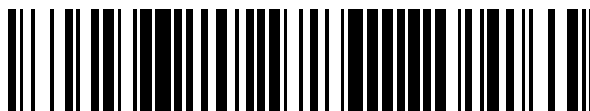


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 067**

51 Int. Cl.:

A61K 31/702 (2006.01)

A61K 31/7016 (2006.01)

A61K 35/20 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2010 PCT/US2010/040895**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11005681**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2010 E 10797669 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2451462**

54 Título: **Inhibición de la inflamación con oligosacáridos de la leche**

30 Prioridad:

06.07.2009 US 223145 P

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

24.01.2018

73 Titular/es:

**CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER
(33.3%)**

3333 Burnet Avenue

Cincinnati, OH 45229-3039, US;

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y
NUTRICION (33.3%) y**

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(33.3%)**

72 Inventor/es:

MORROW, ARDYTHE, L.;

NEWBURG, DAVID, S. y

RUIZ-PALACIOS, GUILLERMO, M.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 651 067 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

Inhibición de la inflamación con oligosacáridos de la leche

REFERENCIA CRUZADA AL PÁRRAFO DE SOLICITUD RELACIONADO

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N.º 61/223.145 presentada el 6 de julio de 2009.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Diversos componentes en la leche humana, por ejemplo, inmunoglobulinas, leucocitos, oligosacáridos y glucoconjugados de la leche, protegen a los lactantes contra enfermedades infecciosas. La leche humana se considera así un "nutricéutico" eficaz natural, es decir, un alimento modelo que transmite beneficios inmunológicos.

10 También se ha encontrado que la leche humana reduce el riesgo de desarrollar enfermedades entéricas inflamatorias en lactantes. Esta actividad antiinflamatoria ha sido atribuida a los leucocitos, citocinas y antioxidantes en la leche humana. Véase Buescher, Adv Exp Med Biol. 501:207-22 (2001).

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y se limita a éstas. La presente invención se basa en un descubrimiento inesperado de que los oligosacáridos en la leche humana inhiben la inflamación.

Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación caracteriza un método de inhibición de la inflamación administrando a un sujeto en necesidad de la misma una cantidad eficaz de una composición que contiene uno o más oligosacáridos derivados de la leche o uno o más glucoconjugados que contienen el (los) oligosacárido(s). Un oligosacárido derivado de la leche contiene una primera unidad de azúcar (es decir, fucosa, galactosa, manosa o ácido siálico), que está localizada en un extremo no reductor del oligosacárido, y una segunda unidad de azúcar (es decir, galactosa, glucosa, manosa o N-acetilglucosamina), que está directamente unida a la primera unidad de azúcar. En un ejemplo, el oligosacárido es una molécula lineal que tiene un extremo no reductor y un extremo reductor. En otro ejemplo, es una molécula ramificada que tiene múltiples extremos no reductores y un extremo reductor. Cuando el oligosacárido tiene dos extremos no reductores, la unidad de azúcar en un extremo no reductor puede ser fucosa y aquella en el otro extremo no reductor puede ser fucosa, galactosa o ácido siálico, o alternativamente, la unidad de azúcar en un extremo no reductor es ácido siálico y aquella en el otro extremo no reductor es galactosa o ácido siálico. La unidad de azúcar en el extremo reductor puede ser una glucosa o una N-acetilglucosamina.

30 El (Los) glucoconjugado(s) usado(s) en el método descrito anteriormente pueden incluir uno o más de los oligosacárido(s) derivado(s) de la leche también descritos anteriormente conjugados con un lípido, un péptido, un polipéptido, o un hidrato de carbono.

Otro aspecto de la presente divulgación caracteriza un método de inhibición de la inflamación con oligosacáridos aislados de la leche, que pueden derivarse de un ser humano, un bóvido (por ejemplo, una vaca, una cabra, o una oveja), u otro mamífero (por ejemplo, un caballo o un camello). Los oligosacáridos pueden prepararse eliminando primero la grasa y proteína de la leche antes de su aislamiento mediante métodos convencionales. En un ejemplo, después de eliminar la grasa y la proteína, la leche se carga sobre una columna de carbono y los oligosacáridos adsorbidos sobre la columna se eluyen con una disolución de alcohol (por ejemplo, una disolución acuosa al 50 % de etanol).

