

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 363**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/29** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2004** **E 09158304 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013** **EP 2100520**

54 Título: **Mejora de la integridad de la barrera intestinal**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.11.2013**

73 Titular/es:

**N.V. NUTRICIA (100.0%)  
EERSTE STATIONSSTRAAT 186  
2712 HM ZOETERMEER, NL**

72 Inventor/es:

**VAN TOL, ERIC ALEXANDER FRANCISCUS;  
WILLEMSSEN, LINETTE EUSTACHIA MARIA;  
KOETSIER, MARLEEN ANTOINETTE;  
BEERMANN, CHRISTOPHER y  
STAHL, BERND**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 431 363 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**

Mejora de la integridad de la barrera intestinal

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un método para mejorar la integridad de la barrera intestinal y a una composición adecuada para usar en dicho método.

10 Antecedentes de la invención

[0002] El epitelio gastrointestinal normalmente funciona como una barrera selectiva que permite la absorción de nutrientes, electrolitos y agua y que previene la exposición a antígenos microbianos y dietéticos, incluyendo alérgenos alimenticios. El epitelio gastrointestinal limita el pasaje de antígenos a la circulación sistémica, que puede causar reacciones inflamatorias, por ejemplo las reacciones alérgicas. Como la incidencia de la alergia, particularmente alergia alimenticia, está en aumento, muchos grupos de investigación buscan curas (preventivas) para estas dolencias.

[0003] El documento EP1272058 describe una composición que contiene oligosacáridos indigeribles para mejorar las uniones ocluyentes para reducir la permeabilidad intestinal y reducir las reacciones alérgicas. La composición puede comprender LC-PUFA (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga).

[0004] El documento EP 745001 describe una combinación de oligosacáridos indigeribles y de ácidos grasos n-3 y n-6 para el tratamiento de la colitis ulcerosa.

[0005] Usami et al (Clinical Nutrition 2001, 20(4): 351-359) describe el efecto de ácido eicosapentaenoico (EPA) en la permeabilidad de las uniones ocluyentes en las células de la monocapa intestinal. Ellos descubrieron que el EPA aumenta la permeabilidad, indicando que el EPA no es adecuado para mejorar la integridad de la barrera intestinal.

[0006] Las formulaciones del estado de la técnica no son óptimamente adecuadas para mejorar la integridad de la barrera.

Resumen de la invención

[0007] La presente invención provee una combinación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga seleccionados (LC-PUFA) y oligosacáridos seleccionados. La presente combinación de LC-PUFA y oligosacáridos mejora eficazmente la integridad de la barrera, mejorando de forma sinérgica la permeabilidad intestinal y la producción de mucosa, y es particularmente adecuada para mejorar la integridad de la barrera en bebés humanos.

[0008] Se descubrió sorprendentemente que los LC-PUFA seleccionados reducen eficazmente la permeabilidad paracelular epitelial. A diferencia de lo que Usami et al (Clinical Nutrition 2001, 20(4): 351-359) han declarado, los presentes inventores descubrieron que los ácidos grasos poliinsaturados C18 y C20, particularmente el ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (ARA), son capaces de reducir eficazmente la permeabilidad de las uniones ocluyentes.

[0009] Además de los LC-PUFA, la presente composición contiene oligosacáridos. Los oligosacáridos seleccionados mejoran la integridad de la barrera estimulando la producción de mucosidad, que tiene como resultado un aumento en el espesor de la capa de mucosidad. Se cree que este efecto está provocado por los efectos de los distintos oligosacáridos en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA). Por lo tanto, cuando se administra completamente a un mamífero, la presente combinación de LC-PUFA y oligosacáridos indigeribles mejora sinérgicamente la integridad de la barrera y/o reduce sinérgicamente la permeabilidad intestinal por reducción simultánea de la permeabilidad de las uniones ocluyentes y la estimulación de la producción de mucosidad.

[0010] En otro aspecto, la presente composición mejora la calidad de la capa de mucosidad intestinal. La capa de mucosidad comprende mucinas. Las mucinas son glicoproteínas de elevada masa molecular que son sintetizadas y segregadas por células caliciformes. Forman una capa de tipo gel sobre la superficie mucosa, mejorando así la integridad de la barrera. La capa de mucosa comprende diferentes tipos de mucinas, por ejemplo mucinas ácidas, neutras y sulfonadas. Se considera que una mayor heterogeneidad de la capa de mucosa mejora la funcionalidad de la barrera.

[0011] La presente composición comprende preferiblemente al menos dos oligosacáridos diferentes, que influyen en la arquitectura de la mucosa e influyen ventajosamente en la heterogeneidad de las mucinas en la capa de mucosa, bien directamente o cambiando la flora intestinal. Se considera que cada oligosacárido diferente seleccionado tiene un efecto diferente sobre la cantidad y la calidad de la mucosa. Además, los dos oligosacáridos diferentes también son capaces de estimular la calidad de la mucosa reflejada por el grado de sulfatación a través de su estimulación sinérgica de producción de SCFA. Los presentes inventores descubrieron de modo sorprendente que una mezcla de dos

oligosacáridos diferentes según la presente invención estimula sinérgicamente la producción de acetato. Los presentes inventores descubrieron también que la producción de mucosa depende de la producción de acetato.

[0012] La presente composición está además preferiblemente mejorada por el hecho de proveer tanto oligosacáridos de cadena larga como de cadena corta. El suministro de diferentes longitudes de cadena tiene como resultado la estimulación de la producción de mucosidad en diferentes partes del íleon y colon. Los oligosacáridos de cadena corta (típicamente con un grado de polimerización (DP) de 2, 3, 4 o 5) estimulan la producción de mucina en el colon proximal y/o íleon distal, mientras que se cree que los oligosacáridos con longitudes de cadena más larga (preferiblemente con un grado de polimerización (DP) superior a 5 hasta 60) estimulan la producción de mucina en las partes más distales del colon.

[0013] Incluso otras mejoras pueden ser obtenidas a través del suministro de al menos dos oligosacáridos diferentes, ambos en forma de oligosacáridos de cadena corta y de cadena larga. Todas estas formas de realización preferidas contribuyen a mejorar además la integridad de la barrera en todo el íleon y/o colon.

[0014] Además, se descubrió de modo sorprendente que el EPA, el DHA y el ARA eran capaces de reducir los efectos nocivos de la interleuquina 4 (IL-4) sobre la permeabilidad intestinal. La IL-4 es una citocina segregada en grandes cantidades por células T mucosales en ciertos pacientes e induce la permeabilidad intestinal. Por lo tanto, la presente invención provee también un método para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades donde la concentración de IL-4 intestinal se incrementa, como una alergia, en particular una dermatitis atópica.

Descripción detallada de la invención

[0015] La presente invención se refiere a una composición nutricional que comprende:

- a) EPA, DHA y ARA, donde el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga con 20 y 22 átomos de carbono no excede el 15% en peso del contenido de grasa total; y
- b) al menos dos oligosacáridos diferentes, donde los dos oligosacáridos diferentes tienen una homología en unidades de monosacárido por debajo del 90%.

[0016] Esta composición se puede utilizar ventajosamente en un método para estimular la integridad de la barrera intestinal, comprendiendo dicho método la administración de dicha composición a un mamífero.

#### Ácidos grasos poliinsaturados

[0017] Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que el ácido eicosapentaenoico (EPA, n-3), el ácido docosahexaenoico (DHA, n-3) y el ácido araquidónico (ARA, n-6) reducen eficazmente la permeabilidad de las uniones ocluyentes intestinales. Por lo tanto la presente composición, que es particularmente adecuada para mejorar la integridad de la barrera intestinal, comprende EPA, DHA y ARA.

