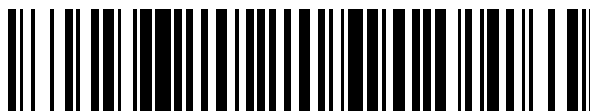


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 281**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/7052 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)
A61K 36/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2009** **PCT/EP2009/061620**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.04.2010** **WO10034615**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2009** **E 09782755 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016** **EP 2346530**

54 Título: **Composiciones inmunoestimuladoras que comprenden una nucleobase y un polisacárido obtenible a partir de hongos, levaduras o bacterias**

30 Prioridad:

26.09.2008 ES 200802731

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2017

73 Titular/es:

BIOIBERICA, S.A. (100.0%)
7 Pl. Francesc Macia
08029 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

ESCAICH FERRER, JOSEP;
MARTINEZ PUIG, DANIEL;
CHETRIT RUSSI, CARLES;
BORDA CASAS, ELISABET y
KOSUNA, KEN-ICHI

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 600 281 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

Composiciones inmunoestimuladoras que comprenden una nucleobase y un polisacárido obtenible a partir de hongos, levaduras o bacterias

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a nuevas composiciones, más específicamente nuevas composiciones inmunoestimuladoras. De igual modo, la presente invención se refiere al procedimiento de preparación de las composiciones, así como a su utilización.

Antecedentes de la invención

Es un hecho conocido que las intervenciones nutricionales (apoyo nutricional enteral o parenteral) a pacientes críticos permiten revertir los estados catabólicos y estimular el anabolismo, lo cual repercute en una mejor recuperación y en un aumento de la tasa de supervivencia.

Un paciente en estado crítico es aquel que, por ejemplo, está sometido a tratamientos quimioterápicos, que sufre septicemia generalizada, infección vírica, cirugía, quemaduras, traumatismos, cáncer, tratamiento inmunosupresor, malnutrición o en general cualquiera que requiera un periodo de hospitalización prolongado. Todas estas situaciones clínicas tienen un efecto negativo sobre la capacidad de respuesta inmunitaria, aumentando el riesgo de infecciones oportunistas, complicaciones postquirúrgicas o ciertas toxicidades asociadas, por ejemplo, a la quimioterapia y radioterapia, retrasando la recuperación y reduciendo la probabilidad de supervivencia.

La respuesta inmunitaria no solo está afectada en los pacientes críticos sino también en seres humanos y animales en situación de estrés, especialmente a edades tempranas. En esos casos, el riesgo de infecciones oportunistas aumente, especialmente aquellas relacionadas con los sistemas digestivo y respiratorio. Un claro ejemplo de las infecciones relacionadas con el estrés a edades tempranas viene de la producción animal. En animales criados en condiciones comerciales, estas infecciones son especialmente importantes. Por ejemplo, en los terneros, el primer poco de enfermedades respiratorias suele emerger a las cuatro semanas de vida, causando pérdidas económicas sustanciales debido a la medicación y depresión del crecimiento (H.J.Postema et al., *Tijdsch Diergeneeskd.* 1,112(11), 665-671 (1987); H.J. van der Fels-Klerx et al., *Preventive Veterinary Medicine* 51(1-2), 75-94 (2001); O. Angen et al., *Veterinary Microbiology* 137(1-2), 28, 165-171 (2009), T. Autio et al., *Veterinary Microbiology* 119 (2-4), 31, 256-265 (2007)).

Además, hay una preocupación creciente sobre el uso excesivo de antimicrobianos con respecto a la amenaza de infecciones oportunistas debido a la aparición de resistencia antimicrobiana (A.G. Mathewet al., *Foodborne Pathog. Dis.* 4(2), 115-133 (2007).

Los nucleótidos son compuestos intracelulares de bajo peso molecular que desempeñan un papel en prácticamente todos los procesos bioquímicos. Están presentes de forma natural en los alimentos aunque en cantidades limitadas (<400mg/100g). Los tejidos que presentan tasas elevadas de proliferación celular, como son los de los sistemas inmunitario y gastrointestinal son incapaces de cubrir sus necesidades de nucleótidos exclusivamente utilizando la síntesis *de novo*, lo que significa que la vía preferente es la recuperación de nucleótidos de la dieta. En situaciones en las que el estrés afecta al sistema inmunitario (pacientes en situaciones críticas) el complemento dietético con formulaciones de nucleótidos es esencial para mantener la respuesta humoral y celular del sistema inmunitario (A. Gil, *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 supl 3, S1-S4 (2002)). En concreto se ha demostrado que el complemento con nucleótidos exógenos estimula la proliferación de células linfoides y la respuesta linfoproliferativa a aloantígenos y mitógenos. Este complemento también contribuye a la respuesta de los linfocitos T, incrementa la respuesta de hipersensibilidad cutánea retardada, aumenta el rechazo de injertos, revierte la inmunodepresión asociada a la malnutrición, incrementa la resistencia a ciertas infecciones, regula la cantidad de linfocitos citolíticos naturales (NK, del inglés *natural killer*) y macrófagos, y promueve la síntesis de inmunoglobulinas (J. Maldonado et al, *Early Human Development*, 65 supl., S69-S74 (2001)).

Se ha estudiado el complemento con nucleótidos en ensayos clínicos aleatorizados (ECA) realizados en pacientes críticos. Un metaanálisis de 13 ensayos ha concluido que el complemento no tiene efecto sobre la mortalidad, pero reduce significativamente la incidencia de infecciones y el periodo de hospitalización (R.J. Beale et al., *Crit. Care Med.*, 27, 799-805 (1999)).

Por otro lado, algunos estudios han demostrado que el complemento dietético con ciertos polisacáridos de extractos de hongos, levaduras o bacterias (sobre todo α -glucanos y β -glucanos) ejerce un efecto positivo sobre la respuesta inmunitaria.

Los β -glucanos son un grupo heterogéneo de polímeros de glucosa estudiados durante los últimos años por sus efectos biológicos en mamíferos. Se ha descrito que los β -glucanos actúan como activadores del sistema inmunitario y como modificadores de la respuesta celular. La unión de los β -glucanos a sus receptores intestinales específicos

resulta en una modulación en la expresión de citocinas, factores de transcripción y factores de crecimiento que regulan la respuesta inmunitaria. Esta regulación se ha mostrado beneficiosa para paliar la inmunodepresión y evitar la hematopoyesis asociada a la quimioterapia y radioterapia. Además, se ha demostrado que los β -glucanos confieren cierta actividad anticarcinogénica, previniendo la oncogénesis y las metástasis (D. Akramiené *et al.*, *Medicina (Kaunas)*, 43(8), 597-606 (2007)).