40 El método de la presente divulgación puede aplicarse a un sujeto, por ejemplo, un ser humano o un mamífero no humano, que está padeciendo o está en riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria, tal como una enfermedad del tubo digestivo. Ejemplos incluyen esofagitis, gastroenteritis, colitis, colangitis, apendicitis, enfermedades inflamatorias del intestino (es decir, colitis ulcerosa, enterocolitis necrotizante y enfermedad de Crohn), o síndrome del intestino irritable.

45 La presente divulgación también se refiere al uso de uno o más oligosacáridos derivados de la leche o uno o más glucoconjugados que contienen el (los) oligosacárido(s) para inhibir la inflamación y para la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades inflamatorias.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas. Otras características o ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de los siguientes dibujos y descripción detallada de un ejemplo.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Se describen primero los dibujos.

La Fig. 1 es un gráfico que muestra que los oligosacáridos de la leche humana inhiben la producción de IL-8 inducida por TNF- α por enterocitos T84.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra que los oligosacáridos de la leche humana inhiben la producción de proteína quimioatrayente de monocitos-1 inducida por TNF- α por la mucosa intestinal humana.

5 La Fig. 3 es un gráfico que muestra que la flagelina, ARN bicatenario poli-inosínico-poli-citidílico, o IL-1 β induce la producción de IL-8 en el cultivo de órgano de mucosa intestinal humana inmadura y oligosacáridos humanos de la leche inhiben esta producción de IL-8 inducida.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 En el presente documento se desvela un método de inhibición de la inflamación con uno o más oligosacáridos derivados de la leche o uno o más glucoconjugados que contienen los oligosacáridos.

15 Un oligosacárido derivado de la leche, es decir, que tiene al menos tres unidades de azúcares, es cualquier oligosacárido que existe de forma natural encontrado en la leche, un fragmento de oligosacárido que existe de forma natural, o una variante del mismo que contiene una unidad de azúcar modificada (por ejemplo, sulfatada, acetilada o fosforilada) en comparación con su homólogo natural. Este oligosacárido incluye un motivo de extremo no reductor S₁S₂, en el que S₁ es fucosa, galactosa, manosa o ácido siálico (N-acetilo o N-glicolilo) y S₂ es galactosa, glucosa, manosa o N-acetilglucosamina. S₁ está unido a S₂ mediante un enlace glucosídico α o β . Cuando S₁ es fucosa, el enlace glucosídico entre S₁ y S₂ es preferentemente un enlace α 1,2, α 1,3 o α 1,4. Cuando es ácido siálico, el enlace glucosídico es preferentemente un enlace α 2,3 o α 2,6.

20 Oligosacáridos derivados de la leche y glucoconjugados que contienen tales oligosacáridos son muy conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la solicitud de patente 61/168.674 y el documento WO2005/055944. Las siguientes tablas enumeran a modo de ejemplo oligosacáridos que se producen naturalmente en la leche humana:

Tabla 1. Oligosacáridos de fucosilo

2'FL	2-Fucosil-lactosa	Fuc α 1,2Gal β 1,4Glc
LNF-I	Lacto-N-fucopentaosa I	Fuc α 1,2Gal β 1,3 glcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc
LNF-II	Lacto-N-fucopentaosa II	Gal β 1,3 \downarrow GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc Fuc α 1,4 \nearrow
3'FL	3-Fucosil-lactosa	Gal β 1,4 \downarrow Glc Fuc α 1,3 \nearrow
LNF-III	Lacto-N-fucopentaosa III	Gal β 1,4 \downarrow GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc Fuc α 1,3 \nearrow
LDFH-I	Lacto-N-difucohexaosa I	Fuc α 1,2Gal β 1,3 \downarrow GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc Fuc α 1,4 \nearrow
LDFT	Lactodifucotetraosa	Fuc α 1,2Gal β 1,4 \downarrow Glc Fuc α 1,3 \nearrow

