

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 412**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61K 36/73 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2010 E 10715818 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2424385**

54 Título: **Composición nutricional que comprende un extracto de manzana y que reduce los síntomas de alergia, especialmente en niños**

30 Prioridad:

28.04.2009 EP 09158980

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

13.03.2015

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**HOLVOET, SÉBASTIEN;
MERCENIER, ANNICK y
ZUERCHER, ADRIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 531 412 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 nutricional que comprende un extracto de manzana y que reduce los síntomas de alergia, especialmente en niños

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de un extracto natural que comprende polifenoles en la preparación de una composición nutricional para reducir los síntomas alérgicos de pacientes alérgicos cuando se exponen a alérgenos.

10

Antecedentes de la invención

Las alergias son uno de los problemas de salud más comunes que afectan a la vida de los pacientes de todas las edades. La OMS actualmente reconoce que las enfermedades alérgicas son una epidemia. Se ha demostrado que la prevalencia de las alergias se ha incrementado en las últimas décadas. El estilo de vida moderno, especialmente urbano, se ha asociado a una prevalencia elevada y a una mayor gravedad de las manifestaciones alérgicas.

15

La sensibilización alérgica en la infancia, especialmente en la infancia temprana y especialmente a alérgenos alimentarios, resulta crucial y del máximo interés ya que se ha demostrado que el desarrollo de un "fenotipo alérgico" o "atopia" facilita la posterior sensibilización frente a otros alérgenos. Por lo tanto, las alergias en la infancia pueden ser la primera etapa de una cascada alérgica que conduce a múltiples alergias posteriormente en la vida, un proceso comúnmente denominado "la marcha atópica". Por ejemplo, se ha demostrado en cohortes humanas que los niños con hipersensibilidad alimentaria persistente en una etapa temprana de la vida presentan un riesgo drásticamente incrementado de desarrollar rinitis alérgica (fiebre del heno) o asma posteriormente en la infancia (Ostblöm *et al.*, 2008). Los niños con formas más leves de hipersensibilidad alimentaria también presentan un riesgo incrementado de desarrollo de alergias respiratorias, aunque en menor grado que los niños con hipersensibilidad alimentaria persistente. Por lo tanto, atenuar la gravedad de la hipersensibilidad alimentaria puede resultar crucial para enlentecer la "marcha atópica".

20

25

30

En el presente contexto, la gestión de los episodios alérgicos y la prevención de las alergias son, en la infancia y lactancia, de la máxima importancia.

El sistema inmunológico del niño está en desarrollo activo durante los primeros años de vida. El tratamiento, prevención, evitación, control, reducción o modulación de las reacciones alérgicas en dichos pacientes jóvenes puede influir sobre su perfil alérgico a corto plazo, aunque también a más largo plazo para posteriormente en la vida.

35

La prevención de las alergias puede conseguirse a diferentes niveles:

La "prevención primaria" es el efecto de prevenir o reducir el riesgo de sensibilización de los pacientes frente a alérgenos, caracterizada por la ausencia o niveles reducidos de anticuerpos IgE específicos de alérgeno. La prevención o reducción de la sensibilización resultará en la ausencia o en la reducción de los síntomas alérgicos al exponerlos al mismo alérgeno. Mediante la modulación de cómo se sensibiliza un paciente con respecto a un alérgeno o grupo de alérgenos (prevención primaria), la respuesta alérgica consiguiente también puede modularse.

40

45

La "prevención secundaria" es el efecto de modular los síntomas de las alergias, es decir, la aparición o intensidad de la reacción alérgica en el paciente ya sensibilizado frente a uno o varios alérgenos al re-exponer el paciente a dicho alérgeno o alérgenos. Mediante la modulación de la aparición o la intensidad de los síntomas alérgicos (prevención secundaria), se minimizan las molestias asociadas a las alergias.

50

Dados estos claros conceptos de prevención de alergias, puede plantearse la hipótesis de que, en virtud de sus mecanismos inherentes de acción, algunos compuestos podrían actuar únicamente en uno o en los dos niveles específicos de prevención. Algunos podrían, por ejemplo, únicamente reducir la sensibilización frente a un alérgeno específico (prevención primaria), mientras que otros compuestos podrían presentar únicamente un efecto sobre la prevención secundaria y reducir la gravedad de las reacciones alérgicas. Otros compuestos podrían ser capaces de influir sobre tanto la sensibilización como los síntomas y, de esta manera, resultar eficaces en la estimulación de la prevención primaria y secundaria.

55

Los alérgenos alimentarios son de los primeros alérgenos a los que se enfrenta el bebé en los primeros años de vida: típicamente el bebé no alimentado exclusivamente con leche materna se encuentra con proteínas lácteas de vaca. Las proteínas lácteas efectivamente con la causa más frecuentemente observada de alergia alimentaria en la infancia, seguida de los huevos y las proteínas del trigo. En general las alergias alimentarias pueden manifestarse

60

por síntomas cutáneos (erupciones, eczema y otros) y síntomas gastrointestinales (calambres abdominales, dolor, especialmente en el abdomen y vómitos) en bebés y niños pequeños. También puede aparecer una sensibilización adicional y episodios de alergias al exponer el bebé/niño pequeño a un nuevo alimento, tal como cereales, verduras o frutas.

5 Los polifenoles son un gran grupo de compuestos de pequeño tamaño con actividad antioxidante que se encuentran comúnmente en plantas y frutos. Los flavonoides son un subgrupo de polifenoles con características estructurales compartidas que pueden a su vez pueden agruparse adicionalmente en subgrupos (nuevamente basándose en estructuras comunes), por ejemplo en flavonoles, flavanoles, flavonas, flavanonas y otros. Se han utilizado algunos compuestos contenidos en las manzanas y se ha demostrado que presentan un efecto general sobre las alergias: los flavonoides, tales como la quercetina, así como otros polifenoles, se sospecha que proporcionan un efecto beneficioso sobre las alergias en general. Las manzanas son ricas en diversos polifenoles, incluyendo la quercetina y la florizidina. Algunos experimentos *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio sugieren que algunos polifenoles podrían ser capaces de reducir las reacciones alérgicas mediante un mecanismo similar al de los antihistamínicos comunes (es decir, un efecto inhibidor de la degranulación de los mastocitos). Lo anterior se ha descrito en particular en M. Kimata *et al.*, Clin. Exp. Allergy 30:501-508, 2000; M.P. Nair *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1593:29-36, 2002, y W. Dorsch *et al.*, Int. Arch. Allergy Immunol. 97:1-7, 1992. Además, Kojima *et al.* describen en Allergology International 49:69-73, 2000, que los polifenoles de manzana pueden presentar un efecto beneficioso sobre la dermatitis atópica. En Biosci. Biotechnol. Biochem. 69(4):829-832, 2005, Kishi *et al.* describen la eficacia del polifenol de manzana en el tratamiento de la polinosis de cedro.