[0018] Los presentes inventores descubrieron que una concentración inferior de LC-PUFA era eficaz para la reducción de la permeabilidad de las uniones concluyentes (ver ejemplos vs. Usami et al). Por lo tanto, el contenido de LC-PUFA con 20 y 22 átomos de carbono en la presente composición, no excede preferiblemente el 15% en peso del contenido total de grasas, preferiblemente no excede el 10% en peso, incluso más preferiblemente no excede el 5% en peso del contenido total de grasas. Preferiblemente la presente composición comprende al menos 0,1% en peso, preferiblemente al menos 0,25 en peso, más preferiblemente al menos 0,5% en peso, incluso más preferiblemente al menos 0,75% en peso de LC-PUFA con 20 y 22 átomos de carbono del contenido total de grasas. Por la misma razón, el contenido de EPA no excede preferiblemente el 5% en peso de grasa total, más preferiblemente no excede el 1% en peso, pero preferiblemente es de al menos 0,05% en peso, más preferiblemente de al menos 0,1% en peso de grasa total. El contenido de DHA preferiblemente no excede el 5% en peso, más preferiblemente no excede el 1% en peso, pero es de al menos 0,1% en peso de la grasa total. Como se descubrió que el ARA es particularmente eficaz para la reducción de la permeabilidad de las uniones ocluyentes, la presente composición comprende cantidades relativamente altas, preferiblemente de al menos 0,1% en peso, incluso más preferiblemente de al menos 0,25% en peso, de forma aún más preferible al menos 0,5% en peso de grasa total. El contenido de ARA preferiblemente no excede el 5% en peso, más preferiblemente no excede el 1% en peso de la grasa total. En la presente composición enteral que contiene ARA, se añade EPA y DHA ventajosamente para equilibrar la acción del ARA, por ejemplo reducen la acción proinflamatoria potencial de los metabolitos de ARA. Metabolitos de ARA en exceso pueden causar inflamación. Por lo tanto, la presente composición comprende preferiblemente ARA, EPA y DHA, donde la proporción en peso de ARA/DHA preferiblemente es superior a 0,25, preferiblemente superior a 0,5, aún más preferiblemente superior a 1. La proporción es preferiblemente inferior a 25. La proporción en peso de ARA/EPA se sitúa preferiblemente entre 1 y 100, más preferiblemente entre 5 y 20.

[0019] La presente composición comprende preferiblemente entre un 5 y un 75% en peso de ácidos grasos poliinsaturados en base a la grasa total, preferiblemente entre un 10 y un 50% en peso.

5 [0020] Si la presente composición es usada como una fórmula infantil (por ejemplo, un método para alimentar a un bebé, dicho método comprendiendo la administración de la presente composición a un bebé), el contenido de LC-PUFA, particularmente los LC-PUFA con 20 y 22 átomos de carbono, preferiblemente no excede el 3% en peso del contenido total de grasa tal como se desea para imitar la leche humana de la forma más similar posible. Por la misma razón, el contenido de LC-PUFA omega-3 preferiblemente no excede un 1% en peso del contenido total de grasa; el contenido de LC-PUFA omega-6 preferiblemente no excede un 2% en peso del contenido de grasa total; el contenido de ARA (omega-6) está preferiblemente por debajo de un 1% en peso del contenido de grasa total; y/o la proporción en peso EPA/DHA es preferiblemente 1 o inferior, más preferiblemente inferior a 0,5.

10 [0021] Los LC-PUFA con 20 y 22 átomos de carbono se pueden proveer como ácidos grasos libres, en forma de triglicéridos, en forma de fosfolípidos, o como una mezcla de uno o más de los anteriores. La presente composición comprende preferiblemente al menos un ARA y un DHA en forma de fosfolípido.

15 [0022] La presente composición nutricional provee también preferiblemente ácidos grasos omega-9 (n-9) (preferiblemente ácido oleico, 18:1), para proveer una nutrición suficiente. Preferiblemente la presente composición provee al menos el 15% en peso de ácidos grasos n-9 en base al peso total de los ácidos grasos, más preferiblemente al menos el 25% en peso. El contenido de ácidos grasos n-9 es preferiblemente inferior al 80% en peso.

#### 20 Oligosacáridos

25 [0023] Los oligosacáridos adecuados según la invención son sacáridos que tienen un grado de polimerización (DP) de al menos 2 unidades de monosacárido, que no son digeridos o sólo parcialmente en el intestino por la acción de ácidos o enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo superior humano (intestino delgado y estómago), pero que son fermentables por la flora intestinal humana. El término unidades de monosacárido se refiere a unidades con una estructura anular cerrada, preferiblemente hexosa, por ejemplo las formas piranosa o furanosa. El grado de polimerización del oligosacárido es típicamente inferior a 60 unidades de monosacárido, preferiblemente inferior a 40, incluso más preferiblemente inferior a 20.

30 [0024] La presente composición comprende al menos dos oligosacáridos diferentes, donde los oligosacáridos tienen una homología en unidades de monosacárido inferior a aproximadamente un 90%, preferiblemente inferior a un 50%, incluso más preferiblemente inferior a un 25%, incluso más preferiblemente inferior a un 5%. El término "homología" como se usa en la presente invención es el acumulativo del porcentaje de las mismas unidades de monosacárido en los diferentes oligosacáridos. Por ejemplo, el oligosacárido 1 (OL1) presenta la estructura fruc-fruc-glu-gal, y comprende así el 50% de fruc, el 25% de gal y el 25% de glu. El oligosacárido 2 (OL2) presenta la estructura fruc-fruc-glu, y comprende por lo tanto el 66% de fruc, el 33% de glu. Los distintos oligosacáridos presentan en consecuencia una homología del 75% (50% de fruc + 25% de glu).

35 [0025] En una forma de realización preferida, la presente composición comprende galactooligosacáridos y al menos uno seleccionado del grupo que incluye fructooligosacáridos e inulina.

40 [0026] Cada uno de los presentes oligosacáridos preferiblemente comprende al menos un 66%, más preferiblemente al menos un 90% de unidades de monosacárido seleccionadas del grupo que consiste en manosa, arabinosa, fructosa, fucosa, ramnosa, galactosa,  $\beta$ -D-galactopiranosa, ribosa, glucosa, xilosa, ácido urónico y derivados de los mismos calculado respecto al número total de unidades de monosacárido contenido aquí.

45 [0027] Según otra forma de realización al menos uno de los oligosacáridos de la presente composición se selecciona del grupo que consiste en fructanos, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos de dextrinas indigeribles (incluyendo transgalactooligosacáridos), xilooligosacáridos, arabinooligosacáridos, glucooligosacáridos, mananooligosacáridos, fucooligosacáridos, oligosacáridos ácidos (véase a continuación, por ejemplo, oligosacáridos de ácido urónico tales como hidrolizado de pectina) y mezclas de los mismos. Preferiblemente la presente composición comprende al menos uno, preferiblemente al menos dos, de los oligosacáridos seleccionados del grupo que consiste en fructooligosacáridos o inulina, galactooligosacáridos e hidrolizado de pectina.

50 [0028] Para una cantidad y calidad de la mucosidad, la presente composición preferiblemente comprende al menos un oligosacárido, que comprende al menos un 66% de galatosa o fructosa como una unidad de monosacárido. En una forma de realización preferida la composición comprende al menos un oligosacárido que comprende al menos 66% de galatosa como una unidad de monosacárido y al menos un oligosacárido que comprende al menos un 66% de fructosa como una unidad de monosacárido. En una forma de realización particularmente preferida, la presente composición comprende un galactooligosacárido y un oligosacárido seleccionados del grupo que consiste en fructooligosacáridos e inulina. Los fructooligosacáridos estimulan la producción de sulfomucina en el colon distal de ratas asociadas a flora humana (Kleessen et al, (2003) Brit J Nutr 89:597-606) y los galactooligosacáridos estimulan la producción de mucina ácida (Meslin et al, Brit. J.Nutr (1993), 69: 903-912).

65 [0029] Para mejorar, además, el espesor de la capa de mucosidad sobre toda el área del colon, al menos un 10% en peso de los oligosacáridos en la presente composición tiene un DP de 2 a 5 (es decir, 2, 3, 4 y/o 5) y al menos un 5% en peso tiene un DP de 10 a 60. Preferiblemente al menos un 50% en peso, más preferiblemente al menos un 75% en

peso de los oligosacáridos tienen un DP de 2 a 9 (es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y/o 9), porque se cree que estos trabajan en todo el íleon y las partes medianas y proximales del colon y debido a que el porcentaje de peso de oligosacáridos que necesita ser incorporado en la composición para conseguir el efecto deseado es reducido.

