

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 199**

51 Int. Cl.:

A61K 36/815 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2008 PCT/EP2008/062132**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2009 WO09034165**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2008 E 08804097 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2200624**

54 Título: **Cambroneras e inflamación de la piel**

30 Prioridad:

12.09.2007 EP 07116190

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

01.02.2019

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (50.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH y
L'ORÉAL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VIDAL, KARINE;
BLUM-SPERISEN, STÉPHANIE;
PHILIPPE, DAVID;
BALLEVRE, OLIVIER;
BUCHELI, PETER y
WANG, JUNKUAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 698 199 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

Cambroneras e inflamación de la piel

La presente invención se refiere en general al campo de la inflamación de la piel. En particular, la presente invención se refiere al uso de compuestos naturales para la preparación de una composición dermatológica como complemento alimenticio, para la prevención y/o el tratamiento de inflamación de la piel y trastornos relacionados.

La inflamación es la respuesta biológica compleja de tejidos a estímulos perjudiciales, tales como patógenos, células dañadas o irritantes. Generalmente, es un intento protector por el organismo para retirar los estímulos perjudiciales, así como iniciar el proceso de cicatrización para el tejido. Sin embargo, la inflamación insuficientemente regulada puede conducir a varias enfermedades independientemente de la edad del sujeto.

El envejecimiento está asociado con una desregulación del sistema inmunitario, tal como un notorio deterioro en la respuesta inmunitaria celular concomitante con un aumento de la disfunción inmunitaria humoral (por ejemplo, menor respuesta a una vacuna). El envejecimiento se asocia además frecuentemente a un estado de inflamación leve. Por consiguiente, en particular muchos sujetos ancianos están en riesgo elevado de enfermedades infecciosas y no infecciosas que contribuyen a la morbilidad y mortalidad.

La cambronera ya se conoce por sus múltiples beneficios para la salud, basados en su composición de múltiples nutrientes (por ejemplo, zeaxantina, vitaminas y polisacáridos de *Lycium barbarum*).

Sin embargo, sigue existiendo una necesidad en la técnica de tener compuestos naturales disponibles que tengan propiedades antiinflamatorias.

Por ejemplo, la intervención nutricional tal como con PUFA (ácido graso poliinsaturado) n-3 disminuyó las funciones de células inflamatorias, pero también disminuyó la respuesta inmunitaria celular (por ejemplo, proliferación de linfocitos y actividad de NK), que puede conducir a posibles efectos perjudiciales con respecto a la defensa del hospedador.

Por tanto, era el objeto de la presente invención proporcionar la técnica con un compuesto natural alternativo que tuviera propiedades antiinflamatorias y que no tuviera ningún efecto perjudicial con respecto a la defensa inmunitaria del sujeto.

Los presentes inventores se sorprendieron al encontrar que una composición que comprendía frutos de cambronera y leche o un vehículo que contiene proteína de la leche como complemento alimenticio tenía propiedades antiinflamatorias de la piel. También se encontró que se mantuvo la respuesta inmunitaria.

En particular, la presente invención se refiere al uso como se define en las reivindicaciones 1 a 5 de una composición que comprende frutos de cambronera (*Lycium barbarum*) y leche o un vehículo que contiene proteína de la leche.

La leche o proteína de la leche puede derivar de origen animal o vegetal, o de sus mezclas. Preferentemente, la leche es leche de vaca, leche de llama, leche de búfala, leche de cabra, leche de oveja, leche vegetal, en particular leche de soja, o una mezcla de las mismas. Proteína de la leche se debe entender como una fracción de proteína obtenible de uno o más de los tipos de leche enumerados anteriormente.

Preferentemente, la composición primaria es una composición miscible.

Ventajosamente, tiene un estrecho perfil de componentes activos esenciales de las cambroneras enteras, tiene una buena estabilidad, miscibilidad y/o dispersabilidad en sistemas acuosos.

Además, la composición tiene un valor nutritivo potenciado, en forma de una mejor biodisponibilidad y estabilidad. Tiene un sabor y color agradable. Se puede usar directamente o concentrada o secada en polvo para varias aplicaciones en productos alimenticios diariamente consumidos u otros usos nutricionales.

Todas estas características se pueden lograr si la composición primaria se prepara por un proceso para preparar la composición primaria para administrar los componentes bioactivos lipófilos y/o hidrófilos esenciales de cambroneras que comprende las etapas de: i) mezclar y triturar material de cambronera en leche o medio líquido que contiene proteína de la leche, ii) opcionalmente separar las fibras insolubles para obtener una suspensión acuosa iii) opcionalmente pasteurizar la suspensión resultante iv) opcionalmente añadir componentes bioactivos sintéticos o naturales durante el procesamiento v) y adicionalmente opcionalmente secar la suspensión para obtener un polvo.

Por consiguiente, según la presente invención, la composición es obtenible por un proceso que comprende las etapas de: i) mezclar y triturar material de cambronera en leche o medio líquido que contiene proteína de la leche, ii) separar las fibras insolubles para obtener una suspensión acuosa iii) opcionalmente pasteurizar la suspensión resultante iv) opcionalmente añadir componentes bioactivos sintéticos o naturales durante el procesamiento v) y adicionalmente opcionalmente secar la suspensión para obtener un polvo. Este proceso tiene la principal ventaja de ser natural y rentable, que permite la mejorada administración de multi-nutrientes en forma de una combinación de

compuestos estabilizados solubles en agua y grasa en sus composiciones naturales, libres de residuos de disolvente orgánico.

5 El texto describe un método de aumento de la miscibilidad o dispersabilidad en un sistema acuoso, estabilidad y biodisponibilidad de compuestos bioactivos de material de cambronería usando un proceso como se ha descrito anteriormente, usando leche o proteínas de la leche, leche de soja o proteína de tipo de planta de plantas para administrar los multinutrientes de componentes funcionales de cambronerías.

Se puede usar una composición primaria como se ha descrito anteriormente para administrar los multi-nutrientes de componentes funcionales de cambronerías con biodisponibilidad, miscibilidad y estabilidad mejoradas.

10 Las cambronerías se pueden usar, por ejemplo, en forma de frutos y otras partes de la planta. La composición usada según la invención comprende frutos de cambronería (*Lycium barbarum*). Los frutos se pueden usar en forma de materiales frescos, concentrados o secados, por ejemplo, material secado al aire o liofilizado. Se prefiere, sin embargo, usar fruto maduro secado.

La composición primaria comprende al menos una parte de los componentes bioactivos lipófilos y/o hidrófilos esenciales de las cambronerías.

15 Los componentes bioactivos lipófilos y/o hidrófilos esenciales se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en lípidos, alcaloides, proteínas, hidratos de carbono, glucoproteínas, carotenoides, compuestos polifenólicos tales como flavonoides, vitaminas, minerales, o sus mezclas.

20 Los carotenoides se pueden seleccionar del grupo que consiste en carotenos y xantófilos tales como licopeno, caroteno, fitoflueno, fitoeno, cantaxantina, beta-criptoxantina, capsantina, luteína, zeaxantina, o aquellos en forma de ésteres de ácidos grasos, o sus mezclas.

