

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 297**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/94** (2006.01)  
**C12Q 1/37** (2006.01)  
**G01N 33/66** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/92** (2006.01)  
**G09B 23/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/GB2014/053449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075467**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14803215 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3074769**

54 Título: **Sistema de intestino modelo**

30 Prioridad:

**25.11.2013 GB 201320781**

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

**14.11.2019**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF NEWCASTLE UPON TYNE  
(100.0%)  
Kings Gate  
Newcastle Upon Tyne and Wear NE1 7RU, GB**

72 Inventor/es:

**PEARSON, JEFF;  
BROWNLEE, IAIN;  
WILCOX, MATT;  
CHATER, PETER y  
HOUGHTON, DAVID**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

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

ES 2 731 297 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

Sistema de intestino modelo

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una prueba nueva e inventiva que simula el tracto digestivo desde la boca hasta el intestino delgado terminal. Más en particular, la presente invención se refiere a una prueba nueva e inventiva para analizar carbohidratos y/o triglicéridos y/o proteínas de una muestra fisiológica mixta mediante el uso del sistema de intestino delgado y/o de intestino modelo descrito en la presente descripción.

Antecedentes de la invención

15 A pesar de los tratamientos actuales contra la obesidad se espera que el número de personas con sobrepeso y obesas aumente a 2,3 mil millones y 700 millones en todo el mundo, respectivamente, en un futuro cercano. Dado los riesgos bien conocidos del desarrollo de otras afecciones asociadas con la obesidad, tal como por ejemplo la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardíaca, estas cifras representan efectivamente una bomba de tiempo de atención médica económica.

20 Actualmente hay muchos programas de desarrollo activos que buscan tratamientos potenciales para el mantenimiento de la obesidad/peso, incluida la búsqueda de nuevos compuestos farmacéuticos o biofarmacéuticos que tengan un impacto en la forma en que el alimento es procesado internamente por un sujeto obeso, así como también la búsqueda de una mayor comprensión del valor nutricional de los productos alimenticios y en particular cómo se digieren.

25 Hollebeeck y otros, (Food Chemistry, Volumen 138, núm. 2, 2012, páginas 1936-1944) analiza el desarrollo de un protocolo de digestión *in vitro* humana estandarizado basado en la digestión de macronutrientes mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta.

El documento WO2011/012932 se refiere al uso de partículas de esteroles o estanol recubiertas para la preparación de composiciones alimenticias que tienen un bajo contenido de grasas y que están esencialmente libres de emulsionantes.

30 Oomen y otros, (Archives of environmental contamination and toxicology, volumen 46, núm. 2, 2004, páginas 183-188) analiza el efecto del tipo de bilis en la bioaccesibilidad de los contaminantes del suelo en un modelo de digestión *in vitro*, mientras que Oomet y otros, (Archives of environmental contamination and toxicology, volumen 44, núm. 3, 2003, páginas 281-287) analiza el desarrollo de un modelo de digestión *in vitro* para estimar la bioaccesibilidad de los contaminantes del suelo.

Una parte clave necesaria de las etapas tempranas de desarrollo en el desarrollo de cualquier producto farmacéutico o tratamiento biofarmacéutico nuevo para la obesidad es evaluar el impacto potencial de los compuestos de prueba en la digestión. Si bien se acepta en general que el uso de los sistemas de modelo *ex vivo* validados es de gran valor dentro del proceso de desarrollo como un reemplazo para los modelos animales, tanto desde una perspectiva ética como comercial, hasta la fecha no ha sido posible evaluar completamente el posible impacto de los compuestos de prueba en el sistema digestivo porque actualmente no existe un sistema de intestino modelo (MGS) *in vitro* fisiológicamente relevante capaz de simular el proceso digestivo del tracto gastrointestinal (GI) desde la boca hasta el intestino delgado terminal. Por lo tanto, existe una necesidad de un sistema de intestino modelo (MGS) *in vitro* fisiológicamente relevante capaz de simular el proceso digestivo del tracto gastrointestinal (GI) desde la boca hasta el intestino delgado terminal. Además, existe una necesidad de un modelo que pueda simular la digestión de carbohidratos, lípidos y proteínas simultáneamente y que, por lo tanto, facilite el estudio de la digestión de todo el alimento, en lugar de componentes individuales.

50 El Solicitante ha reconocido que, junto con la necesidad de nuevos tratamientos eficaces para la obesidad, existe una necesidad paralela de identificar activos/compuestos que influyen positivamente o negativamente en la digestión de macromoléculas, por ejemplo, para proporcionar una mejor comprensión de la digestión química y enzimática de los macronutrientes en los productos alimenticios, y en particular la digestión de los sistemas de macronutrientes mixtos.

55 Antes de la presente invención no ha sido posible analizar la digestión química y enzimática de un sistema mixto de los macronutrientes, triglicéridos, proteínas y/o carbohidratos en un MGS *in vitro* que incluye la boca, estómago e intestino delgado.

Resumen de la invención

60 La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier asunto que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones es solo para información.

65 El solicitante ha desarrollado un sistema de intestino modelo (MGS) *in vitro* fisiológicamente relevante que simula los procesos digestivos del tracto gastrointestinal (GI) desde la boca hasta el intestino delgado terminal. Al respecto, la invención proporciona un sistema de prueba nuevo e inventivo para analizar la digestión de carbohidratos y/o triglicéridos y/o proteínas de una muestra fisiológica mixta. Además, se describe un modelo de intestino delgado que simula el tracto

- digestivo desde la boca hasta el intestino delgado terminal. La invención proporciona una prueba nueva e inventiva para analizar carbohidratos y/o triglicéridos y/o proteínas de una muestra fisiológica mixta mediante el uso del modelo de intestino delgado descrito en la presente descripción. La invención proporciona una prueba de modelo de intestino nueva e inventiva para analizar carbohidratos y/o triglicéridos y/o proteínas de una muestra fisiológica mixta mediante el uso del modelo de intestino delgado; un modelo de estómago y un modelo de boca descritos en la presente descripción.
- Los métodos para el análisis de productos de la digestión en muestras de un entorno digestivo simulado se confunden por la interferencia de fondo en una muestra fisiológica mixta. La presencia de diversos productos químicos, compuestos y sustratos da como resultado una reactividad cruzada con los reactivos de la prueba y puede dar como resultado falsos positivos o negativos y al informe incorrecto de los datos.
- Los modelos y sistemas de prueba mencionados anteriormente pueden usarse, ventajosamente, para estudiar la digestión química y enzimática simultánea de los macronutrientes grasa, proteína y/o carbohidrato, y para analizar los efectos de compuestos exógenos en la digestión de estos macronutrientes, con miras a desarrollar productos terapéuticos, alimentos bioactivos o dispositivos médicos novedosos y/o comprender los mecanismos de la digestión. Las pruebas de la invención se han validado mediante el uso de inhibidores conocidos de la digestión de macronutrientes, que incluyen orlistat, acarbosa, polisulfato de pentosano e inhibidor de tripsina de soya. Además, las pruebas de la invención se han usado exitosamente en la identificación y caracterización de nuevos inhibidores/activadores de lipasa de la digestión de lípidos, proteínas y carbohidratos, que incluyen alginato, fucoidan y extractos de algas marinas.
- Las pruebas de la invención fueron un instrumento en la caracterización de alginatos específicos como inhibidores de la digestión de lípidos, y estos alginatos desde entonces han demostrado eficacia clínica en ensayos en seres humanos.
- Al igual que con los estudios farmacológicos, los ensayos de control aleatorizados, doble ciego en poblaciones humanas son el estándar de oro de los estudios de nutrición, sin embargo, el costo y la complejidad son frecuentemente prohibitivos. Los estudios en seres humanos a pequeña escala también pueden ser costosos y difíciles. Los sistemas de prueba de la presente invención proporcionan un método de tamizaje primario de alto rendimiento mediante el cual los compuestos pueden incluirse o excluirse como agentes terapéuticos eficaces, y un sistema de análisis para observar los efectos bioactivos. La disponibilidad de un sistema *in vitro* robusto y de bajo costo, que permita la predicción de los efectos *in vivo* en seres humanos de un compuesto (o un rango de compuestos) en la digestión puede usarse para informar la dosificación y el contexto (por ejemplo, presencia, ausencia o concentración de componentes dietéticos específicos) en el que un compuesto tendrá el efecto deseado y la magnitud de este efecto. Esta información es a su vez útil en el diseño de ensayos en seres humanos.
- Las pruebas de la invención proporcionan además una alternativa a las pruebas en animales costosas y controvertidas. Las pruebas de la invención proporcionan una simulación fisiológica de la digestión humana normal, lo que puede usarse para examinar cómo los nuevos productos farmacéuticos y los aditivos alimentarios afectan la digestión con el fin de crear nuevos productos de intervención dietética. El análisis del modelo de intestino y/o del modelo de intestino delgado proporciona una alternativa controlada, reproducible y rentable para los estudios en animales y un modelo fisiológicamente relevante para informar y mejorar los estudios en seres humanos.
- El sistema de intestino modelo es una robusta simulación fisiológica de los aspectos químicos y enzimáticos de la digestión que puede usarse para modelar los efectos de compuestos exógenos en la digestión de macronutrientes. Los jugos salivales y gástricos sintéticos se componen de productos químicos y enzimas comprados de acuerdo con los valores fisiológicos de la bibliografía. Para modelar el entorno más complejo del intestino delgado, se recolecta y se agrupa la bilis porcina fresca desde los mataderos, y se usa la pancreatina porcina en polvo para la mezcla compleja de enzimas del intestino delgado. Esto significa que puede lograrse una simulación robusta de los procesos químicos y enzimáticos de la digestión.
- Se describe un sistema de intestino modelo (MGS) que comprende una fase pancreática (modelo de intestino delgado) que consiste esencialmente en jugo pancreático sintético que comprende pancreatina y uno o más diluyentes pancreáticos adecuados a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, preferentemente aproximadamente 7,9 a aproximadamente 8,2 y bilis porcina.
- El sistema de intestino modelo puede comprender adicionalmente una fase gástrica (modelo de estómago).
- El sistema de intestino modelo puede comprender adicionalmente una fase gástrica (modelo de estómago) y una fase salival (modelo de boca).
- Se describe además un método de tamizaje utilizando el sistema de intestino modelo descrito en la presente descripción.
- Se describe además un método para analizar triglicéridos y/o proteínas de una muestra fisiológica mixta que comprende las etapas de: i) tratamiento de una muestra fisiológica mixta con ácido tricloroacético (TCA); ii) centrifugación de la muestra resultante; y iii) análisis de los productos de degradación de lípidos y/o proteínas presentes en el sobrenadante de la muestra resultante.

5 Se describe además un método para analizar carbohidratos y/o triglicéridos y/o proteínas de una muestra fisiológica mixta que comprende las etapas de: i) tratamiento de una muestra fisiológica mixta con ácido tricloroacético (TCA), seguido opcionalmente por centrifugación; tratamiento de la muestra tratada con TCA con cloruro de potasio (KCl), en donde el tratamiento con KCl está presente como una solución en disolvente acuoso; centrifugación de la muestra resultante; y análisis de los productos de degradación de carbohidratos y/o lípidos y/o proteínas presentes en el sobrenadante de la muestra resultante.

