar a la formulación y administración, como diluyentes, excipientes, antioxidantes, lubricantes, colorantes, aglutinantes, desintegrantes y similares.

- 35 Entre los diluyentes, excipientes, lubricantes, colorantes, aglutinantes y desintegrantes adecuados se encuentran el polietileno, el cloruro de polivinilo, la etilcelulosa, los polímeros de acrilato y sus copolímeros, la hidroxietilcelulosa, la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), la carboximetilcelulosa sódica, el polihidroxietilmetacrilato (PHEMA), el alcohol polivinílico (PVA) polivinilpirrolidona (PVP), óxido de polietileno (PEO) o poliacrilamida (PA), carragenina, alginato de sodio, policarbofilo, ácido poliacrílico, tragacanto, metilcelulosa, pectina, gomas naturales, goma xantana, goma guar, goma karaya, hipromelosa, estearato de magnesio, celulosa microcristalina y dióxido de silicio coloidal. Los antioxidantes adecuados son la vitamina A, los carotenoides, la vitamina C, la vitamina E, el selenio, los flavonoides, los polifenoles, el licopeno, la luteína, el lignano, la coenzima Q10 ("CoQ10") y el glutatión.

Las formas de dosificación unitarias, especialmente las que se presentan en forma de sobre, también pueden incluir varios nutrientes, incluidos los macronutrientes.

Dosificación de administración

- Para inducir y/o promover la cicatrización de la mucosa en un paciente, preferiblemente un ser humano, la cantidad de mono y/u oligosacárido(s) de leche humana que se requiere administrar al paciente variará dependiendo de factores tales como el riesgo y la gravedad de una afección gastrointestinal inflamatoria o una EII, la edad del paciente, la forma de la composición y otros medicamentos que se administren al paciente. Sin embargo, la cantidad requerida puede ser fijada fácilmente por un médico y generalmente estaría en el rango de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 20 g por día, en ciertas realizaciones de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 15 g por día, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 10 g por día, de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 10 g por día, o de aproximadamente 1 g a aproximadamente 7,5 g al día y, en otras realizaciones, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 20 g al día, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 20 g al día, de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 15 g al día o de aproximadamente 1 g a aproximadamente 10 g al día. La dosis adecuada puede determinarse en función de varios factores, incluidos, por ejemplo, el peso corporal y/o el estado del paciente que se está tratando, la gravedad de la afección gastrointestinal inflamatoria o EII que se está tratando, otras dolencias y/o enfermedades del paciente, la incidencia y/o la gravedad de los efectos secundarios y la forma de administración. Los rangos de dosis apropiados pueden determinarse mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Durante una fase de tratamiento inicial, la dosificación puede ser mayor (por ejemplo, de 200 mg a 20 g por día, en ciertas realizaciones preferiblemente de 500 mg a 15 g por día, más preferiblemente de 1 g a 10 g por día, incluso más preferiblemente de 2,5 g a 7,5 g por día, y en otras realizaciones preferiblemente de 500 mg a 20 g por día, más preferiblemente de 1 g a 20 g por día, incluso más preferiblemente de 1,5 g a 2,5 g por día). Durante una fase de mantenimiento, la dosificación puede reducirse (por ejemplo, a 10 mg a 10 g por día, en ciertas realizaciones preferiblemente a 100 mg a 7,5 g por día, más preferiblemente a 500 mg a 5 g por día, incluso más preferiblemente a 1 g a 2,5 g por día, y en otras realizaciones preferiblemente a 100 mg a 10 g por día, más preferiblemente a 500 mg a 7,5 g por día, incluso más preferiblemente a 1 g a 5 g por día).
- Una composición sintética de la presente invención puede ser coadministrada a un paciente que también está recibiendo una medicación estándar como un 5-aminosalicilato, un corticosteroide o un tratamiento anti-TNF- α para mejorar el protocolo de tratamiento promoviendo la cicatrización de la mucosa. Esto puede hacer que el paciente entre en remisión más rápidamente, permitiendo que se reduzca la dosis de la medicación estándar. Del mismo modo, la composición sintética de la presente invención puede mantener al paciente en remisión durante más tiempo mediante el mantenimiento de la integridad de la mucosa.