Tabla 2. Oligosacáridos no sialilados no fucosilados

LNT	Lacto-N-tetraosa	Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc
LNneoT	Lacto-N-neotetraosa	Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc

25

Tabla 3. Estructuras de sialiloligosacárido de la leche

3'-SL	3'-Sialil-lactosa	NANA α 2,3Gal β 1,4Glc
6'-SL	6'-Sialil-lactosa	NANA α 2,6Gal β 1,4Glc
SLNT-c	Sialil-lacto- <i>N</i> -neotetraosa c	NANA α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc
MSLNH	Monosialil-lacto- <i>N</i> -hexaosa	NANA α 2,6Gal β 1,4GlcNAc1,6 \searrow Gal β 1,4Glc Gal β 1,3GlcNAc β 1,3 \nearrow
DSLNH-I	Disialil-lacto- <i>N</i> -hexaosa I	NANA α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3 \searrow Gal β 1,4Glc NANA α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β 1,6 \nearrow
MSLNh-1	Monosialil-lacto- <i>N</i> -neohexaosa I	NANA α 2,6Gal β 1,3GlcNAc β 1,3 \searrow Gal β 1,4Glc Gal β 1,4GlcNAc β 1,6 \nearrow
SLNnH-II	Monosialil-lacto- <i>N</i> -neohexaosa II	Gal β 1,4GlcNAc β 1,3 \searrow Gal β 1,4Glc NANA α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β 1,6 \nearrow
DSLNnH	Disialil-lacto- <i>N</i> -neohexaosa	NANA α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β 1,3 \searrow Gal β 1,4Glc NANA α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β 1,6 \nearrow
DSLNT	Disialil-lacto- <i>N</i> -tetraosa	NANA α 2,6 \searrow GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc NANA α 2,3Gal β 1,3 \nearrow
DSLNH-II	Disialil-lacto- <i>N</i> -hexaosa II	NANA α 2,6 \searrow GlcNAc β 1,3 \searrow NANA α 2,3Gal β 1,3 \nearrow Gal β 1,4Glc Gal β 1,4GlcNAc β 1,6 \nearrow
SLNT-a	Sialil-lacto- <i>N</i> -tetraosa a	NANA α 2,3Gal β 1,2,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc
DSLNH-I	Disialil-lacto- <i>N</i> -hexaosa I	NANA α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3 \searrow Gal β 1,4Glc NANA α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β 1,6 \nearrow
SLNT-b	Sialil-lacto- <i>N</i> -tetraosa b	NANA α 2,6 \searrow GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc Gal β 1,3 \nearrow

Tabla 4. Sialilfucosiloligosacáridos

3'-S-3FL	3'-Sialil-3-fucosil-lactosa	NANA α 2,3Gal β 1,4 \searrow Glc Fuca1,3 \nearrow
DSFLNH	Disialomonofucosil-lacto- <i>N</i> -neohexaosa	NANA α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β 1,6 \searrow Fuca1,3 \searrow Gal β 1,4Glc GlcNAc β 1,3 \nearrow NANA α 2,3Gal β 1,4 \nearrow

MFMSLNO	Monofucosilmonosialil-lacto-N-octaosa (sialil Lea)	Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,6 \searrow Gal β 1,4Glc NANA α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3 \nearrow Fuc α 1,4 \nearrow
SLNFH-II	Sialil-lacto-N-fucohexaosa II	NANA α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc Fuc α 1,4 \nearrow Fuc α 1,3 \nearrow
DSLNFII	Disialil-lacto-N-fucopentaosa II	NANA α 2,6 \searrow NANA α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc Fuc α 1,4 \nearrow
MFDLNT	Monofucosildisialil-lacto-N-tetraosa	NANA α 2,6 \searrow NANA α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc Fuc α 1,4 \nearrow

Los oligosacáridos derivados de la leche descritos en el presente documento pueden prepararse por métodos convencionales, por ejemplo, sintetizarse químicamente, purificarse de la leche, o producirse en un microorganismo. Véase el documento WO2005/055944. A continuación está un ejemplo de aislamiento de oligosacáridos de la leche.