Las glucoproteínas se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en proteínas de arabinogalactona, en particular polisacárido de *Lycium barbarum*, y macromoléculas que se pueden detectar por el reactivo de Yariv de beta-glucosilo.

25 Los flavonoides se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en flavonas tales como apigenina, luteolina o diosmetina, flavonoles tales como quercetina, miricetina, kaempferol, flavanonas, antocianidinas tales como pelargonidina, malvidina, o isoflavonas tales como genisteína, daidzeína, o sus mezclas.

30 La composición primaria puede contener al menos los componentes bioactivos esenciales de las cambronerías, excluyendo las fibras insolubles, en una leche o vehículo que contiene proteína de la leche. El vehículo de leche puede estar en forma de leche desnatada o leche entera de origen animal o vegetal (por ejemplo, leche de soja, zumo o leche de coco, etc.). En una realización más preferida, se usan leche de vaca o leche de soja, dependiendo de la composición primaria que se desee. El vehículo que contiene leche puede ser cualquier líquido comestible que contenga proteínas de la leche tales como caseínas o proteínas del suero de la leche, por ejemplo.

Opcionalmente se pueden añadir aceites vegetales al medio líquido.

35 El material de cambronería se puede mezclar y triturar en dicha leche o medio líquido que contiene proteína de la leche en una relación respectiva desde aproximadamente 1:1 hasta 1:1000, preferentemente desde 1:5 hasta 1:50. La etapa de mezcla y trituración se puede llevar a cabo a una temperatura de desde 1 hasta 95 °C, preferentemente desde aproximadamente 20 hasta 80 °C y más preferentemente desde 40 hasta 80 °C. Entonces, las fibras insolubles pueden ser al menos parcialmente retiradas para obtener una suspensión acuosa.

40 Esto se puede hacer por cualquier método convencional. La composición primaria resultante se puede pasteurizar adicionalmente y/o secar en un polvo por técnicas conocidas en la técnica. La composición primaria obtenida también puede estar en forma líquida o de gel.

45 Así, la presente invención proporciona una composición primaria que tiene un perfil similar de los nutrientes importantes como el fruto completo, tiene una buena estabilidad, miscibilidad y biodisponibilidad. Estas composiciones pueden ser altamente dispersables en un sistema acuoso, si se elige la forma de polvo. En este caso, el polvo es dispersable en agua fría o caliente, por ejemplo. Se puede añadir igual de bien en leche.

La composición puede comprender adicionalmente uno o más de emulsionantes, estabilizadores, antioxidantes y otros aditivos. Se hace uso preferentemente de emulsionantes compatibles en alimentos, tales como fosfolípidos, por ejemplo, lecitina, mono- o triestearato de polioxietilensorbitano, monolaurato, monopalmitato, mono- o trioleato, un mono- o diglicérido.

50 También se puede hacer uso de cualquier tipo de estabilizador que es conocido por ser utilizable en complementos alimenticios, en cosméticos o en productos farmacéuticos.

Se puede hacer uso de cualquier tipo de antioxidantes que sean conocidos por ser utilizables en complementos alimenticios, en cosméticos o en productos farmacéuticos.

Se puede hacer uso adicional de aditivos, de aromatizantes, de colorantes conocidos por ser utilizables en complementos alimenticios, cosméticos o productos farmacéuticos.

Los emulsionantes, estabilizadores, antioxidantes y aditivos se pueden añadir según el uso final previsto de la composición primaria.

- 5 La composición puede contener además principios bioactivos sintéticos o naturales tales como aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, minerales, carotenoides, polifenoles, etc., que se pueden añadir preferentemente ya sea por mezcla seca o húmeda a dicha composición antes de la pasteurización y/o secado.

El producto descrito en el texto puede ser un complemento dietético o alimenticio, un complemento que se va a usar como o en un medicamento.

- 10 Según la invención, el producto se usa para la administración por vía oral como un complemento alimenticio.

En una realización preferida de la presente invención, el producto está previsto para su uso por y/o aplicación a seres humanos o mascotas.

- 15 El producto se puede administrar a sujetos de cualquier edad, en particular lactantes, niños, adolescentes, adultos y/o ancianos. Sin embargo, los beneficios de las cambronerías parecen ser en particular muy aptos para adultos y ancianos.

Según una realización preferida de la presente invención, el producto preparado por el uso de la presente invención está previsto para consumo humano en o como un complemento alimenticio.

Según la invención, la composición se usa en un complemento alimenticio para administración por vía oral.

- 20 El producto como complemento nutricional para administración por vía oral según la invención puede estar presente en cápsulas, cápsulas de gelatina, cápsulas blandas, comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, píldoras, pastas o pastillas, gomas, o disoluciones o emulsiones bebibles, un jarabe o un gel. La dosis de la composición primaria se puede variar dependiendo de los fines previstos por aquellos expertos en la técnica, pero generalmente estará entre aproximadamente 0,1 y 100 % en peso de la composición primaria. Dicho complemento también podría incluir un edulcorante, un estabilizador, un antioxidante, un aditivo, un aromatizante y/o un colorante. Un
25 complemento para un fin cosmético podría comprender además un compuesto activo con respecto a la piel.

- 30 En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran en una cantidad suficiente para curar o detener al menos parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como "una dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este fin dependerán de varios factores conocidos para aquellos expertos en la materia tales como la gravedad de la enfermedad y el peso y estado general del paciente. En aplicaciones profilácticas, las composiciones se administran a un paciente susceptible a o de otro modo en riesgo de una enfermedad particular en una cantidad que es suficiente para reducir al menos parcialmente el riesgo de desarrollar una enfermedad. Dicha cantidad se define por ser "una dosis eficaz profiláctica". Otra vez, las cantidades precisas dependen de varios factores específicos del paciente tales como el estado de salud y el peso del paciente.

- 35 Los compuestos, si se administran como una composición farmacéutica, se administran preferentemente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, diferenciándose la naturaleza del vehículo del modo de administración, por ejemplo, vías enteral, oral y tópica (incluyendo oftálmica). La formulación deseada se puede preparar usando una variedad de excipientes que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio.

- 40 Se apreciará que el experto seleccionará, basándose en su propio conocimiento, los componentes apropiados y la forma galénica para dirigir el compuesto activo al tejido de interés, por ejemplo la piel, colon, estómago, ojos, riñón o hígado, teniendo en cuenta la vía de administración.

- 45 La administración de un complemento nutricional según la invención o composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente da como resultado una salud mejorada, en particular reduciendo al menos parcialmente la inflamación.

La inflamación que se puede tratar aplicando el producto preparado por el uso descrito en el texto se puede seleccionar del grupo que consiste en inflamaciones y trastornos de la piel relacionados tales como quemaduras, tales como inflamación de la piel inducida por UV o productos químicos, eccema, piel reactiva, psoriasis, vitiligo, acné, dermatitis atópica e imperfecciones de la piel.

- 50 El producto preparado según la invención es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de inflamación de la piel seleccionado del grupo que consiste en inflamación de la piel inducida por UV o productos químicos, eccema, psoriasis, vitiligo, acné y dermatitis atópica.

La reactividad de la piel es una respuesta de la piel a compuestos específicos (sintéticos o naturales) o factores ambientales (UV, polución, frío...) que aplicados a o en contacto con la superficie de la piel inducen más frecuentemente rojez de la piel, dolor, de escozor, opresión y conduce a molestia importante.