Ejemplos

A continuación, se describen ejemplos para ilustrar mejor la invención:

Ejemplo 1 - Tratamiento del modelo de inflamación aguda

- Se utilizó un modelo de ratón con dextrano sulfato sódico (DSS). El DSS interfiere con la función de barrera intestinal y luego estimula la inflamación local. Por lo tanto, el DSS induce una forma de colitis de ratón que imita las características clínicas e histológicas de las EII que tienen características de la CU. Doscientos cuarenta ratones C57BL/6 machos que pesaban entre 20 y 25 g fueron alojados en jaulas individuales a temperatura controlada (22 °C) con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas. Fueron divididos en 12 grupos de 20 ratones; un grupo de control y 11 grupos de tratamiento. Todos los ratones fueron alimentados con la misma dieta seca para roedores, excepto que la dieta de los ratones de control incluyó celulosa (50 g/kg de dieta) y cada grupo de tratamiento incluyó celulosa (30 g/kg de dieta) y un HMS/HMO (20 g/kg de dieta). Los HMS/HMO en los grupos de tratamiento fueron ácido siálico, L-fucosa, 2'-FL, 3-FL, 3'-SL, 6'-SL, LNT, LNnT, LNFP-I, DSLNT, una combinación de cada uno de estos sacáridos. Se les proporcionó comida fresca a diario. Todos los ratones tenían libre acceso al agua potable.
- Después de un período de adaptación de 7 días, los ratones de control y de tratamiento fueron distribuidos al azar en dos grupos experimentales. Un grupo, denominado grupo DSS, fue tratado con DSS disuelto en el agua de bebida. La concentración de DSS fue de aproximadamente un 2-4% durante los primeros 4 días y luego los ratones pasaron a un período de recuperación en el que no se administró DSS. El otro grupo de ratones, denominado grupo alimentado por parejas (PF), no recibió DSS y fue alimentado con la cantidad media de comida consumida por el grupo DSS.
- Durante el tratamiento, se evaluó diariamente el peso corporal, la ingesta de alimentos y la presencia de sangre en las heces. La visualización directa del daño y la cicatrización de la mucosa colónica in vivo se realizó utilizando el Coloview (Karl Storz Veterinary Endoscopy, Tuttlingen, Alemania). Los ratones fueron anestesiados con 1,5 a 2 % de isoflurano y visualizaron 3 cm del colon proximal al ano tras inflar el colon con aire. La cicatrización de la mucosa se evaluó visualmente mediante cuatro descriptores
- patrón vascular (normal - 0, parcialmente visible - 1, pérdida completa - 2)
 - granularidad (normal - 0, fino - 1, grueso - 2)
 - ulceración (normal - 0, erosiones - 1, superficial - 2, profunda - 3, difusa > 30 % de profundidad - 4)

- sangrado/friabilidad (normal - 0, friable - 1, sangrado espontáneo - 2).

La puntuación fue 3,1 x patrón vascular + 3,6 x granularidad + 3,5 x ulceración + 2,5 x sangrado/friabilidad.

Al final del protocolo, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico. Los ratones fueron desangrados mediante una muestra de sangre de la aorta abdominal y el plasma se separó por centrifugación y se mantuvo a -80 °C hasta su análisis. Los siguientes tejidos se extrajeron rápidamente, se secaron con un paño, se pesaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su análisis: bazo, timo, hígado, pulmón y músculos gastrocnemio y sóleo. El íleon y el ciego se extrajeron, se enjuagaron con PBS frío, se pesaron y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. El colon se enjuagó con PBS frío, se secó, se pesó y se dividió en secciones para la extracción de la mucosa y la evaluación histológica, y el resto se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la legislación vigente sobre experimentación animal en Europa.

La presencia de diarrea y/o sangre en las heces fue evaluada siguiendo un sistema de puntuación: 0 = sin sangre, sin diarrea; 0,5 = sin sangre con diarrea; 1 = poca sangre con diarrea; 1,5 = sin sangre con diarrea severa; 2 = poca sangre con diarrea severa; 2,5 = mucha sangre con diarrea severa. El recuento de células sanguíneas (glóbulos blancos y rojos, plaquetas y hematocrito) se determinó con un contador hematológico automático en sangre fresca. Dos patólogos que no conocían los grupos experimentales analizaron las secciones de colon de espesor total (5 mm) teñidas con hematoxilina y eosina. Se tomaron microfotografías con un microscopio Leica DM 500B.