Los α -glucanos son un grupo de polímeros de glucosa unidos por enlaces α (1-4) y/o α (1-6). Un ejemplo de la obtención de estos compuestos a partir de un extracto de *Lentinus edodes*, hongo de la familia de los basidiomicetos se describe en los documentos de patente EP733647 (véase también el documento US 5.756.318), US 6.831.067 y US 7.169.762. Las investigaciones realizadas durante los últimos diez años en seres humanos y animales han demostrado que el complemento oral con estos polisacáridos tiene un efecto inmunomodulador. En modelo animal se ha descrito un incremento de los niveles de TNF α , lo cual reduce significativamente el tamaño de tumores metastásicos en ratas. A su vez, previenen la hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono y protegen frente a la alopecia en ratas tratadas con arabinósido de citosina (utilizado en quimioterapia). En estudios realizados en seres humanos se ha demostrado que el complemento oral con estos polisacáridos reduce la recurrencia de carcinoma hepatocelular y en general los efectos secundarios asociados al tratamiento quimioterápico (E.L. Spierings *et al.*, *J Nutr Sci Vitaminol*, 53, 536-539 (2007)).

Existen documentos en los que se describe la utilización de una combinación de nucleótidos con otros nutrientes para paliar la inmunodepresión en pacientes críticos. Por ejemplo, en la solicitud de patente EP367724 (véase también el documento US 5.231.085) se describe una combinación de nucleótidos con arginina y ácidos grasos poliinsaturados para mejorar la respuesta inmunitaria en seres humanos.

Aunque los nucleótidos y los extractos ricos en polisacáridos de hongos, levaduras o bacterias administrados por sí solos confieren cierto nivel de inmunoestimulación o de reducción de la inmunodepresión asociada a los estados críticos, hasta el momento, no se ha descrito ni sugerido la combinación de una nucleobase o de una fuente de nucleobases (por ejemplo, nucleótidos, nucleósidos, ARN o ADN) con un polisacárido de un extracto de hongos, levaduras o bacterias. Tampoco se ha encontrado descrito el efecto de dicha combinación sobre la respuesta inmunitaria.

Descripción de la invención

Inesperadamente, ahora se ha observado que la combinación de una nucleobase, una fuente de nucleobases o una mezcla de las mismas con un α -glucano obtenible a partir de un extracto de hongos, levaduras o bacterias mejora el efecto sobre diversos parámetros, en comparación con los efectos de cada componente por separado. También se ha demostrado que dicha combinación tiene un efecto sinérgico.

Así pues, la presente invención se refiere a una composición que comprende:

- un componente a) que comprende una nucleobase, una fuente de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en nucleósidos, nucleótidos, ARN y ADN o una mezcla de los mismos; y
- un componente b) que comprende un α -glucano obtenible a partir de un extracto de hongos, levaduras o bacterias.

En una realización preferida de la invención, la composición comprende, en una dosis unitaria:

- el componente a) que comprende de 15 mg a 3.000 mg de la nucleobase, la fuente de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en nucleósidos, nucleótidos, ARN y ADN o la mezcla de los mismos; y
- el componente b) que comprende de 15 mg a 3.000 mg del α -glucano obtenible a partir de un extracto de hongos, levaduras o bacterias.

Preferentemente, las composiciones se formularán para permitir que una dosis unitaria comprenda de 30 mg a 2.100 mg, más preferentemente de 150 mg a 750 mg de la nucleobase, la fuente de nucleobases o la mezcla de las mismas.

También preferentemente, las composiciones se formulan para permitir que una dosis unitaria comprenda de 30 mg a 2.100 mg, más preferentemente de 150 mg a 750 mg del α -glucano obtenible a partir de un extracto de hongos, levaduras o bacterias.

También preferentemente, las composiciones se formulan de modo que una dosis unitaria comprenda entre 1 mg y 60 mg por kg de peso corporal de un mamífero, incluido un ser humano del componente a) y entre 1 mg y 60 mg por kg de peso corporal de un mamífero, incluido un ser humano del componente b).

Preferentemente, el polisacárido es un α -1,4-glucano o un derivado acetilado del mismo.

En otra realización de la invención, la proporción del peso del componente a) con respecto al componente b) está entre 25:75 y 75:25, más preferentemente, la proporción del peso del componente a) con respecto al componente b) es 50:50.

5 En otra realización de la invención, el componente a) además comprende glutamina.

En una realización particularmente preferida de la invención, el componente a) es Nucleoforce® y el componente b) es AHCC®.

10 En otra realización particularmente preferida de la invención, el componente a) es Nucleoforce® Dogs y el componente b) es AHCC®.

En una realización particular, la composición de la invención es una composición inmunoestimuladora.

15 En otra realización particular, la composición de la invención es una composición farmacéutica.

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición dietética.

20 La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar una composición definida anteriormente, que comprende mezclar en estado sólido los componentes a) y b), preferentemente, por dosis unitaria, el peso del componente a) está entre 15 mg y 3.000 mg y el peso del componente b) está entre 15 mg y 3.000 mg.

25 En una realización preferida, por dosis unitaria, el peso del componente a) está entre 1 mg y 60 mg por kg de peso corporal de un mamífero, incluido un ser humano, y el peso del componente b) está entre 1 mg y 60 mg por kg de peso corporal de un mamífero, incluido un ser humano.

La presente invención también se refiere a una composición definida anteriormente, para su uso como un medicamento.

30 La presente invención también se refiere a una composición definida anteriormente, para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis en un mamífero, incluido un ser humano, de la inmunodepresión, de la toxicidad derivada de tratamientos de quimioterapia o radioterapia, de una enfermedad del sistema inmunitario, cáncer, de una infección o para estimular la función inmunitaria.

35 La presente invención también se refiere al uso de una composición definida previamente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o profilaxis de la inmunodepresión en un mamífero, incluido un ser humano.

40 En una realización preferida de la invención, la inmunosupresión está asociada a cáncer, cirugía, sepsis, traumatismo, quemaduras, tratamiento inmunodepresor, malnutrición o a una infección. En otra realización preferida, la inmunodepresión está asociada a tratamientos de quimioterapia o de radioterapia.

45 La presente invención también se refiere al uso de una composición definida anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o profilaxis de la toxicidad derivada de tratamientos quimioterápicos o radioterápicos en un mamífero, incluido un ser humano, preferentemente la toxicidad se selecciona entre el grupo que consiste en toxicidad hematológica, digestiva, renal, urinaria, cardíaca, respiratoria, neurológica, cutánea y hepática.

50 La presente invención también se refiere al uso de una composición definida anteriormente, para la preparación de un medicamento para estimular la función inmunitaria en un mamífero, incluido un ser humano.

55 La presente invención también se refiere al uso de una composición definida anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o profilaxis de una enfermedad del sistema inmunitario en un mamífero, incluido un ser humano. Preferentemente la enfermedad del sistema inmunitario se selecciona entre en grupo que consiste en artritis reumatoide, lupus eritematoso, enfermedad de Graves, síndrome de Reiter y síndrome de Sjögren.

60 La presente invención también se refiere al uso de una composición definida anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o profilaxis del cáncer en un mamífero, incluido un ser humano.

65 La presente invención también se refiere al uso de una composición definida anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención o profilaxis de una infección en un mamífero, incluido un ser humano, siendo la infección preferentemente una infección vírica, fúngica, bacteriana y parasitaria. Más preferentemente, la infección es vírica (por ejemplo, causada por: Virus respiratorio sincitial, virus parainfluenza de tipo 1, 3 y , virus de la gripe A y B, adenovirus, coronavirus, virus de la gripe aviar o virus del herpes) y/o bacteriana (por ejemplo, causada por: *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma*

pneumoniae, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* o *Mycoplasma bovis*) afectando a las vías respiratorias.