En el documento nº WO2006/003750 describe la utilización de lecha de vaca o bebidas lácteas que contienen polifenoles derivados de la manzana para la prevención de la inflamación y la reducción del estornudo tras la administración intranasal de solución de ovoalbúmina, un alérgeno alimentario común.

El documento nº JP2009/060800 da a conocer la utilización de una bebida que contienen un extracto en polvo procedente de manzanas para la reducción de la urticaria crónica inducida por alérgenos alimentarios en pacientes varones.

Akiyama *et al.* (FEBS Letters, 2005) describen la utilización de polifenoles procedentes de manzanas para prevenir el desarrollo de alergias alimentarias inducidas por ovoalbúmina. La enseñanza de dicho documento se refiere además a la administración de polifenoles procedentes de manzanas en la infancia temprana, que por lo tanto provoca que la materia objeto de la presente solicitud resulte evidente.

El documento nº JP 2006/096694 enseña la adición de polifenoles procedentes de manzanas, tales como proantocianidinas, a alimentos, tales como bebidas o helado, para la prevención y el tratamiento de síntomas alérgicos inducidos por la ovoalbúmina.

Fumihide *et al.* (Biological & Pharmaceutical Bulletin, mayo de 2007) enseñan una reducción en los niveles de IgE anti-ovoalbúmina mediante la administración de fracciones enriquecidas en polifenoles obtenidas de manzanas.

Sin embargo, sigue existiendo una necesidad de reducir específicamente la reacción y síntomas alérgicos especialmente en la población de niños pequeños y bebés.

La cuestión de la reacción alérgica originada en alimentos en la edad pediátrica resulta complicada adicionalmente por las necesidades nutricionales específicas de los bebés y niños pequeños. La ingesta calórica, la densidad calórica, la diversidad de nutrientes deseables, el contenido de proteínas y la calidad de las proteínas son todos factores importantes para una nutrición adecuada para el bebé y el niño pequeño. La presencia de micronutrientes tales como vitaminas y minerales también resultan importantes, más concretamente en el caso de que su presencia se encuentre limitada por intervalos definidos específicos correspondientes a la edad de los pacientes diana. De esta manera, para los niños pequeños y bebés, las matrices de presentación de los alimentos son inherentemente complejas aunque también son menos variadas; por ejemplo el bebé, aunque potencialmente alérgico, requiere un equilibrio específico de proteínas en una matriz de proteínas de origen lácteo. La presencia de dichos múltiples nutrientes puede potenciar el efecto de los alérgenos alimentarios. En dichas matrices complejas, algunos alérgenos alimentarios de bajo nivel que son incapaces de desencadenar una manifestación alérgica por sí solos pueden adquirir más potencia en la inducción de una reacción alérgica. De manera similar, los compuestos que pueden neutralizar alérgenos o actuar sobre la prevención de alergias pueden ver sus efectos reducidos o anulados en estas matrices nutricionales complejas. Concretamente no es predecible si los compuestos que habitualmente se admite que actúan en la prevención de alérgicas todavía se encontrarán activos, y en qué grado, dentro de matrices complejas tales como una composición nutricional para bebés o niños de corta edad.

Existe una necesidad de aliviar los síntomas de las alergias alimentarias en poblaciones de bebés y niños pequeños con una historia de episodios alérgicos y/o que son alérgicas.

Existe una necesidad de proporcionar una composición nutricional completa que no sólo aporte una diversidad de nutrientes sino que también reduzca la gravedad de las reacciones alérgicas.

5 Existe una necesidad de proporcionar una composición nutricional que module la reacción alérgica de los pacientes jóvenes que sufren de formas leves a moderadas de alergia, ya que estos pacientes presentan necesidades especiales dictadas por la poca madurez de sus sistemas intestinal e inmunológico.

10 También existe una necesidad de modular las reacciones alérgicas en niños pequeños que no toleran moléculas farmacéuticas astringentes, por ejemplo mediante intervenciones nutricionales, tales como la inclusión de moduladores del sistema inmunológico en el régimen nutricional habitual.

15 Existe una necesidad de proporcionar una composición nutricional que module la reacción alérgica de pacientes jóvenes durante el destete y en torno a ese momento, cuando el tracto intestinal experimenta grandes modificaciones y cuando se introducen nuevos alimentos sólidos potencialmente alergénicos y, por lo tanto, cuando el paciente es particularmente susceptible a la sensibilización frente a alérgenos alimentarios.

20 Existe una necesidad de alivio de los síntomas de las alergias al proporcionar una composición eficaz, posiblemente mediante la reducción de la exposición a alérgenos, aunque la composición puede no reducir directamente la sensibilización frente a los alérgenos.

Existe una necesidad de una composición que presente un efecto positivo sobre la prevención secundaria de las alergias, aunque sin actuar necesariamente sobre la prevención primaria de las mismas.

25 Existe finalmente una necesidad de una composición más particularmente adecuada para pacientes jóvenes que mediante la reducción de los síntomas pueda ayudar a disminuir el "fenotipo alérgico" y, de esta manera, pueda reducir la sensibilización posteriormente en la vida frente a nuevos alérgenos. Existe una necesidad de atenuar la marcha atópica.

30 Descripción resumida de la invención

La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición nutricional completa para reducir los síntomas de las alergias originadas en alimentos en pacientes que presentan alergias inducidas por alérgenos alimentarios, especialmente en infantes y/o niños pequeños.

40 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que estimula significativamente la prevención secundaria de reacciones alérgicas desencadenadas por alérgenos alimentarios, opcionalmente sin afectar a la prevención primaria frente a los mismos.

La presente invención proporciona una composición enriquecida en polifenoles, especialmente en quercetina.

45 En otro aspecto de la invención, la composición de la invención resulta especialmente eficaz para infantes y/o niños pequeños en el momento del destete.

La invención se extiende adicionalmente a la reducción de la sensibilización frente a otros alérgenos posteriormente en la vida.

50 Breve descripción del dibujo

Figura 1: descripción esquemática del modelo de ratón de alergia alimentaria a OVA

55 Figura 2: síntomas reducidos de alergia alimentaria en ratones que reciben 1% de extracto de manzana durante la semana previa al reto con alérgeno. Resultados de 2 experimentos independientes.