En el ciego y el colon se analizó la actividad de la mieloperoxidasa (MPO). La actividad de MPO está ampliamente aceptada como marcador de la infiltración de neutrófilos en los tejidos, y está correlacionada con el recuento de glóbulos blancos y asociada a las lesiones histológicas del colon en los ratones tratados con DSS.

La expresión génica, incluida la de las citocinas, se determinó como sigue. El ARN total se extrajo utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transcribió de forma inversa utilizando el kit de síntesis de ADNc (Fermentas, Glen Burnie, MD). La RT-PCR se realizó con el kit GeneJET Fast PCR (Fermentas, Glen Burnie, MD). La RT-PCR en tiempo real se realizó utilizando un iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA). Brevemente, el ADNc se amplificó mediante 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 minuto, utilizando el sistema iQ SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA) y cebadores específicos. Durante los 7 días anteriores al tratamiento con DDS, el aumento de peso corporal y la ingesta de alimentos fueron similares en los ratones de control y de tratamiento. En los ratones de control con DSS, la ingesta de alimentos se redujo durante el tratamiento y el periodo de recuperación. En los ratones tratados con DSS, la ingesta de alimentos disminuyó inicialmente pero luego se recuperó. El peso corporal siguió el mismo patrón. El peso del gastrocnemio, el hígado, el timo y el íleon de los ratones sometidos a tratamiento con DSS fue inferior al de los ratones de control con FP, pero superior al de los ratones de control con DSS.

Se obtuvieron resultados similares para la relación peso/longitud del colon, lo que indica una respuesta inflamatoria local más débil. Los ratones de control DSS tenían una puntuación media de heces más alta que los ratones tratados con DSS.

El tratamiento con DSS provocó un aumento de los leucocitos tanto en los ratones de control como en los de tratamiento; especialmente los granulocitos. El grupo de tratamiento con DDS tenía menos aumento de leucocitos que el grupo de control con DSS.

La actividad de MPO en el colon fue mayor en los ratones de control DSS en comparación con su control PF. Por el contrario, la actividad de la MPO del colon en los ratones tratados con DSS no fue diferente estadísticamente de la de su grupo de FP.

El análisis de la expresión génica reveló que el tratamiento con DSS provocó una reducción de la expresión de factores de crecimiento relevantes para la maduración y la reparación intestinal. Sin embargo, los ratones del grupo tratado con DSS tenían una mayor expresión del gen de la proteína relacionada con el factor de crecimiento epidérmico, hasta alcanzar valores normales. La recuperación de la expresión del gen del factor de crecimiento de la placenta, que participa en la regulación de la angiogénesis, fue evidente en los ratones tratados con DSS. Un grupo de genes que codifican mucinas (MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-5) están regulados a la baja por el tratamiento con DSS, pero su expresión tiende a ser normal en los ratones tratados con DSS; especialmente el MUC-2. La fosfatasa alcalina, un marcador de la EII, fue inducida por el tratamiento con DSS, pero su expresión volvió a ser normal en los ratones tratados con DSS. Los genes implicados en la inflamación, en concreto la IL-1b, se vieron fuertemente inducidos por el tratamiento con DSS. Sin embargo, los ratones tratados con DSS tenían una menor expresión de esta y otras citoquinas inflamatorias en comparación con los ratones de control de DSS. La expresión de la IL-10 estaba regulada al alza en los ratones tratados con DSS en comparación con los ratones de control.

El HMS/HMO protegió a los ratones de la toxicidad del DSS, ya que los ratones alimentados con el HMS/HMO mostraron síntomas clínicos menos graves (diarrea, lesiones colónicas y heces sanguinolentas) que los ratones de control del DSS. Además, los ratones del tratamiento se recuperaron mejor del proceso inflamatorio agudo, como demostraron las lesiones colónicas y los síntomas clínicos menos graves. Los ratones del tratamiento también

mostraron una respuesta inflamatoria más débil. Los ratones del tratamiento con DSS presentaron una mejor cicatrización de la mucosa en comparación con los ratones de control con DSS.