5 La presente invención también se refiere al uso de una composición definida anteriormente, para la preparación de un medicamento o una composición dietética para el tratamiento, prevención o profilaxis de un trastorno digestivo que evoluciona con alteraciones de la mucosa intestinal (tales como trastornos digestivos derivados de antibioterapia, periodos de ayuno largos, infecciones víricas, bacterianas o parasitarias, enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias intestinales).

10 En una realización preferida, el medicamento que se va a administrar comprende de 1 mg a 60 mg por kg de peso corporal del mamífero, incluido un ser humano, del componente a) y de 1 mg a 60 mg por Kg de peso corporal del mamífero, incluido un ser humano, del componente b) de la composición definida anteriormente.

15 En otra realización preferida, el medicamento es para la administración por vía enteral o parenteral.

La presente invención también se refiere al uso de una composición definida anteriormente, en un procedimiento para preparar una composición dietética para la estimulación de la función inmunitaria del cuerpo humano o de cualquier otro mamífero. Preferentemente la composición dietética comprende de 1 mg a 60 mg por kg de peso corporal del mamífero, incluido un ser humano, de componente a) y de 1 mg a 60 mg por kg de peso corporal del mamífero, incluido un ser humano, de componente b) de la composición definida anteriormente.

20 En una realización preferida el mamífero se selecciona entre el grupo que consiste en ser humano, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, lechón, oveja y pollo. De entre ellos, el mamífero preferido es el perro.

25 En la invención, la expresión "una dosis unitaria" se entenderá que es una dosis diaria o una dosis que puede administrarse más de una vez al día.

30 Las nucleobases o bases nucleicas son compuestos orgánicos cíclicos que incluyen dos o más átomos de nitrógeno. Son parte fundamental de los nucleósidos, nucleótidos, y ácidos nucleicos. Las nucleobases más preferidas que forman parte de las composiciones de la presente invención son las bases púricas (adenina y guanina) y las bases pirimidínicas (citosina, timina y uracilo).

35 La expresión "fuente de nucleobases" se refiere a nucleósidos, nucleótidos, ARN (ácido ribonucleico), ADN (ácido desoxirribonucleico) o equivalentes.

El componente a) de las composiciones de la invención comprende nucleobases en forma libre y/o una fuente de nucleobases, por ejemplo, nucleósidos, nucleótidos, ADN, ARN o mezclas de los mismos.

40 Los nucleósidos incluyen nucleósidos de ribosa tales como adenosina, guanosina, uridina y citidina y nucleósidos de desoxirribosa como desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxiuridina y desoxicitidina.

45 Los nucleótidos incluyen ésteres fosfato de nucleósidos, tales como monofosfatos de adenosina (AMP), guanosina (GMP), uridina (UMP), citidina (CMP), desoxitimidina (dTMP) y desoxicitidina (dCMP), así como los di y trifosfatos de los nucleósidos tales como UDP y UTP.

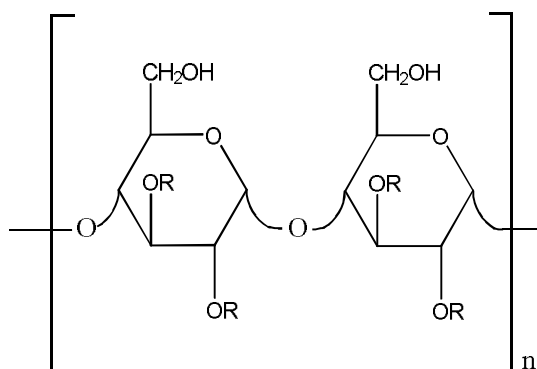
El origen de la fuente de nucleobases es preferentemente levaduras, aunque también pueden emplearse productos cárnicos o similares.

50 Por lo tanto, por ejemplo, los productos Nucleoforce®, Nucleoforce® Dogs y Nucleoforce® Piglets se pueden obtener a partir de la extracción, purificación e hidrólisis del ARN de *Saccharomices cerevisiae*. Dependiendo de las condiciones del procedimiento se obtendrá, por ejemplo, Nucleoforce®, Nucleoforce® Dogs o Nucleoforce® Piglets, entre otros. Estos productos los comercializa la empresa Bioibérica S.A. (www.bioiberica.com). Las diferencias en la composición y perfil de nucleótidos del componente a) de las composiciones de la invención responden a diferencias en las necesidades nutricionales de las especies a que se destinan las composiciones de la invención.

55 Para los fines de la presente invención, los polisacáridos obtenidos a partir de extractos de hongos, levaduras o bacterias son polímeros de glucosa unidos mediante enlaces beta β (1-4) y/o β (1-6), o cualquier otro polisacárido que contenga combinaciones de los enlaces descritos anteriormente. Asimismo, la presente invención también contempla derivados de, por ejemplo, formas metiladas o acetiladas de los polisacáridos naturales mencionados anteriormente.

60 Preferentemente, los polisacáridos del componente b) de las composiciones de la invención se pueden obtener, por ejemplo, a partir de los hongos basidiomicetos de las siguientes especies: *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa*, *Schizophillum commune*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Agaricus bisporus*, *Pholiota nameko*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Auricularia auricular*, *Ganoderma applanatum*, *Coriolus versicolor*, *Grifola umbellata*, *Volvariella volvacea* y similares, siendo la más preferida la especie *Lentinus edodes*.

El polisacárido α -1,4-glucano preferido en la presente invención comprende unidades de α -D-glucosa unidas mediante enlaces (1 $\rightarrow$ 4). Éste se puede representar mediante la siguiente estructura:



en la que R es un átomo de hidrógeno o un grupo acetilo, en una proporción de 7:3.

Este polisacárido se puede extraer y aislar en un medio de cultivo en el que un microorganismo perteneciente a la clase de los basidiomicetos, particularmente de la especie *Lentinus edodes*, se cultiva en un medio líquido en presencia de un extracto vegetal. El cultivo se realiza de acuerdo con la aireación del cultivo para temperatura del medio ordinaria.

La obtención de dicho polisacárido se describe en el documento de patente EP733647 (véase también el documento US 5.756.318) y lo comercializa la empresa Amino Up Chemical Company con el nombre AHCC® (www.aminoup.co.jp).

La presente invención también contempla un derivado de este polisacárido descrita en los documentos US 6.831.067 y US 7.169.762, que puede obtenerse haciendo reaccionar una solución de cultivo, obtenida cultivando un basidiomiceto con una mezcla de reacción de una solución de extractos de salvado de arroz y una enzima.