5 [0030] Preferiblemente las proporciones de peso:

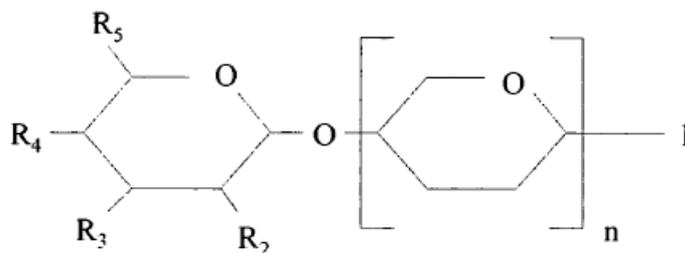
- a. (oligosacáridos con DP 2 a 5): (oligosacáridos con DP 6, 7, 8 y/o 9) > 1 y
- b. (oligosacáridos con DP 10 a 60): (oligosacáridos con DP 6, 7, 8 y/o 9) > 1 están ambos por encima de 1.

10 [0031] Preferiblemente ambas proporciones de peso son superiores a 2, incluso más preferiblemente superiores a 5.

[0032] Para mejorar incluso más el espesor de la capa de mucosidad y la calidad sobre el área total del colon, preferiblemente cada uno de al menos dos oligosacáridos diferentes están provistos en diferentes longitudes de cadena, preferiblemente al menos un 10% en peso de cada oligosacárido en base al peso total del oligosacárido respectivo tiene un DP de 2 a 5 (es decir, 2, 3, 4 y/o 5) y al menos un 5% en peso tiene un DP entre 10 y 60. Preferiblemente al menos un 50% en peso, más preferiblemente al menos un 75% en peso del oligosacárido en base al peso total de estos oligosacáridos tiene un DP entre 2 y 10, porque se cree que éstos trabajan en todo el íleon y en las partes medianas y proximales del colon.

20 Oligosacáridos ácidos

[0033] Para mejorar más la integridad de la barrera, la presente composición incluye preferiblemente oligosacáridos ácidos con un DP entre 2 y 60. El término oligosacárido ácido se refiere a oligosacáridos que comprenden al menos un grupo ácido seleccionado del grupo que incluye ácido N-acetilneuramínico, ácido N-glicololneuramínico, ácido carboxílico libre o esterificado, grupo ácido sulfúrico y grupo ácido fosfórico. El oligosacárido ácido preferiblemente comprende unidades de ácido urónico (es decir, polímero de ácido urónico), más preferiblemente unidades de ácido galacturónico. El oligosacárido ácido puede ser un carbohidrato heterogéneo u homogéneo. Ejemplos adecuados son hidrolizados de pectina y/o alginato. En el tracto intestinal, los polímeros de ácido urónico se hidrolizan a monómeros de ácido urónico, que estimulan la producción de acetato intestinal, que a su vez estimula la secreción de mucosidad intestinal (Barcelo et al., Gut 2000; 46:218-224). Preferiblemente el oligosacárido ácido tiene la estructura I mostrada a continuación, donde la hexosa terminal (izquierda) preferiblemente comprende un doble enlace. Las unidades de hexosa aparte de la(s) unidad(es) de hexosa terminal(es) son preferiblemente unidades de ácido urónico, incluso más preferiblemente unidades de ácido galacturónico. Los grupos ácido carboxílico en estas unidades pueden estar libres o (parcialmente) esterificados, y preferiblemente al menos un 10% está metilado (véase a continuación).



donde:

40 R se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en hidrógeno, grupo hidroxilo o grupo ácido, preferiblemente hidroxilo; y al menos uno seleccionado del grupo que consiste en R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representa ácido N-acetilneuramínico, ácido N-glicololneuramínico, ácido carboxílico libre o esterificado, grupo ácido sulfúrico y grupo ácido fosfórico, y el resto de R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representa hidroxilo y/o hidrógeno. Preferiblemente uno seleccionado del grupo que consiste en R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representa ácido N-acetilneuramínico, ácido N-glicololneuramínico, ácido carboxílico libre o esterificado, grupo ácido sulfúrico o grupo ácido fosfórico, y el resto representan hidroxilo y/o hidrógeno. Incluso más preferiblemente uno seleccionado del grupo que consiste en R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representa ácido carboxílico libre o esterificado y el resto de R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representa hidroxilo y/o hidrógeno; y

45 n es un número entero y se refiere a un número de unidades de hexosa (véase también el grado de polimerización, a continuación), que puede ser cualquier unidad de hexosa. Adecuadamente n es un número entero entre 1-5000. Preferiblemente la(s) unidad(es) de hexosa es(son) una unidad de ácido urónico.

De la forma más preferible R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan hidroxilo, R<sub>4</sub> representa hidrógeno, R<sub>5</sub> representa ácido carboxílico, n es cualquier número entre 1 y 250, preferiblemente entre 1 y 10 y la unidad de hexosa es ácido galacturónico.

[0034] La detección, medida y análisis de los oligosacáridos ácidos preferidos como se usa en el presente método se dan en la solicitud de patente anterior de los solicitantes acerca de oligosacáridos ácidos, es decir en el documento WO 0/160378.

5 [0035] Para mejorar la estimulación del espesor de la capa de mucosidad en toda la zona del colon, la presente composición comprende preferiblemente al menos un 10% en peso de oligosacáridos ácidos con un DP de 2 a 5 (es decir de 2, 3, 4 y/o 5) y al menos un 5% en peso de oligosacáridos ácidos con un DP entre 10 y 60, basándose dicho % en peso en el peso total de los oligosacáridos.

10 [0036] Los oligosacáridos ácidos usados en la invención se preparan preferiblemente a partir de pectina, pectato, alginato, condroitina, ácidos hialurónicos, heparina, heparano, carbohidratos bacterianos, sialoglicanos, fucoidano, fucooligosacáridos o carragenina, más preferiblemente de pectina y/o alginato.

#### Contenido de oligosacárido

15 [0037] Cuando está en forma líquida lista para el consumo, la presente composición comprende preferiblemente 0,1 a 100 gramos de oligosacáridos indigeribles por litro, más preferiblemente entre 0,5 y 50 gramos por litro, incluso más preferiblemente entre 1 y 25 gramos por litro. Un contenido demasiado alto de oligosacáridos puede causar incomodidad debido a una fermentación excesiva, mientras que un contenido muy bajo puede tener como resultado una capa de mucosa insuficiente.

20 La proporción en peso de al menos dos oligosacáridos diferentes se encuentra preferiblemente entre 1 y 10, más preferiblemente entre 1 y 5. Estas proporciones de peso estimulan la producción de mucina de diferentes tipos óptimamente en sitios diferentes en el intestino.

25 [0038] El oligosacárido se incluye preferiblemente en la presente composición según la invención en una cantidad que excede el 0,1% en peso, preferiblemente excediendo el 0,2% en peso, más preferiblemente excediendo el 0,5% en peso e incluso más preferiblemente excediendo el 1% en peso en base al peso seco total de la composición. La presente composición tiene preferiblemente un contenido de oligosacáridos inferior al 20% en peso, más preferiblemente inferior al 10% en peso, aún más preferiblemente inferior al 5% en peso.

30 [0039] La adición de nucleótidos y/o nucleósidos a la presente composición mejora también la barrera mucosa intestinal, particularmente debido a que inhibe y/o reduce la incidencia de translocación bacteriana y reduce la lesión intestinal. Por lo tanto, la presente composición también comprende preferiblemente entre 1 y 500 mg de nucleósidos y/o nucleótidos por 100 gramos de fórmula seca, aún más preferiblemente entre 5 y 100 mg.

#### Aplicación

35 [0040] La presente composición puede ser usada de manera ventajosa en un método para mejorar la integridad de la barrera en mamíferos, particularmente en humanos. La presente composición también puede ser utilizada de manera ventajosa en un método para el tratamiento o prevención de enfermedades asociadas a la reducción de la integridad de la barrera, dicho método comprendiendo la administración de la presente composición a un mamífero. La presente composición se administra preferiblemente por vía oral.

45 [0041] Para el enfermo y los bebés, la presente composición preferiblemente se combina con una alimentación completa, incluyendo proteínas, carbohidratos y grasas. La presente composición se administra de manera ventajosa a bebés de edad entre 0 y 2 años. La composición se puede administrar a pacientes que padecen de una integridad de la barrera perjudicada y pacientes saludables. La presente composición se utiliza ventajosamente en un método para proporcionar los requisitos nutricionales de un bebé prematuro (un bebé nacido antes de las 37 semanas de gestación).