60 Figura 3: síntomas reducidos de alergia alimentaria en ratones que recibieron 1% de extracto de manzana (Pomactiv HFV o Diana Naturals AFPOMM9080) durante el periodo de sensibilización (primaria) o durante la semana previa al reto con alérgeno (secundaria).

Figura 4: mediana de niveles de proteasa 1 de mastocito de ratón (MMCP-1) en sueros 4 horas después del reto.

Figura 5/Tabla 1: niveles de expresión génica en placas de Peyer en el íleon.

Figura 6/Tabla 2: niveles de expresión génica en el íleo.

Descripción detallada de la invención

5

Definiciones: en la presente memoria, las expresiones siguientes presentan los significados siguientes:

10
15
20
"Composición nutricional completa". Para los fines del presente documento, una composición nutricional completa es una composición que comprende una cantidad significativa, habitualmente 50% o más, de los nutrientes nutricionales principales recomendados para una edad dada. Estos nutrientes principales habitualmente se proporcionan en cantidad y proporción para satisfacer 50% o más de las dosis de nutrientes específicas recomendadas para una edad dada, al utilizarla en cantidad adecuada par proporcionar la ingesta calórica recomendada para una edad dada. Una composición nutricional completa habitualmente comprende una fuente de proteínas, una fuente de lípidos, una fuente de carbohidratos en una proporción equilibrada que cumple la recomendación general para una edad dada. Habitualmente incluye además micronutrientes tales como vitaminas y minerales, así como una fuente de aminoácidos esenciales y una fuente de ácidos grasos esenciales. Sin embargo, se entiende que una composición nutricional completa puede no comprender todos los nutrientes específicos, ni todas las cantidades recomendadas, para satisfacer todas las necesidades nutricionales de un bebé o niño pequeño. Una composición nutricional completa excluye las composiciones que comprenden meramente extractos de manzana o extractos de manzana en una proporción predominante.

25
La expresión "*Síntomas de alergias*" incluye de manera general los síntomas inducidos por alérgenos. Entre estos síntomas se incluyen manifestaciones cutáneas (enrojecimiento de la piel, erupción, prurito, dermatitis, eccema), oculares (picor y lagrimeo), gastrointestinales (congestión, dolor abdominal, calambres, vómitos y diarrea), respiratorios (prurito nasal, congestión nasal, rinitis y asma) y en casos graves, sistémicas (mareo, confusión mental y anafilaxis).

30
La expresión "*prevención primaria de alergias*" se refiere a todas las medidas destinadas a evitar o reducir la sensibilización alérgica (inmunológica), por ejemplo la prevención o reducción de anticuerpos IgE específicos.

La expresión "*prevención secundaria de alergias*" se refiere a la prevención del desarrollo de enfermedades alérgicas/síntomas alérgicos en un individuo sensibilizado.

35
La expresión "*periodo de destete*" es el periodo durante el que los bebés se están adaptando de la nutrición líquida pura a los alimentos sólidos o semisólidos, y de un tipo de alimento cuasi-único (generalmente leche materna o una fórmula infantil) a una diversidad de alimentos.

El término "*sensibilización*" se refiere a la inducción/desarrollo de anticuerpos IgE específicos de alérgeno.

40
45
La expresión "niños/niños pequeños/infantes/bebés": debido a que los niños o bebés resultan especialmente afectados por las alergias alimentarias, la composición de la presente invención está destinada, aunque sin limitación, a niños y/o bebés. Según las definiciones que figuran en el artículo 2 de la Directiva de la Comisión Europea 2006/141/EC, de 22 de diciembre de 2006, sobre fórmulas infantiles y de continuación, los "bebés" son niños de menos de 12 meses de edad y los niños pequeños son niños de entre 1 y 3 años de edad. El término "niños" comprende los grupos de edad de entre 1 y 14 años. El término bebés puede ser equivalente a infantes y/o niños pequeños.

50
Los inventores han puesto de manifiesto que las reacciones y síntomas alérgicos pueden aliviarse proporcionando a mamíferos jóvenes sensibilizados una composición nutricional completa que comprende un extracto de manzana. Lo anterior ha definido un efecto positivo sobre la prevención secundaria de alergias.

Inesperadamente, dicho efecto no se vio acompañado de una reducción de la sensibilización de los jóvenes mamíferos frente a alérgenos (es decir, no se puso de manifiesto ninguna prevención primaria de las alergias).

55
Efecto de la composición:

60
La invención se refiere a la utilización de un extracto de manzana que comprende polifenoles para la preparación de una composición nutricional completa para reducir los síntomas de alergias originadas en alimentos en pacientes que presentan alergias inducidas por alérgenos alimentarios. Los inventores han puesto de manifiesto que el extracto de manzana es capaz de reducir los síntomas de alergia alimentaria en un grupo de ratones que han recibido una composición nutricional que contiene extracto de manzana. Lo anterior se pone de manifiesto al inducir una reacción alérgica (reto) tras la sensibilización. El modelo imite la alergia alimentaria en el ser humano, en el caso de que el ser humano (típicamente infantes/niños pequeños) se encuentren naturalmente sensibilizados frente a

alérgenos alimentarios. Por lo tanto, el extracto de manzana muestra un efecto protector. Sin restringirse a ninguna teoría, se cree que los polifenoles del extracto de manzana interactúan con la composición nutricional completa (en particular los componentes grasos o proteicos), proporcionan un efecto mejorado.

5 En una realización de la invención, el efecto de la composición es más concretamente un efecto sobre la prevención secundaria de alergias. Los síntomas de las alergias, en el modelo de ratón, en efecto se reducen significativamente, tal como ilustra una puntuación clínica alérgica más baja. Generalmente, los síntomas pueden incluir todas o una selección de los síntomas habitualmente identificados de las alergias.

10 En una realización de la invención, los síntomas comprenden diarrea, irritación de la piel o síntomas respiratorias, o una combinación de los mismos.

En una realización de la invención, los síntomas se ven acompañados por la liberación de mediadores bioquímicos, tales como triptasa, quimasa, histamina y leucotrienos.

15 Sin embargo, la composición de la invención no presenta ningún efecto sobre la sensibilización de los pacientes frente a los alérgenos. En efecto, la prevención primaria aparentemente no se consigue con la composición que comprende extracto de manzana. Los pacientes todavía se encuentran sensibilizados a los alérgenos alimentarios, aunque desarrollan menos síntomas de alergia al exponerlos nuevamente al alérgeno sensibilizador. Sin restringirse a ninguna teoría, se cree que el efecto, por lo tanto, no es de reducción de las defensas inmunológicas naturales (que presentan un efecto positivo para el paciente) sino que simplemente es de reducción de la expresión de los síntomas de alergia.