5 Entonces, tras la irritación, la piel reacciona para restaurar la homeostasis cutánea alterada y repara los daños inducidos. La respuesta de la piel puede ser inferior a la clínica. Sin embargo, esta respuesta del tejido de la piel es muy molesta para el sujeto en contacto con el agente irritante.

10 Cuando los irritantes llegan a la piel, pueden inducir un efecto irritante por sí mismos, pero también pueden reaccionar a algunas sustancias presentes en las células de tejidos y entonces liberar otras sustancias tales como citocinas. Estas citocinas pueden actuar en la piel para aumentar la respuesta inflamatoria y/o reclutar otros glóbulos sanguíneos implicados en el proceso inflamatorio. Al final, esta cascada inflamatoria conduce a una reacción de la piel, principalmente irritación de la piel. Según la calidad y la cantidad de agente irritante, los sujetos pueden tener algunas molestias tales como calentamiento de la piel, de escozor, opresión, picor y/o rojez de la piel, edema.

15 Los presentes inventores han investigado el mecanismo molecular de la composición primaria de efecto antiinflamatorio de la presente invención. Sin desear quedar ligado a teoría, los inventores creen actualmente que suprime la producción de citocinas proinflamatorias mediada por LPS por macrófagos (Figura 1) y la vía de activación de NF-κB inducida por TNF-α o LPS (Figura 2) en células epiteliales intestinales humanas. En estudios preclínicos, la complementación dietética con la composición primaria de la presente invención demostró fuertes propiedades antiinflamatorias en un modelo murino de inflamación intestinal aguda (Figuras 3 a 10). Además, la composición primaria de la presente invención fue adicionalmente capaz de reducir la expresión de citocinas proinflamatorias, tales como TNF-α, en el hígado de ratones ancianos (Figura 11). Además, la complementación dietética con la composición primaria de la presente invención potenció las respuestas inmunitarias humorales y celulares específicas de antígeno en ratones ancianos (Figura 12 y 13, respectivamente). Así, se mostró que la composición primaria de la presente invención era beneficiosa en la reducción del estado inflamatorio. Al mismo tiempo, la composición primaria de la presente invención es adicionalmente capaz de soportar el sistema inmunitario. Por consiguiente, el producto preparado por el uso de la presente invención se puede usar para reducir el estado inflamatorio y - simultáneamente - para reforzar el sistema inmunitario.

20 Por tanto, la composición primaria de la presente invención tiene el potencial de devolver la respuesta inmunitaria e inflamatoria alterada de nuevo a la homeostasis. Por este efecto doble, la composición primaria de la presente invención es, por ejemplo, adecuada para su uso en productos para ancianos.

30 En particular, la composición primaria de la presente invención es beneficiosa en el mantenimiento de la función inmunitaria durante el envejecimiento, mientras que reduce el estado inflamatorio leve relacionado con la edad de la piel.

35 Además, la composición primaria o producto dermatológico descrito en el texto se puede usar para tratar o prevenir trastornos relacionados con el estrés oxidativo. Los inventores han mostrado que la aplicación de la composición primaria y/o el producto descrito en el texto puede inducir un fuerte aumento de los genes antioxidantes tales como GPX-1, CAT1 y SOD2 (Figura 9). Por consiguiente, la composición primaria y/o el producto descrito en el texto pueden proporcionar protección contra el estrés oxidativo, causado, por ejemplo, por radicales libres, tales como •O₂•, el anión superóxido; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; •OH, el radical hidroxilo; ROOH, hidroperóxido orgánico; RO•, radicales alcoxi; ROO•, radicales peroxi; HOCl, ácido hipocloroso; OONO-, peroxinitrito; y/o NO•.

40 Las ventajas y características adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos y figuras.

La Figura 1 muestra la inhibición de la producción de IL-6 mediada por LPS por LWB en la línea celular de macrófagos murinos (células RAW).

45 La Figura 2 muestra la inhibición de la activación de NF-κB mediada por LPS por LWB en la línea celular epitelial intestinal humana (HT-29 establemente transfectada con un gen indicador NF-κB).

La Figura 3 muestra la pérdida de peso corporal después de la administración de TNBS. Media +/- EEM

La Figura 4 muestra la evaluación de la puntuación macroscópica. Panel derecho: Media +/- EEM; Panel izquierdo: Valores individuales y mediana.

50 La Figura 5 muestra la evaluación de la puntuación histológica. Panel derecho: Media +/- EEM; Panel izquierdo: Valores individuales y mediana

La Figura 6 muestra la relación de COX-2 con la proteína de referencia (actina). Panel derecho: Media +/- EEM; Panel izquierdo: Valores individuales y mediana

La Figura 7 muestra la expresión de pSTAT3. Panel derecho: Media +/- EEM; Panel izquierdo: Valores individuales y mediana

La Figura 8 muestra la expresión de genes proinflamatorios, tales como TNF α , IL-6 e IL-1 β y proteínas tales como KC en un modelo murino de inflamación intestinal aguda sin y con complementación de LWB.

La Figura 9 muestra la expresión de genes antioxidantes tales como GPX-1, CAT1 y SOD2 en un modelo murino de inflamación intestinal aguda sin y con complementación de LWB.

- 5 La Figura 10 muestra la capacidad antioxidante. Panel derecho: Media +/- EEM; Panel izquierdo: Valores individuales y mediana

La Figura 11 muestra la expresión del gen que codifica TNF- α en el hígado de ratones ancianos complementados con LWB en comparación con los niveles observados en el hígado de ratones ancianos normales (H2O) y ratones adultos (CTRL).

- 10 La Figura 12 muestra la del respuesta del anticuerpo específico de antígeno (KLH) en ratones ancianos.

La Figura 13 muestra la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) inmunitaria mediada por células en ratones ancianos.

Ejemplo 1:

Preparación de una composición primaria que comprende cambroneras y leche (LWB, lacto-cambronera)

- 15 Se introdujeron en un recipiente de 1 litro frutos secos de cambronera (40 g) y leche entera (300 g). La mezcla se dejó reposar durante 10 minutos y se trató con Polytron (Tecnología para dispersión y mezclado por KINEMATICA, PT3000) a 26000 rpm durante 15 minutos bajo una atmósfera de nitrógeno. Durante el tratamiento con Polytron, la temperatura de la mezcla se mantuvo a 80-85 °C por medio de baño de agua y se enfrió después hasta temperatura ambiente. Entonces, la mezcla resultante se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos. Se desechó el residuo sólido.
- 20 Se liofilizó la fase líquida (306 g de leche de color naranja-amarillo). Finalmente, se molió el producto secado dando 54 g de polvo de color naranja-amarillo, que había mostrado muy buena propiedad de dispersión en agua y estabilidad mejorada de zeaxantina en comparación con el polvo del fruto de cambronera.

Ejemplo 2:

Reactivos

- 25 Se proporcionaron polvo de lacto-cambronera (LWB) del lote piloto N° WB03A1506H producido en NRC (Centro de Investigación de Nestlé; Lausanne) como se ha descrito anteriormente y polvo de extracto de cambronera (lote N° WB03A1506H) por J. Wang (FS, Lipids & Bioactives). Se compró de Sigma (St. Louis, MO) lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* serotipo 055:B5. Se recogió leche de mama humana (HM) de diferentes donantes sanos 20 días después del parto siguiendo la autorización del comité ético. Se compró hemocianina de lapa californiana (KLH) de Sigma.