10 Se describe además un modelo de intestino que comprende: una fase salival que consiste esencialmente en saliva sintética que comprende una mezcla acuosa de una o más enzimas adecuadas, y uno o más componentes de diluyentes salivales adecuados a un pH en el intervalo de desde aproximadamente 5 a 9; una fase gástrica en donde la fase gástrica comprende: consiste esencialmente en jugo gástrico sintético que comprende una mezcla acuosa de lipasa gástrica, pepsina y uno o más componentes de diluyentes gástricos adecuados, a un pH de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3,5 y una fase pancreática, una fase pancreática que consiste esencialmente en jugo pancreático sintético que comprende pancreatina y uno o más diluyentes pancreáticos adecuados a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, preferentemente aproximadamente 7,9 a aproximadamente 8,2 y bilis porcina.

15 Se describen además kits para el análisis de carbohidratos y/o triglicéridos y/o proteínas en una muestra fisiológica mixta que comprende los modelos descritos en la presente descripción.

20 Se proporciona además el uso de un modelo descrito en la presente descripción para analizar carbohidratos y/o triglicéridos y/o proteínas o productos de degradación de estos.

25 Se proporciona además el uso de un modelo descrito en la presente descripción para simular la digestión de una sustancia comestible/potable.

Breve descripción de los dibujos

Las modalidades de la invención se describen a continuación con referencia a los dibujos acompañantes, en los cuales:  
Figura 1: Es un esquema de la configuración del equipo del sistema de intestino modelo.

30 Figura 2: Es un esquema de un sistema de intestino modelo (MGS) que muestra la adición de 10 ml de saliva sintética a T[-10] en la fase salival, 50 ml de jugo gástrico sintético a T[0], seguido de la adición a 0,5 ml/minuto de jugo gástrico sintético desde T10 hasta el final de la fase gástrica, en la fase salival, 25 ml de bilis porcina fresca a T[60], seguido de la adición a 0,5 ml/minuto de jugo pancreático sintético desde T[60] hasta el final de la fase pancreática.

35 Figura 3: Es un gráfico de barras que ilustra las cantidades relativas de BSA no digerida frente a BSA digerida según se mide mediante el uso del kit Pierce BCA Total Protein assay y en particular compara el reporte de BCA de 1,5625 mg de BSA antes y después de la digestión con pepsina/tripsina en 2 etapas;

Figura 4: Ilustra la detección de una cantidad constante, conocida de proteína digerida en el sistema de intestino modelo (MGS), con y sin bilis;

Figura 5: Muestra una digestión de control del trioctanoato de glicerilo en el sistema de intestino modelo (MGS);

40 Figura 6: Es un gráfico que muestra la digestión del trioctanoato de glicerilo en el sistema de intestino modelo (MGS) con y sin Orlistat®;

Figura 7: Es un gráfico que muestra la digestión del trioctanoato de glicerilo en el sistema de intestino modelo (MGS) con y sin FMC3;

45 Figura 8: Es un gráfico que muestra la digestión del trioctanoato de glicerilo en un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin FMC13;

Figura 9: Es un gráfico que muestra la digestión del trioctanoato de glicerilo en un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin Fucoidan;

Figura 10: Es un gráfico que muestra la digestión del trioctanoato de glicerilo en un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin LFR560;

50 Figura 11: Es un gráfico que muestra la digestión del almidón de maíz en un sistema de intestino modelo (MGS);

Figura 12: Es un gráfico que muestra la digestión del almidón de maíz en un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin Acarbosa;

Figura 13: Es un gráfico que muestra la digestión del almidón de maíz en un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin alginato FMC13;

55 Figura 14: Es un gráfico que muestra la digestión del almidón de maíz en un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin alginato FMC3;

Figura 15: Es un gráfico que muestra la digestión del almidón de maíz en un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin Fucoidan;

60 Figura 16: Es un gráfico que muestra la digestión de la albúmina sérica bovina (BSA) en la fase gástrica (estómago) de un sistema de intestino modelo (MGS);

Figura 17: Es un gráfico que muestra la digestión de la albúmina sérica bovina (BSA) en la fase gástrica (estómago) de un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin alginato FMC13;

Figura 18: Es un gráfico que muestra la digestión de la albúmina sérica bovina (BSA) en la fase gástrica (estómago) de un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin alginato FMC3;

65 Figura 19: Es un gráfico que muestra la digestión de la albúmina sérica bovina (BSA) en la fase gástrica (estómago) de un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin SP54;

Figura 20: Es un gráfico que muestra la digestión de la albúmina sérica bovina (BSA) en la fase gástrica (estómago) de un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin Fucoidan;

Figura 21: Es un gráfico que muestra la digestión de la albúmina sérica bovina (BSA) en la fase pancreática / intestinal de un sistema de intestino modelo (MGS);

5 Figura 22: Es un gráfico que muestra la digestión de la albúmina sérica bovina (BSA) en la fase pancreática / intestinal de un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin SBTI;

Figura 23: Es un gráfico que muestra la digestión de la albúmina sérica bovina (BSA) en la fase pancreática / intestinal de un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin FMC3;

10 Figura 24: Es un gráfico que muestra la digestión de la albúmina sérica bovina (BSA) en la fase pancreática / intestinal de un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin FMC13; y

Figura 25: Es un gráfico que muestra la digestión de la albúmina sérica bovina (BSA) en la fase pancreática / intestinal de un sistema de intestino modelo (MGS) con y sin Fucoidan.

#### Descripción detallada

15

Como se analizó anteriormente, existe la necesidad de un sistema de intestino modelo (MGS) *in vitro* confiable, fisiológicamente relevante capaz de simular el proceso digestivo del tracto gastrointestinal (GI) desde la boca hasta el intestino delgado terminal.

20

Los Solicitantes ahora han desarrollado un sistema de intestino modelo *in vitro* (MGS) fisiológicamente relevante que simula el tracto digestivo desde la boca hasta el intestino delgado terminal. Como demuestran los resultados a continuación, este modelo puede usarse para estudiar la digestión química y enzimática de los macronutrientes, triglicéridos, proteínas y carbohidratos, y también para analizar los efectos de los compuestos exógenos sobre estos.

25

La eficacia del MGS ha sido demostrada por el papel que ha desempeñado en la construcción de un caso para el nuevo inhibidor de lipasa alginato como un tratamiento para la pérdida de peso, el cual ahora se encuentra en ensayos en seres humanos.

30

El MGS es una simulación fisiológica robusta de los aspectos químicos y enzimáticos de la digestión que puede usarse para modelar los efectos de compuestos exógenos en la digestión de macronutrientes. Para asegurar que pueda lograrse una simulación robusta de los procesos químicos y enzimáticos de la digestión, el MGS utiliza jugo salival, gástrico y pancreático sintético.

35

Se describe un sistema de intestino modelo (MGS) que comprende una fase pancreática que consiste esencialmente en jugo pancreático sintético que comprende pancreatina y uno o más diluyentes pancreáticos adecuados a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, preferentemente de aproximadamente 7,9 a aproximadamente 8,2 y bilis, preferentemente bilis porcina.

40

El MGS puede comprender además una fase gástrica que consiste esencialmente en jugo gástrico sintético que comprende una mezcla acuosa de lipasa gástrica, pepsina y uno o más componentes de diluyentes gástricos adecuados, a un pH de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3,5.

45

El MGS puede comprender además una fase salival que consiste esencialmente en saliva sintética que comprende una mezcla acuosa de una o más enzimas salivales y uno o más componentes de diluyentes salivales adecuados a un pH en el intervalo de aproximadamente 5 a 9, preferentemente de aproximadamente 6,8 a 7,8.

50

Se describe un modelo de intestino que comprende: una fase salival que consiste esencialmente en saliva sintética que comprende una mezcla acuosa de una o más enzimas adecuadas, y uno o más componentes de diluyentes salivales adecuados a un pH en el intervalo de aproximadamente 5 a 9; una fase gástrica en donde la fase gástrica comprende: consiste esencialmente en jugo gástrico sintético que comprende una mezcla acuosa de lipasa gástrica, pepsina y uno o más componentes de diluyentes gástricos adecuados, a un pH de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3,5; y bilis; y una fase pancreática, una fase pancreática que consiste esencialmente en jugo pancreático sintético que comprende pancreatina y uno o más diluyentes pancreáticos adecuados a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, preferentemente de aproximadamente 7,9 a aproximadamente 8,2 y bilis.

55

En cada uno de los modelos anteriores preferentemente la bilis es bilis porcina. Alternativamente la bilis es bilis bovina u ovina. Con mayor preferencia, la bilis porcina se recolecta de vesículas biliares porcinas. Alternativamente la bilis es una bilis sintética, ácidos biliares, lecitinano, bilirrubina o una combinación de estos.

60

La pancreatina puede ser pancreatina dializada, por ejemplo, pancreatina dializada a través de una membrana semipermeable que tiene un peso molecular de corte (MWCO) de aproximadamente 12.000 a aproximadamente 14.000 Daltons. Preferentemente, la pancreatina dializada se proporciona a una concentración de 5 - 40 mg/ml, preferentemente de 6,5-12 mg/ml, con mayor preferencia de 9 mg/ml de diluyente pancreático. En una modalidad preferida, la pancreatina se añade a 0,1-2,5 ml/min, preferentemente a una tasa de 0,5 ml/min. En consecuencia, la pancreatina dializada está presente preferentemente en la fase pancreática a un nivel de desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15.000 mg.