5 La leche se desengrasa primero por centrifugación para producir leche desnatada. La leche desnatada se mezcla entonces con un disolvente orgánico, tal como acetona (por ejemplo, acetona acuosa al 50 %) y etanol (por ejemplo, etanol acuoso al 67 %), para precipitar las proteínas de la leche. Tras la centrifugación, se recoge el sobrenadante y se somete a cromatografía. Se recogen las fracciones que contienen oligosacárido y se reúnen. Si fuera necesario, los oligosacáridos así preparados pueden concentrarse por métodos convencionales, por ejemplo, diálisis o liofilización.

También pueden aislarse oligosacáridos de la leche de leche desnatada pasando la leche desnatada a través de una membrana de ultrafiltración de 30.000 MWCO, recogiendo el difundido, pasando el difundido a través de un ultrafiltro de 500 MWCO y recogiendo el retenido, que contiene los oligosacáridos de la leche.

15 Los glucoconjugados descritos en el presente documento, que contienen uno o más oligosacáridos derivados de la leche, pueden ser químicamente sintetizados conjugando el (los) oligosacárido(s) con una molécula de esqueleto (por ejemplo, un hidrato de carbono, un lípido, un ácido nucleico, o un péptido) directamente o mediante un conector. Como se usa en el presente documento, "glucoconjugado" se refiere a un complejo que contiene un resto de azúcar asociado a un resto de esqueleto. Los restos de azúcar y de esqueleto pueden asociarse mediante un enlace covalente o no covalente, o mediante otras formas de asociación, tales como atrapamiento (por ejemplo, de un resto sobre o dentro del otro, o de cualquiera o ambas entidades sobre o dentro de un tercer resto). El glucoconjugado descrito en el presente documento puede contener un tipo de oligosacárido derivado de la leche (es decir, una o más copias de un oligosacárido derivado de la leche unidas a una molécula de esqueleto). Alternativamente, el glucoconjugado contiene múltiples tipos de oligosacáridos derivados de la leche. En un ejemplo, el oligosacárido derivado de la leche (por ejemplo, lacto-N-fucopentaosa I, 2-fucosillactosa, lacto-N-difucohexaosa I, lactodifucotetraosa, o una variante acetilada de las mismas) se une covalentemente mediante su unidad de azúcar de extremo reductor a un lípido, una proteína, un ácido nucleico, o un polisacárido. Preferentemente, la unidad de azúcar del extremo reductor es N-acetilglucosamina.

Esqueletos de péptido adecuados para preparar el glucoconjugado descrito anteriormente incluyen aquellos que tienen múltiples sitios de glucosilación (por ejemplo, resto de asparagina, lisina, serina o treonina) y bajo potencial alérgico. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, amilasa, lipasa estimulada por sales biliares, caseína, proteína de unión a folato, globulina, gluten, haptocorrina, lactoalbúmina, lactoferrina, lactoperoxidasa, lipoproteína lipasa, lisozima, mucina, ovoalbúmina y albúmina de suero.

35 Normalmente, un oligosacárido derivado de la leche puede unirse covalentemente a un resto de serina o treonina mediante un O-enlace o unirse a un resto de asparagina mediante un N-enlace. Para formar estos enlaces, la unidad de azúcar en el extremo reductor del oligosacárido es preferentemente una unidad de azúcar acetilada, por ejemplo, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y N-acetilmanosamina. Un oligosacárido puede unirse a un péptido (por ejemplo, una proteína) usando métodos convencionales. Véanse, por ejemplo, McBroom et al., Complex Carbohydrates, Parte B, 28:212-219, 1972; Yariv et al., Biochem J., 85:383-388, 1962; Rosenfeld et al., Carbohydr. Res., 46:155-158, 1976; y Pazur, Adv. Carbohydr. Chem, Biochem., 39:405-447, 1981.