- 30 Cultivo celular

- Se mantuvo la línea celular de monocitos/macrófagos de ratón RAW 264.7 (TIB-71 de ATCC, Manassas, Virginia, EE.UU.) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Amimed, Bioconcept, Allschwill, Suiza) complementado con 10 % de FCS termoinactivado (Amimed) y 1 % de penicilina/estreptomocina (Invitrogen, Paisley, RU) a 37 °C en una estufa de incubación de 5 % de CO₂/aire. Las células se subcultivaron usando tripsina/EDTA (Sigma, St-Louis, MO, EE.UU.). Se mantuvieron células del clon 34 (es decir, células HT-29 transfectadas establemente con un gen indicador NF- κ B) de la línea celular de adenocarcinoma colónico humano HT-29 en DMEM de alta glucosa (4,5 g/l) (Bioconcept, Allschwill, Suiza) que contenía 1 % de L-glutamina estable y complementada con 10 % de FCS termoinactivado (una hora a 56 °C), 1 % de penicilina/estreptomocina (Sigma, St Louis, MO), 500 μ g/ml de G418 (Invitrogen) y 100 μ g/ml de Normocin (Invivogen) a 37 °C en una estufa de incubación de 5 % de CO₂/aire. Se cambió el medio de cultivo cada 2 días hasta que las monocapas de células alcanzaron ~ 90 % de confluencia. Las células se subcultivaron usando tripsina/EDTA (Sigma).
- 35
- 40

Cuantificación de la expresión de IL-6 mediada por LPS

- Se sembraron células RAW 264.7 a 10⁴ células/pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en medio de cultivo normal a 37 °C en una estufa de incubación de 5 % de CO₂/aire. Después de 3 días de cultivo (es decir, alcanzando las células ~ 80 % de confluencia), las células se estimularon o no con 0,5 μ g/ml de LPS de *E. coli* (055:B5, Sigma) en ausencia o presencia de muestras de LWB (0,1 – 1 % de concentración final) durante 24 horas en medio de cultivo normal. Entonces se recogieron y usaron los sobrenadantes de cultivo celular para cuantificar la producción de IL-6. Los niveles de interleucina-6 (IL-6) en sobrenadante de cultivo celular se determinaron por ELISA (Murine IL-6 Eli-par, Diaclone, Besançon, Francia) según las instrucciones del fabricante.
- 45

- 50 Actividad de NF- κ B

Se sembraron células del clon 34 de HT-29 a 10⁴ célula/pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos (Nunc) en medio de mantenimiento de cultivo. Después de 3-4 días de cultivo (es decir, alcanzando las células ~ 80 % de

confluencia), las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma) y luego se estimularon o no con LPS (10 ng/ml + 5 % de leche humana) o TNF- α recombinante (10 ng/ml; R&D Systems, Oxon, Inglaterra) en ausencia o presencia de muestras de LWB durante 24 horas en DMEM que contenía 1 % de penicilina/estreptomicina. Entonces se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se guardaron a +4 °C durante la noche hasta el análisis de la actividad de NF- κ B. Tras la activación de NF- κ B, las células del clon 34 de HT-29 secretan fosfatasa alcalina (SEAP) en el sobrenadante de cultivo. Se midió la liberación de SEAP usando un método de detección de fluorescencia (sistema Phospha-Light™) siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Bedford, EE.UU.). Brevemente, los sobrenadantes de cultivo celular se incubaron con tampón de reacción del sistema Phospha-Light™ durante 20 min en una placa de polipropileno de fondo plano blanco de 96 pocillos (Greiner) y se midió la luminiscencia usando el espectrómetro Spectrafluor Plus (Tecan 8634 Hombrechtikon, Suiza). Los resultados se expresan como unidades relativas de luminiscencia (URL)

Modelo de colitis inducida por TNBS

El modelo de colitis por TNBS es un modelo de inflamación aguda inducida por el producto químico: ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) a la dosis de 150 mg/kg. Se alimentaron diez ratones por grupo con dieta que contenía 1 % de LWB (50 mg) siete días antes de la inducción de la colitis y hasta el sacrificio. Desde el día 1 hasta el día 4 después de la administración de TNBS, se han administrado 50 mg de LWB por sonda nasogástrica para compensar el menor consumo de alimentos asociado a la inflamación intestinal aguda. Para cada pérdida de peso corporal del animal, se evaluaron la puntuación macroscópica, histológica, COX-2, pSTAT3, expresión de genes proinflamatorios y antioxidantes y potencia antioxidante. Se realizaron la puntuación macroscópica e histológica siguiendo los criterios de puntuación de Wallace (Wallace et al, 1989) y Ameho (Ameho et al, 1997). COX-2, la forma inducible de ciclooxigenasa, una proteína de 72 kDa, es responsable de la biosíntesis inducible de prostaglandinas en afecciones inflamatorias agudas. Stat3 es una molécula de señalización clave para muchas citocinas; en particular para citocinas proinflamatorias como IL-6.

Diseño del estudio para evaluar la modulación inmunitaria en ratones ancianos

Se compraron ratones C57BL/6J macho libres de patógenos específicos (4 semanas de edad) de Charles River Laboratories Inc. (Francia). Los ratones se alojaron en circunstancias convencionales (ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, temperatura 22 °C, humedad 56 %) y recibieron agua y dieta Kliba 3434 semisintética a voluntad. Hasta la edad de 5 meses, los ratones se mantuvieron a 5 por jaula y luego se alojaron individualmente en jaulas. Todas las condiciones y manipulación de los animales fueron autorizadas por los comités éticos de Nestlé y estatales con el acuerdo de Swiss Federal Veterinary Advisor. Se aleatorizaron ratones de 21 meses de edad en 2 grupos de 10 animales. Los ratones de control no complementados (H2O, n=10 por grupo de edad) y los ratones complementados con LWB (LWB, n=10 por grupo de edad) recibieron una dieta semisintética (AIN-93). Se proporcionó LWB como una disolución al 0,5 % (peso/volumen) en el agua de beber, que se preparó nueva y se cambió cada dos días. Durante el ensayo (44 días), se dejó que todos los ratones bebieran y comieran a voluntad. El mismo diseño del estudio se realizó dos veces y también se realizó con ratones de 8 meses de edad (n=8 por grupo). Para estudiar la respuesta humoral dependiente de linfocitos T *in vivo* (producción de anticuerpos específicos de antígeno), los ratones ancianos se inmunizaron en el día 15 del ensayo por inyección subcutánea (100 μ l) de una hemocianina de lapa californiana de antígeno inerte (KLH, Sigma) a 100 μ g en 1 % de alumbre (Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca). Se usó la respuesta de DTH como una medida *in vivo* de inmunidad celular. Las mediciones del espesor de la oreja (hinchazón de la oreja) tomadas antes, y 24 horas a 8 días después, de la provocación permitieron la determinación de la capacidad para generar una respuesta de DTH. Brevemente, 7 días después de la inmunización de los ratones con KLH (es decir, día 22 del ensayo), se provocaron respuestas de DTH inyectando KLH de antígeno de memoria (10 μ l de 0,5 μ g/ml) en cada oreja derecha del ratón. Se inyectaron las orejas derechas con vehículo solo (solución salina = PBS) y sirvieron de controles internos para cada animal. 24 horas después de la provocación, y durante los 7 días siguientes, se midieron tanto las orejas no provocadas (oreja izquierda) como las provocadas (oreja derecha). Se expresaron las respuestas de DTH (KLH-PBS) como la magnitud del hinchazón de la oreja, es decir, el cambio en el espesor de la oreja usando la siguiente fórmula: Δ en espesor de la oreja - [enfermedad de la oreja provocada (derecha, KLH) - enfermedad de la oreja no provocada (izquierda, PBS)], donde Δ en el espesor de la oreja = [espesor de la oreja después de la provocación - antes de la provocación]. Se recogieron muestras de sangre en los días 0, 15, 29 de la vena de la cola y en el día 44 mediante punción cardíaca. Los ratones se sacrificaron en el día 44 del ensayo. En la autopsia, se extrajo el hígado y se congeló inmediatamente un trozo en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a +80 °C hasta posterior análisis.