65

- 5 La pancreatina puede ser pancreatina no dializada. Preferentemente, la pancreatina no dializada se proporciona a una concentración de 50-90 mg/ml de pancreatina, preferentemente 70 mg/ml de diluyente pancreático. En una modalidad preferida, la pancreatina se añade a 0,1-2,5 ml/min, preferentemente a una tasa de 0,5 ml/min. En consecuencia, la pancreatina no dializada está presente preferentemente en la fase pancreática a un nivel de desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30.000 mg.
- 10 Alternativamente la pancreatina es una pancreatina sintética que comprende amilasa, tripsina, quimotripsina, lipasa pancreática y elastasa carboxipeptidasa A o B.
- 15 En cada uno de los aspectos anteriores, preferentemente, la bilis porcina está presente a un nivel de aproximadamente 0,25 a 0,75 ml, preferentemente aproximadamente 0,5 ml, por ml de diluyente pancreático.
- 20 En cada uno de los aspectos anteriores, preferentemente, el diluyente pancreático comprende  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y urea. En una modalidad particularmente preferida el diluyente pancreático comprende de aproximadamente 82,5 a aproximadamente 137,5 mM de  $\text{CHNaO}_3$ , aproximadamente 1,8 a aproximadamente 3,1 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , aproximadamente 41,2 a aproximadamente 68,6 mM de  $\text{NaCl}$ , desde aproximadamente 0,75 a aproximadamente 1,25 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y de aproximadamente 1,25 a aproximadamente 2,09 mM de urea, preferentemente, titulada a aproximadamente pH 7,5 a aproximadamente 8,5. Con la máxima preferencia, el diluyente pancreático comprende aproximadamente 110 mM de  $\text{CHNaO}_3$ , 2,5 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 54,9 mM de  $\text{NaCl}$ , 1 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 1,67 mM de urea titulada a aproximadamente pH 8.
- 25 El nivel de  $\text{NaHCO}_3$  en el diluyente pancreático puede variarse de manera que, durante su uso, la liberación de ácidos grasos de los analitos de triglicéridos no disminuya el pH a un nivel no fisiológico en la fase pancreática.
- 30 En cada uno de los aspectos anteriores, preferentemente, el diluyente pancreático comprende además mucina, por ejemplo, mucina de estómago porcino. Con mayor preferencia, el diluyente pancreático comprende mucina a un nivel de 1 mg/ml.
- 35 En cada uno de los aspectos anteriores, preferentemente, el jugo pancreático sintético se filtra antes de su uso, por ejemplo, mediante el uso de lana de vidrio.
- 40 En cada uno de los aspectos anteriores los modelos son preferentemente no dinámicos. Como se usa aquí el término no dinámico se refiere a un modelo que recrea las condiciones químicas y enzimáticas de la digestión, en la ausencia de procesos físicos de la digestión tal como el movimiento peristáltico, la motilidad gástrica y la absorción.
- 45 En cada uno de los modelos anteriores, preferentemente, la lipasa gástrica es una lipasa bacteriana, tal como la lipasa gástrica AP12 de Amano Enzymes o alternativamente una lipasa fúngica. Preferentemente, la pepsina es pepsina porcina o alternativamente una pepsina sintética.
- 50 Preferentemente, el jugo gástrico sintético comprende una mezcla acuosa de lipasa gástrica, pepsina y uno o más componentes de diluyentes gástricos adecuados, a un pH de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3,5.
- 55 Preferentemente, la relación relativa en v/ml de lipasa gástrica: pepsina porcina es de aproximadamente 10  $\mu\text{g/ml}$ :125  $\mu\text{g/ml}$  a aproximadamente 40  $\mu\text{g/ml}$ :500  $\mu\text{g/ml}$ , preferentemente aproximadamente 40  $\mu\text{g/ml}$ :0,5 mg/ml. Preferentemente, la lipasa gástrica está presente a un nivel de desde aproximadamente 40  $\mu\text{g/ml}$  de diluyente pancreático. Preferentemente, la pepsina está presente a un nivel de desde aproximadamente 500  $\mu\text{g/ml}$  de diluyente pancreático. En una modalidad preferida, el jugo gástrico sintético se añade a la fase gástrica a una tasa de 0,1-2,5 ml/min, preferentemente a una tasa de 0,5 ml/min. En consecuencia, la pepsina está presente preferentemente en la fase gástrica a un nivel de desde aproximadamente 85 a aproximadamente 5.000  $\mu\text{g/ml}$  de jugo gástrico sintético. En consecuencia, la lipasa está presente preferentemente en la fase gástrica a un nivel de desde aproximadamente 8,5 a aproximadamente 250  $\mu\text{g/ml}$  de jugo gástrico sintético.
- 60 Preferentemente, el diluyente gástrico comprende  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y urea. En una modalidad particularmente preferida el diluyente gástrico comprende de aproximadamente 37 a aproximadamente 61 mM de  $\text{NaCl}$ , aproximadamente 7,05 a aproximadamente 11,75 mM de  $\text{KCl}$ , aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6,25 mM de urea. Con la máxima preferencia, el diluyente gástrico comprende aproximadamente 49,6 mM de  $\text{NaCl}$ , aproximadamente 9,4 mM de  $\text{KCl}$ , aproximadamente 2 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y aproximadamente 5 mM de urea titulada a pH 2,0.
- 65 Preferentemente, el jugo gástrico sintético está presente como una solución acuosa del 20 % al 80 %. Preferentemente, la solución acuosa es una solución 1:1 con agua desionizada.
- Preferentemente, el diluyente salival comprende  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  y  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . En una modalidad particularmente preferida el diluyente salival comprende de aproximadamente 46,5 a aproximadamente 77,5 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , de aproximadamente 11,25 a

aproximadamente 18,75 mM de NaCl, de aproximadamente 4,69 a aproximadamente 8,03 mM de KCl y de aproximadamente 2,25 a aproximadamente 3,75 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  titulado a pH 7,4.

5 Preferentemente, la enzima salival es amilasa, preferentemente  $\alpha$ -amilasa. Preferentemente, la amilasa está presente a un nivel de desde aproximadamente 0,01  $\mu\text{l/ml}$  a aproximadamente 2  $\mu\text{l/ml}$ , preferentemente 1  $\mu\text{l/ml}$  de diluyente salival. Preferentemente, la saliva sintética está presente como una solución acuosa del 20 % al 80 %. Preferentemente, la solución acuosa es una solución 1:1 con agua desionizada.

10 Preferentemente, el Modelo de Intestino comprende además un analito que comprende carbohidratos y/o lípidos y/o proteínas y/o productos de degradación de estos. Por ejemplo, el analito puede ser un producto alimenticio, un producto farmacéutico o terapéutico.

15 Los sistemas modelo mencionados anteriormente son particularmente útiles para analizar carbohidratos y/o triglicéridos y/o proteínas o productos de degradación de estos y las muestras aisladas de los sistemas modelo, en particular las muestras que comprenden analitos, pueden usarse con cualquier prueba conocida en la técnica para analizar carbohidratos y/o triglicéridos y/o proteínas o productos de degradación de estos. Tales pruebas incluyen la prueba de glicerol de Zenbio, la prueba K-Gluc de Megazyme y la prueba para proteínas con BCA de Pierce.

20 Preferentemente, el analito se digiere en la fase salival de aproximadamente 1 a 15 minutos, preferentemente aproximadamente 10 minutos. Preferentemente, el analito se digiere en la fase gástrica de aproximadamente 30 a 120 minutos, preferentemente aproximadamente 60 minutos. Preferentemente, el analito se digiere en la fase pancreática de aproximadamente 45 a 240 minutos, preferentemente aproximadamente 190 minutos.

25 Preferentemente, el analito se transfiere desde la fase salival a la fase gástrica después de la digestión. Preferentemente, el analito se transfiere desde la fase gástrica a la fase pancreática después de la digestión. Preferentemente, el analito se transfiere desde la fase salival a la fase gástrica después de la digestión en la fase salival, seguido de la transferencia desde la fase gástrica a la fase pancreática después de la digestión en la fase gástrica.

30 Preferentemente, el analito se transfiere desde la fase gástrica a la fase pancreática en el jugo pancreático sintético. Preferentemente, el analito se transfiere desde la fase salival a la fase gástrica en la saliva sintética.

35 Se describe un método para analizar carbohidratos y/o triglicéridos y/o proteínas de una muestra fisiológica mixta que comprende las etapas de: tratamiento de una muestra fisiológica mixta con ácido tricloroacético (TCA), opcionalmente seguido de centrifugación; tratamiento de la muestra tratada con TCA con cloruro de potasio (KCl), en donde el tratamiento con KCl está presente como una solución en disolvente acuoso; centrifugación de la muestra resultante; y análisis de los productos de degradación de carbohidratos y/o lípidos y/o proteínas presentes en el sobrenadante de la muestra resultante.

40 Como se usa en la presente descripción, el término "muestra fisiológica mixta" se refiere a una muestra que comprende al menos uno de los siguientes componentes: Una muestra fisiológica mixta podría incluir uno o más de los siguientes componentes: un producto químico diluyente, por ejemplo,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, KCl; una enzima, por ejemplo pepsina, amilasa, lipasa; bilis, por ejemplo sales biliares, bilirrubina lecitina; moco; y sustratos alimenticios, por ejemplo carbohidratos, proteínas, grasas, fibra no digerible. Preferentemente, la muestra fisiológica mixta incluye uno o más sustratos alimenticios (por ejemplo, carbohidratos, proteínas, grasas, fibra no digerible), uno o más diluyentes químicos (por ejemplo,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, KCl) y opcionalmente, uno o más de los siguientes componentes: amilasa salival, lipasa gástrica, pepsina, bilis, pancreatina y/o mucosa.

50 Preferentemente, el TCA está presente en una cantidad eficaz para la precipitación de proteínas no digeridas en la muestra. Preferentemente, el TCA está presente como una solución acuosa del 5 % al 20 % y la relación del volumen de muestra con respecto al volumen de la solución de TCA está en el intervalo de aproximadamente 1:0,5 a aproximadamente 1:2.

55 Preferentemente, el KCl está presente en una cantidad eficaz para la precipitación de carbohidratos en la muestra. Preferentemente, el KCl está presente a un nivel de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % en peso en una solución de disolvente que comprende de 60 % a aproximadamente 80 % de disolvente orgánico acuoso. Preferentemente, la relación de volumen de muestra con respecto al volumen de solución de KCl está en el intervalo de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:15. Preferentemente, el disolvente es metanol (MeOH). Alternativamente, el disolvente puede ser un alcohol superior, por ejemplo, propanol.

60 Como se hace referencia en la presente descripción, los productos de degradación de los carbohidratos son monosacáridos y/u oligosacáridos cortos, y/o los productos de degradación de los lípidos son glicerol y/o ácidos grasos, y/o el producto de degradación de las proteínas son aminoácidos y/u oligopéptidos.

65 El método puede comprender además la centrifugación de la muestra tratada con TCA, preferentemente a 10.000 rpm durante 10 minutos, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 48 horas después del tratamiento, preferentemente aproximadamente 24 horas después del tratamiento.

En una modalidad preferida, la muestra fisiológica mixta a analizar se aísla del MSI, por ejemplo, un MGS al que se le ha añadido un analito.

5 En un ejemplo, el MSI o MGS es automatizado, es decir, la transferencia de muestras desde la boca al estómago y/o desde el estómago al intestino delgado es automatizada. En otra modalidad, el muestreo de la muestra fisiológica mixta de las fases salival, gástrica y/o pancreática es automatizado.

#### Métodos experimentales

10

#### Preparación de líquidos GI sintéticos

Los líquidos GI sintéticos no están específicamente tamponados, pero se han diseñado para simular los cambios de pH y el contenido iónico del tracto GI. Los líquidos pueden prepararse como soluciones de reserva, las enzimas se añaden frescas antes de cada ejecución. Todos los productos químicos y enzimas se adquirieron de Sigma-Aldrich a menos que se indique lo contrario.

20 Saliva sintética: Se preparó  $\alpha$ -amilasa (Sigma-Aldrich) a 1  $\mu$ l/ml en diluyente salival (62 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 6 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 15 mM de NaCl, 6,43 mM de KCl, 3 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , titulado a pH 7,4). Antes de ejecutar la prueba, la mezcla de diluyente salival y 1  $\mu$ l/ml de  $\alpha$ -amilasa se diluyeron 1:1 con agua desionizada para proporcionar la saliva sintética como se utiliza en la presente descripción.