40 En un ejemplo, un oligosacárido derivado de la leche se une a una molécula de esqueleto mediante un conector. Conectores a modo de ejemplo se describen en el documento WO2005/055944. El oligosacárido puede unirse a un conector por una reacción enzimática, por ejemplo, una reacción de glucosiltransferasa. Pueden usarse varias glucosiltransferasas, que incluyen fucosiltransferasas, galactosiltransferasas, glucosiltransferasas, manosiltransferasas, galactosaminiltransferasas, sialiltransferasas y N-acetilglucosaminiltransferasas, para preparar el glucoconjugado descrito en el presente documento. Más detalles sobre estas glucosiltransferasas pueden

encontrarse en las patentes de EE.UU. N.º: 6.291.219; 6.270.987; 6.238.894; 6.204.431; 6.143.868; 6.087.143; 6.054.309; 6.027.928; 6.025.174; 6.025.173; 5.955.282; 5.945.322; 5.922.540; 5.892.070; 5.876.714; 5.874.261; 5.871.983; 5.861.293; 5.859.334; 5.858.752; 5.856.159; y 5.545.553.

5 Alternativamente, los glucoconjugados descritos en el presente documento pueden purificarse de la leche por métodos convencionales, por ejemplo, pasando a través de membranas de ultrafiltración, mediante precipitación en disolventes no polares, o a través de reparto entre disolventes inmiscibles.

10 Pueden mezclarse uno o más de los oligosacáridos de la leche o glucoconjugados anteriormente descritos con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica. El vehículo en la composición farmacéutica debe ser "aceptable", en el sentido de ser compatible con el principio activo de la formulación (y preferentemente, capaz de estabilizarlo) y no perjudicial para el sujeto que va a tratarse. Por ejemplo, pueden utilizarse agentes solubilizantes tales como ciclodextrinas, que forman complejos más solubles con los oligosacáridos/glucoconjugados, o más agentes solubilizantes, como vehículos farmacéuticos para la administración de los oligosacáridos/glucoconjugados. Ejemplos de otros vehículos incluyen dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y D&C Yellow # 10.

15 Alternativamente, los oligosacáridos/glucoconjugados también pueden formularse como productos alimenticios o suplementos alimenticios siguiendo métodos muy conocidos en la industria alimentaria. En un ejemplo, son componentes de leches de inicio.

20 Los oligosacáridos y glucoconjugados son eficaces en inhibir la inflamación y tratar enfermedades asociadas a inflamación (es decir, enfermedades inflamatorias). La inflamación es la reacción de tejido vivo (por ejemplo, calor, enrojecimiento, hinchazón o dolor) en respuesta a lesión o infección. Enfermedades asociadas a inflamación a modo de ejemplo, caracterizadas por una inflamación local o sistémica, aguda o crónica, incluyen retinopatía inflamatoria (por ejemplo, retinopatía diabética), dermatosis (por ejemplo, dermatitis, eccema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto, urticaria, vasculitis necrotizante, vasculitis cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, miositis eosinófila, polimiositis, dermatomiositis y fascitis eosinófila), enfermedades pulmonares por hipersensibilidad (por ejemplo, neumonitis por hipersensibilidad, neumonía eosinófila, hipersensibilidad de tipo retardado, enfermedad pulmonar intersticial o ILD, fibrosis pulmonar idiopática, e ILD asociada a artritis reumatoide), asma y rinitis alérgica. Además de tratar las enfermedades inflamatorias anteriormente enumeradas, el método de la presente invención es particularmente eficaz en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del tubo digestivo, que incluye esofagitis (es decir, inflamación del esófago, tal como úlcera esofágica), gastroenteritis (es decir, inflamación de las membranas mucosas del estómago e intestino, tal como gastritis, úlcera duodenal, ileítis o enterocolitis), colitis (es decir, inflamación del colon, tal como diverticulitis), colangitis (es decir, inflamación de la vía biliar) y apendicitis (es decir, inflamación del apéndice). La enfermedad inflamatoria del tubo digestivo también incluye enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) y síndrome del intestino irritable.