Cuantificación de los niveles de anticuerpos IgG2a específicos de KLH

Se determinaron por ELISA cantidades de anticuerpos IgG2a específicos de KLH en los sueros. Brevemente, se recubrieron con KLH (50 μ l/pocillo a 100 ng/ml) placas de microtitulación y se incubaron a 37 °C durante 3 horas. Se bloquearon con tampón de ELISA sitios de unión libres durante 1 hora a 37 °C. Entonces se añadieron las muestras y se incubaron a +4 °C durante la noche. Se hicieron reaccionar los anticuerpos unidos 1 hora a 37 °C mientras se agitaban con una IgG2a de cabra anti-ratón conjugado con biotina (cadena específica de γ 2a) de Southern Biotechnologies (Birmingham, EE.UU.). Las placas se leyeron a 450 nm después de la adición del sustrato de TMB-peroxidasa de KPL. Se expresaron los niveles de anticuerpo IgG2a anti-KLH como valores medios de DO_{450nm}.

Expresión de genes

Se transfirieron muestras de hígado en 1 ml de tampón de lisis de ARN (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y se homogeneizaron usando Ribolyser (Hybaid, Waltham, MA, EE.UU.) con el siguiente parámetro: potencia a 6 durante 20 segundos. La extracción de ARN se realizó usando un kit comercialmente disponible (NucleoSpin RNA II Kit; Macherey-Nagel, Düren, Alemania). La cuantificación de ARN se logró usando el kit de cuantificación de ARN Ribogreen (Molecular Probes; Eugene, Oregon EE.UU.), y se ensayó la calidad del ARN usando Agilent RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, EE.UU.). Se transcribió de forma inversa el ARN total (2 µg) usando transcriptasa inversa Multiscribe siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Biosystems; Rokreutz, Suiza). Se compraron de Applied Biosystems (Foster City, EE.UU.) matrices de baja densidad hechas a medida (LDA) con 48 sondas TaqMan (capacidad de carga: 8 muestras por tarjeta en monoplificados técnicos) y se usaron según las instrucciones del fabricante. Se calculó la expresión génica usando el método de cuantificación relativa el método $\Delta\Delta Ct$ con el software SDS 2.2.2 (Applied Biosystems). Los valores del ciclo umbral resultante (Ct) se exportaron en MS Excel (Microsoft, EE.UU.) para análisis adicional. Brevemente, se calculó primero el valor ΔCt (es decir, valor Ct del gen diana - valor Ct del gen de mantenimiento GAPDH) y luego se determinó la expresión relativa de ARNm usando la siguiente fórmula: $2^{-\Delta Ct} \times 10^6$.

Análisis estadístico general

Los datos se analizaron por media +/- EEM o DE, y la prueba de la T de Student (datos independientes) o ANOVA bilateral, cuando convenga. Se consideraron como significativos los valores de probabilidad de menos de 5 %.

Resultados:

20 A) Experimentos *in vitro* que demuestran las propiedades antiinflamatorias de lacto-cambronera

La disolución de lacto-cambronera (LWB) inhibió *in vitro* la liberación mediada por LPS de la citocina pro-inflamatoria IL-6 por una línea celular de macrófagos murinos (Figura 1) y la activación de NF-κB mediada por LPS en células epiteliales intestinales humanas (Figura 2).

B) Experimentos *in vivo* que demuestran los efectos antiinflamatorios e inmunopotenciadores de lacto-cambronera

25 a. Inflamación aguda patológica

La suplementación dietética con LWB demostró fuertes propiedades antiinflamatorias en un modelo murino de inflamación intestinal aguda. La administración por vía oral de 1 % de LWB produjo una mejora de la pérdida de peso corporal (Figura 3), lesiones macroscópicas e histológicas (Figura 4 y 5), reducción significativa de los niveles de expresión de COX-2 y pSTAT3 (Figura 6 y 7). Además, se redujo la expresión de genes proinflamatorios, tales como TNFα, IL-6 e IL-1β y proteínas tales como KC en el colon en comparación con el grupo de control (Figura 8). En paralelo, LWB indujo un fuerte aumento de los genes antioxidantes tales como GPX-1, CAT1 y SOD2 (Figura 9) en el colon y aumentó las defensas antioxidantes en el plasma (Figura 10).

b. Inflamación fisiológica leve relacionada con la edad

35 La suplementación dietética con LWB (0,5 % en agua de beber) indujo una reducción de la expresión de los genes relacionados con la inflamación en el hígado de ratones ancianos hasta los niveles observados en ratones adultos (Figura 11: como un ejemplo, gen que codifica TNF-α).

c. Efecto inmunopotenciador en ratones ancianos

La suplementación dietética con LWB (0,5 % en agua de beber) mejoró tanto la respuesta inmunitaria humoral (Figura 12) como la mediada por células (Figura 13) en ratones ancianos.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición que comprende frutos de cambrónera (*Lycium barbarum*) y leche o un vehículo que contiene proteína de la leche para la preparación de un producto dermatológico para administración por vía oral como complemento alimenticio, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de inflamación de la piel seleccionada del grupo que consiste en inflamación de la piel inducida por UV o productos químicos, eccema, psoriasis, vitiligo, acné y dermatitis atópica, en el que la composición y/o el producto excluye fibras insolubles,
- 10 en el que la composición es obtenible por un proceso que comprende las etapas de: i) mezclar y triturar frutos de cambrónera en leche o medio líquido que contiene proteína de la leche, ii) separar las fibras insolubles para obtener una suspensión acuosa iii) opcionalmente pasteurizar la suspensión resultante iv) opcionalmente añadir componentes bioactivos sintéticos o naturales durante el procesamiento v) y adicionalmente opcionalmente secar la suspensión para obtener un polvo.
- 15 2. Uso según la reivindicación 1, en el que el producto se usa para consumo humano en o como un complemento alimenticio.
3. Uso según una de las reivindicaciones 1-2, en el que el producto es un comprimido, una cápsula, una píldora, una disolución, una suspensión, un jarabe, un polvo, un gel, un complemento oral secado o un complemento oral húmedo.
- 20 4. Uso según una de las reivindicaciones 1-3, en el que la leche es de origen animal o vegetal, o sus mezclas; preferentemente la leche es leche de vaca, leche de llama, leche de búfala, leche de cabra, leche de oveja, leche vegetal, en particular leche de soja o una mezcla de las mismas.
5. Uso según una de las reivindicaciones 1-4, en el que el producto se usa por lactantes, niños, adolescentes, adultos y/o ancianos.