25 Jugo gástrico sintético: Se prepararon 40  $\mu$ g/ml de lipasa gástrica bacteriana (Amano Enzyme Company) y 0,5 mg/ml de pepsina porcina (Sigma-Aldrich) en diluyente gástrico (49,6 mM de NaCl, 9,4 mM de KCl, 2 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 5 mM de urea, titulado a pH 2,0).

30 Jugo pancreático sintético: Se prepararon 70 mg/ml de pancreatina (Sigma-Aldrich) en diluyente pancreático (110 mM de  $\text{CHNaO}_3$ , 2,5 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 54,9 mM de NaCl, 1 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,67 mM de urea y 1 g/l de mucina titulado a pH 8) y se filtró a través de lana de vidrio. La bilis porcina fresca se extrajo de las vesículas biliares porcinas frescas (recolectadas en hielo desde el matadero). Se recolectaron aproximadamente 50 vesículas biliares por lote. La bilis recolectada se combinó, se mezcló y se congeló en alícuotas de 25 ml para su almacenamiento, ya que se requieren 25 ml para cada réplica.

#### Preparación del sustrato

35

Todos los sustratos, muestras y controles se analizan por triplicado. Los sustratos de proteínas, triglicéridos y carbohidratos pueden analizarse por separado o en un modelo mixto, pero se describen aquí por separado. Las mezclas de sustratos se completan a 10 ml con saliva sintética como se describe más adelante y se incuban en incubadoras con rotor durante 10 minutos antes de su adición al depósito en reposo del diluyente gástrico.

40

45 Digestión de grasas - Se han validado seis triglicéridos de longitudes variables de cadena de ácido graso en el sistema de intestino modelo (Tabla 1). Para la validación de los triglicéridos que liberan ácidos grasos (FA) con valores bajos de pKa (indicados \* en la Tabla 1), el *diluyente pancreático* se modificó a 322,8 mM de  $\text{NaHCO}_3$  para contrarrestar una disminución del pH a medida que se liberan los FA. Se usó trioctanoato de glicerilo como sustrato de triglicéridos para todas las pruebas de digestión de grasas informadas en la presente descripción. En estos experimentos, se añadieron 2 mmol (0,94136 g) de trioctanoato de glicerilo a las preparaciones de saliva sintética a T[-10] en donde T[-10] significa 10 minutos antes de la adición de la saliva sintética al sistema de prueba.

50 La Tabla 1 ilustra los 6 sustratos de triglicéridos analizados y los pKa de sus ácidos grasos constituyentes.

50

Tabla 1

Triglicérido	Ácido graso	pKa
Triacetina*	Ácido acético	4.5
Tributirato de glicerilo*	Ácido butírico	4.84
Trioctanoato de glicerilo*	Ácido octanoico (ácido caprílico)	4.9
Tripalmitato de glicerilo	Ácido palmítico	9.7
Trioleoato de glicerilo	Ácido oleico	9.95
Triestearato de glicerilo	Ácido esteárico	10.15

65

- 5 Digestión de carbohidratos: El almidón de maíz, trigo y patata, tanto en sus formas nativas como gelatinizadas, se han validado como sustratos de carbohidratos en el sistema de intestino modelo (MGS). El almidón de maíz nativo se ha usado como sustrato de carbohidratos para todas las pruebas de digestión de carbohidratos informadas en la presente descripción. Para investigar la digestión de carbohidratos, se añadió 1 g de almidón de maíz a la preparación de saliva sintética a T[-10]
- 10 Digestión de proteínas: Para distinguir los efectos en la digestión de proteínas de las fases gástrica y pancreática de la digestión, se llevaron a cabo pruebas separadas de proteólisis gástrica y pancreática.
- 15 Digestión gástrica de proteínas: La albúmina sérica bovina (BSA) y la caseína han sido validadas como sustratos de proteínas en el sistema de intestino modelo. La BSA se adquirió de Fisher Scientific y se ha usado como sustrato de proteínas para todas las pruebas de digestión de proteínas informadas en la presente descripción. En la fase gástrica se añadió 0,5 g de BSA a los diluyentes salivales a T[-10] y la prueba se ejecutó hasta el final de la fase gástrica a T[60].
- 20 Digestión de proteínas en el intestino delgado: Para las pruebas de digestión de proteínas en la fase del intestino delgado, se añadió 1 g de BSA a la saliva sintética a T[-10] y no se incluyó la pepsina gástrica en el diluyente gástrico para evitar cualquier digestión de proteínas en la fase gástrica.
- Preparación de muestras de control y de prueba
- 25 Para los controles de fondo se prepararon 10 ml de saliva sintética sin sustrato.
- Para el análisis de muestras el sustrato se preparó de acuerdo con la metodología para la preparación del control de sustrato con cantidades conocidas de diferentes muestras de prueba añadidas. Para los controles de muestra se preparan 10 ml de saliva sintética con una cantidad adecuada de la muestra de prueba, pero sin sustrato.
- 30 Para el análisis de biopolímeros se prepararon 125, 250 y 500 mg de muestra de biopolímero con preparaciones salivales sintéticas. Se han usado Acarbosa, Orlistat, polisulfato de pentosano e inhibidor de tripsina de soya como controles de inhibición positiva para  $\alpha$ -amilasa, lipasa, pepsina y tripsina, respectivamente.
- Los inhibidores se prepararon de acuerdo con los métodos de la bibliografía en concentraciones apropiadas para lograr la inhibición.
- 35 Las muestras de alginato y Fucoidan fueron proporcionadas por FMC Biopolymer. El alginato es un polisacárido no digerible y como tal puede considerarse una fibra dietética. Los alginatos son polisacáridos no ramificados compuestos de residuos de ácido (1-4)- $\alpha$ -L-gulurónico (residuos G) y de ácido (1-4)- $\beta$ -D-manurónico (residuos M). Las cadenas poliurónicas se componen de bloques de aproximadamente 20 residuos que son ya sea ricos en G, ricos en M o ricos en MG. Las características del alginato son dictadas por la disposición de estos bloques. El alginato tiene propiedades bioactivas. El fucoidan es un polisacárido altamente sulfatado extraído de algas pardas (FMC Biopolymer).
- 40 Equipo
- 45 Los líquidos GI sintéticos se incubaron previamente a 37 °C en un baño de agua. Se prepararon vasos de muestra (vasos de vidrio de 3 x 500 ml) en un baño de agua a 37 °C con agitadores por encima para simular la agitación del estómago. Se ajustó una bomba peristáltica Watson Marlow a 0,5 ml/min. Se usó un espectrofotómetro de placas de 96 pocillos BioTek EL808 para el análisis de muestras. La configuración del equipo se ilustra en la Figura 1.
- Análisis de muestra en el MGS
- 50 Todos los sustratos, muestras y controles se analizaron por triplicado. Los sustratos de proteínas, triglicéridos y carbohidratos pueden analizarse por separado o en un modelo mixto y se describen aquí por separado.
- 55 Fase salival - En T[-10], las preparaciones salivales que contenían sustrato/muestra/controles se prepararon como se indicó anteriormente en el presente documento y se incubaron durante 10 minutos en incubadoras con rotor.
- 60 Fase gástrica - En T[0] las preparaciones salivales se añadieron a un depósito en reposo de 50 ml de jugo gástrico sintético que se había incubado previamente a 37 °C en un baño de agua con un agitador por encima. Se añadió jugo gástrico sintético adicional (preincubado a 37 °C) inmediatamente a una tasa de 0,5 ml/min mediante el uso de una bomba peristáltica. Debido al riesgo de autodigestión de la pepsina, el diluyente gástrico se preparó inmediatamente antes de ejecutar la prueba a T[-20].
- 65 Fase pancreática - En T[60] se añadieron 25 ml de bilis porcina fresca, se detuvo el bombeo del jugo gástrico sintético y se bombeó el jugo pancreático sintético filtrado al sistema a una tasa de 0,5 ml/min. En los ejemplos en la presente descripción la fase del intestino delgado se continúa hasta T[180]. Sin embargo nuestros experimentos han demostrado que esta fase puede prolongarse. En la Figura 2 se muestra un esquema del proceso general para el análisis individual

de los sustratos de proteínas, triglicéridos y carbohidratos y en la Figura 26 se muestra un modelo anatómico correspondiente del proceso.

Figura 2: Ilustra el procedimiento general donde se incuban una preparación salival que comprende una muestra de prueba (1a), o un control (1b), y el sustrato (3) durante 10 minutos en incubadoras con rotor, de cero a 10 minutos, de T-10 a T0, durante la fase salival [A], y después se añade a un depósito en reposo que contiene 50 ml de un jugo gástrico sintético inicial (preincubado a 37 °C en baño de agua con agitador por encima) al comienzo de la fase gástrica [B]. Durante la fase gástrica, de 0 a 60 minutos, T0 a T60, se añade jugo gástrico adicional a una tasa de 0,5 ml/min con una bomba peristáltica. A T60, se añaden 25 ml de bilis porcina fresca, que corresponde al comienzo de la fase pancreática [C] y se detuvo el bombeo de jugo gástrico sintético y se bombeó el jugo pancreático sintético filtrado a una tasa de 0,5 ml/min. En los ejemplos actuales la fase del intestino delgado se continúa hasta 2 horas desde el comienzo de la fase salival, T180.

#### Muestreo

En todos los experimentos, se tomaron muestras de datos de 0,5 ml a T0, T5, T10, T15, T30, T45, T60, T60<sup>B</sup>, T65, T70, T75, T90, T105, T120, T150 y T180, en donde (T60<sup>B</sup>) representa una segunda muestra a T60 que se tomó después de la adición de la bilis porcina fresca. Las muestras de prueba se precipitaron inmediatamente con TCA al 10 % (p/v) (ácido tricloroacético) en una proporción de 1:1. Esta etapa se incluye para detener la actividad de la enzima y precipitar las proteínas no digeridas. Las muestras de prueba se almacenaron a 4 °C durante toda la noche para permitir la precipitación y después se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos, después de lo cual se analizó el sobrenadante. En el cálculo de los resultados de la prueba, se tienen en cuenta la dilución del volumen del líquido GI sintético, así como también la dilución de la muestra en TCA.

#### Análisis

Análisis de glicerol - La digestión de triglicéridos puede medirse mediante el uso del Reactivo A de glicerol de ZenBio para cuantificar la liberación de glicerol. Se incubaron 5 µl de la muestra con 80 µl del Reactivo A durante 30 minutos y se midió el desarrollo de color a 550 nm. Se preparó una curva estándar a partir de una solución de reserva de glicerol de 2,5 mM.

Análisis de almidón - Para separar los productos de la digestión con maltasa del sustrato de almidón no digerido, se mezclaron 50 µl de sobrenadante con 950 µl de solución de KCl al 1% (p/v), metanol al 75% (v/v) y después de 20 minutos se centrifugaron a 10k rpm durante 10 minutos. Después se evaporaron 500 µl del sobrenadante resultante hasta un volumen de 100 µl. Una vez enfriado a 37 °C, se añadieron 50 µl de 1 mg/ml de alfa glucosidasa (Sorachim) y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. La glucosa liberada se analizó después mediante el uso del kit de análisis de D-Glucosa de Megazyme (glucosa oxidasa/peroxidasa; GOPOD).