35 El término "tratar", como se usa en el presente documento, se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o más agentes activos a un sujeto, que tiene una enfermedad inflamatoria, un síntoma de la enfermedad inflamatoria, o una predisposición hacia la enfermedad inflamatoria, con el fin de curar, sanar, aliviar, atenuar, alterar, remediar, mejorar, corregir o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad.

40 Para poner en práctica el método de la presente divulgación, puede administrarse una cantidad eficaz de la composición farmacéutica anteriormente descrita a un sujeto (por ejemplo, un lactante humano o anciano) por vía oral, por vía parenteral, por spray de inhalación, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal o mediante un depósito implantado. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intrarticular, intrarterial, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión. "Una cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de cada agente activo requerida para conferir efecto terapéutico al sujeto, tanto solo como en combinación con uno o varios de otros agentes activos. Las cantidades eficaces varían, como es reconocido por aquellos expertos en la materia, dependiendo de la vía de administración, uso de excipientes y uso con otros agentes activos.

50 Puede formularse una composición inyectable estéril, por ejemplo, una suspensión acuosa u oleaginosas inyectable estéril, según técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tales como Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están manitol, agua, disolución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono- o diglicéridos sintéticos). Ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de glicérido, son útiles en la preparación de inyectables, ya que son aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas disoluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares. También pueden usarse otros tensioactivos comúnmente usados tales como Tweens o Spans u otros agentes emulsionantes

similares o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas, u otras, farmacéuticamente aceptables, para los fines de formulación.

5 Una composición para administración por vía oral puede ser cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral que incluye, pero no se limita a, cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y disoluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden normalmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración por vía oral en una forma de cápsula, diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el principio activo puede suspenderse o disolverse en una fase aceitosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes. Puede prepararse un aerosol nasal o composición para inhalación según técnicas muy conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica.

10 Pueden usarse ensayos *in vitro* e *in vivo* adecuados para evaluar preliminarmente la actividad antiinflamatoria de un oligosacárido de la leche particular o una combinación de diversos oligosacáridos de la leche. Por ejemplo, el (los) oligosacárido(s) puede(n) probarse *in vitro* para su capacidad para inhibir la secreción de citocinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IL-1, IL-6, TNF-alfa GM-CSF, IL-8 e IL-12). La actividad antiinflamatoria puede confirmarse además en un modelo animal (por ejemplo, un modelo de ratón). Basándose en los resultados, también puede determinarse un intervalo de dosificación y vía de administración apropiados.

15 Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la materia puede utilizar, basándose en la descripción anterior, la presente invención en la mayor medida posible. El siguiente ejemplo específico debe, por tanto, interpretarse como simplemente ilustrativo.

Uso de oligosacáridos de la leche humana para inhibir inflamación intestinal

Preparación de oligosacáridos de la leche humana

25 Se aisló una fracción de oligosacáridos de la leche humana siguiendo el método descrito en Chaturvedi et al., Anal. Biochem. 251(1):89-97, 1997. Brevemente, se desengrasó primero leche humana reunida y luego se añadió etanol para precipitar las proteínas. La disolución resultante se cargó sobre una columna de carbono, que adsorbe oligosacáridos. La columna se lavó con 5 % de etanol y los oligosacáridos adsorbidos se eluyeron con 60 % de etanol para producir una fracción que contenía oligosacáridos de la leche humanos ("HMOS").

HMOS inhiben la secreción de IL-8 en células T84 tratadas con TNF

30 Se cultivaron células T84, usadas rutinariamente para estudiar inflamación epitelial neonatal, en placas de cultivo de órgano Falcon de 24 pocillos a 37 °C con 95 % de O₂ y 5 % de CO₂ en medio DMEM/F12 complementado con FBS (5 %), tampón Hepes, NaOH, penicilina y estreptomycin. Estas células se trataron con (i) solución salina como control negativo, (ii) TNF-α (10 ng/ml) como control positivo, (iii) HMOS (5 g/l), y (iv) TNF-α (10 ng/ml) y HMOS (5 g/l). Después de 16 horas, la concentración de IL-8 en cada sobrenadante de cultivo se midió por ELISA. Los resultados así obtenidos se normalizaron a los números de células (es decir, se dividieron entre el contenido de células total de proteínas de los cultivos de células correspondientes).