50 [0042] La presente composición se puede utilizar también ventajosamente en un método para el tratamiento y/o la prevención del daño intestinal administrando la presente composición al paciente antes o después de un tratamiento médico, que puede causar daño intestinal. Tal tratamiento médico puede ser por ejemplo cirugía o tratamiento de medicina enteral (p. ej., antibióticos, analgésicos, NSAID, agentes quimioterapéuticos, etc).

55 [0043] La presente composición también puede ser usada ventajosamente para tratar o prevenir enfermedades donde la alteración de la barrera intestinal sea la causante del desarrollo del curso de la enfermedad, por ejemplo, en un método para el tratamiento o prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, particularmente enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome del intestino irritable (IBS), enfermedad celíaca, pancreatitis, hepatitis, artritis o diabetes. Además, la invención se puede usar en un método para proveer una alimentación a pacientes que han sido sometidos o están siendo sometidos a una cirugía abdominal y a pacientes que padezcan disfunciones postoperatorias del intestino y/o a pacientes desnutridos.

60 [0044] En otra forma de realización de la invención, la presente composición es administrada ventajosamente a pacientes que padecen el síndrome de deficiencia inmunológica adquirida (SIDA) y/o a pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), por ejemplo en un método para el tratamiento del SIDA y/o de infección por VIH.

Dicho método comprende la administración oral de la presente composición, preferiblemente combinada con nutrientes seleccionados del grupo que incluye carbohidratos, proteínas y grasas.

5 [0045] Además, la invención también puede usarse para tratar o prevenir complicaciones que resultan de una integridad de la barrera reducida, particularmente en un método para el tratamiento y/o prevención de la diarrea, particularmente la diarrea infantil. Debido a la reducida incidencia de la diarrea infantil, la presente composición puede ser usada también ventajosamente para reducir el sarpullido producido por el pañal.

10 [0046] La administración de la presente composición reduce el paso de antígenos microbianos y dietéticos, particularmente alérgenos alimenticios, del lumen intestinal a la mucosidad o circulación sistémica, y por lo tanto puede ser ventajosamente usada en un método para el tratamiento o prevención de alergia y/o reacción alérgica, particularmente en un método para el tratamiento o prevención de alergia alimenticia, por ejemplo reacción alérgica que resulta de la ingestión de un producto alimenticio.

15 [0047] Los presentes inventores descubrieron también que el EPA, el DHA y/o el ARA son capaces de reducir los efectos de IL-4 en la permeabilidad intestinal. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención mantiene un método para el tratamiento y/o prevención de enfermedades donde la concentración de IL-4 intestinal se incrementa (p. ej., enfermedades alérgicas), dicho método comprendiendo la administración de LC-PUFA preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en EPA, DHA y ARA, preferiblemente junto con los presentes oligosacáridos seleccionados. Por  
20 lo tanto, la presente composición puede también ser ventajosamente usada en un método para el tratamiento de dermatitis atópica.

[0048] Dado que la función de la barrera de los recién nacidos no se ha desarrollado completamente, la presente  
25 composición puede ser ventajosamente administrada a niños jóvenes, es decir bebés entre 0 y 6 meses de edad. La composición se puede administrar al bebé en forma de una fórmula infantil sin leche humana o mezclada con leche humana. Por lo tanto la presente invención también mantiene una fórmula de alimentación comprendiendo leche humana y la presente composición. Las composiciones que incluyen leche humana y la presente composición son especialmente adecuadas para alimentar bebés prematuros.

30 [0049] La presente composición se provee preferiblemente como un polvo empaquetado o fórmula empaquetada lista para el consumo. Para prevenir la alteración del producto, el tamaño del envase de fórmula lista para el consumo preferiblemente no excede una ración, por ejemplo preferiblemente no excede 500 ml; y el tamaño del envase de la presente composición en polvo preferiblemente no excede 250 raciones. Los tamaños de envases adecuados para el  
35 polvo son 2000 gramos o menos, preferiblemente por 1000 gramos o menos.

[0050] Los productos envasados provistos con etiquetas que indiquen explícita o implícitamente al consumidor el uso de dicho producto según uno o más de los objetivos anteriores o posteriores, están incluidos en la presente invención. Tales etiquetas pueden, por ejemplo, hacer referencia al actual método para evitar la reacción alérgica a alérgenos alimenticios mediante la inclusión de una redacción como, "sensibilidad alimentaria reducida", "mejora de la tolerancia intestinal", "tolerancia a la comida mejorada" o redacción similar. De manera similar, la referencia al presente método para tratar y/o prevenir una alergia puede ser realizada incorporando terminología equivalente a "resistencia mejorada" o "sensibilidad reducida".

#### 45 Fórmulas

[0051] Se descubrió que la presente composición puede ser aplicada ventajosamente a alimentos, tales como alimentos para bebés y alimentos clínicos. Tales alimentos comprenden preferiblemente lípidos, proteínas y carbohidratos y se administran preferiblemente en forma líquida. El término "alimento líquido" como se usa en la presente invención incluye alimentos secos (p. ej., polvos) que van acompañados con instrucciones respecto a la mezcla de dicha mezcla de  
50 alimento seco con un líquido adecuado (p. ej., agua).

[0052] Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición nutricional que comprende preferiblemente entre un 5 y un 50 en% de lípidos, entre un 5 y un 50 en% de proteínas, entre un 15 y un 90 en% de carbohidratos y la presente combinación de oligosacáridos y de LC-PUFA. Preferiblemente la presente composición nutricional contiene preferiblemente entre un 10 y un 30 en% de lípido, entre un 7,5 y un 40 en% de proteína y entre un  
55 25 y un 75 en% de carbohidrato (en% es la forma abreviada del porcentaje de energía y representa la cantidad relativa en que cada constituyente contribuye al valor calórico total de la preparación).

[0053] Preferiblemente se usa una combinación de lípidos vegetales y al menos un aceite seleccionado del grupo que consiste en aceite de pescado y aceite omega-3 vegetal, de algas o bacteriano.

[0054] Las proteínas usadas en la preparación nutricional se seleccionan preferiblemente del grupo de proteínas animales no humanas (tales como proteínas de la leche, proteínas de la carne y proteínas del huevo), proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz, y proteína de guisante), aminoácidos libres y mezclas de los mismos. Las fuentes de nitrógeno provenientes de leche de vaca, particularmente proteínas de proteína de la leche de vaca tales como caseína y proteínas de lactosuero son particularmente preferidas.  
65

5 [0055] Una fuente de carbohidrato digerible se puede adicionar a la fórmula nutricional. Provee preferiblemente de aproximadamente un 40% a aproximadamente un 80% de la energía de la composición nutricional. Cualquier (fuente de) carbohidratos adecuada puede ser utilizada, por ejemplo sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, y maltodextrinas, y sus mezclas derivadas.

10 [0056] La presente composición se utiliza preferiblemente como una fórmula infantil y contiene preferiblemente de 7,5 a 12,5% energía en proteína; de 40 a 55% energía en carbohidratos; y de 35 a 50% energía en grasas. Como la presente composición es adecuadamente usada para reducir la reacción alérgica en un bebé, la proteína de la fórmula infantil se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en proteína de la leche hidrolizada (p. ej., caseína hidrolizada o proteína de lactosuero hidrolizado), proteína vegetal y/o aminoácidos. El uso de estas proteínas redujo además las reacciones alérgicas del bebé.

15 [0057] Las irregularidades intestinales (por ejemplo heces duras, volumen de heces insuficiente, diarrea) son un problema importante en muchos bebés y sujetos enfermos que reciben alimentos líquidos. Se descubrió que los problemas intestinales pueden ser reducidos mediante la administración de los presentes oligosacáridos en los alimentos líquidos con una osmolalidad entre 50 y 500 mOsm/kg, más preferiblemente entre 100 y 400 mOsm/kg.

20 [0058] En vista de lo anterior, también es importante que el alimento líquido no tenga una densidad calórica excesiva pero que siga proveyendo las calorías suficientes para alimentar al sujeto. Por lo tanto, los alimentos líquidos preferiblemente tienen una densidad calórica entre 0,1 y 2,5 kcal/ml, incluso más preferiblemente una densidad calórica entre 0,5 y 1,5 kcal/ml, más preferiblemente entre 0,6 y 0,8 kcal/ml.