Análisis de la proteólisis - Los polipéptidos no digeridos se eliminaron sustancialmente de las muestras mediante precipitación con TCA y centrifugación. La digestión de proteínas puede medirse mediante el análisis de los aminoácidos y oligopéptidos cortos que permanecen en el sobrenadante con el kit de análisis de proteína totales con BCA de Pierce. El Reactivo de trabajo (WR) se preparó mediante la mezcla del Reactivo A con el Reactivo B en una relación de 50:1. Se incubaron 25 µl de la muestra con 200 µl de WR a 37 °C durante 30 minutos y se midió el desarrollo de color a 575 nm. Se preparó una curva estándar mediante el uso una solución de reserva de BSA a 2 mg/ml.

#### Resultados experimentales

Los resultados de los experimentos de control y de prueba se ilustran en las Figuras 3 a 25.

#### Análisis de los resultados experimentales

Figura 3: Ilustra en formato gráfico los resultados obtenidos del análisis de los aminoácidos y oligopéptidos cortos que permanecen en el sobrenadante con el kit de análisis de proteínas totales con BCA de Pierce. Para preparar las muestras de prueba, los polipéptidos no digeridos se eliminan de las muestras mediante precipitación con TCA y centrifugación. El Reactivo de trabajo (WR) se preparó mediante la mezcla del Reactivo A con el Reactivo B en una relación de 50:1. Se incubaron 25 µl de la muestra con 200 µl de WR a 37 °C durante 30 minutos y se midió el desarrollo de color a 575 nm. Se prepara una curva estándar mediante el uso de una solución de reserva de BSA a 2 mg/ml. La Figura 3 muestra que solo se reporta el 37,76 % de BSA en esta prueba con BCA después de la proteólisis completa. Esto puede corregirse mediante la multiplicación de los resultados por un factor de 2,648.

Figura 4: Muestra que en la fase pancreática del MGS, desde T60 a T180 minutos, solo se detecta el 60,325 % de la proteína digerida. La digestión en bilis se representa por (▨) y la digestión en tampón se representa por (◆). Si bien no se desea unirse a ninguna teoría particular, se propone en la presente descripción que esta baja detección se debe a la unión de metabolitos proteicos a la bilis. Para tener en cuenta esta unión a la bilis y el reporte subestimado del Ensayo analizado en la Figura 3, los solicitantes multiplican los datos del análisis de la digestión de proteínas en la fase de intestino delgado por un factor de 6,675 para corregir estos factores. Figura 5: Ilustra los resultados obtenidos para una digestión

- controlada de trioctanoato de glicerilo en el sistema de intestino modelo (MGS) en donde T[0] representa el comienzo de la fase gástrica de la digestión. Se digirieron 2 mmol de trioctanoato de glicerilo (digestión de control). El gráfico muestra el glicerol total recuperado del sistema de intestino modelo después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad enzimática. La digestión de control se representa como (■). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar. Como se mostró anteriormente en la Figura 4, no se produjo una liberación significativa de glicerol durante la fase salival, antes de la adición al depósito gástrico en reposo. De manera similar, la Figura 5 muestra que, a lo largo de la fase gástrica, desde T(10) hasta T(60) tampoco hubo liberación de glicerol.
- Este dato sugiere que la lipasa gástrica tiene poca o ninguna actividad hacia el trioctanoato de glicerilo. Una vez que el sistema entra a la fase pancreática más allá de T(60), el glicerol comienza a liberarse del trioctanoato de glicerilo.
- Figura 6: Ilustra que para la digestión de trioctanoato de glicerilo en un sistema de intestino modelo (MGS), el glicerol total recuperado del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima varía de acuerdo con el nivel de Orlistat® presente. En estos experimentos, se digirieron 2 mmol de trioctanoato de glicerilo solo como una digestión de control y además en presencia de concentraciones variables de Orlistat. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con Orlistat a 2,5 mg como (▲), 5 mg (▼) y 10 mg (●) respectivamente. Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.
- Figura 7: Ilustra que para la digestión de trioctanoato de glicerilo en un sistema de intestino modelo con y sin FMC3, el glicerol total recuperado del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad enzimática aumenta con el nivel de FMC3 añadido. Se digirieron 2 mmol de trioctanoato de glicerilo solo para simular la digestión de control, además en presencia de concentraciones variables de FMC3. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con FMC3 a 125 mg como (▲), 250 mg (▼) y 500 mg (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.
- Figura 8: Ilustra que el nivel total de glicerol recuperado del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima varía en relación con el nivel de FMC13 y también en relación con la duración del tiempo de digestión. En estos experimentos se digirieron 2 mmol de trioctanoato de glicerilo solo como una simulación de la digestión de control, así como también en presencia de concentraciones variables de FMC13. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con FMC13 a 125 mg como (▲), 250 mg (▼) y 500 mg (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.
- Figura 9: Ilustra que el nivel total de glicerol recuperado del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima varía en relación con el nivel de Fucoïdan y también en relación con la duración del tiempo de digestión. En estos experimentos se digirieron 2 mmol de trioctanoato de glicerilo solo como una simulación de la digestión de control, así como también en presencia de concentraciones variables de Fucoïdan. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con Fucoïdan a 125 mg como (▲), 250 mg (▼) y 500 mg (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.
- Figura 10: Ilustra que el nivel total de glicerol recuperado del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima varía en relación con el nivel de LFR560 y también en relación con la duración del tiempo de digestión. En estos experimentos, se digirieron 2 mmol de trioctanoato de glicerilo solo como una simulación de la digestión de control, así como también en presencia de concentraciones variables de LFR560. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con LFR560 a 125 mg como (▲), 250 mg (▼) y 500 mg (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.
- Figura 11: Ilustra el nivel total de glicerol recuperado del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y la precipitación con metanol-KCl para eliminar los aumentos de almidón no digerido en el tiempo. En estos experimentos se digirió 1 g de almidón de maíz nativo solo como una simulación de la digestión de control y se representa como (■). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.
- Figura 12: Ilustra el nivel total de glucosa recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y la precipitación con metanol-KCl para eliminar el almidón no digerido. En estos experimentos, se digirió 1 g de almidón de maíz nativo solo como una simulación de la digestión de control, se representa por (■), así como también en presencia de Acarbosa a 100 mg como (▲), 50 mg (▼) y 25 mg (◆). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.
- Figura 13: Ilustra el nivel total de glucosa recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y la precipitación con metanol-KCl para eliminar el almidón no digerido. En estos experimentos se digirió 1 g de almidón de maíz nativo solo como una simulación de la digestión de control, se representa por (■), así como también en presencia de concentraciones variables de alginato

FMC13 a 125 mg como (▲), 250 mg (▼) y 500 mg (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

5 Figura 14: Ilustra el nivel total de glucosa recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y la precipitación con metanol-KCl para eliminar el almidón no digerido. En estos experimentos se digirió 1 g de almidón de maíz nativo solo como una simulación de la digestión de control, se representa por (■), así como también en presencia de concentraciones variables de alginato FMC3 a 125 mg como (▲), 250 mg (▼) y 500 mg (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

10 Figura 15: Ilustra el nivel total de glucosa recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y la precipitación con metanol-KCl para eliminar el almidón no digerido. En estos experimentos se digirió 1 g de almidón de maíz nativo solo como una simulación de la digestión de control, se representa por (■), así como también en presencia de concentraciones variables de Fucoidan a 125 mg como (▲), 250 mg (▼) y 500 mg (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

15 Figura 16: Ilustra el nivel total de proteína recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y eliminar los polipéptidos no digeridos. En estos experimentos, se digirió 0,5 g de BSA solo como una simulación de la digestión de control y se representa por (■). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

20 Figura 17: Ilustra el nivel total de proteína recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y eliminar los polipéptidos no digeridos. En estos experimentos, se digirió 0,5 g de BSA solo como una simulación de la digestión de control y en presencia de concentraciones variables de alginato FMC13. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con alginato FMC13 a 125 mg como (▲), 250 mg como (▼) y 500 mg como (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

25 Figura 18: Ilustra el nivel total de proteína recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y eliminar los polipéptidos no digeridos. En estos experimentos, se digirió 0,5 g de BSA solo como una simulación de la digestión de control y en presencia de concentraciones variables de alginato FMC3. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con alginato FMC3 a 125 mg como (▲), 250 mg como (▼) y 500 mg como (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

30 Figura 19: Ilustra el nivel total de proteína recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y eliminar los polipéptidos no digeridos. En estos experimentos, se digirió 0,5 g de BSA solo como una simulación de la digestión de control, y en presencia de concentraciones variables de SP54. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con SP54 a 200 mg como (▲), 100 mg como (▼), 50 mg como (●) y 10 mg como (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

35 Figura 20: Ilustra el nivel total de proteína recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y eliminar los polipéptidos no digeridos. En estos experimentos, se digirió 0,5 g de BSA solo como una simulación de la digestión de control y en presencia de concentraciones variables de Fucoidan. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con Fucoidan a 125 mg como (▲), 250 mg como (▼) y 500 mg como (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

40 Figura 21: Ilustra el nivel total de proteína recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y eliminar los polipéptidos no digeridos. En estos experimentos, se digirió 1 g de BSA solo como una simulación de la digestión de control y se representa como (■). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

45 Figura 22: Ilustra el nivel total de proteína recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y eliminar los polipéptidos no digeridos. En estos experimentos, se digirió 1 g de BSA solo como una simulación de la digestión de control y en presencia de concentraciones variables de SBTI. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con SBTI a 5 mg como (▲), 25 mg como (▼) y 125 mg como (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

50 Figura 23: Ilustra el nivel total de proteína recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y eliminar los polipéptidos no digeridos. En estos experimentos, se digirió 1 g de BSA solo como una simulación de la digestión de control y en presencia de concentraciones variables de FMC3. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con FMC3 a 125 mg como (▲), 250 mg

como (▼) y 500 mg como (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

5 Figura 24: Ilustra el nivel total de proteína recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y eliminar los polipéptidos no digeridos. En estos experimentos, se digirió 1 g de BSA solo como una simulación de la digestión de control y en presencia de concentraciones variables de FMC13. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con FMC13 a 125 mg como (▲), 250 mg como (▼) y 500 mg como (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

10 Figura 25: Ilustra el nivel total de proteína recuperada del sistema de intestino modelo (MGS) después de la precipitación con TCA (ácido tricloroacético) para detener la actividad de la enzima y eliminar los polipéptidos no digeridos. En estos experimentos, se digirió 1 g de BSA solo como una simulación de la digestión de control y en presencia de concentraciones variables de Fucoïdan. La digestión de control se representa como (■) y la digestión con Fucoïdan a 125 mg como (▲), 250 mg como (▼) y 500 mg como (●). Todas las muestras se analizaron por triplicado y los errores se muestran como desviación estándar.

20 A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta descripción, las palabras "comprender" y "contiene" y las variaciones de las palabras significa "que incluyen, pero sin limitarse a", y no se pretende excluir (y no se excluyen) otras porciones, aditivos componentes, enteros o etapas. A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta especificación, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera otra cosa. En particular, donde se use el artículo indefinido en la descripción, se entiende que contempla los plurales, así como los singulares, a menos que el contexto requiera otra cosa.