La cantidad a administrar de nucleobases y/o fuentes de nucleobases y del polisacárido o polisacáridos obtenidos a partir de extracto de hongos, levaduras o bacterias es dependiente de la edad del paciente, la situación clínica, el tratamiento de elección, la patología a tratar y la vía de administración. Por ejemplo, para un mamífero adulto (por ejemplo, un perro), una respuesta inmunoestimuladora se puede conseguir con una dosis de entre 25 mg y 60 mg por kg de peso corporal del mamífero del componente a) y entre 25 mg y 60 mg por kg de peso corporal del mamífero del componente b) de las composiciones de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse al paciente en dosis requeridas. Las composiciones pueden administrarse por diferentes vías, por ejemplo, enteral o parenteral.

Las formulaciones farmacéuticas de la invención generalmente estarán en forma sólida, líquida o de gel. Las formulaciones farmacéuticas en forma sólida que pueden prepararse de acuerdo con la presente invención se incluyen polvos, microgránulos (pellas), microesferas, nanopartículas, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, parches y supositorios. Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes comúnmente utilizados, tales como agua destilada, etanol, sorbitol, glicerol o propilenglicol. Se contemplan también formulaciones en forma sólida que se pueden convertir, inmediatamente antes de usarse, en formulaciones en forma líquida. Estas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

Para preparar las composiciones dietéticas y nutricionales, las composiciones de la invención se formulan con componentes y/o excipientes empleados en nutrición. Las composiciones dietéticas preparadas pueden estar, por ejemplo, en forma sólida, líquida, de emulsión, suspensión o de gel. También se contemplan las formulaciones en forma sólida que se puedan convertir, antes de usarse, en formulaciones en forma líquida o en suspensiones.

Las composiciones de la invención pueden usarse como tratamiento o como tratamiento paliativo, por ejemplo, para restaurar la respuesta inmunitaria de pacientes inmunodeprimidos, o con fines preventivos o profilácticos, por ejemplo, para mantener la función inmunitaria en pacientes que van a ser sometidos, por ejemplo, a tratamiento quimioterápico o radioterápico, tratamiento inmunodepresor o similares.

Cuando las composiciones de la invención van a usarse para tratamiento o de forma paliativa, se recomienda administrar la composición de la invención a partir del momento en que se detecta la depresión de la función inmunitaria hasta la total restitución de la situación.

En tratamientos preventivos se recomienda administrar la composición de la invención, preferentemente durante un periodo de cuatro semanas antes de que el paciente se someta, por ejemplo, a un procedimiento inmunodepresor.

De acuerdo con la presente invención se ha encontrado que las composiciones de la invención presentan ventajas, tales como: (i) posteriormente a la administración de una composición de la invención el sistema inmunitario responde de forma rápida y eficaz; (ii) las composiciones de la invención son más eficaces, en los diversos parámetros medidos, que cada uno de sus componentes por separado; (iii) existe un efecto sinérgico entre los componentes a) y b) de las composiciones de la invención, más específicamente entre Nucleoforce® y AHCC® cuando se administran conjuntamente; (iv) la administración de una composición de la invención que comprende Nucleoforce® Dogs y AHCC® permite mejorar la función inmunitaria y reducir la lesión hepática de animales sometidos a un tratamiento quimioterápico.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el porcentaje de variación de la concentración plasmática de inmunoglobulina A (IgA) con respecto al valor basal de los perros complementados con el producto placebo (C), con Nucleoforce® Dogs (A), con AHCC® (B) y con la composición de la invención que comprende la combinación de Nucleoforce® Dogs con AHCC® (A+B) tras la aplicación del tratamiento quimioterápico.

La figura 2 muestra el porcentaje de variación de la concentración plasmática de inmunoglobulina M (IgM) con respecto al valor basal de los perros complementados con el producto placebo (C), con Nucleoforce® Dogs (A), con AHCC® (B) y con la composición de la invención que comprende la combinación de Nucleoforce® Dogs con AHCC® (A+B) tras la aplicación del tratamiento quimioterápico.

La figura 3 muestra el porcentaje de variación de la concentración plasmática de inmunoglobulina G (IgG) con respecto al valor basal de los perros suplementados con el producto placebo (C), con Nucleoforce® Dogs (A), con AHCC® (B) y con la composición de la invención que comprende la combinación de Nucleoforce® Dogs y AHCC® (A+B) tras la aplicación del tratamiento quimioterápico.

La figura 4 muestra la concentración plasmática de alanina aminotransferasa (ALT) de los perros complementados con el producto placebo (C), con Nucleoforce® Dogs (A), con AHCC® (B) y con la composición de la invención que comprende Nucleoforce® Dogs y AHCC® (A+B) tras la aplicación del tratamiento quimioterápico.

La figura 5 muestra el índice de proliferación de linfocitos de perros sanos complementados con el producto placebo (C), con Nucleoforce® Dogs (A), con AHCC® (B) y con la composición de la invención que comprende Nucleoforce® Dogs y AHCC® (A+B) a lo largo de un periodo de 30 días.

La figura 6 muestra la incidencia de problemas respiratorios (%) desde el día 37 hasta el día 111 de vida en terneras lecheras que reciben un sustituto lácteo complementado, bien con el producto placebo (control) o bien con la composición de la invención comprende Nucleoforce® Dogs y AHCC® (A+B) desde el día 37 hasta el día 53 de vida.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los siguientes ejemplos son para fines ilustrativos únicamente y no representan una limitación del alcance de la presente invención.

A continuación se exponen dos ejemplos representativos de formulaciones para comprimidos.

Ejemplo 1: Comprimidos de Nucleoforce® Dogs y AHCC® para perros

Los comprimidos se prepararon siguiendo procedimientos convencionales.

Contenido de principios activos por comprimido:

Nucleoforce® Dogs	450 mg
AHCC®	450 mg

Ejemplo 2: Comprimidos de Nucleoforce® y AHCC® para seres humanos

Los comprimidos se prepararon mediante procedimientos convencionales.

Contenido de principios activos por comprimido:

Nucleoforce®	1.000 mg
AHCC®	1.000 mg

A continuación se exponen algunos ejemplos de ensayos que se pueden usar para determinar la actividad de las composiciones de la presente invención.

Ejemplo 3: Protección de la función inmunitaria y hepática de animales sometidos a tratamiento quimioterápico

El objetivo del experimento fue estudiar el impacto de la administración de una composición de la invención que comprende Nucleoforce® Dogs y AHCC® sobre la función inmunitaria de perros sometidos a tratamiento de quimioterapia.

5 Materiales y métodos

El diseño del estudio clínico fue aleatorizado y con ocultación doble. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Animal de la Universidad de Murcia.

- 10 Se dividió aleatoriamente un total de 25 perros *Beagle* adultos de 15 kg de peso corporal medio (machos y hembras sanos entre 1 y 2 años de edad) en cuatro grupos (C, A, B y A+B) (n=6) y se alimentaron durante un periodo de 30 días con una dieta comercial convencional complementada con:

- 15 Grupo control C: Producto placebo (microcelulosa cristalina).
 Grupo A: Nucleoforce® Dogs (60 mg/kg de peso corporal).
 Grupo B: AHCC® (60 mg/kg de peso corporal).
 Grupo (A+B): una composición de la invención formada por Nucleoforce® Dogs (30 mg/kg de peso corporal) y AHCC® (30 mg/kg de peso corporal).