35 Como se muestra en la Fig. 1, la producción de IL-8 inducida por TNF se redujo significativamente en células T84 tratadas con HMOS, que indica que HMOS presentó actividad antiinflamatoria.

HMOS inhiben la secreción de proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) en mucosa intestinal humana

40 Se incubaron muestras de mucosa de intestino delgado humano de abortos de 14 semanas en placas de cultivo de órgano Falcon de 24 pocillos con medio CMRL 1066 complementado con FBS (5 %), glucosa (5 g/l), tampón tricina (20 mM, pH 7,4), hemisuccinato de hidrocortisona (0,5 µg/l), acetato de β-retinilo (1 mg/l), penicilina y estreptomycin en 5 % de CO₂ a 37 °C. La muestras de mucosa se trataron con (i) solución salina como control negativo, (ii) TNF-α (10 ng/ml) como control positivo, (iii) HMOS (5 g/l), y (iv) TNF-α (10 ng/ml) y HMOS (5 g/l). Después de 16 horas, se midió la concentración de MCP-1, una quimiocina pro-inflamatoria, en cada sobrenadante de cultivo por ELISA. Los resultados así obtenidos se normalizaron a números de células como se ha descrito anteriormente.

45 Los datos obtenidos de este estudio mostrado indican que en presencia de TNF-α, la mucosa intestinal humana secretó un alto nivel de MCP-1, una medida de inflamación y esta producción de MCP-1 inducida por TNF-α se atenuó por HMOS. Véase la Fig. 2.

Inhibición de la secreción de IL-8 en cultivo de órgano de mucosa intestinal humana inmadura

50 Se incubaron muestras de mucosa de intestino delgado humano de abortos de 22 semanas en placas de 24 pocillos con el medio CMRL modificado descrito anteriormente en 5 % de CO₂ a 37 °C. Las muestras se trataron con IL-1β (10 ng/ml), flagelina (1 mg/ml), ARN bicatenario poli-inosínico-poli-citidílico (PIC; 10 ng/ml), o PBS (como control negativo) en ausencia o presencia de 5 mg/ml de HMOS durante 18 h. Se midieron los niveles de secreción de IL-8 en los sobrenadantes de cultivo usando un kit de ELISA (R & D Systems) por duplicado, con detección a 450 nm en

un lector de placas VersaMax (Molecular Devices, CA, EE.UU.). Se normalizó cada valor de DO_{450} a la cantidad de proteína total del cultivo de órgano correspondiente.

5 Flagelina, ARN bicatenario poli-inosínico-poli-citidílico e IL-1 β indujeron todos una respuesta pro-inflamatoria, como se demuestra por la secreción de IL-8. Véase la Fig. 3. Esta respuesta pro-inflamatoria fue significativamente atenuada por HMOS.

Tomados juntos, los resultados mostrados anteriormente indican que los oligosacáridos de la leche son eficaces en inhibir la inflamación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligosacárido derivado de la leche para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino o síndrome del intestino irritable, en el que el oligosacárido derivado de la leche es 2'-fucosil-lactosa, o una variante de la misma, siendo la variante idéntica a 2'-fucosil-lactosa, excepto que el extremo reductor es N-acetilglucosamina en lugar de glucosa.
2. El oligosacárido derivado de la leche para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino o síndrome del intestino irritable según la reivindicación 1, en el que el oligosacárido está conjugado con un hidrato de carbono, un lípido, o un péptido.
- 10 3. El oligosacárido derivado de la leche para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino o síndrome del intestino irritable según la reivindicación 1 o 2, en el que el oligosacárido es para su uso en un lactante humano.
4. El oligosacárido derivado de la leche para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino o síndrome del intestino irritable según la reivindicación 1, en el que el oligosacárido ha sido aislado de leche humana.
- 15 5. El oligosacárido derivado de la leche para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino o síndrome del intestino irritable según la reivindicación 1, en el que el oligosacárido ha sido aislado de leche, después de eliminar la grasa y proteína.
- 20 6. El oligosacárido derivado de la leche para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino o síndrome del intestino irritable según la reivindicación 1, en el que el oligosacárido ha sido aislado de leche, cargando la leche sobre una columna de carbono y eluyendo el oligosacárido de la columna con una disolución de alcohol.
7. El oligosacárido derivado de la leche para su uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino o síndrome del intestino irritable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