25 Los rasgos, números enteros, características, compuestos, porciones químicas o grupos descritos junto con un aspecto particular, modalidad o ejemplo de la invención se entiende que son aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente descripción a menos que sea incompatible con estos. Todas las características descritas en esta descripción (que incluyen cualquier reivindicación, resumen y figuras adjuntos), y/o todas las etapas de cualquier método o proceso así descrito, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto las combinaciones donde al menos algunas de tales características y/o etapas son mutuamente excluyentes. La invención no se restringe a los detalles de ninguna modalidad anterior. La invención se extiende a cualquier característica nueva, o cualquier combinación nueva de las características descritas en esta descripción (incluyendo cualquier reivindicación, resumen y dibujos adjuntos), o a cualquier característica nueva o cualquier combinación nueva, de las etapas de cualquier método o proceso así revelado.

35

## REIVINDICACIONES

1. Una prueba para analizar carbohidratos, lípidos, triglicéridos y/o proteínas o productos de degradación de estos; o para simular la digestión de una sustancia comestible/potable, el método que comprende:
  - (a) someter el carbohidrato, lípido, triglicérido, proteína o producto de degradación de estos, o sustancia comestible/potable a una fase salival que consiste en saliva sintética que comprende una mezcla acuosa de una o más enzimas salivales, y uno o más componentes de diluyentes salivales adecuados a un pH en el intervalo de 5 a 9, preferentemente de 6,8 a 7,8;
  - (b) someter el producto de (a) a una fase gástrica que consiste en jugo gástrico sintético que comprende una mezcla acuosa de lipasa gástrica, pepsina y uno o más componentes de diluyentes gástricos adecuados, a un pH de 1,5 a 3,5, en donde la lipasa gástrica está presente a un nivel de desde 8,5 a 250  $\mu\text{g/ml}$  de jugo gástrico sintético y la pepsina está presente a un nivel de desde 85 a 5.000  $\mu\text{g/ml}$  de jugo gástrico sintético y en donde el jugo gástrico sintético se añade a la fase gástrica a una tasa de 0,1 - 2,5 ml/min; y
  - (c) someter el producto de (b) a una fase pancreática que consiste en jugo pancreático sintético que comprende pancreatina y uno o más diluyentes pancreáticos adecuados a un pH de 7 a 9, preferentemente de 7,9 a 8,2 y bilis porcina, en donde:
    - i) cuando la pancreatina es pancreatina dializada, se proporciona a una concentración de 5 a 40 mg/ml de diluyente pancreático y se añade a la fase pancreática a una tasa de 0,1 - 2,5 ml/min; o
    - ii) cuando la pancreatina es pancreatina no dializada, se proporciona a una concentración de 50 a 90 mg/ml de diluyente pancreático, y se añade a la fase pancreática a una tasa de 0,1 - 2,5 ml/min.
2. La prueba según se reivindica en la reivindicación 1 en donde la bilis porcina:
  - (a) es bilis de la vesícula biliar porcina; y/o
  - (b) está presente a un nivel de desde 0,25 a 0,75 ml, preferentemente 0,5 ml, por ml de diluyente pancreático.
3. La prueba según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el diluyente pancreático comprende  $\text{CHNaO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , NaCl,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y urea, opcionalmente en donde el diluyente pancreático comprende además mucina.
4. La prueba según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el jugo pancreático sintético se filtra antes de su uso, opcionalmente en donde el jugo pancreático sintético se filtra mediante el uso de lana de vidrio antes de su uso.
5. La prueba según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la lipasa gástrica es lipasa bacteriana.
6. La prueba según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la pepsina es pepsina porcina.
7. La prueba según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde:
  - (a) el diluyente gástrico comprende NaCl, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y urea; y/o
  - (b) el diluyente salival comprende  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, KCl y  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .
8. La prueba según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la enzima salival es amilasa, preferentemente  $\alpha$ -amilasa, opcionalmente en donde la amilasa está presente a un nivel de 0,01  $\mu\text{l/ml}$  a 2 mg/ml, preferentemente 1  $\mu\text{l/ml}$  de diluyente salival.
9. La prueba según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la saliva sintética está presente como una solución acuosa del 20 % al 80 %.
10. La prueba según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha solución acuosa es una solución 1:1 con agua desionizada.