- 20 Después de haber recibido durante 30 días complementos junto con la dieta convencional, todos los perros recibieron un tratamiento quimioterápico que comprendió:

una dosis única de lomustina (70 mg/m² de superficie corporal) por vía oral, y
 una dosis única de ciclofosfamida (180 mg/m² de superficie corporal) por vía oral.

- 25 Después del tratamiento quimioterápico, los perros se vigilaron diariamente y se registraron signos clínicos tales como su de atención/actividad. Además, se tomaron muestras en serie de sangre de forma semanal durante las 9 semanas posteriores a la administración de los fármacos quimioterápicos.

- 30 Todas las muestras de sangre se sometieron a hemogramas completos, se analizó el perfil bioquímico, se determinaron las concentraciones plasmáticas de inmunoglobulinas inespecíficas IgA, IgG e IgM, así como el porcentaje de linfocitos B y T y subtipos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺.

- 35 Se analizaron las concentraciones de inmunoglobulinas en plasma porque constituyen un índice de la actividad del sistema inmunitario y por lo tanto permiten medir la inmunodepresión asociada al tratamiento quimioterápico. También, se realizó un perfil bioquímico completo para caracterizar la toxicidad del tratamiento, especialmente sobre la función hepática.

- 40 Las determinaciones bioquímicas se realizaron utilizando un autoanalizador Olympus AU400. La concentración de inmunoglobulinas inespecíficas se analizó utilizando los kits comerciales de ELISA (IgA, IgG e IgM; Bethyl, TX, EE.UU.). El fenotipo de los linfocitos se determinó por citometría de flujo utilizando una detección de inmunofluorescencia (FACSCalibur, Becton Dickinson) y los datos se analizaron utilizando el programa informático CELL-Quest™.

- 45 Todos los datos se analizaron usando un análisis de la varianza (ANOVA) basado en el procedimiento GLM (modelo general lineal) del programa estadístico SAS (1996). Para todos los tratamientos se estudiaron el efecto del tratamiento experimental y el efecto del tiempo, así como la interacción entre ambos parámetros. Los valores medios se compararon usando el procedimiento LS-MEANS de SAS. Se consideró significativo un valor de P bilateral <0,05.

50 Resultados

- Una semana después del tratamiento quimioterápico todos los perros presentaron leucopenia grave. El mismo día se registraron síntomas graves de depresión y diarrea en el 50% (3/6) de los perros del grupo control. El porcentaje de animales afectados fue ligeramente menor en el grupo tratado con Nucleoforce® Dogs (33% (2/6)) y en el grupo tratado con AHCC® (33% (2/6)), mientras que en el grupo tratado con la composición de la invención (Nucleoforce® Dogs y AHCC®) ninguno de los animales (0% (0/6)) presentó signos clínicos de enfermedad.

- 60 Una semana después del tratamiento quimioterápico se redujo el porcentaje de linfocitos B en todos los grupos. El porcentaje de cambio con respecto el valor basal fue de 43, 69, 55 y -50% para los grupos C (control), grupo A (Nucleoforce® Dogs), grupo B (AHCC®) y grupo A+B (Nucleoforce® Dogs y AHCC®) respectivamente. Sin embargo, el grupo de perros que recibió la combinación Nucleoforce® Dogs y AHCC® presentó una tendencia a recuperar el porcentaje de células B con respecto a los otros grupos, porque el día 28 el porcentaje de cambio de la proporción de linfocitos B con respecto el valor basal se elevó hasta -23% mientras que en los otros tres grupos los valores se mantuvieron constantes durante el periodo experimental (51%, 59% y 49% para los grupos control, Nucleoforce® Dogs y AHCC® respectivamente).

El incremento en la recuperación de las poblaciones linfocitarias tipo B se observó claramente en la producción de anticuerpos inespecíficos. La figura 1 muestra como en el grupo control C la concentración de IgA cayó bruscamente siete días después del tratamiento quimioterápico mientras que en el grupo A (Nucleoforce® Dogs) y en el grupo B (AHCC®) se mantuvo, y en el grupo A+B (combinación de Nucleoforce® Dogs y AHCC®) se incrementó ligeramente ($P<0,01$).

El mismo patrón de respuesta se observa en la figura 2 para la IgM ($P<0,05$). En el caso de la IgG (figura 3), se detectó un incremento significativo ($P<0,001$) de la concentración plasmática de inmunoglobulinas en el grupo que recibió la composición de la invención (combinación de Nucleoforce® Dogs y AHCC®) con respecto a los grupos A (Nucleoforce® Dogs), B (AHCC®) y C (control), observándose un efecto sinérgico.

Aparte del efecto sobre la función inmunitaria, el complemento de la dieta con la composición de la invención (Nucleoforce® Dogs y AHCC®) ejerció un efecto protector sobre la hepatotoxicidad asociada al tratamiento quimioterápico. Tal y como puede observarse en la figura 4, en el día 28 se observó un incremento en los niveles serológicos de alanina aminotransferasa (ALT) que fue significativamente más elevado ($P<0,05$) en el grupo control (563,8 UI/l) que en los grupos A (Nucleoforce® Dogs) (266,3 UI/l), B (AHCC®) (221 UI/l) y A+B (Nucleoforce® Dogs y AHCC®) (141,9 UI/l).

En su conjunto los resultados del ensayo muestran que la administración de una composición de la invención que comprende la combinación de Nucleoforce® Dogs con AHCC® permite mejorar la función inmunitaria y reducir las lesiones hepáticas en animales sometidos a tratamiento quimioterápico. También muestran que existe un efecto sinérgico entre Nucleoforce® Dogs y AHCC®, ya que el efecto de la combinación sobrepasa la suma de los efectos individuales de cada componente por separado.

Ejemplo 4: Refuerzo de la respuesta inmunitaria en animales sanos

El fin del experimento fue estudiar el impacto de la administración de una composición de la invención que comprende Nucleoforce® Dogs y AHCC® sobre la función inmunitaria de perros sanos.

Materiales y métodos

El diseño del estudio clínico fue aleatorizado y con ocultación doble. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Animal de la Universidad de Murcia. Se dividió aleatoriamente un total de 24 perros *Beagle* adultos de 15 kg de peso corporal medio (machos y hembras sanos entre 1 y 2 años de edad) en cuatro grupos (C, A, B y A+B) ($n=6$) y se alimentaron durante un periodo de 30 días con una dieta comercial convencional complementada con:

Grupo control C: producto placebo (microcelulosa cristalina).

Grupo A: Nucleoforce® Dogs (60 mg/kg de peso corporal).

Grupo B: AHCC® (60 mg/kg de peso corporal)

Grupo A+B: una composición de la invención formada por Nucleoforce® Dogs (30 mg/kg de peso corporal) y AHCC® (30 mg/kg de peso corporal).

Los animales se vigilaron diariamente y se vigiló cualquier signo clínico de enfermedad. Al principio (día 0) y al final del periodo experimental (día 30) se tomaron muestras de sangre para determinar el índice de proliferación linfocitaria *in vitro*. Se utilizó este índice porque se considera que es una determinación que determina de forma fiable la capacidad del sistema inmunitario para responder a una infección.