25 **Ejemplos**

Ejemplo 1: efecto de LC-PUFA en la integridad de la barrera

30 [0059] Se cultivaron monocapas (MC) de las líneas celulares epiteliales intestinales T84 (American Type Culture Collection, (ATTC) Manassas, EE. UU.) en filtros transwell (Coming, Costar BV, Países Bajos) permitiendo la toma de muestras de la mucosidad y la membrana serosa y la estimulación de células epiteliales intestinales humanas. Las monocapas se incubaron, dos semanas post confluencia, en el compartimento luminal con ácidos grasos poliinsaturados ARA (ácido araquidónico; ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico), DHA (ácido cis-4,7,10,13,16,19 docosahexaenoico), EPA (ácido eicosapentaenoico) o control de ácido palmítico (C 16:0) (Palm) (Sigma, St. Louis, EE. UU.). Este último procedimiento fue elegido para imitar la vía de administración in vivo de los compuestos dietéticos. Las células se incubaron con ARA, DHA, EPA, o ácido palmítico durante 0, 24, 48 y 72 h a concentraciones diferentes (10 μM y 100 μM). Se realizaron experimentos para la evaluar integridad de la barrera basal. La función de la barrera epitelial fue determinada por medición de la resistencia transepitelial (TER, Ω.cm<sup>2</sup>) fue medida por un medidor epitelial de voltios/ohmios (EVOM; World Precision Instruments, Alemania) y la permeabilidad para FITC-dextrano de 4kD (marcador de permeabilidad paracelular, Sigma, EE. UU.). La resistencia (permeabilidad epitelial para FITC-dextrano de 4kDa) fue determinada de la siguiente manera. Antes de los flujos de dextrano, el medio fue enfriado con un medio de cultivo sin fenol rojo durante una hora seguido de la adición de 5 μl (provisión de 100 mg/ml) de FITC-dextrano de 4 kDa en el compartimento luminal. Después de 30 min de incubación, 100 μl de muestra se recogieron del compartimento de membrana serosa y se midió la señal fluorescente a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm (FLUOstar Galaxy<sup>®</sup>, BMG Labtechnologies, EE. UU.). Los flujos de FITC-dextrano se calcularon como pmol FITC-dextrano/cm<sup>2</sup>/h. Se realizaron análisis estadísticos usando el ANOVA (SPSS versión 10).

45 Los resultados del efecto de los ácidos grasos (100 μM) en la integridad de la barrera espontánea después de 72 h incubación se dan en la tabla 1. La tabla 1 muestra que los LC-PUFA ARA, EPA y DHA reducen el flujo molecular y mejoran la resistencia epitelial. En contraste, los experimentos de control muestran que el ácido palmítico tiene los efectos opuestos, es decir pone en peligro la integridad de la barrera. Estos resultados son indicativos del uso ventajoso de EPA, DHA y ARA, y en particularmente ARA en la composición según la presente invención y del uso en un método según la presente invención, por ejemplo en un método para mejorar integridad de la barrera. Estos resultados además sostienen los efectos sinérgicos de la presente combinación de ácidos grasos y oligosacáridos indigeribles.

55 La figura 1 muestra los efectos dependientes del tiempo y la dosis (10 μM y 100 μM) de varios ácidos grasos (ácido palmítico, DHA, GLA, y AA) en la integridad de la barrera basal (TER). La figura 1 muestra que los LC-PUFA AA, DHA, y GLA, mejoran la integridad de la barrera epitelial como se refleja por la resistencia aumentada (TER). Estos resultados son indicativos del uso ventajoso de EPA, DHA, GLA y ARA, en particularmente ARA, en la composición según la presente invención y para el uso en un método según la presente invención, es decir en un método para mejorar la integridad de la barrera. Estos resultados además sostienen los efectos sinérgicos de la presente combinación de ácidos grasos y oligosacáridos indigeribles.

Tabla 1

<u>Ingrediente (LC-PUFA)</u>	<u>Flujo</u>	<u>Resistencia (TER)</u>
Control	79	1090
Ácido palmítico	161	831

DHA	72	1574
ARA	28	1816
EPA	65	1493

5 Ejemplo 2: Efecto de LC-PUFA en la alteración de la barrera mediada por IL-4.

[0060] Se cultivaron monocapas (MC) de líneas celulares epiteliales intestinales T84 (ATCC, EEUU) en filtros transwell (Coming, Costar BV, Países Bajos) permitiendo la toma de muestras tanto de la mucosidad como de la membrana serosa y la estimulación de células epiteliales intestinales humanas. Las monocapas se incubaron, dos semanas post confluencia, en presencia de IL-4 (2 ng/ml, compartimento de membrana serosa, Sigma, EEUU) con o sin ácidos grasos poliinsaturados ARA, DHA, GLA, EPA, o ácido palmítico de control (10 µM o 100 µM, compartimento mucosal, Sigma, St. Louis, EE. UU.). Las células fueron preincubadas con ARA, DHA, EPA, o ácido palmítico durante 48 h antes de la incubación con IL-4. La coincubación de PUFA y ácido palmítico con IL-4 fue prolongada durante otras 48 h; mientras que el medio de cultivo y aditivos fueron cambiados cada 24 h. La función de la barrera epitelial fue determinada midiendo la resistencia transepitelial (TER) y la permeabilidad como se describe en el ejemplo 1. La evaluación estadística fue realizada como se describe en el ejemplo 1.

Los resultados del efecto de ARA, DHA, EPA y ácido palmítico (100 µM) en la interrupción de la barrera mediada por IL-4 se dan en la tabla 2. La tabla 2 muestra que los LC-PUFA, ARA, DHA y EPA inhiben el flujo aumentado provocado por IL-4. En cambio el ácido palmítico tiene un efecto perjudicial y una alteración de la barrera reducida en comparación con el control. Estos resultados son indicativos del uso ventajoso de ARA, DHA y EPA en formulaciones de nutrición clínica e infantil para prevenir o reducir la alteración de la barrera mediada por IL-4, por ejemplo como ocurre con una alergia a la leche de vaca o alimentaria. Estos resultados sostienen además los efectos sinérgicos de la presente combinación de ácidos grasos y oligosacáridos indigeribles.

[0061] La figura 2 provee los efectos protectivos dependientes del tiempo y la dosis (10 µM y 100 µM) de varios FA (ácido palmítico, DHA, GLA y AA) en la destrucción de la barrera mediada por IL-4 (flujo). La figura 2 muestra que ARA, DHA y GLA protegen contra la alteración de la barrera mediada por IL-4 como se refleja por el flujo de dextrano de 4kD disminuido. Estos resultados son indicativos del uso ventajoso de ARA, DHA y GLA en formulaciones de nutrición clínica e infantil para prevenir o reducir la alteración de la barrera mediada por IL-4, por ejemplo como ocurre con una alergia alimentaria o a la leche de vaca. Estos resultados además sostienen los efectos sinérgicos de la presente combinación de ácidos grasos y oligosacáridos indigeribles.

Tabla 2

Ingrediente (LC-PUFA)	Flujo IL-4	TER IL-4
Control	582	374
Ácido palmítico	777	321
DHA	271	547
ARA	218	636
EPA	228	539

35 Ejemplo 3: efecto de los oligosacáridos en la producción de acetato

[0062] Se obtuvieron microorganismos de heces frescas de bebés alimentados de biberones. El material fecal fresco de bebés entre 1 a 4 meses de edad fue reunido y dispuesto en un medio conservante durante 2 horas. Como sustrato se utilizó bien una mezcla de prebióticos (TOS; TOS/inulina (HP) en proporción 9/1 (w/w); o bien inulina; una mezcla de oligofructosa (OS)/inulina en proporción 1/1 (w/w), o ninguno (blanco). Los transgalactooligosacáridos (TOS) fueron obtenidos de Vivinal GOS, Borculo Domo Ingredients, Zwolle, Países Bajos y comprende como oligosacáridos indigeribles: un 33% en peso de disacáridos, un 39% en peso de trisacáridos, un 18% en peso tetrasacáridos, un 7% en peso de pentasacáridos y un 3% en peso de hexa-, hepta- y octasacáridos. Ingredientes de alimentación activa de inulina (HP) Orafiti, Tienen, Bélgica, es decir Raftiline HP®, con un DP de 23. **Medios:** medio McBain & MacFarlane: agua con peptona tamponada 3,0g/l, extracto de levadura 2,5 g/l, mucina (bordes de cepillo) 0,8 g/l, triptona 3,0g/l, L-cisteína-HCl 0,4 g/l, sales de bilis 0,05 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 2,6 g/l, NaHCO<sub>3</sub> 0,2 g/l, NaCl 4,5 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,228 g/l, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,005 g/l. Se llenan botellas Scott de 500 ml con el medio y se esterilizan durante 15 minutos a 121 °C. **Medio tamponado:** K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 2,6 g/l, NaHCO<sub>3</sub> 0,2 g/l, NaCl 4,5 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,228 g/l, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,005 g/l. Ajustar a pH 6.3 ± 0.1 con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> o NaHCO<sub>3</sub>. Se llenan botellas Scott de 500ml con el medio y se esterilizan durante 15 minutos a 121 °C.