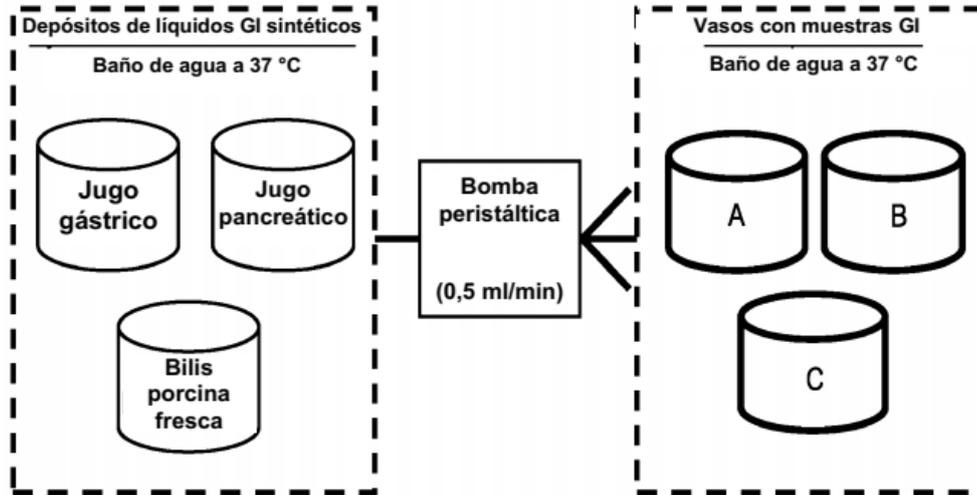


Figura 1

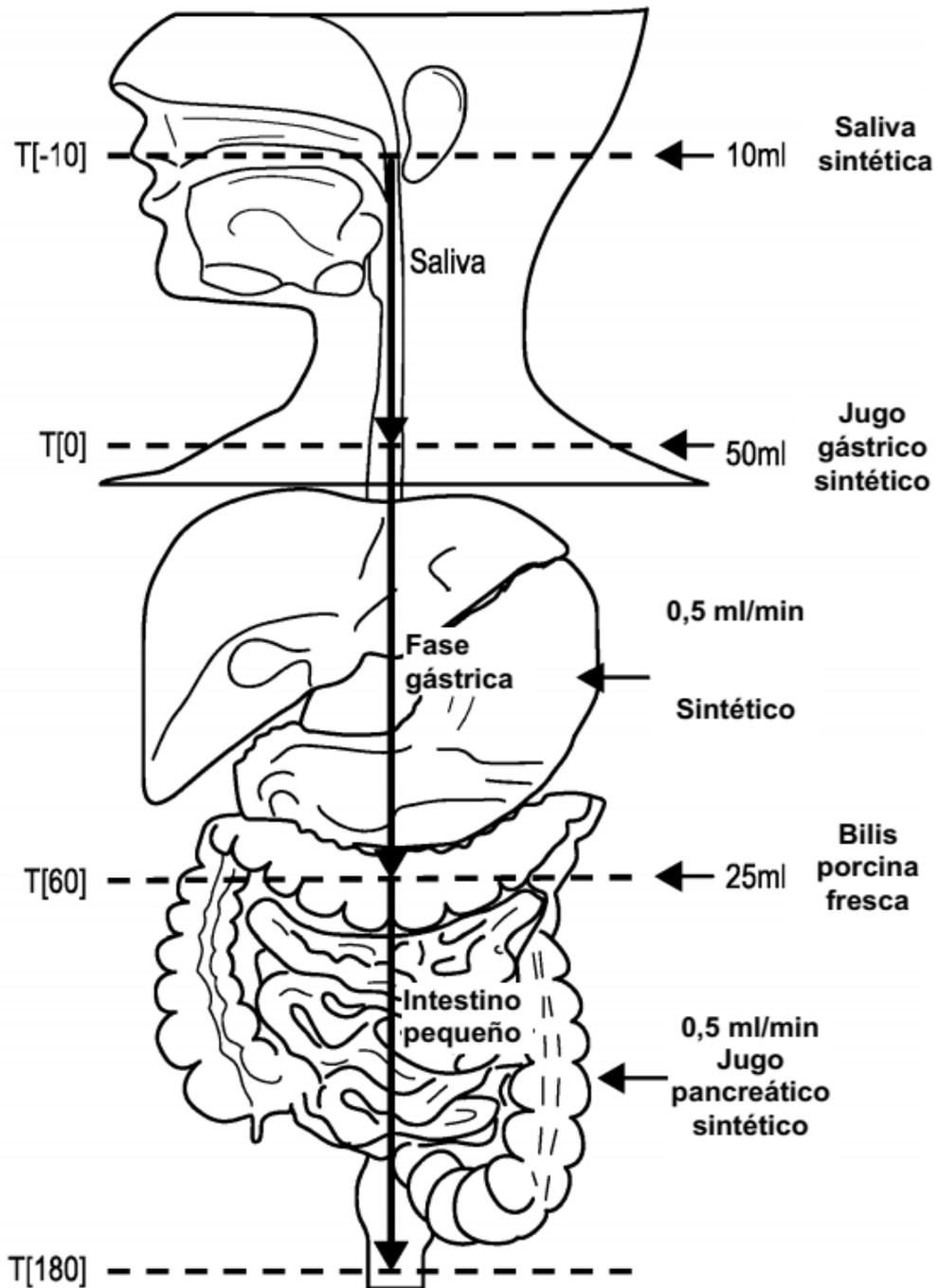


Figura 2

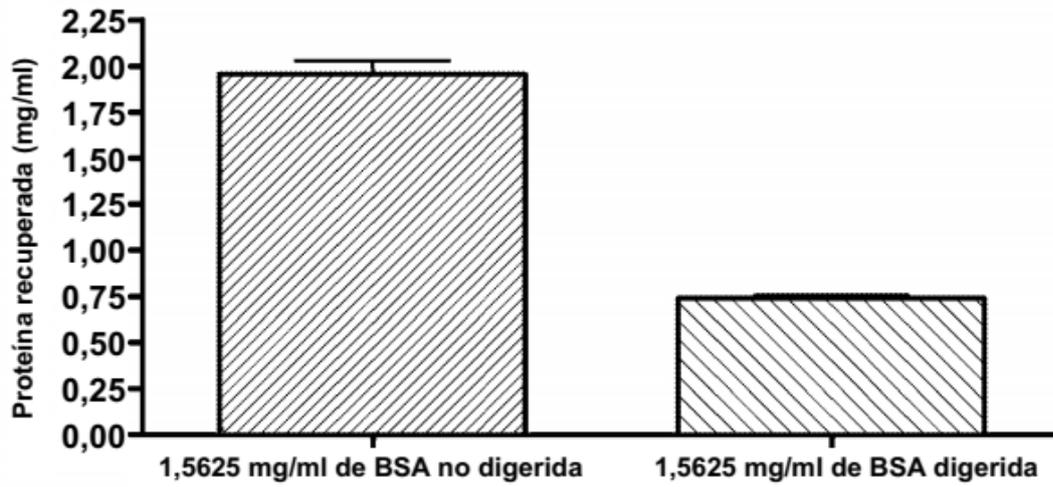


Figura 3

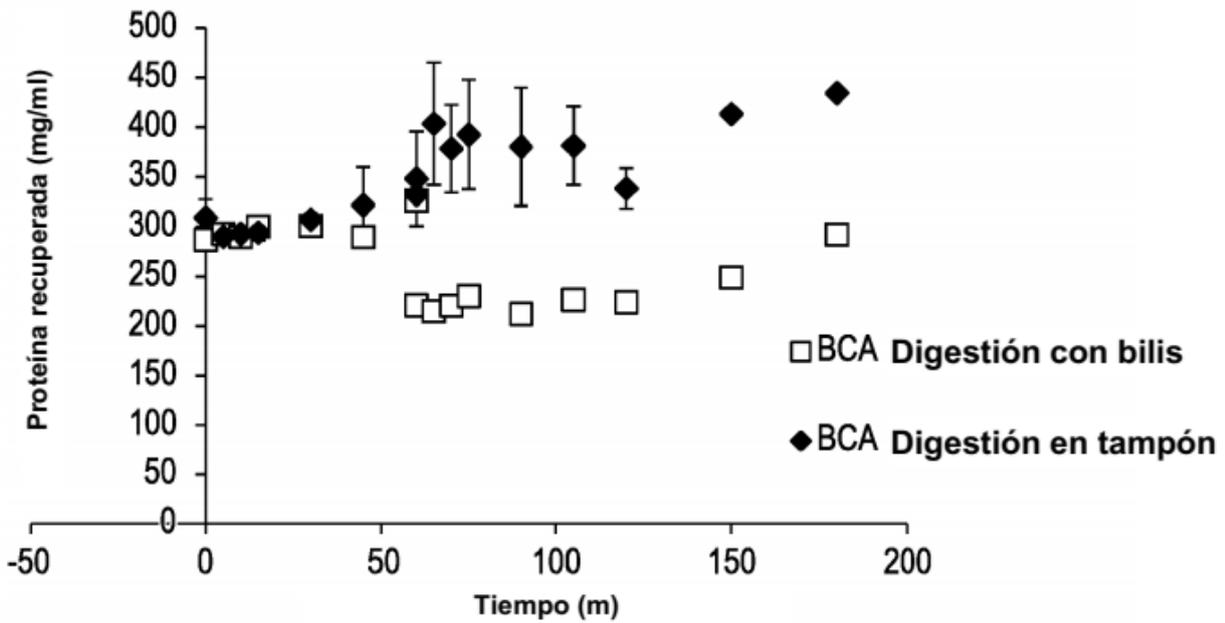


Figura 4

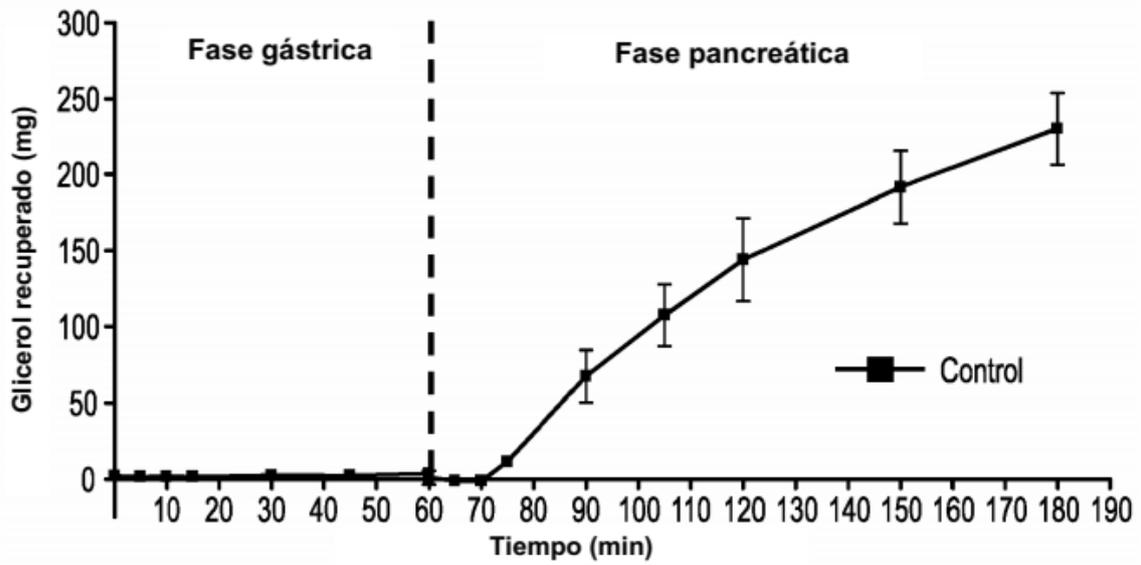


Figura 5

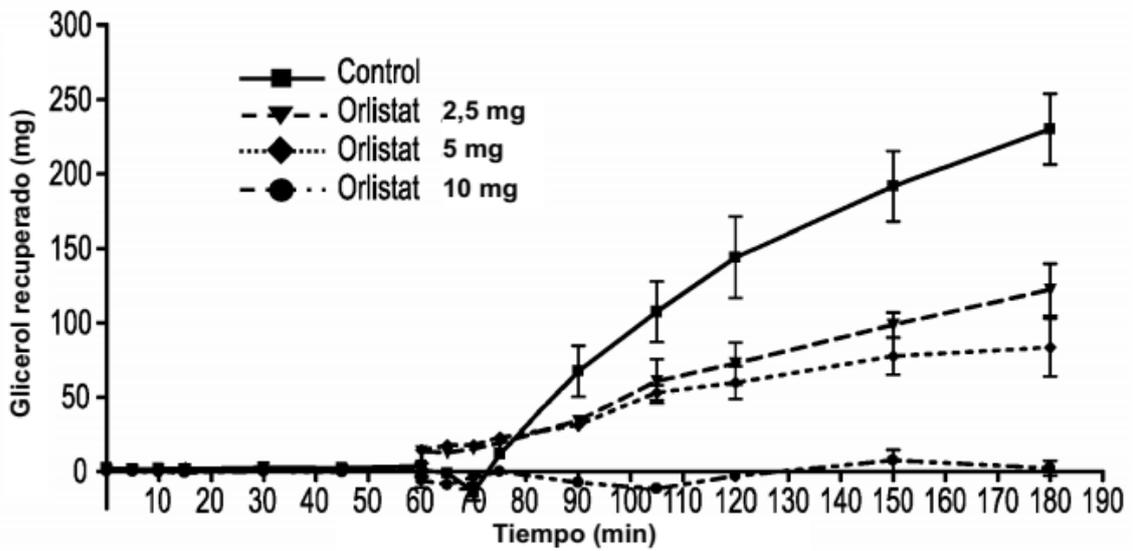


Figura 6

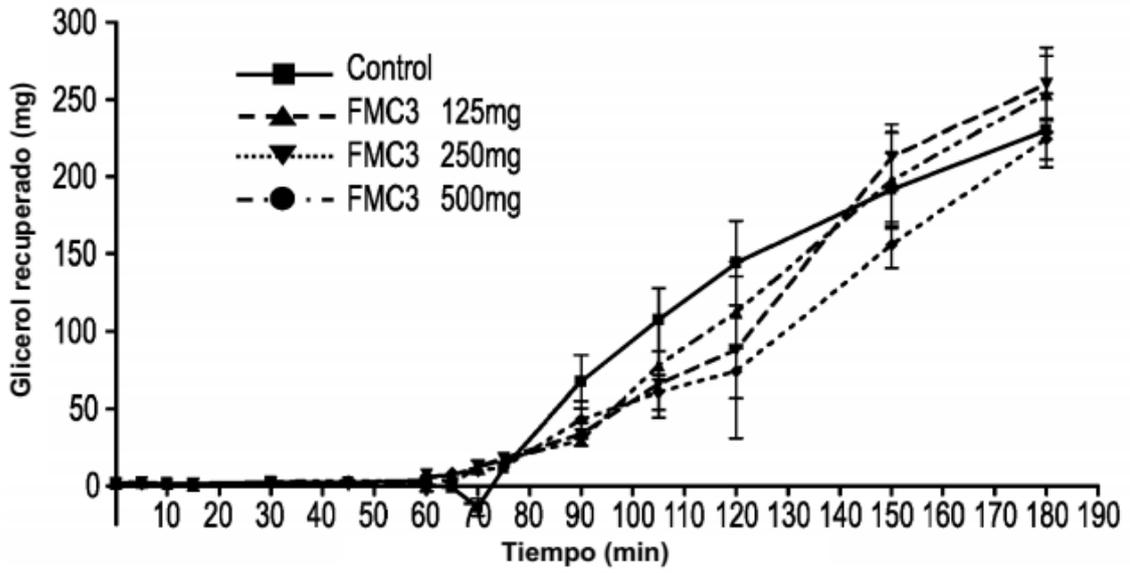