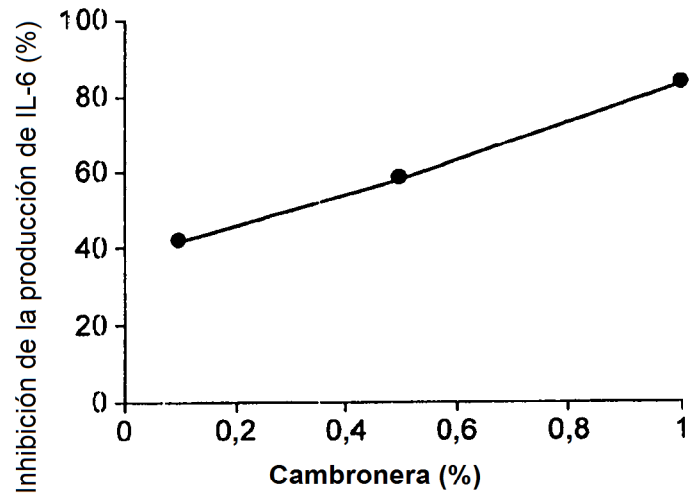


FIG. 1

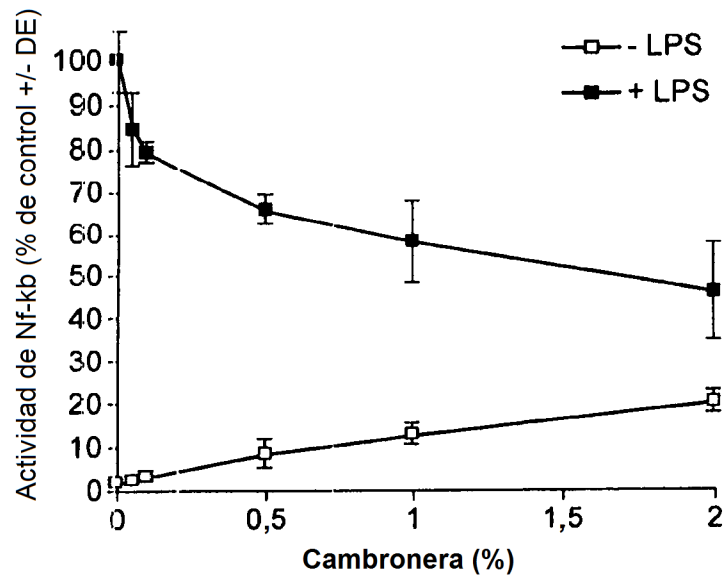


FIG. 2

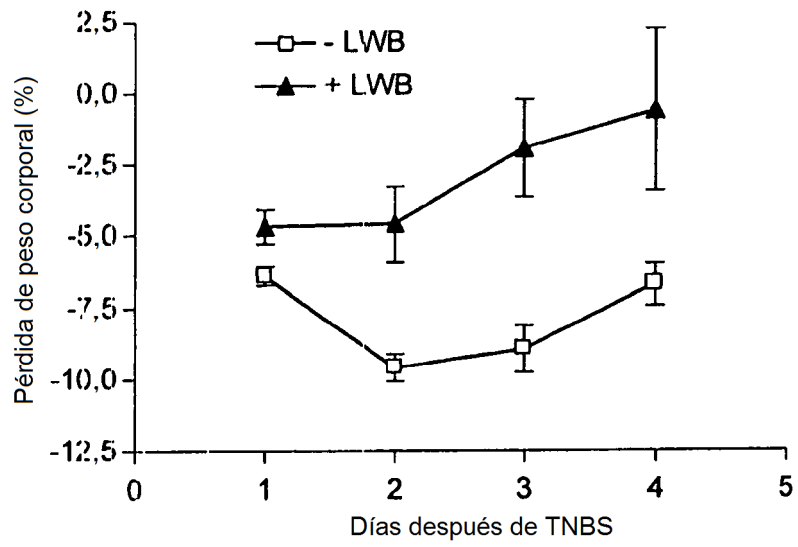


FIG. 3

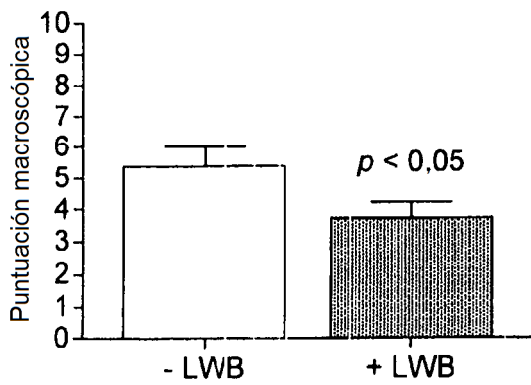


FIG. 4a

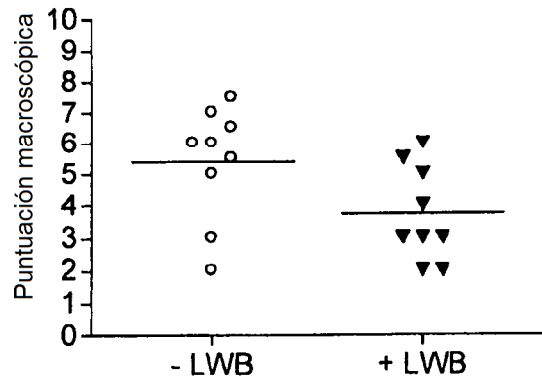


FIG. 4b

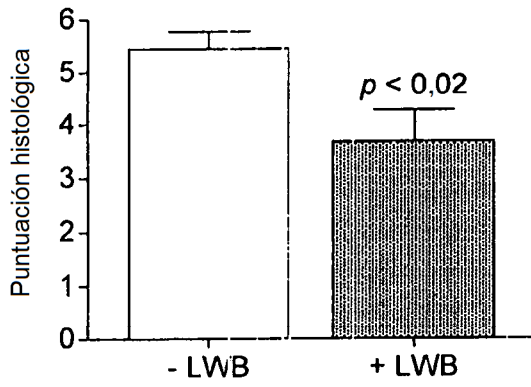


FIG. 5a

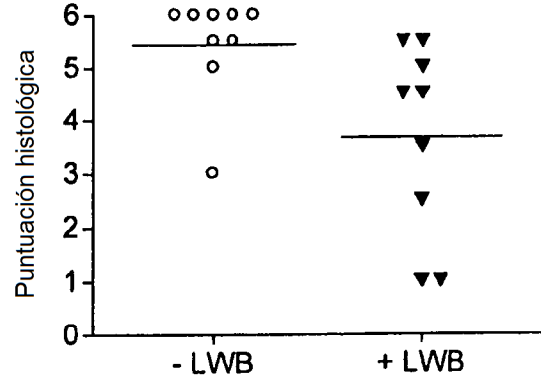


FIG. 5b

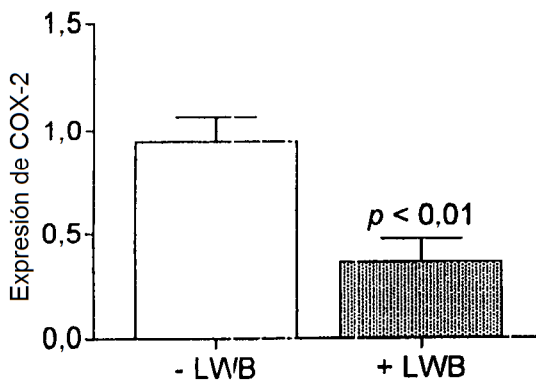