**Medio conservante:** Peptona tamponada 20,0 g/l, L-cisteína-HCl 0,5 g/l, tioglicolato de sodio 0,5 g/l, comprimido de resazurina 1 por litro, ajuste a pH 6.7 ± 0.1 con 1 M de NaOH o HCl. Hervido en microondas. Las botellas de suero fueron llenadas con 25 ml de medio y esterilizadas durante 15 minutos a 121 °C.

Las muestras fecales frescas fueron mezcladas con un medio conservante y almacenadas durante varias horas a 4 °C. La solución de heces conservada fue centrifugada a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos, el sobrenadante fue eliminado y las heces se mezclaron con un medio McBain & Mac Farlane en una proporción de peso de 1:5. De esta suspensión fecal se combinaron 3 ml con 85 mg de glucosa o prebióticos o sin adición (blanco) en una botella y se mezclaron íntegramente. Se retiró una muestra a t=0 (0,5 ml). 2,5 ml de la suspensión resultante se dispusieron en un tubo de diálisis en una botella de 60 ml llena con 60 ml del medio tamponado. La botella se cerró bien y se incubó a 37 °C. Se

tomaron muestras del tubo de diálisis (0,2 ml) o tampón de diálisis (1,0 ml) con una jeringa hipodérmica después de 3, 24 y 48 horas y se pusieron en hielo inmediatamente para parar la fermentación. El experimento se efectuó usando las siguientes muestras:

- 5 1) 85 mg TOS
- 2) 85 mg inulina
- 3) 85 mg TOS/inulina en una proporción de 9/1 (w/w) y
- 4) 85 mg OS/inulina en una proporción de 1/1 (w/w).

10 [0063] Los SCFA (acetato, propionato, butirato) fueron cuantificados usando un cromatógrafo de gases (GC) Varian 3800 (Varian Inc., Walnut Creek, EE. UU.) equipado con un detector de ionización de llama. Se inyectaron 0,5 µl de la muestra a 80 °C en la columna (Stabilwax, 15 x 0,53 mm, espesor de película 1,00 µm, Restek Co., EE. UU.) utilizando helio como gas portador (3,0 psi). Después de la inyección de la muestra, el horno fue calentado a 160 °C a una velocidad de 16 °C/min, seguido de una calefacción a 220 °C a una velocidad de 20 °C/min y finalmente mantenido a 220 °C durante 1,5 minutos. La temperatura del inyector y del detector fue 200 °C. Se utilizó ácido 2-etilbutírico como un estándar interno.

La figura 3 representa el perfil de SCFA absoluto (figura 3A) y relativo (figura 3B) resultante de la fermentación de los distintos oligosacáridos. La figura 3A muestra que una mezcla de dos oligosacáridos diferentes (TOS/Inulina), donde los dos oligosacáridos diferentes presentan una homología en unidades de monosacárido inferior a 90 y una longitud de cadena diferente, produce una cantidad de SCFA significativa y sinérgicamente incrementada (particularmente de acetato) por gramo de fibra con respecto a los componentes individuales. La figura 3B muestra que la adición de una combinación de TOS/inulina favorece una proporción más elevada del acetato conveniente (B). La producción de acetato in vivo se traduce en una producción mejorada de mucosidad por células caliciformes y una medida del espesor de capa de mucosidad intestinal (véase ejemplo 4). Estos resultados son indicativos del uso ventajoso de la presente composición.

#### Ejemplo 4: Efectos de los SCFA en la producción de mucosidad.

30 [0064] Las monocapas de células T84 epiteliales intestinales (ATCC, EE. UU.), fueron cultivadas en placas de cultivo de tejido de 24 o 96 pocillos (Corning B.V.). Las T84 se incubaron con los ácidos grasos de cadena corta acetato, propionato y butirato (SCFA, Merck, EEUU) durante 24 h en un rango de concentración de 0,025-4,0 mM. Se recogieron los sobrenadantes y/o células y se determinó la expresión de MUC-2 (mucina). Una técnica Dotblot fue usada para determinar la expresión de MUC-2 en los cultivos de células, ya que las mucinas son glicoproteínas extremadamente grandes (sobre 500 kDa) que las hacen difíciles de manejar en las técnicas de Western blotting. El método fue validado usando suero pre-inmunológico (T84 teñidas negativas), células de control negativo CCD-18Co (ATCC; EE. UU.) y albúmina de suero bovino (BSA). Se recogieron muestras celulares en Laemmli (tampón de aislamiento de proteína) y se llevó a cabo la determinación de proteína utilizando un ensayo de microproteína (Biorad; EE. UU.) según el protocolo de los fabricantes. Se puntuaron muestras (0,3-0,7-1,0 µg/2 µl) en las membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Alemania). Las membranas fueron bloqueadas en TBST/5% Protivar (Nutricia, Países Bajos) seguido de 1 h incubación con anticuerpo anti-MUC-2 (gentilmente donado por Dr. Einerhand, Erasmus University, Rotterdam, Países Bajos). Después del lavado, las manchas fueron incubadas con anti-conejo-HRP de cabra (Santacruz Biotechnology, EE. UU.) y se usó ECL para la detección de sustrato (Roche Diagnostics, Países Bajos). La densitometría fue realizada usando el Lumi-Imager (Boehringer Mannheim B.V., Países Bajos) y la señal fue expresada en unidades de luz (BLU). Las BLU se expresaron también con respecto a incubaciones de control (%BLU). Para comparar el efecto estimulador de los SCFA en la expresión de MUC-2 basal, los niveles de expresión de la MUC-2 fueron reducidos. La figura 4 muestra los efectos diferenciales de los SCFA (acetato, propionato, butirato) en la expresión de MUC-2 en células epiteliales intestinales (MC T84) y co-cultivos de células mesenquimales epiteliales (CC T84). La figura 2 también muestra que el acetato es más potente en la estimulación de la expresión de MUC-2 (producción de mucosidad) en comparación con el propionato y el butirato. Por lo tanto, la presente combinación de oligosacáridos (que mostró aumentar la producción de acetato (véase ejemplo 3)) es particularmente útil para estimular la producción de mucosidad y puede ser ventajosamente utilizada en un método para estimular la integridad de la barrera.

#### Ejemplo 5: fórmula de leche infantil I

55 [0065] Ingredientes (por litro), energía 672 Kcal; proteínas 15 g; lactosuero: proporción de caseína 60:40; grasas 36 g; carbohidratos 72 g; vitamina A 750 RE; mezcla de carótidas naturales 400 UI; vitamina D 10,6 mcg; Vitamina F 7,4 mg; vitamina K 67,0 mcg; vitamina B.sub.1 (tiamina) 1000 mcg; vitamina B.sub.2 (riboflavina) 1500 mcg; vitamina B.sub.6 (piridoxina) 600 mcg; vitamina B.sub.12 (cianocobalamina) 2,0 mcg; niacina 9,0 mcg; ácido fólico 80 mcg; ácido Pantoténico 3000 mcg; biotina 90 mcg; vitamina C (ácido ascórbico) 90 mg; colina 100 mg; Inositol 33 mg; calcio 460 Mg; fósforo 333 Mg; magnesio 64 Mg; hierro 8,0 Mg; Zinc 6,0 Mg; manganeso 50 mcg; cobre 560 mcg; yodo 100 mcg; sodio 160 mg; potasio 650 mg; cloruro 433 mg y selenio 14 mcg; donde el contenido de grasa proporciona incluye 3 gramos de aceite de pescado y 3 gramos de aceite de ácido araquidónico al 40% (DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos); comprendiendo además 4 gramos de transgalactooligosacáridos Elix'or™ (Borculo Domo Ingredients, Países Bajos) y 4 gramos de Raffiline™ (Orafti Active Food Ingredients, Bélgica).