Ejemplo 2 - Tratamiento del modelo de inflamación crónica

Los ratones knock out de IL-10 se utilizaron porque desarrollan una afección crónica cercana a la EC humana. Los ratones knock-out de IL-10 se alojaron y criaron en condiciones específicas libres de patógenos. A las cuatro semanas de su nacimiento, los ratones se expusieron a un desencadenante ambiental para inducir la colitis (en este caso, el alojamiento en condiciones no patógenas). En estas condiciones, se esperaba que cerca del 100% de los ratones desarrollaran una colitis de moderada a grave. Los ratones se separaron en doce grupos de 10 ratones como sigue:

- 5
- 10 Grupo 1 - control
- Grupo 2 - ácido siálico
- Grupo 3 - L-fucosa
- Grupo 4 - 2'-FL
- Grupo 5 - 3-FL
- 15 Grupo 6 - 3'-SL
- Grupo 7 - 6'-SL
- Grupo 8 - LNT
- Grupo 9 - LNNt
- Grupo 10 - LNFP-I
- 20 Grupo 11 - DSLNT
- Grupo 12: una combinación de cada uno de los sacáridos anteriores.

Para los grupos de tratamiento (2 - 12), el tratamiento con sacáridos se inició en el momento del destete. Los sacáridos se añadieron al agua de bebida a una concentración de 5 mM. Se administró agua fresca diariamente y todos los ratones tenían libre acceso al agua de bebida. Los ratones fueron alimentados con un pienso para roedores y se les dió pienso fresco diariamente. Los ratones fueron alimentados con los sacáridos durante 4 semanas.

Los ratones fueron evaluados semanalmente en cada uno de los siguientes parámetros: moco perianal excretado, prolapso rectal, daño de la mucosa y cicatrización por endoscopia, diarrea y pérdida de peso. Se asignaron puntuaciones de 0 o 1 para obtener una puntuación clínica que se asemejara al índice de actividad de la enfermedad de Crohn. Se recogieron muestras de heces semanalmente. Las muestras se sometieron a un análisis de la microbiota (pírosecuenciación del ARN 16S) y se emulsionaron en 500 µl/100 µg de heces en PBS con inhibidor de tripsina de soja y fluoruro de fenilmetilsulfonilo y se centrifugaron. Los sobrenadantes se recogieron y se mantuvieron congelados a -20 °C hasta su uso. La expresión génica se midió como se describe en el ejemplo 1.

La cicatrización de la mucosa se evaluó visualmente utilizando un sistema de puntuación del Índice Endoscópico de Gravedad de la Enfermedad de Crohn (CDEIS) modificado.

Los parámetros clínicos y los resultados de los biomarcadores fueron similares a los obtenidos en el Ejemplo 1, ya que los ratones de tratamiento presentaron niveles reducidos de citoquinas proinflamatorias, aumentaron la expresión de MUC-2 y mejoraron las puntuaciones de cicatrización de la mucosa.

Ejemplo 3 - Modelo de tratamiento preventivo de la inflamación crónica

El protocolo del ejemplo 2 se repitió excepto que (1) sólo había dos grupos de ratones, el grupo de control y un grupo de tratamiento que recibió una combinación de todos los HMS/HMO; y (2) la intervención comenzó 1 semana antes de la exposición al desencadenante ambiental.

Los ratones tratados retrasaron/limitaron el desarrollo de colitis en comparación con el grupo de control. Esto indicó las propiedades preventivas del HMS/HMO. Otros parámetros fueron similares a los obtenidos en el ejemplo 2.