Para la determinación de la proliferación de linfocitos se aislaron los linfocitos de muestras de sangre heparinizada de los animales y se cultivaron en ausencia o presencia de fitohemaglutinina con presencia en el medio de $10\ \mu\text{mol}$ de 5-bromodeoxyuridina (BrdU). El índice de proliferación celular se determinó utilizando una técnica de ELISA no radioactiva (Cell proliferation ELISA; Boehringer Mannheim, Alemania). Los resultados se expresaron como unidades de densidad óptica (DO).

Todos los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el procedimiento GLM (modelo general lineal) del programa estadístico SAS (1996). Los valores medios se compararon usando el procedimiento LS-MEANS de SAS. Se consideró significativo un valor de P bilateral $<0,05$.

Resultados

Tal como se muestra en la figura 5, tras 30 días de administrar los productos a ensayar, los animales que recibieron la composición de la invención (combinación de Nucleoforce® Dogs y AHCC®) presentaron un índice de proliferación linfocitaria significativamente superior ($13,42\pm0,72\ \text{DO}$) ($P<0,05$) al de los animales que recibieron Nucleoforce® Dogs ($7,04\pm1,72\ \text{DO}$), AHCC® ($7,18\pm1,79\ \text{DO}$) o el producto placebo ($8,01\pm1,81\ \text{DO}$).

No se detectó ningún signo de toxicidad asociado a la administración del producto.

Estos resultados demostraron el efecto preventivo o profiláctico de la composición de la invención que comprende la combinación de Nucleoforce® Dogs y AHCC®, ya que la administración de dicha composición mejora la capacidad de respuesta inmunitaria, permitiendo que el animal esté preparado para cualquier proceso capaz de causar depresión del sistema inmunitario.

5 **Ejemplo 5: Efectos del complemento con una combinación de Nucleoforce® Dogs y AHCC® a terneras lecheras antes del destete sobre las afecciones respiratorias y la respuesta inmunitaria durante el periodo de posdestete**

10 El objeto del presente estudio fue analizar el efecto de una combinación de Nucleoforce® Dogs y AHCC® sobre la incidencia de problemas respiratorios y la función inmunitaria de terneras en edad de destete de una graja comercial con una alta incidencia de enfermedad respiratoria.

Materiales y métodos

15 Se alimentó a 78 terneras de sustitución lecheras (edad inicial= $18 \pm 6,3$ días y peso corporal = $43 \pm 6,1$ kg) con 2 l de sustituto lácteo (SL) dos veces al día por medio de un biberón a las 7:30 y a las 16:30 hasta los 45 días de vida y después con una dosis diaria de 2 l de SL a las 7:30 durante una semana adicional. A los 37 días de edad, la mitad de las terneras recibió una dosis diaria de 3 g de la combinación de Nucleoforce® (Bioibérica, España) y AHCC (AminoUp, Japón) complementado a través de la toma matinal de SL hasta el momento del destete (52 días). Tras el
20 destete, las terneras se mudaron de establos individuales a corales que albergaban a 8 animales hasta alcanzar $111 \pm 2,1$ días (cuando se completó el estudio). El comportamiento del animal se vigiló desde los días 52 a 111 de vida. Las afecciones respiratorias se vigilaron diariamente desde los días 37 a 111 de vida. Se obtuvieron muestras de sangre de la mitad de los animales elegidos al azar de cada grupo de tratamiento mediante venopunción de la vena yugular a la edad de 37 y 52 días de vida. La incidencia de afecciones respiratorias se analizó usando análisis
25 de regresión logística de efectos mixtos y el número total de casos respiratorios usando un análisis de regresión de Poisson de efectos mixtos. Las determinaciones en sangre se analizaron usando un ANOVA de efectos mixtos.

Resultados

30 El plaquetocrito sanguíneo fue superior ($P < 0,05$) en las terneras complementadas al de las de control (22,9 frente a $21,5 \pm 0,45$ %, respetivamente). El volumen plaquetario medio también fue superior ($P < 0,05$) en las terneras complementadas al de las de control (10,3 frente a $7,9 \pm 0,01$ fl, respetivamente). De forma similar, el porcentaje de monocitos también fue superior en las terneras complementadas al de las de control (10,7 frente a $9,1 \pm 0,10$ %, respetivamente).

35 Como puede observarse en la figura 6, la incidencia de animales afectados por problemas respiratorios tendió a ser menor ($P = 0,06$) en las terneras que recibieron el complemento ($27 \pm 0,45$ %) que en los animales no complementados ($48,7 \pm 0,51$ %).

40 Pudo concluirse que 3 g/día de la combinación de Nucleoforce® y AHCC® tendían a ser eficaces para proporcionar a los animales una respuesta inmunitaria adecuada para reducir la incidencia de molestias respiratorias durante la transición de la alimentación líquida a la sólida.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

- 5 - un componente a) que comprende una nucleobase, una fuente de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en nucleósidos, nucleótidos, ARN y ADN o una mezcla de los mismos; y
 - un componente b) que comprende un α -glucano obtenible a partir de un extracto de hongos, levaduras o bacterias.

10 2. La composición según la reivindicación 1, que comprende en una dosis unitaria:

- el componente a) que comprende de 15 mg a 3.000 mg de la nucleobase, la fuente de nucleobases seleccionada del grupo que consiste en nucleósidos, nucleótidos, ARN y ADN o la mezcla de los mismos; y
 - el componente b) que comprende de 15 mg a 3.000 mg del α -glucano obtenible a partir de un extracto de hongos, levaduras o bacterias.

3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el α -glucano es un α -1,4-glucano o un derivado acetilado del mismo.

20 4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proporción del peso del componente a) con respecto al componente b) está comprendida entre 25:75 y 75:25, siendo preferentemente 50:50.

25 5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el componente a) además comprende glutamina.

6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el componente a) es Nucleoforce® o Nucleoforce® Dogs y el componente b) es AHCC®.

30 7.- Una composición inmunoestimuladora que comprende la composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

35 8. Una composición farmacéutica que comprende la composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Una composición dietética que comprende la composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y al menos un excipiente nutricional.

40 10.- Un procedimiento para preparar una composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende mezclar en estado sólido los componentes a) y b).

11. Una composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como medicamento.

45 12. Una composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento o prevención de la inmunodepresión, de la toxicidad derivada del tratamiento quimioterápico o radioterápico, de una enfermedad del sistema inmunitario, cáncer, una infección o para estimular la función inmunitaria en un mamífero.

50 13. Uso de una composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la inmunodepresión en un mamífero, estando la inmunodepresión asociada preferentemente a tratamientos quimioterápicos o radioterápicos, cáncer, cirugía, traumatismo, quemaduras, tratamiento inmunodepresor, malnutrición o una infección.

55 14. Uso de una composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de toxicidad derivada de tratamientos quimioterápicos o radioterápicos en un mamífero, seleccionándose la toxicidad preferentemente del grupo que consiste en toxicidad hematológica, digestiva, renal, urinaria cardíaca, respiratoria, neurológica, cutánea y hepática.