20 En una realización, la composición reduce la sensibilización frente a otros alérgenos posteriormente en la vida. Se cree que la composición estimula (o por lo menos no bloquea) los procesos naturales de maduración inmunológica y, por lo tanto, es capaz de presentar un efecto a largo plazo sobre la reducción de la sensibilización a los mismos alérgenos o a diferentes alérgenos (reducción de la sensibilización posteriormente en la vida). Mediante la simple reducción de los síntomas de alergia (prevención secundaria), se cree que la composición de la invención permite que se produzca la maduración inmunológica natural, presentando un efecto beneficioso a tan largo plazo.

30 Composición de la invención:

La composición comprende un extracto de manzana rico en polifenoles. El extracto de manzana en efecto se encuentra enriquecido en polifenoles en comparación con un extracto de manzana en bruto (no enriquecido). El factor de enriquecimiento es de por lo menos 1,5, de por lo menos 2 ó de por lo menos 5. Aparentemente resulta crucial para el efecto de la composición que el extracto de manzana se encuentre suficientemente concentrado (enriquecido en polifenoles) para permitir que se desarrolle y se ejerza el efecto antialérgico. El efecto podría encontrarse mediado por el bloqueo de la liberación de mediadores alérgicos a partir de células efectoras tales como mastocitos (un efecto comparable a los fármacos antihistamínicos). Sin restringirse a ninguna teoría, se cree además que algunos de los compuestos presentes en cantidades significativas en el extracto de manzana pueden unirse a alérgenos proteicos y enmascararlos frente a su reconocimiento por parte del sistema inmunológico del huésped. No puede descartarse que el extracto de manzana (posiblemente los polifenoles activos) reacciona con las proteínas específicas de la composición (proteínas presentes en la composición, especialmente las proteínas de origen lácteo), formando complejos y enmascarando los alérgenos potenciales.

45 La composición comprende entre 0,1% (p/p) y 1% (p/p) de extracto de manzana. Aunque resulta crucial la presencia de una cantidad suficiente de extracto de manzana para la inducción del efecto deseado, una cantidad de extracto de manzana excesivamente elevada presentaría un efecto negativo al impactar negativamente sobre la composición (desequilibrio de nutrientes). Lo anterior implica que el acomplejamiento de un exceso de proteínas podría alterar el contenido de la composición de proteínas biodisponibles.

50 En una realización de la invención, el extracto de manzana es el extracto de proteínas comercializado por Val de Vire Bioactives (Conde sur Vire, Francia) bajo la referencia "Pomactiv HFV". En una realización, el extracto de manzana es similar o se deriva del citado Pomactiv HFV y presenta un efecto similar.

55 En una realización de la invención, la composición comprende quercetina. La quercetina puede encontrarse comprendida en el extracto de manzana, en particular en los componentes polifenólicos del extracto de manzana. Específicamente, la quercetina puede unirse/acomplejar proteínas de la composición nutricional completa, incluyendo proteínas alérgicas contenidas en la composición y el acomplejamiento puede contribuir al efecto antialérgico mediante el secuestro de alérgenos del sistema inmunológico.

60 En una realización de la invención, la composición comprende proteínas hidrolizadas o parcialmente hidrolizadas. Una composición nutricional basada (parcialmente) en proteínas hidrolizadas resulta particularmente adecuada para

el sistema inmunológico y tracto gastrointestinal de infantes/niños jóvenes porque las proteínas hidrolizadas son más fácilmente digeridas y presentan una alergenicidad reducida en comparación con las proteínas intactas. Además, se cree que las proteínas hidrolizadas son ligadas muy eficientemente por los polifenoles de los extractos de manzana, por ejemplo debido a su tamaño relativo. Lo anterior puede inducir un mayor efecto de enmascaramiento de los alérgenos y, de esta manera, reducir adicionalmente la alergenicidad de la composición. Ello representa una composición más apropiada para el sistema inmunológico y tracto gastrointestinal de un infante/niño pequeño con alergia alimentaria. En este caso, la combinación del extracto de manzana con proteínas hidrolizadas es de la máxima relevancia para la invención.

En una realización, las proteínas hidrolizadas son proteínas hidrolizadas de proteínas de soja y/o caseína. En una realización, las proteínas hidrolizadas resultan de la acción de la tripsina y/o quimiotripsina sobre las proteínas (especialmente proteínas de suero). En una realización, las proteínas hidrolizadas comprenden proteínas de soja y/o proteínas de huevo. En una realización, las proteínas hidrolizadas resultan de la acción de proteasas tales como Protamex® y/o Flavourzyme® (Novozyme, Dinamarca). En una realización, las proteínas de la composición, preferentemente las proteínas hidrolizadas, comprenden proteínas de cereales o huevo. En una realización, las proteínas hidrolizadas resultan de la acción de alcalasa. La composición de la invención puede comprender una mezcla de 2 ó más de las fuentes de proteínas citadas.

Grupo diana:

La composición de la invención está dirigida más adecuadamente a pacientes relativamente jóvenes, aunque no puede descartarse un efecto sobre adultos. En efecto, preferentemente los pacientes son suficientemente jóvenes para que todavía se encuentren pasando una etapa de maduración de su sistema inmunológico y su tracto gastrointestinal. En estos pacientes el efecto de la composición puede ser más intenso o más rápido. En una realización, la composición es una fórmula infantil, una fórmula de continuación, una leche de crecimiento, unos cereales infantiles y/o un alimento para bebés. La fórmula de continuación habitualmente se entiende que se refiere a composiciones para infantes tras los 6 primeros meses de vida. La leche de crecimiento habitualmente se entiende que se refiere a composiciones para niños pequeños y/o niños de entre 1 ó 2 y 6 años de edad o de entre 2 ó 3 y 5 años. La leche de crecimiento habitualmente son composiciones basadas en leche de vaca. Preferentemente la composición está destinada a infantes o niños pequeños o seres humanos jóvenes de menos de 6 años de edad, entre el nacimiento y los 3 años de edad, o entre el nacimiento y el destete. En una realización, la composición es una fórmula infantil de inicio o de continuación. Preferentemente, la composición nutricional comprende una amplia mayoría de los nutrientes necesarios para la alimentación del ser humano joven.

En una realización, la composición nutricional es una composición de cereales infantiles para infantes/niños pequeños de 1 a 4 años de edad. La composición puede estar destinada más específicamente y administrarse durante el periodo de destete y/o hasta los 12 meses posteriores. El periodo de destete efectivamente resulta importante con respecto a la invención, ya que los infantes están expuestos a una diversidad de alimentos durante el periodo de destete, durante un periodo de rápida maduración de su sistema inmunológico y su tracto gastrointestinal. Por lo tanto, el control eficaz de la respuesta alérgica resulta de particular importancia durante este periodo.