Ejemplo 4 - Tratamiento de una afección crónica cercana al modelo de inflamación humana

Los ratones MUC2 knock out se utilizaron porque desarrollan una afección crónica cercana a la CU humana. Los ratones MUC2 knock-out se alojaron y criaron en condiciones específicas libres de patógenos. A las cuatro semanas

de nacer, los ratones se expusieron a un desencadenante ambiental para inducir la colitis (en este caso, el alojamiento en condiciones no SPF). En estas condiciones, se esperaba que cerca del 100% de los ratones desarrollaran una colitis de moderada a grave. Los ratones se separaron en doce grupos de 10 ratones como sigue:

- Grupo 1 - control
- 5 Grupo 2 - ácido siálico
- Grupo 3 - L-fucosa
- Grupo 4 - 2'-FL
- Grupo 5 - 3-FL
- Grupo 6 - 3'-SL
- 10 Grupo 7 - 6'-SL
- Grupo 8 - LNT
- Grupo 9 - LNnT
- Grupo 10 - LNFP-I
- Grupo 11 - DSLNT
- 15 Grupo 12: una combinación de cada uno de los sacáridos anteriores.

Para los grupos de tratamiento (2 - 12), el tratamiento con sacáridos se inició en el momento del destete. Los sacáridos se añadieron al agua de bebida a una concentración de 5 mM. Se administró agua fresca diariamente y todos los ratones tenían libre acceso al agua de bebida. Los ratones fueron alimentados con un pienso para roedores y se les proporcionó pienso fresco diariamente. Los ratones fueron alimentados con los sacáridos durante 4 semanas.

Los ratones fueron evaluados semanalmente en cada uno de los siguientes parámetros: moco perianal excretado, prolapso rectal, daño de la mucosa y cicatrización por endoscopia, diarrea y pérdida de peso. Se dieron puntuaciones de 0 o 1 para obtener una puntuación clínica que se asemejara al índice de actividad de la enfermedad de Crohn. Se recogieron muestras de heces semanalmente. Las muestras se sometieron a un análisis de la microbiota (pirosecuenciación del ARN 16S) y se emulsionaron en 500 µl/100 µg de heces en PBS con inhibidor de tripsina de soja y fluoruro de fenilmetilsulfonilo y se centrifugaron. Los sobrenadantes se recogieron y se mantuvieron congelados a -20 °C hasta su uso. La expresión génica se midió como se describe en el ejemplo 1.

La cicatrización de la mucosa se evaluó visualmente utilizando un sistema de puntuación del Índice Endoscópico de Gravedad de la Enfermedad de Crohn (CDEIS) modificado.

30 Los parámetros clínicos y los resultados de los biomarcadores fueron similares a los obtenidos en el Ejemplo 1, con los ratones de tratamiento que tenían niveles reducidos de citoquinas proinflamatorias y puntuaciones de cicatrización de la mucosa mejoradas.

Ejemplo 5 - Tratamiento preventivo de una afección crónica cercana al modelo de inflamación humana

35 El protocolo del ejemplo 4 se repitió excepto que (1) sólo había dos grupos de ratones, el grupo de control y un grupo de tratamiento que recibió una combinación de todos los HMS/HMO; y (2) la intervención comenzó 1 semana antes de la exposición al desencadenante ambiental.

Los ratones tratados retrasaron/limitaron el desarrollo de colitis en comparación con el grupo de control. Esto indicó las propiedades preventivas del HMS/HMO. Otros parámetros fueron similares a los obtenidos en el ejemplo 4.

Ejemplo 6 - Modelo de función de barrera de la mucosa

40 El ácido siálico, la L-fucosa, el 2'-FL, el 3-FL, el 3'-SL, el 6'-SL, el LNT, el LNnT, el LNFP-I, el DSLNT y una combinación de cada uno de estos sacáridos se sometieron a prueba con respecto a su capacidad para inducir la expresión de MUC2, TFF3, EIMβ, CHST5 y GAL3ST2 en el modelo de cultivo celular humano LS174T de células caliciformes. Las células LS174T (ATCC) se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado según las instrucciones a 37 °C en 5 % de CO₂. El ácido siálico, la L-fucosa, el 2'-FL, el 3-FL, el 3'-SL, el 6'-SL, el LNT, el LNnT, el LNFP-I, el DSLNT y una combinación de cada uno de estos sacáridos se disolvió en agua de cultivo celular hasta la concentración requerida. Las células LS174T se trataron con la solución HMS/HMO que contenía 0 o 5 mg de HMS/HMO por ml.