## REIVINDICACIONES

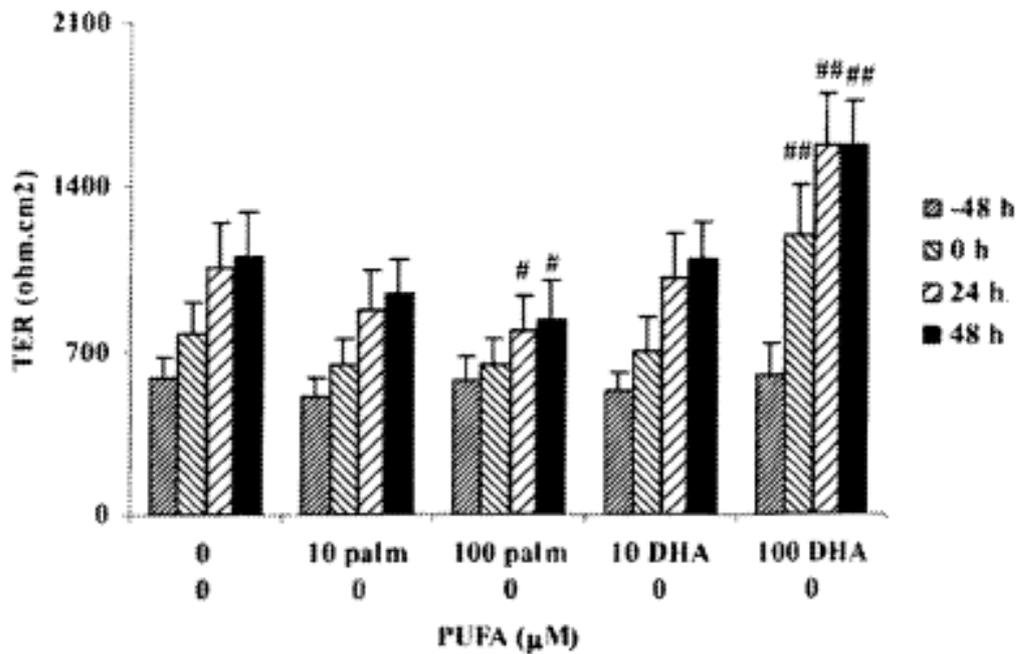
1. Composición nutricional que comprende:
- 5 EPA, DHA y ARA, donde el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga con 20 y 22 átomos de carbono no excede un 15% en peso del contenido total de grasa; y  
al menos dos oligosacáridos diferentes (OL1 y OL2), que no son digeridos o sólo parcialmente en el intestino por la  
acción de los ácidos o enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo superior humano, pero que es fermentable  
10 por la flora intestinal humana, donde los dos oligosacáridos diferentes tienen una homología en unidades de monosacárido inferior a un 90%.
2. Composición según la reivindicación 1 que comprende además oligosacáridos ácidos con un DP entre 2 y 60, donde los oligosacáridos ácidos comprenden al menos un grupo ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido N-acetilneuramínico, ácido N-glicolilneuramínico, ácido carboxílico libre o esterificado, grupo de ácido sulfúrico y grupo ácido fosfórico.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1 que comprende además entre 1 y 500 mg de nucleósidos y/o nucleótidos por 100 gramos de fórmula seca.
- 20 4. Composición según la reivindicación 1 a 3 que comprende galactooligosacáridos y un fructano seleccionado del grupo que consiste en fructooligosacáridos, inulina y sus mezclas derivadas.
5. Composición según la reivindicación 1 a 4 donde al menos un 10% en peso del oligosacárido tiene un grado de polimerización (DP) de 2 a 5 y al menos un 5% en peso tiene un DP de entre 10 y 60.
- 25 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un oligosacárido ácido, preferiblemente un polímero de ácido urónico con un DP entre 2 y 60.
- 30 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende de 7,5 a 12,5% de energía en proteínas; de 40 a 55% de energía en carbohidratos; y de 35 a 50% de energía en grasa, donde dicha proteína comprende un elemento seleccionado del grupo que consiste en proteína de la leche hidrolizada, proteína vegetal y/o aminoácidos.
- 35 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, dicha composición teniendo un contenido calórico de 0,6 a 0,8 kcal/ml; una osmolalidad de 50 a 500 mOsm/kg; y una viscosidad inferior a 50 mPas.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, adecuada para alimentar un bebé, donde:
- a. el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga es inferior a un 3% en peso del contenido total de  
40 grasa;  
b. el ácido graso poliinsaturado de cadena larga omega-3 está por debajo de un 1% en peso del contenido total de  
grasa;  
c. el ácido graso poliinsaturado de cadena larga omega-6 está por debajo de un 2% en peso del contenido total de  
grasa;  
45 d. el contenido de ARA es inferior a un 1% en peso del contenido total de grasa; y  
e. la proporción EPA/DHA es 1 o inferior.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso como medicamento.
11. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la producción de una composición para  
50 la administración a un bebé de entre 0 y 2 años de edad.
12. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la producción de una composición para uso en un método para el tratamiento o prevención de alergia, dicho método comprendiendo la administración de la composición a un mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 55 13. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la producción de una composición para uso en un método para el tratamiento o prevención de diarrea, dicho método comprendiendo la administración de la composición a un mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 60 14. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la producción de un medicamento para uso en un método para reducir el sarpullido producido por el pañal, dicho método comprendiendo la administración de la composición a un mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 65 15. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la producción de una composición para:

## ES 2 431 363 T3

- a. proveer los requisitos nutricionales de un bebé prematuro;
- b. el tratamiento o prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, particularmente enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de intestino irritable, enfermedad celíaca, pancreatitis, hepatitis, artritis o diabetes;
- 5 c. suministrar nutrición a pacientes que han sufrido cirugía abdominal y pacientes que experimentan una disfunción postoperatoria del intestino y/o pacientes desnutridos;
- d. la administración a pacientes que sufren de síndrome de inmunodeficiencia adquirida y/o pacientes que se han infectado con el virus de inmunodeficiencia humana;
- e. tratar o prevenir complicaciones que resultan de una integridad de la barrera reducida, particularmente prevención de diarrea;
- 10 f. el tratamiento o prevención de alergia;
- g. el tratamiento y/o prevención de enfermedades donde se incrementa la concentración de IL-4 intestinal; o
- h. estimular la integridad de la barrera intestinal.