60 15. Uso de una composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un medicamento para estimular la función inmunitaria en un mamífero.

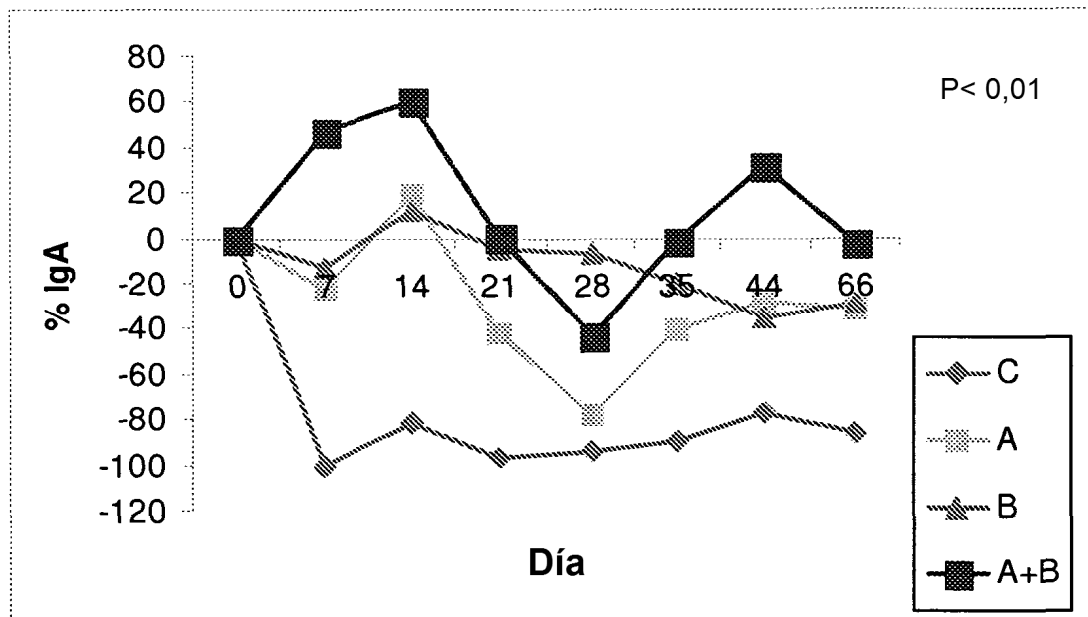
16. Uso de una composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad del sistema inmunitario en un mamífero.

65 17. Uso de una composición tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación

de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección en un mamífero, siendo la infección preferentemente una infección vírica y/o bacteriana de las vías respiratorias.

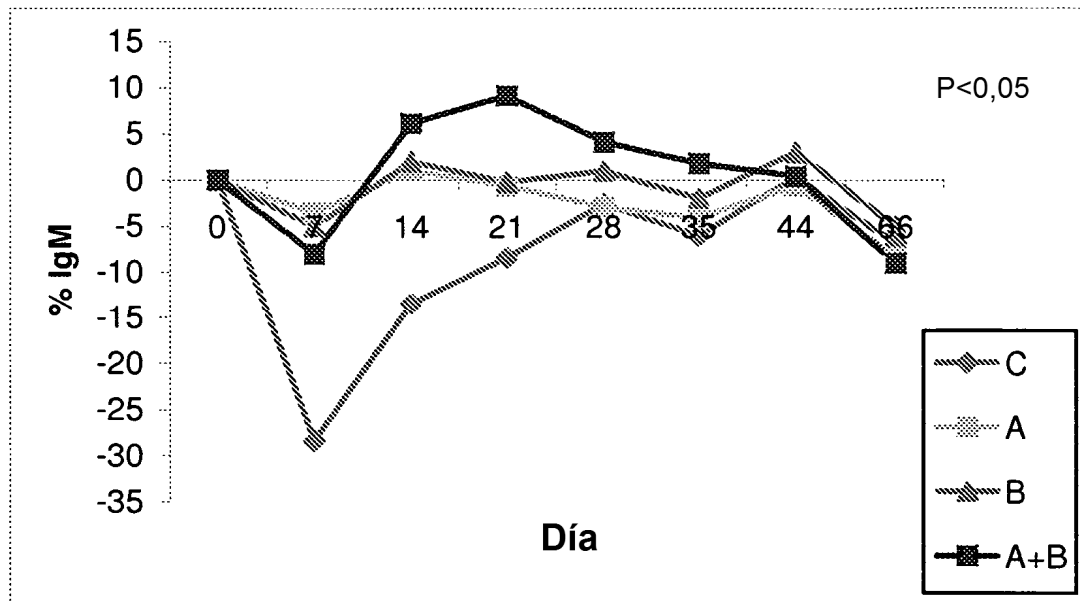
5 18. Uso de una composición tal como se define en la reivindicación 9, en un procedimiento para preparar una composición dietética para la estimulación de la función inmunitaria en un mamífero.

19. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18 o una composición según la reivindicación 12, en la que el mamífero es un ser humano o un perro.



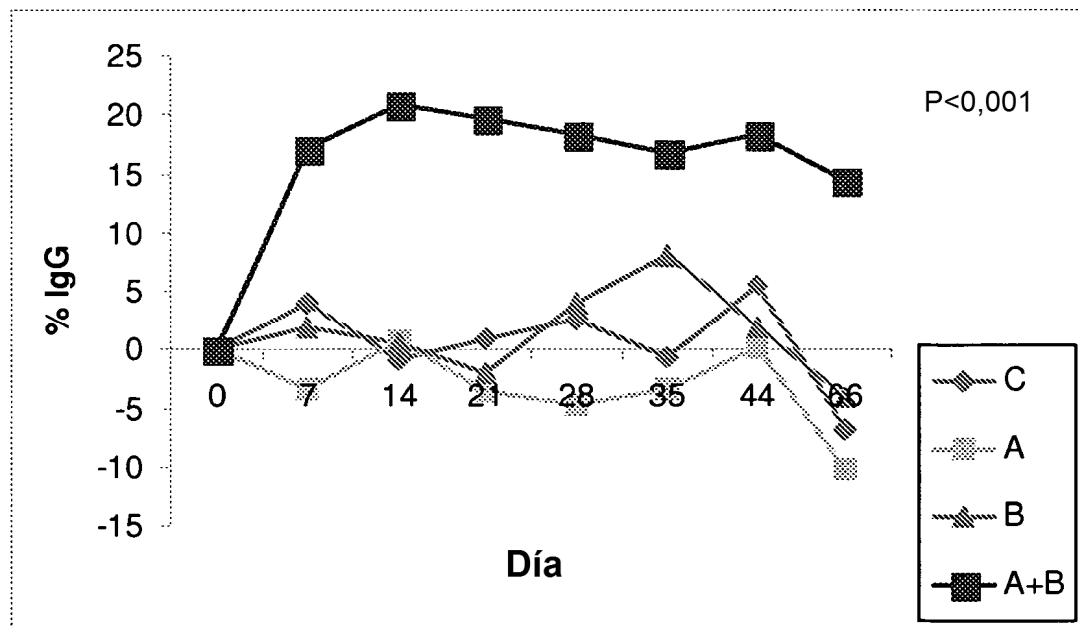
C = Control (producto placebo)
A = Nucleoforce® Dogs
B = AHCC®
A+B = Nucleoforce® Dogs + AHCC®