Las células LS174T se recogieron y suspendieron en el reactivo Trizol y se aisló el ARN total utilizando un kit de análisis de ARN (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los aislados de ARN se cuantificaron utilizando el análisis Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Los aislados de ARN se transcribieron de forma inversa utilizando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) para crear ADNc, que luego se utilizó para evaluar la expresión génica mediante PCR cuantitativa.

Para la RT-PCR cuantitativa, se obtuvieron ensayos específicos de expresión génica TaqMAN de Applied Biosystems, que incluían ensayos de expresión para MUC2, TFF3, CHST5 y GAL3ST2. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando la mezcla maestra TaqMAN PCR (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron por duplicado en una placa de 384 pocillos utilizando un sistema de PCR rápida en tiempo real 7900HT de Applied Biosystems. Los resultados se analizaron con el software SDS 2.3 y se calcularon por el procedimiento delta Ct. Todas las muestras se normalizaron con respecto a la expresión de Gus-β y se calculó la inducción de pliegues con respecto a los controles no tratados. La expresión de los genes se expresó como el aumento del pliegue en comparación con las células de control sin HMS/HMO. El experimento se repitió tres veces.

Los resultados indicaron que los HMS/HMO y su combinación aumentaron la expresión de los genes MUC2 y TFF3 en comparación con los cultivos de control. El aumento de la expresión de los genes de las células caliciformes es específico y no universal, como lo demuestra la mínima inducción o la falta de inducción de CHST5 y GAL3ST2, respectivamente. MUC2 y TFF3 son componentes clave de la barrera de la mucosa y mejoran su función.

Ejemplo 7 - Composición nutricional

Se preparó una composición nutricional lista para alimentación a partir de agua, maltodextrina, proteína de suero hidrolizada enzimáticamente (de leche de vaca), triglicéridos de cadena media (de aceite de coco y/o de palmiste), almidón de maíz, aceite de soja, lecitina de soja, HMS/HMO, cloruro de magnesio, fosfato de calcio, goma guar, ascorbato de sodio, citrato de potasio, fosfato de sodio, citrato de calcio, cloruro de colina, cloruro de potasio, citrato de sodio, óxido de magnesio, taurina, L-carnitina, acetato de alfa-tocoferilo, sulfato de zinc, sulfato ferroso, niacinamida, pantotenato de calcio, palmitato de vitamina A, ácido cítrico, sulfato de manganeso, clorhidrato de piridoxina, vitamina D3, sulfato de cobre, mononitrato de tiamina, riboflavina, betacaroteno, ácido fólico, biotina, yoduro de potasio, cloruro de cromo, selenato de sodio, molibdato de sodio, fitonadiona, vitamina B12.

La composición tenía una densidad calorífica de 1,0 kcal/ml con una distribución calórica (% de kcal) como sigue: proteínas: 16 %, hidratos de carbono: 51 %, grasa: 33 %. La fuente de proteínas tenía una relación NPC:N de 131:1. La relación MCT:LCT era de 70:30 y la relación n6:n3 era de 7,4:1. La osmolaridad (mOsm/kg de agua) era de 270 sin sabor. La composición contenía un 85 % de agua y 1500 ml cumpliendo el 100 % de la IDR de 22 micronutrientes clave.

La composición tenía un perfil de péptidos equilibrado que favorecía la absorción e integridad gastrointestinal y la proteína de suero 100 % hidrolizada enzimáticamente facilitando el vaciado gástrico. El MCT disminuyó el potencial de malabsorción de grasas. La composición era nutricionalmente completa para la alimentación por sonda o la suplementación oral.

Ejemplo 8 - Composición del comprimido

Se preparó un comprimido con HMS/HMO, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, goma, celulosa microcristalina, dióxido de silicio coloidal y estearato de magnesio. Todas las materias primas, excepto el estearato de magnesio, se colocaron en un granulador de alto cizallamiento y se premezclaron. Se pulverizó agua sobre la premezcla mientras se continuó mezclando a 300 rpm. El granulado se transfirió a un secador de lecho fluidizado y se secó a 75 °C. El polvo seco se tamizó y se clasificó con un molino. El polvo resultante se lubricó con estearato de magnesio y se prensó en forma de comprimidos. Cada comprimido contenía 325 mg de HMS/HMO. Los comprimidos tenían un peso de 750 mg cada uno.