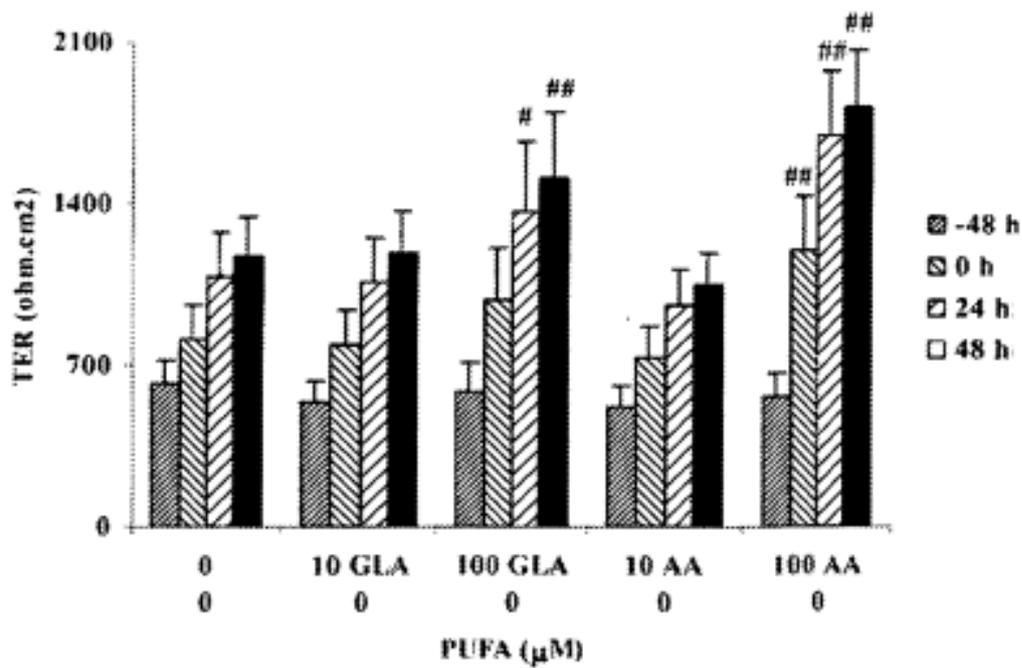
**Fig 1a**

**Efecto de los PUFA (n=3) en la integridad de la barrera basal (TER)**



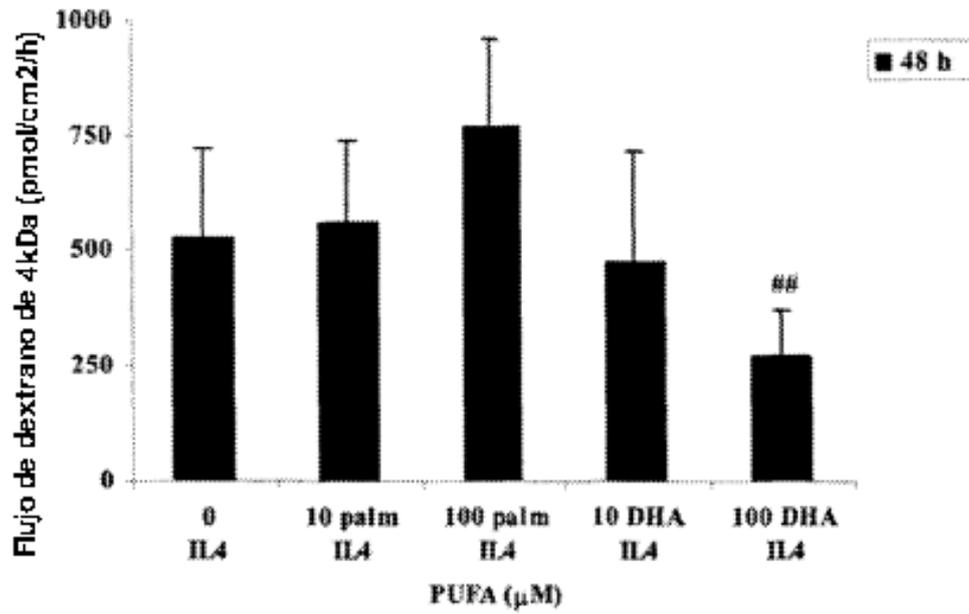
**Fig 1b**

**Efecto de los PUFA (n=3) en la integridad de la barrera basal (TER)**



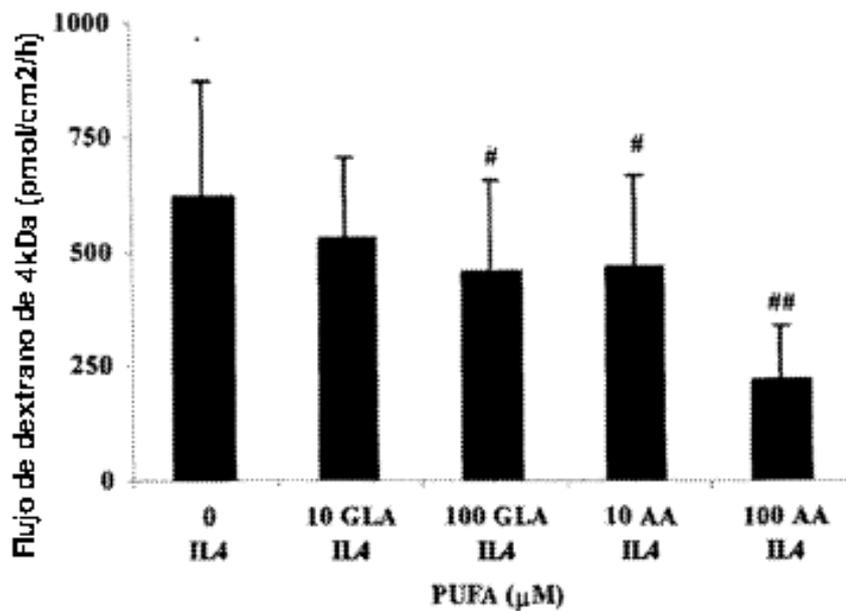
**Fig 2a**

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

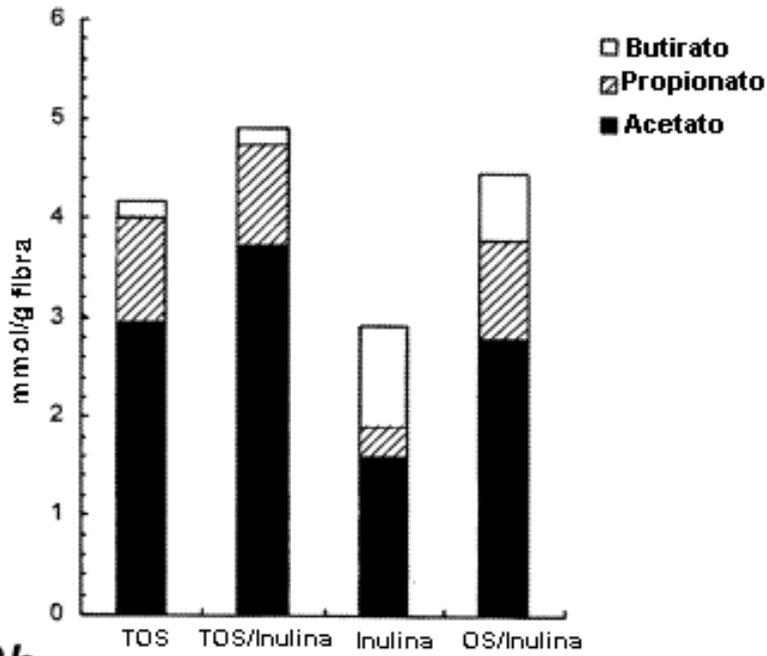


**Fig 2b**

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



*Fig 3a*



*Fig 3b*

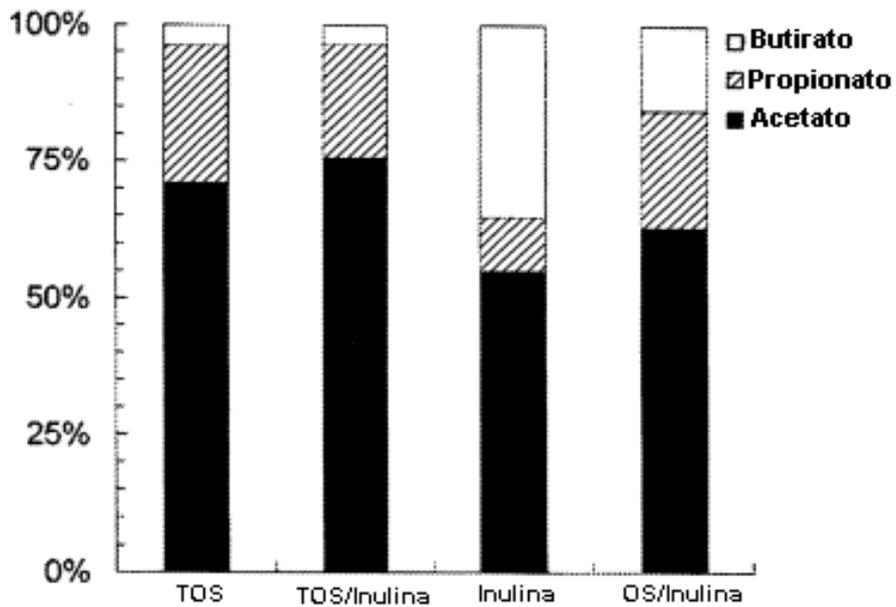


Fig 4