FIGURA 1



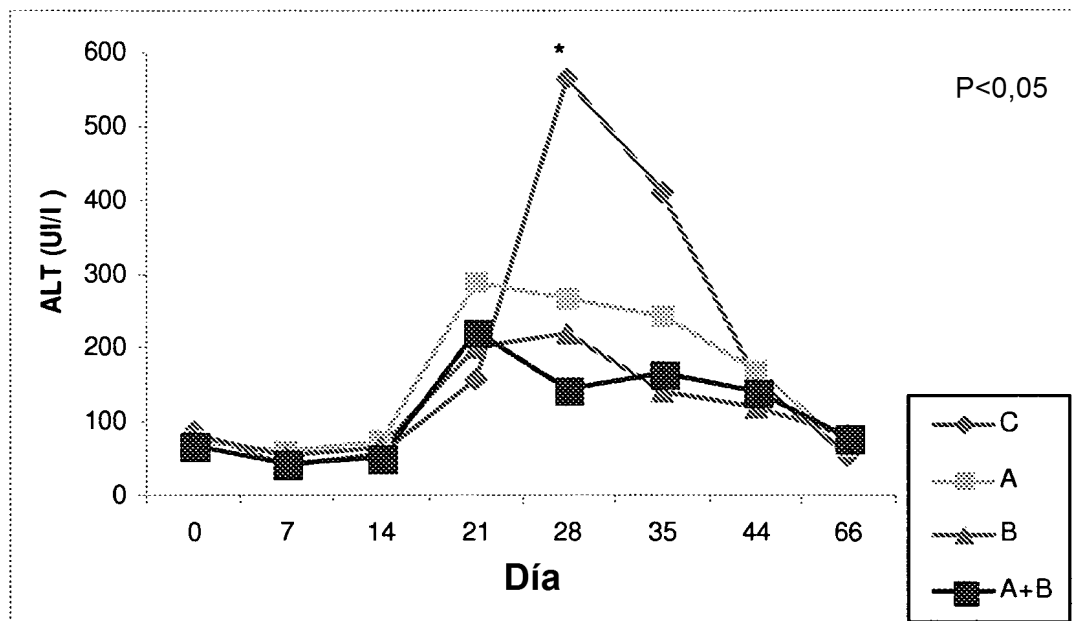
C = Control (producto placebo)
 A = Nucleoforce® Dogs
 B = AHCC®
 A+B = Nucleoforce® Dogs + AHCC®

FIGURA 2



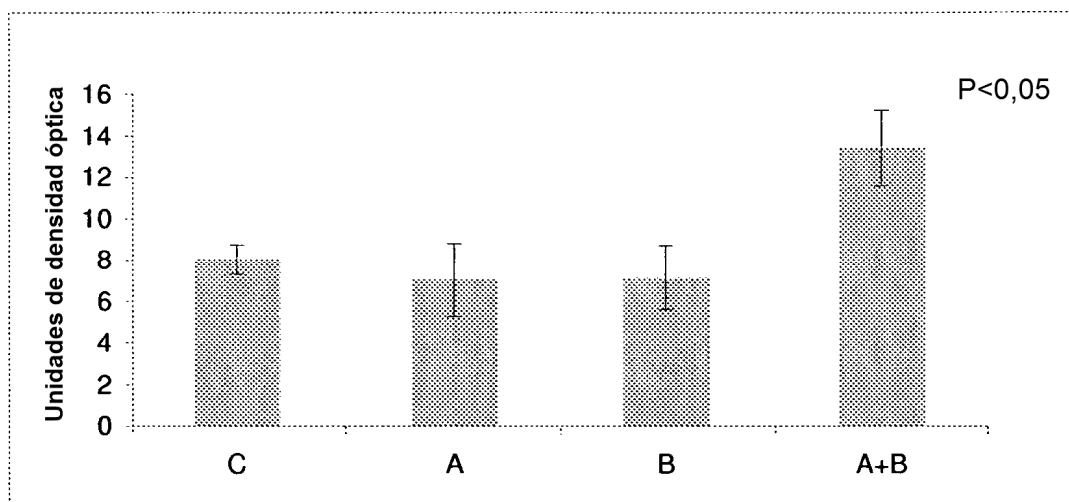
C = Control (producto placebo)
 A = Nucleoforce® Dogs
 B = AHCC®
 A+B = Nucleoforce® Dogs + AHCC®

FIGURA 3



C = Control (producto placebo)
A = Nucleoforce® Dogs
B = AHCC®
A+B = Nucleoforce® Dogs + AHCC®

FIGURA 4



C = Control (producto placebo)
 A = Nucleoforce® Dogs
 B = AHCC®
 A+B = Nucleoforce® Dogs + AHCC®

FIGURA 5

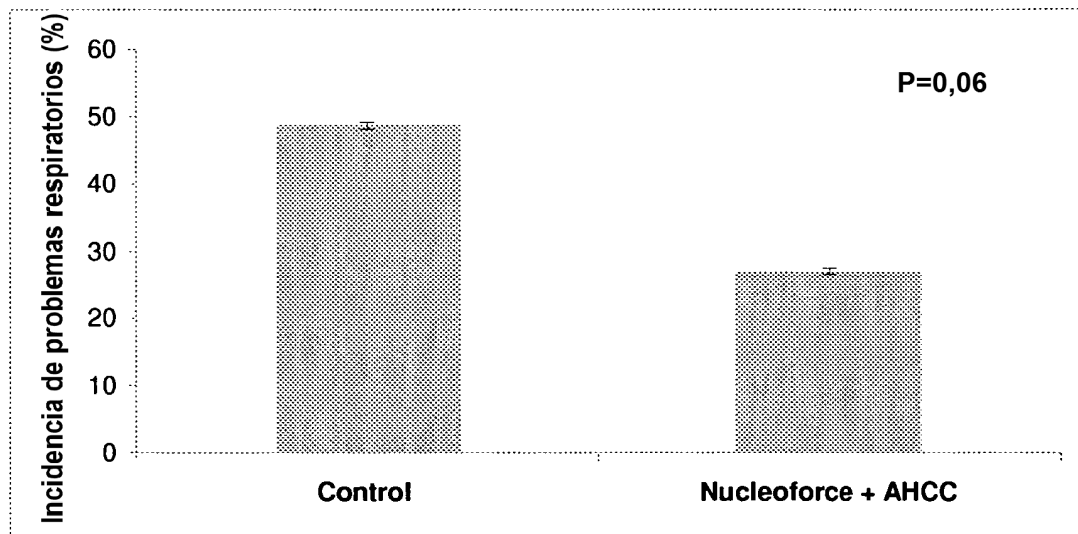


FIGURA 6