FIG. 6a

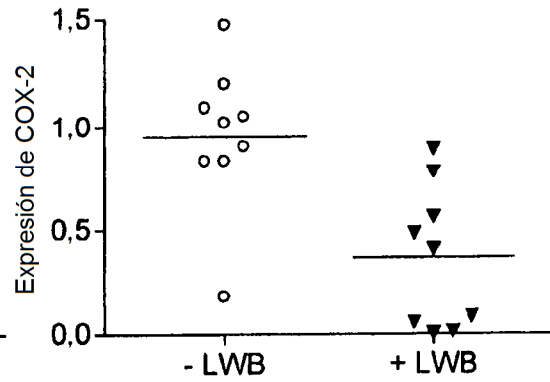


FIG. 6b

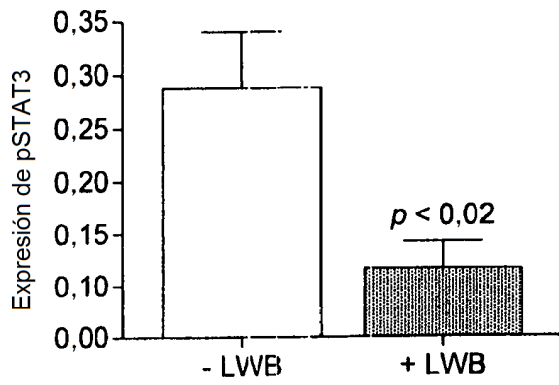


FIG. 7a

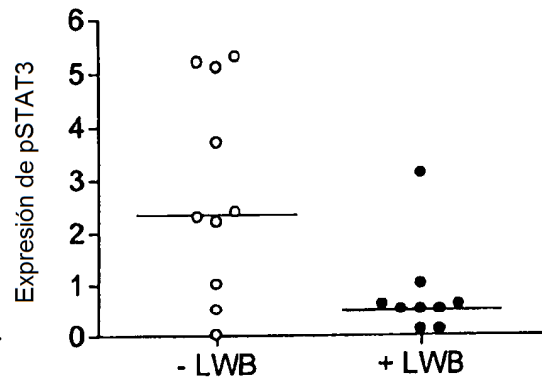


FIG. 7b

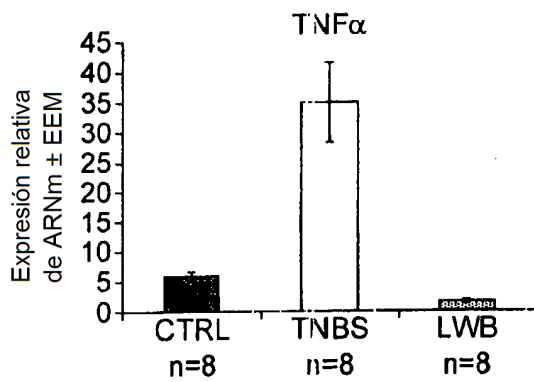


FIG. 8a

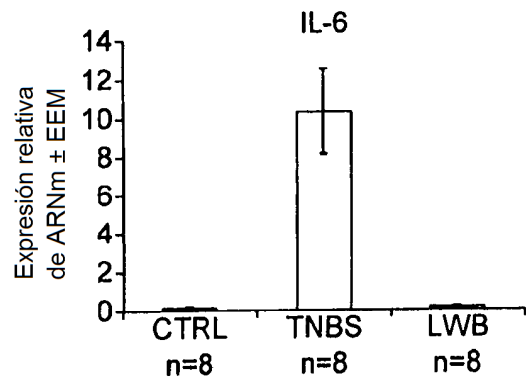


FIG. 8b

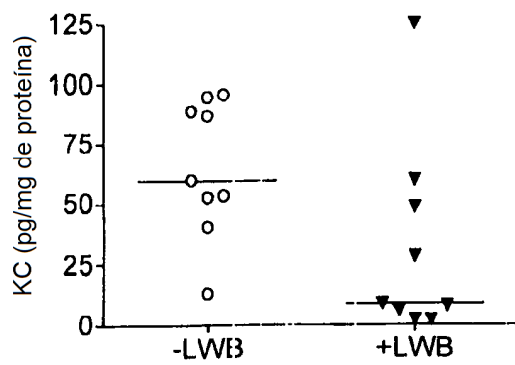


FIG. 8c

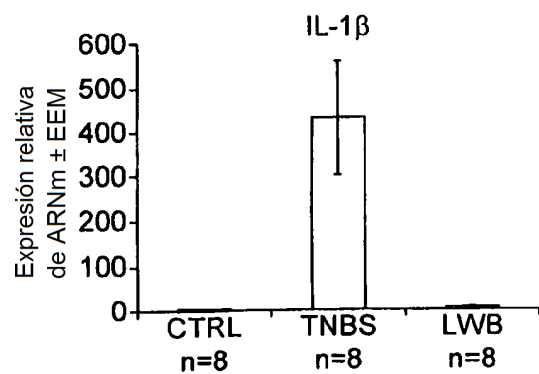


FIG. 8d

FIG. 9a