Fig.1

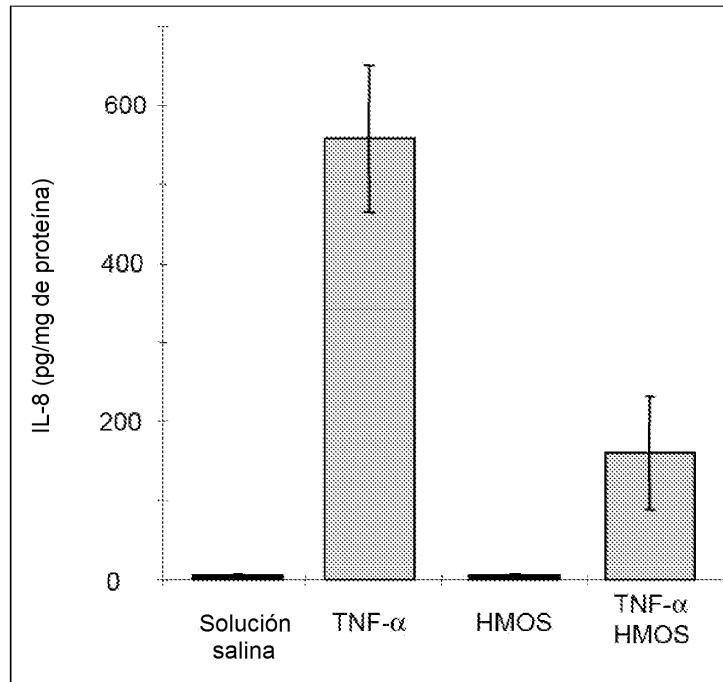


Fig. 2

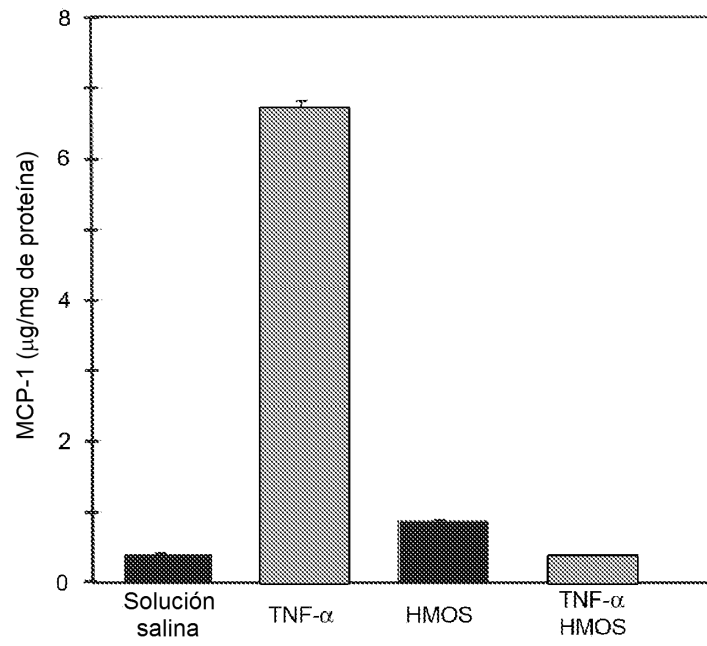


Fig. 3