En una realización, la composición nutricional de la invención es una leche de crecimiento destinada y formulada específicamente para niños pequeños de entre 1 y 3 años o para niños de entre 3 y 6 años de edad. La composición está basada en leche de vaca y puede contener probióticos y/o prebióticos. La composición puede ser parte de un régimen de continuación entre los 1 y 6 años de edad y puede administrarse tanto durante el periodo de 1 a 3 años como en el periodo de 3 a 6 años de edad. Dicha administración puede no ser diaria, aunque puede ser suficientemente regular (por lo menos una vez cada mes o semana) para inducir el efecto pretendido. Mediante la acción en el periodo o periodos clave de maduración del sistema inmunológico y mediante la administración durante un periodo de tiempo prolongado se consigue un efecto más marcado de la composición.

En una realización, la composición se administra durante la primera infancia (primeros 6 meses) y/o entre los 6 meses y 1 año de edad y durante la infancia posterior (por ejemplo de los 1 a 4 años o de los 2 a 6 años de edad). Dicha administración puede ser, aunque no necesariamente, diaria, suficientemente regular (por ejemplo como mínimo una vez cada mes o semana) para inducir el efecto pretendido. Una administración continua durante un periodo de tiempo prolongado (unos cuantos años), aunque relativamente infrecuente (una vez a la semana, una a 4 veces al mes) puede incrementar el efecto observado al actuar en la etapa crítica de maduración del sistema inmunológico.

Con respecto a la utilización de la composición de la invención, los niños, bebés o infantes pueden ser niños alérgicos. Los niños alérgicos son aquellos niños, bebés o infantes que han experimentado por lo menos un episodio de reacción alérgica (leve, moderada o grave) frente a un alérgeno alimentario. En una realización de la invención,

los niños, bebés o infantes presentan alergias graves declaradas a alérgenos alimentarios y/o han experimentado más de un episodio moderado o grave de alergia alimentaria.

5 Los alérgenos alimentarios comprendidos en la presente invención pueden incluir todos los tipos de alérgenos naturalmente presentes o habitualmente presentes en los alimentos, especialmente los alimentos para seres humanos jóvenes (por ejemplo infantes, bebés y niños).

Resultados experimentales:

10 Los estudios *in vitro* con células humanas y de roedor sugieren que algunos antioxidantes podrían modular la función de los mastocitos. Debido a que las frutas y verduras son ricas en antioxidantes, los presentes inventores estudiaron si los síntomas de alergia alimentaria podían verse influidos por un extracto de fruta. Concretamente, los presentes inventores sometieron a ensayo el efecto de consumir el extracto de manzana Pomactiv HFV en un modelo de alergia alimentaria en el ratón (modelo de ratón de alergia alimentaria con OVA, ilustrado en la fig. 1).

15 Tras el reto, los ratones tratados con extracto de manzana desarrollaron síntomas clínicos menos graves que los animales sensibilizados no tratados (control positivo). Estos resultados quedan ilustrados por los resultados experimentales mostrados en las figuras 2 y 3.

20 La figura 2 muestra los resultados de 2 experimentos exploratorios independientes realizados con 10 animales/grupo. El resultado medido (puntuación alérgica) muestra una tendencia positiva de reducción de la puntuación de alergia en ratones que han recibido extracto de manzana en comparación con el control positivo ($p=0,08$ y $0,06$, respectivamente).

25 La figura 3 muestra los resultados de un experimento potenciado estadísticamente ($n=15$ /grupo) en el mismo modelo. Se confirmó el efecto de reducción de la puntuación de alergia en el grupo que había recibido extracto de manzana durante la semana previa al reto (prevención secundaria) y era un efecto estadísticamente significativo (fig. 3, $p=0,014$, grupo "extracto de manzana Pomactiv HFV, secundario"). Un grupo tratado con el mismo extracto de manzana durante la etapa de sensibilización (grupo "extracto de manzana Pomactiv HFV, primario") no mostró síntomas reducidos tras el reto. De manera similar, un grupo tratado con un extracto de manzana diferente no presentó síntomas reducidos tras el reto (fig. 3, grupo "Diana Naturals AFPOMM9080").

35 Además de la puntuación clínica, se determinaron los niveles séricos de proteasa-1 de mastocito de ratón (PMM-1) como medida de la activación de los mastocitos intestinales por el reto de alérgeno. El consumo del extracto de manzana Pomactiv HFV redujo significativamente los niveles séricos de PMM-1 en comparación con los animales de control no tratados (figura 4). Los niveles de expresión en el intestino de diversos genes asociados a alergia se determinados mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (PCR-RTc, ver el método posteriormente). Las mediciones de la expresión génica se llevaron a cabo en tejidos de 2 sitios diferentes (placas de Peyer del íleon e íleon del grupo de control positivo, el grupo de control negativo y el grupo que había recibido extracto de manzana (Pomactiv HFV) durante la semana previa al reto (prevención secundaria). La figura 5 (Tabla 1) y la figura 6 (Tabla 2) ilustran los resultados obtenidos: el grupo que había recibido el extracto de manzana Pomactiv HFV mostró una expresión reducida de diversos genes, incluyendo las citoquinas interleuquina (IL)-5, IL-13, IL-10, interferón (IFN)- γ y quimioquina CCL11 (eotaxina) en placas de Peyer del íleon y las citoquinas IL-13, IL-10, IL-12 IFN- γ , quimioquina CCL11 (eotaxina) y factor de transcripción GAT-3 en el íleon. Los genes para los que se ha puesto de manifiesto una expresión reducida generalmente son marcadores reconocidos para un fenotipo de células T ayudante 2 (IL-5, IL-13, CCL11 y GATA-3), que es conocido que regula el desarrollo de las alergias. Por lo tanto, los experimentos demuestran la modulación negativa de las respuestas inmunológicas mediante reducción de la expresión de genes relevantes al recibir los animales sensibilizados extracto de manzana (una prevención secundaria). Se cree que lo anterior está contribuyendo al efecto antialérgico del extracto de manzana sometido a ensayo en la reducción de los síntomas alérgicos (prevención secundaria).

Conclusión:

55 Estos datos demuestran que el consumo de un extracto de manzana enriquecido en polifenoles (Pomactiv HFV) por un animal sensibilizado conduce a síntomas alérgicos reducidos tras la exposición al alérgeno de sensibilización. La reducción de los síntomas se vio acompañada de niveles séricos reducidos de MMCP-1 y una expresión reducida de genes clave relacionados con las alergias en el intestino, sugiriendo que una modulación de componentes del sistema inmunológico, tales como los mastocitos, contribuye al efecto de protección.