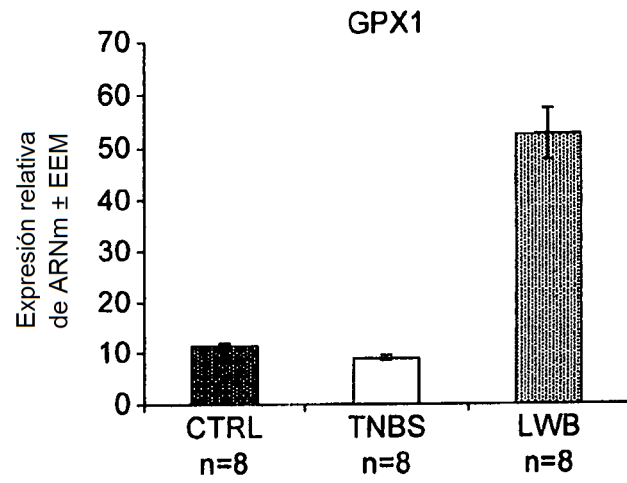


FIG. 9b

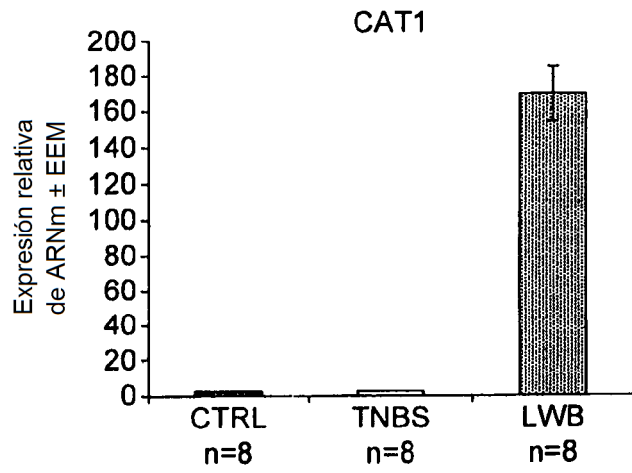
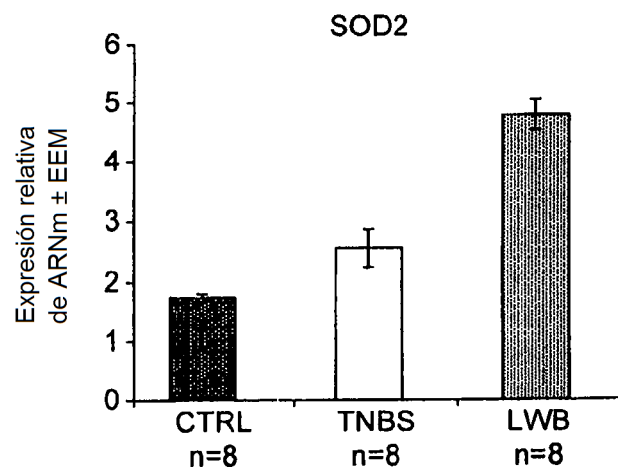


FIG. 9c



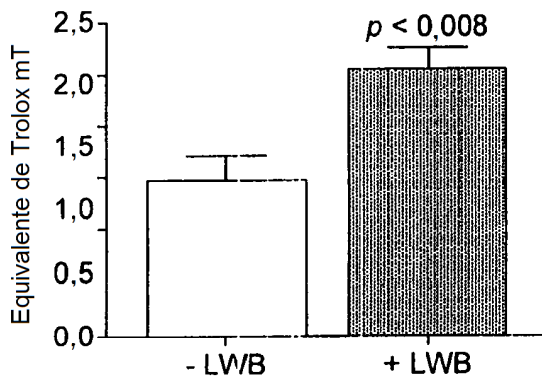


FIG. 10a

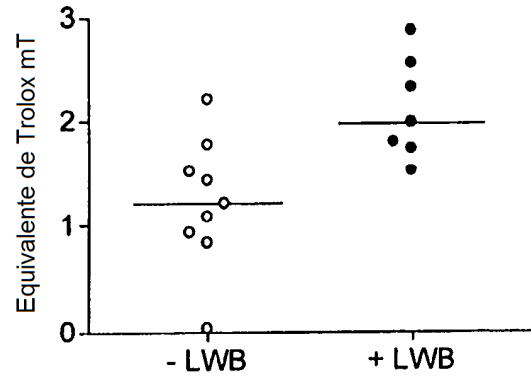


FIG. 10b

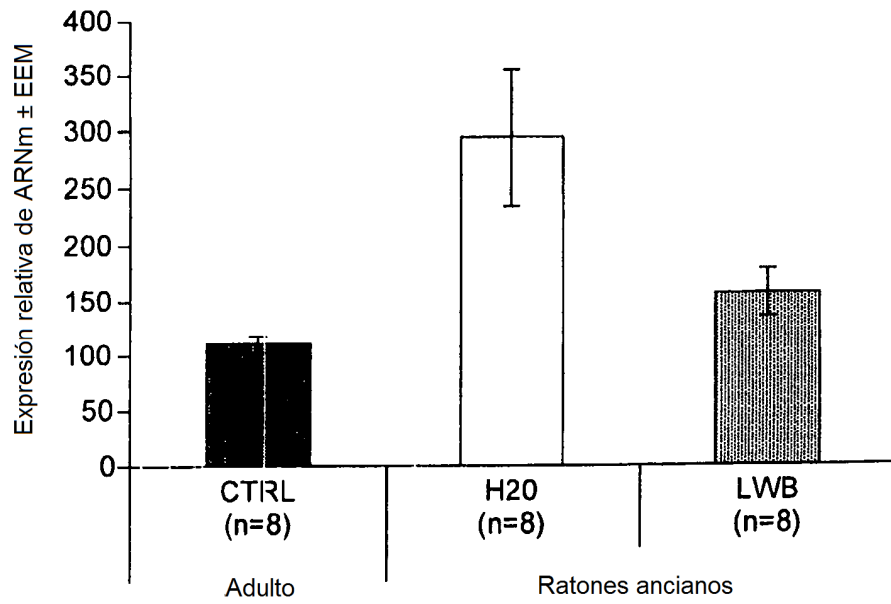


FIG. 11

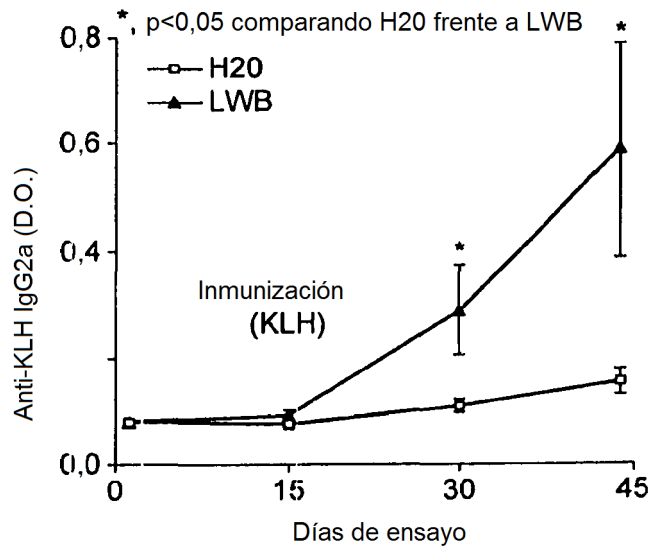


FIG. 12

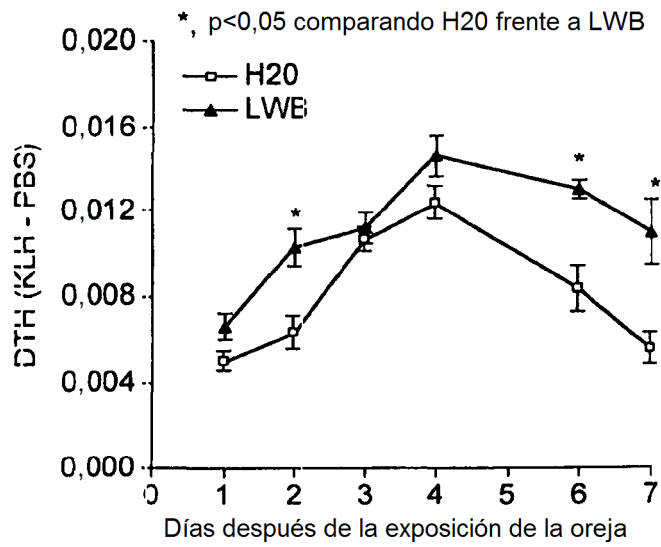


FIG. 13