Ejemplo 9 - Composición de la cápsula

Se preparó una cápsula llenando aproximadamente 1 g de HMS/HMO en una cápsula de gelatina 000 utilizando una máquina de llenado. A continuación, se cerraron las cápsulas. El HMS/HMO estaba en forma de polvo de flujo libre.

REIVINDICACIONES

1. Uno o más oligosacáridos de la leche humana (HMO) para su uso para:
 - tratar a un paciente con EII que tenga una ulceración para inducir la remisión al inducir y/o promover la cicatrización de la mucosa en el paciente,
- 5
 - mantener a un paciente con EII en remisión induciendo/promoviendo la cicatrización de la mucosa en el paciente y manteniendo la integridad de la mucosa,
 - promover la cicatrización de la mucosa en un paciente con una ulceración debida a una enfermedad gastrointestinal inflamatoria, y/o
 - inducir la cicatrización de la mucosa en un paciente con una ulceración debida a una afección gastrointestinal inflamatoria.
- 10
2. Una composición sintética para su uso para:
 - tratar a un paciente con EII que tenga una ulceración para inducir la remisión al inducir y/o promover la cicatrización de la mucosa en el paciente,
 - mantener a un paciente con EII en remisión induciendo/promoviendo la cicatrización de la mucosa en el paciente y manteniendo la integridad de la mucosa,
 - promover la cicatrización de la mucosa en un paciente con una ulceración debida a una enfermedad gastrointestinal inflamatoria, y/o
 - inducir la cicatrización de la mucosa en un paciente con una ulceración debida a una afección gastrointestinal inflamatoria,
- 15
- 20 **caracterizada porque** la composición contiene una cantidad eficaz de uno o más oligosacáridos de la leche humana (HMO).
3. El uno o más HMO para su uso según la reivindicación 1 o la composición sintética para su uso según la reivindicación 2, en el que el paciente es un ser humano.
4. El uno o más HMO para su uso según la reivindicación 1 o 3, o la composición sintética para su uso según la reivindicación 2 o 3, en el que el uso es para:
 - tratar a un paciente con EII que tenga una ulceración para inducir la remisión mediante la inducción y/o la promoción de la cicatrización de la mucosa en el paciente, y/o
 - mantener a un paciente con EII en remisión induciendo/promoviendo la cicatrización de la mucosa en el paciente y manteniendo la integridad de la mucosa.
- 25
5. El uno o más HMO o la composición sintética para su uso según la reivindicación 4, en el que el paciente con EII es un paciente con EII de moderada a grave que está recibiendo tratamiento inmunomodulador.
- 30
6. El uno o más HMO para su uso según la reivindicación 1 o 3, o la composición sintética para su uso según la reivindicación 2 o 3, en el que el uso es promover la cicatrización de la mucosa en un paciente que tenga ulceración debido a una afección gastrointestinal inflamatoria.
- 35
7. El uno o más HMO para su uso según la reivindicación 1 o 3, o la composición sintética para su uso según la reivindicación 2 o 3, en el que el uso es inducir la cicatrización de la mucosa en un paciente que tenga ulceración debido a una afección gastrointestinal inflamatoria.
- 40
8. El uno o más HMO para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7, o la composición sintética para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 7, en el que el paciente es un paciente pediátrico o adulto.
9. La composición sintética para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que es una composición nutricional.
10. La composición sintética para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, comprende además una fuente de treonina, serina y/o prolina.
- 45
11. El uno o más HMO para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 8, o la composición sintética para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que los HMO comprenden
 - uno o más HMO de esqueleto y uno o más HMO fucosilos,

- uno o más HMO de esqueleto y uno o más HMO sialilos, o

- uno o más HMO fucosilos y uno o más HMO sialilos.

12. El uno o más HMO para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 8, o la composición sintética para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que los HMO comprenden uno o más HMO de esqueleto, uno o más HMO sialilos y uno o más HMO fucosilos.
- 5
13. El uno o más oligosacáridos de la leche humana (HMO) para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 8, o la composición sintética para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que el oligosacárido de la leche humana se selecciona entre 2'-FL, 3-FL, DFL, 3'-SL, 6'-SL, LNT, LNnT, LNFP-I y DSLNT.