60 Métodos analíticos:

Modelo de ratón de alergia alimentaria por OVA:

Se sensibilizaron ratones BALB/c convencionales adultos de seis semanas de edad por vía oral (con una cánula) a intervalos semanales con 20 mg de Ovoalbúmina (OVA) de Fluka (Buchs, Suiza) + 10 µg/ratón de toxina del cólera (utilizada como adyuvante) de LuBioscience (Lucerne, Suiza) durante 7 semanas. Una semana después de la última sensibilización, se llevó a cabo un reto oral con 100 mg de OVA. Se llevó a cabo una intervención nutricional con extracto de manzana HFV de Val de Vire Bioactives (Val de Vire bioactives - BP2 - 50890 Conde sur Vire, Francia, referencia de catálogo "Pomactiv HFV") o AFPOMM9080 de Diana Naturals (Antrain, Francia) (al 1% p/p) incorporado en los alimentos (Kliba 3200, Kliba Nafag Kaiseraugst, Suiza) durante todo el experimento; como prevención primaria durante el periodo de sensibilización o como prevención secundaria desde el final de la etapa de sensibilización (fig. 1). Quince minutos después del reto, los ratones fueron observados individualmente durante 30 minutos. Se registraron los síntomas clínicos y se cuantificaron de la manera siguiente (puntuación de alergia): 0, sin síntomas, menos de 4 episodios de rascado; 1: 4a 10 episodios de rascado en torno a nariz y cabeza, sin diarrea; 2: más de 10 episodios de rascado o pelaje erizado e inmovilidad heces blandas; 3: diarrea o respiración laboriosa o cianosis; 4: diarrea en combinación con inmovilidad tras pinchado, pelaje erizado, respiración laboriosa o cianosis; 5: anafilaxis. Cuatro horas después del reto se sacrificaron los ratones (dislocación cervical), se extrajo sangre y el último centímetro de íleon más una placa de Peyer del mismo área y se congelaron en nitrógeno líquido.

PMM-1 sérico:

Se cuantificó la proteasa-1 de mastocitos murinos (PMM-1) en suero de ratón mediante ELISA, obtenido de Moredun Scientific (Midlothian, Escocia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvo la concentración de PMM-1 mediante la conversión de los valores de DO en pg/ml utilizando una curva estándar polinómica.

Análisis de matrices de baja densidad de la expresión génica en intestino:

Extracción y cuantificación del ARN:

Se extrajeron los ácidos ribonucleicos (ARN) totales de íleon y placa de Peyer siguiendo el protocolo del fabricante utilizando un kit de sistema de aislamiento de ARN total SV obtenido de Promega (Dübendorf, Suiza).

Se cuantificó el ARN utilizando el kit de reactivo Ribogreen quant-IT proporcionado (Promega Dübendorf, Suiza) siguiendo el protocolo del fabricante.

Transcripción inversa:

Se llevó a cabo la transcripción inversa en 1 µg de ARN total mediante la utilización del kit de transcriptasa inversa Multiscribe de Applied Biosystems (Foster City, USA). Se mezcló el ARN total con 50 µM de hexámeros aleatorios, 0,5 mM de dNTP, 20 U de inhibidor de ARNasa (Applied Biosystems), 62,5 U de transcriptasa inversa Multiscribe, 1X de tampón de TI y 5,5 mM de MgCl₂ en un volumen final de 50 µl. Se llevó a cabo la transcripción inversa en un termociclador T3 (Biometra, Göttingen, Alemania) con el siguiente programa de ciclado: 10 min. a 25°C, 30 min. a 48°C, 5 min. a 95°C, finalizando a 4°C.

MBD:

Se diseñaron matrices de baja densidad en Internet, en el sitio de Internet de Applied Biosystems (<http://www3.appliedbiosystems.com/index.htm>). La carga, la operación y el análisis se llevaron a cabo siguiendo el protocolo del fabricante en un ABI-Prism 7900HT cuantitativo.

La cuantificación se normalizó respecto a la media de 3 genes de mantenimiento: β-actina, GAPDH y HPRT. Basándose en los valores de umbral de ciclo (Ct) obtenidos, se determinó una expresión de ARNm relativa y normalizada para cada gen utilizando ΔCt. El valor de Ct de cada gen se corrigió con la media de Ct de los tres genes de mantenimiento. Se calcularon los resultados como expresión relativa utilizando la fórmula $-2^{-\Delta Ct} \times K$, en la que K es un factor 10⁶. La expresión de resultados de factor de incremento se normalizó respecto a los niveles de expresión en el grupo negativo.

55

REIVINDICACIONES

- 5 1.Utilización de un extracto de manzana que comprende polifenoles para la preparación de una composición nutricional completa para reducir los síntomas de alergias originadas por alimentos en pacientes que presentan alergias inducidas por alérgenos alimentarios, en la que dicha composición no presenta ningún efecto sobre la sensibilización de dichos pacientes frente a dichos alérgenos, en la que dicho extracto de manzana se ha enriquecido en polifenoles en un factor de por lo menos 1,5 frente a extracto de manzana en bruto, en el que dicha composición comprende entre 0,1% p/p y 1% p/p de dicho extracto de manzana.
- 10 2.Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha composición proporciona una prevención secundaria significativa frente a las reacciones alérgicas inducidas por dichos alérgenos alimentarios.
- 15 3.Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende quercetina.
- 4.Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende proteínas hidrolizadas.
- 20 5.Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición reduce la sensibilización frente a otros alérgenos posteriormente en la vida.
- 6.Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho extracto de manzana es Pomactiv HFV de Val de Vire Bioactives (Conde sur Vire, Francia).
- 25 7.Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos síntomas son diarrea, irritación de la piel o respiratorios, o una combinación de los mismos.
- 8.Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende proteínas de cereales.
- 30 9.Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es una fórmula infantil, una fórmula de continuación, una leche de crecimiento, un cereal infantil o un alimento para bebés.
- 35 10.Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es una composición de cereales infantil para niños de 1 a 4 años de edad.
- 11.Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición se proporciona a niños durante el periodo de destete y/o hasta 12 meses después.
- 40 12.Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos pacientes son infantes o niños pequeños de edad inferior a 6 años, preferentemente entre el nacimiento y la edad de 3 años.
- 45 13.Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos síntomas se ven acompañados por la liberación de mediadores bioquímicos tales como triptasa, quimasa, histamina y leucotrienos.

Figura 1:

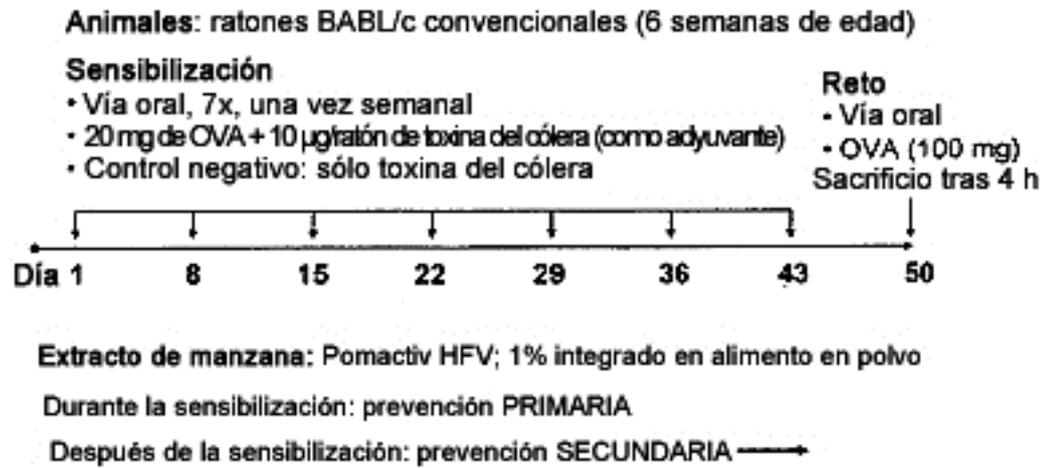


Figura 2:

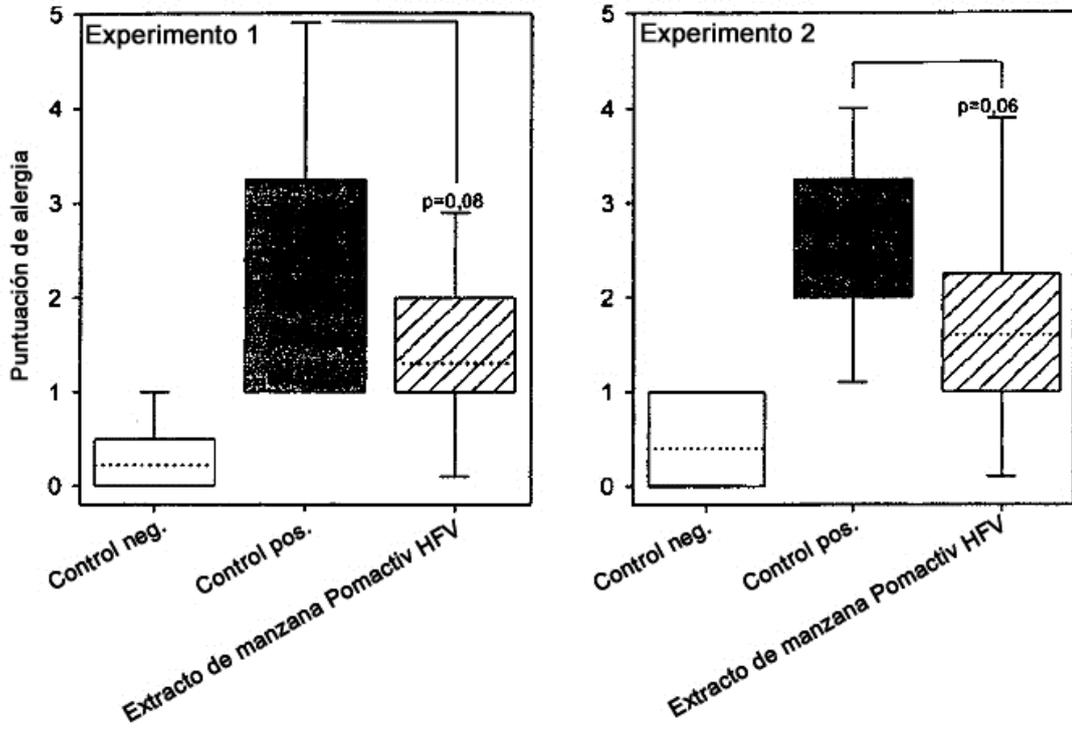


Figura 3:

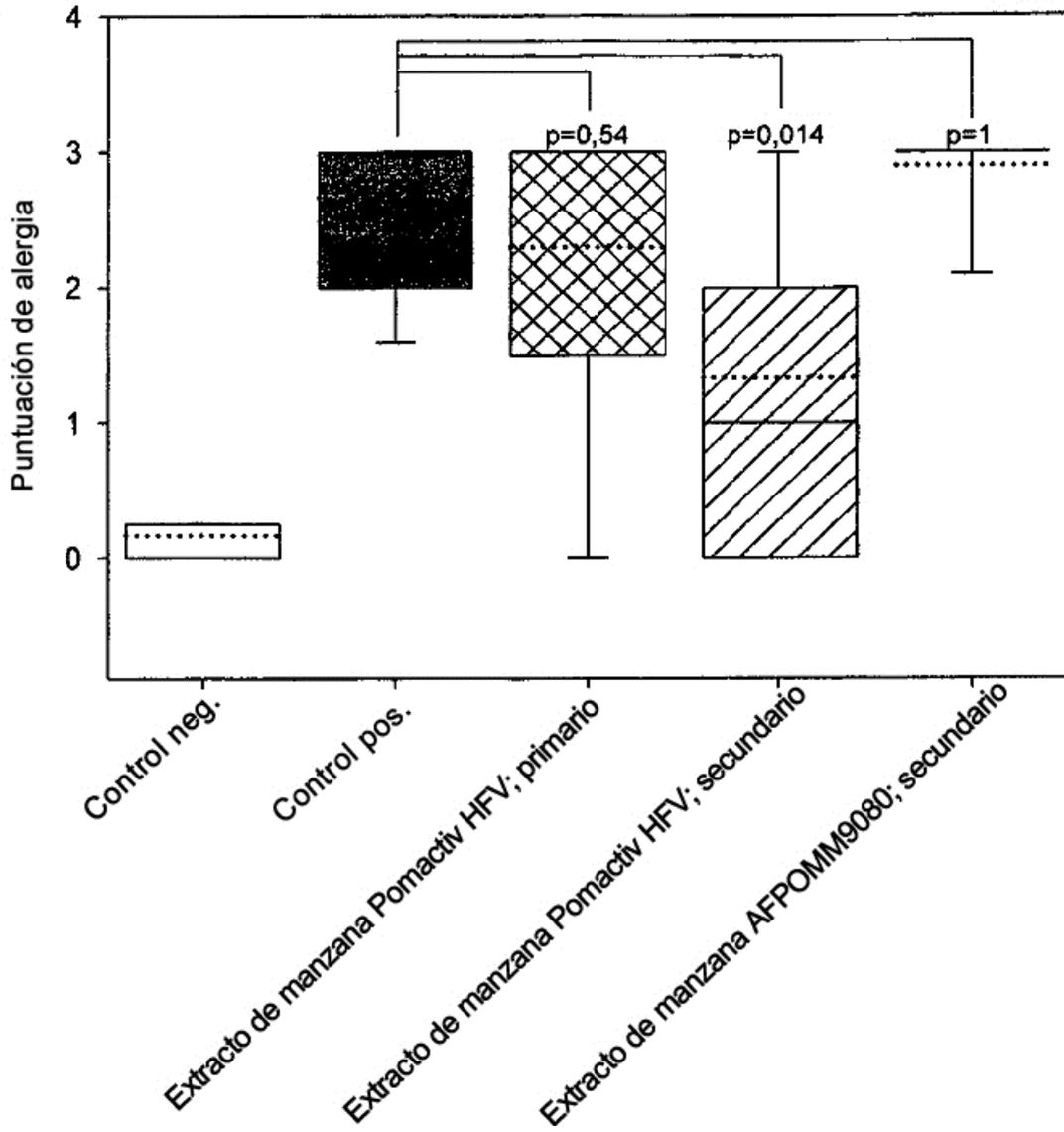


Figura 4:

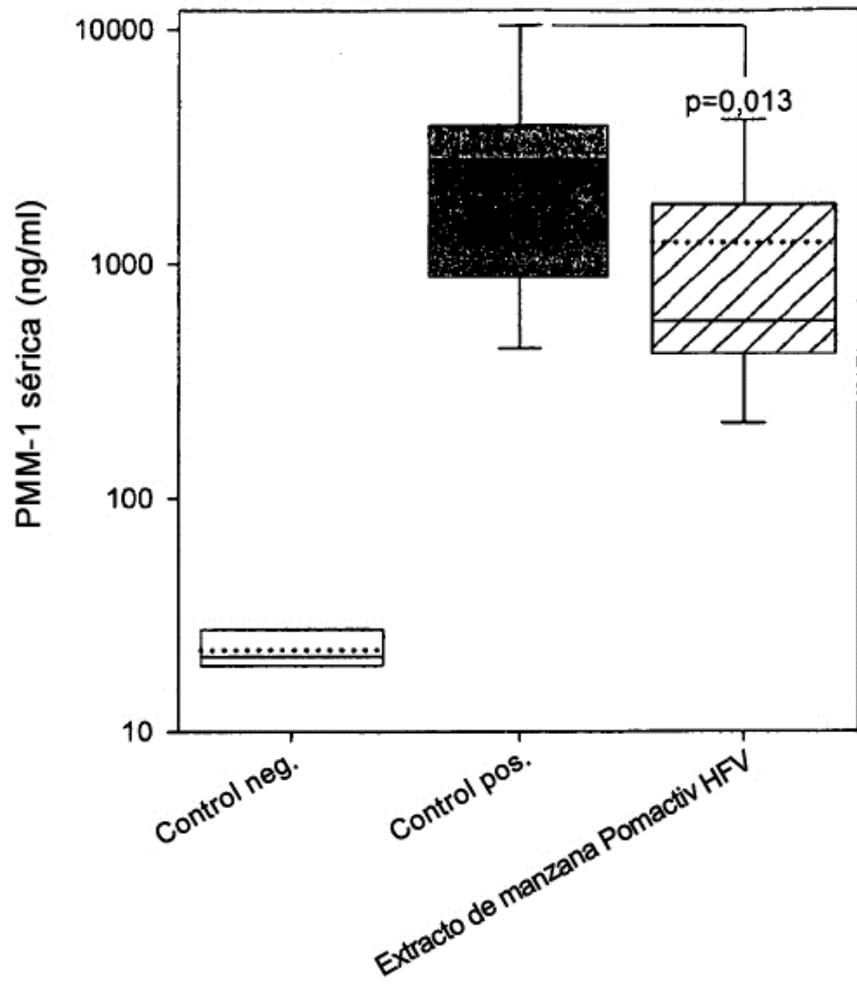


Figura 5 (Tabla 1). Niveles de expresión génica en placas de Peyer ileales

Gen diana	Expresión génica relativa (mediana±SEM y factor de cambio)					
	Control neg.		Control pos.		Extracto de manzana Pomactiv HFV	
	Relativo ¹	Factor ²	Relativo	Factor	Relativo	Factor
IL-5	1±4	1	45±19	85.3	1±21	2.5
IL-13	1±4	1	175±50	324.0	48±49	88.9
CCL11	491±308	1	2388±1078	4.9	974±1981	2.0
CCL17	245±42	1	1994±687	8.1	1288±366	5.3
GATA3	3103±300	1	3622±462	1.2	4549±615	1.5
IL-10	197±34	1	913±108	4.6	445±95	2.3
IL-12a	1372±145	1	2163±605	1.6	1974±327	1.4
IFN- γ	74±28	1	220±102	3.0	83±20	1.1

¹ Los niveles de expresión génica relativos se normalizaron respecto a 3 genes de mantenimiento (GAPDH, β -actina, HPRT)

² El factor de expresión se normalizó respecto a los niveles de expresión en el grupo de control neg.

Figura 6 (Tabla 2). Niveles de expresión génica en el ileon

Gen diana	Expresión génica relativa (mediana±SEM y factor de cambio)					
	Control neg.		Control pos.		Extracto de manzana Pomactiv HFV	
	Relativo	Factor	Relativo	Factor	Relativo	Factor
IL-5	8±47	1	15±403	1.8	16±114	1.9
IL-13	6±1	1	648±360	100.5	277±105	43.0
CCL11	4703±3286	1	18038±6797	3.8	2118±1352	0.5
CCL17	359±177	1	3754±888	10.5	2203±543	6.1
GATA3	2920±845	1	5827±1191	2.0	2302±1059	0.8
IL-10	306±163	1	2604±1540	8.5	615±602	2.0
IL-12a	100±148	1	830±438	8.3	190±323	1.9
IFN- γ	775±308	1	1747±738	2.3	631±196	0.8

¹ Los niveles de expresión génica relativos se normalizaron respecto a 3 genes de mantenimiento (GAPDH, β -actina, HPRT)

² El factor de expresión se normalizó respecto a los niveles de expresión en el grupo de control neg.