Figura 7

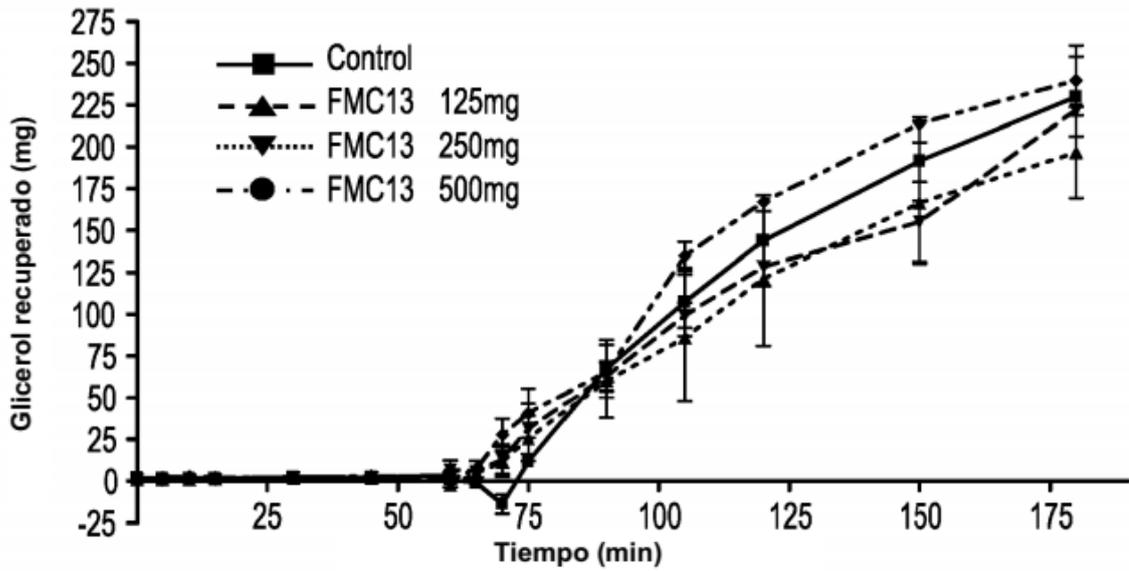


Figura 8

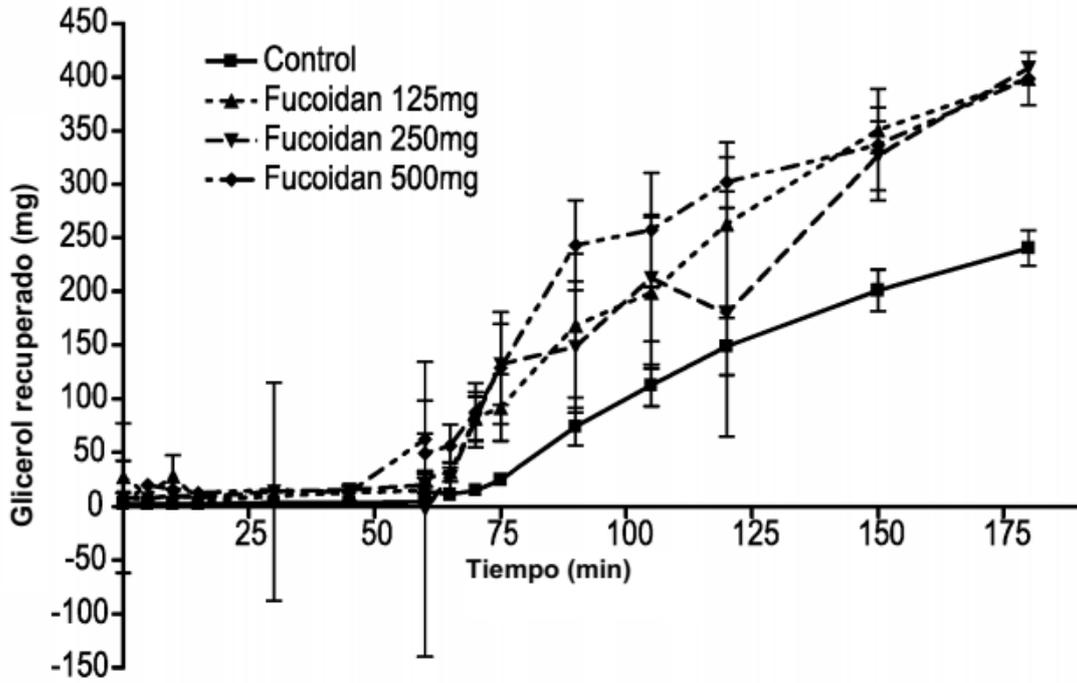


Figura 9

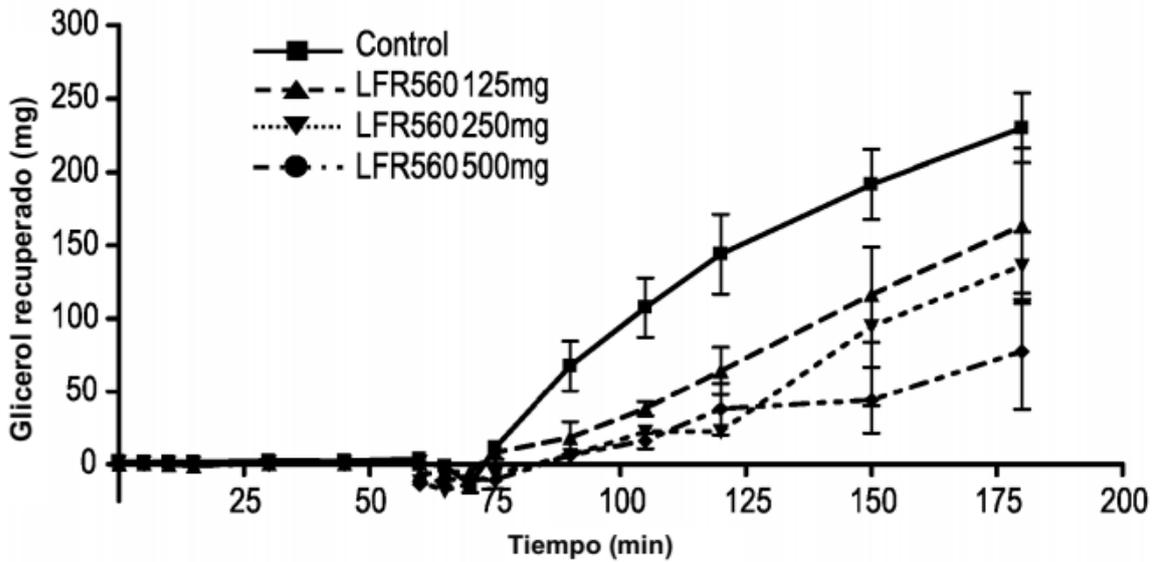


Figura 10

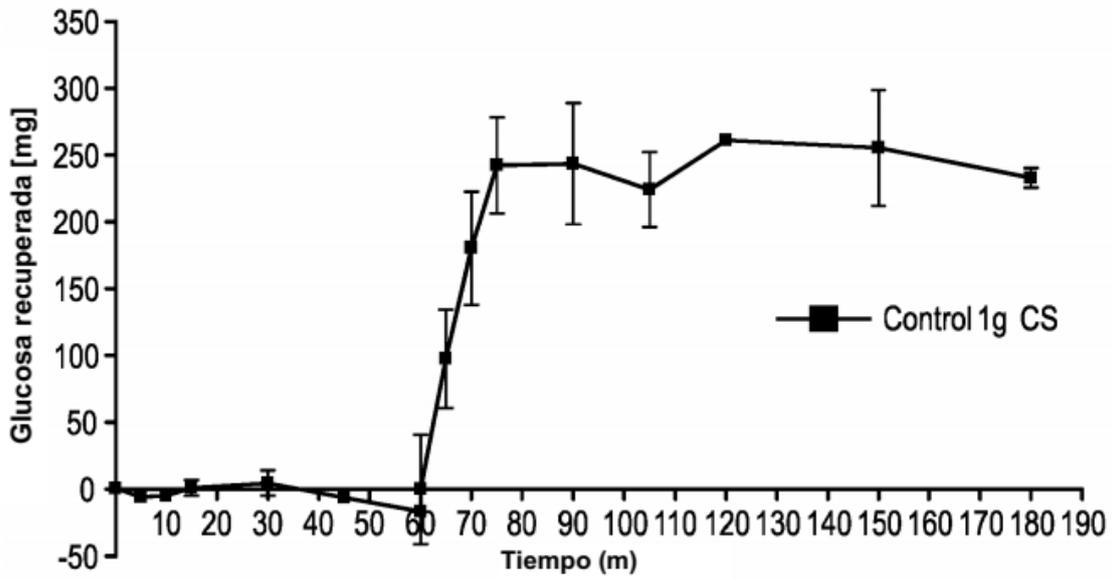


Figura 11

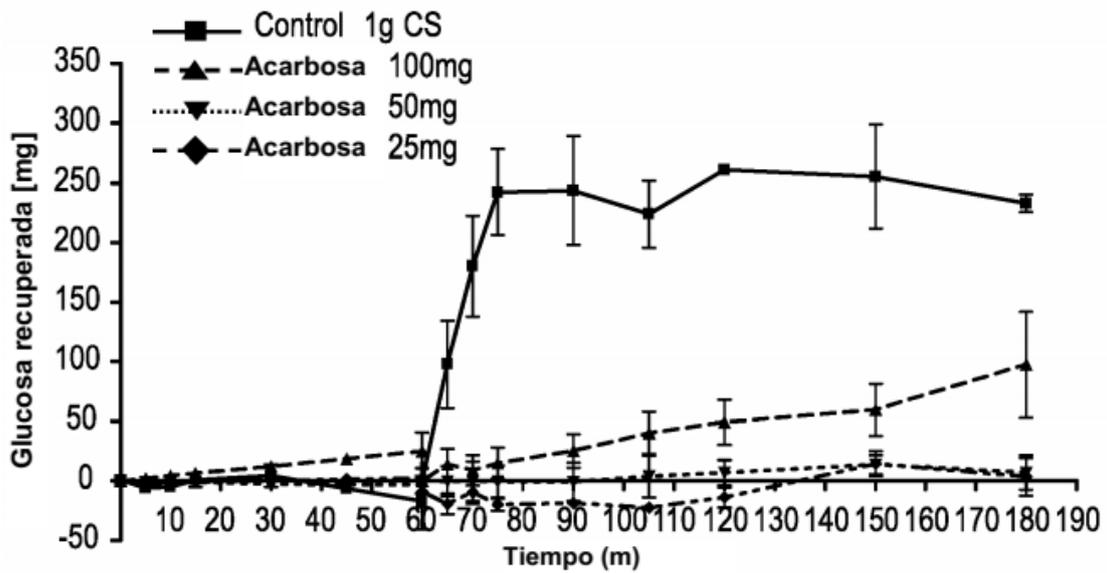


Figura 12

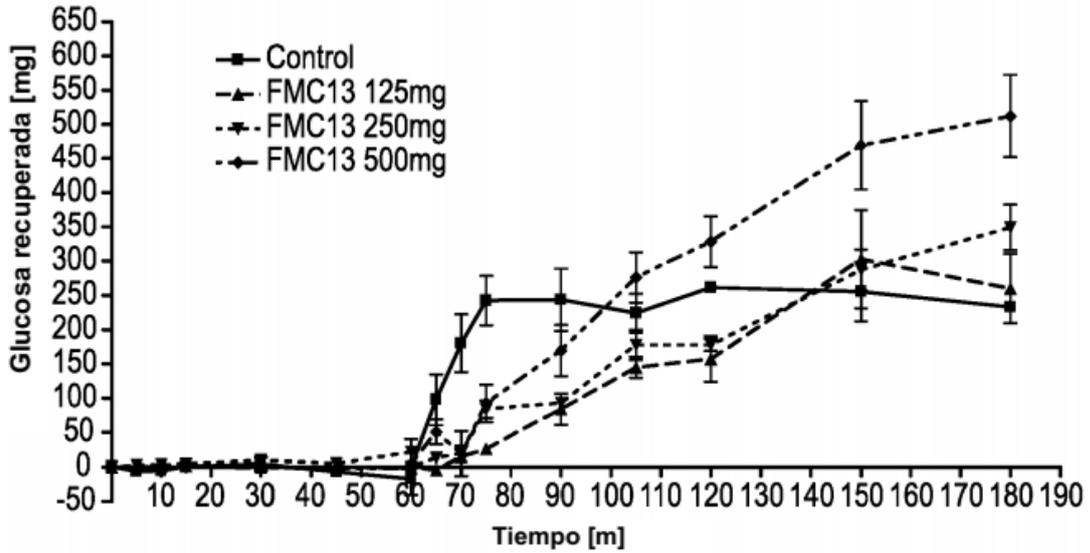


Figura 13

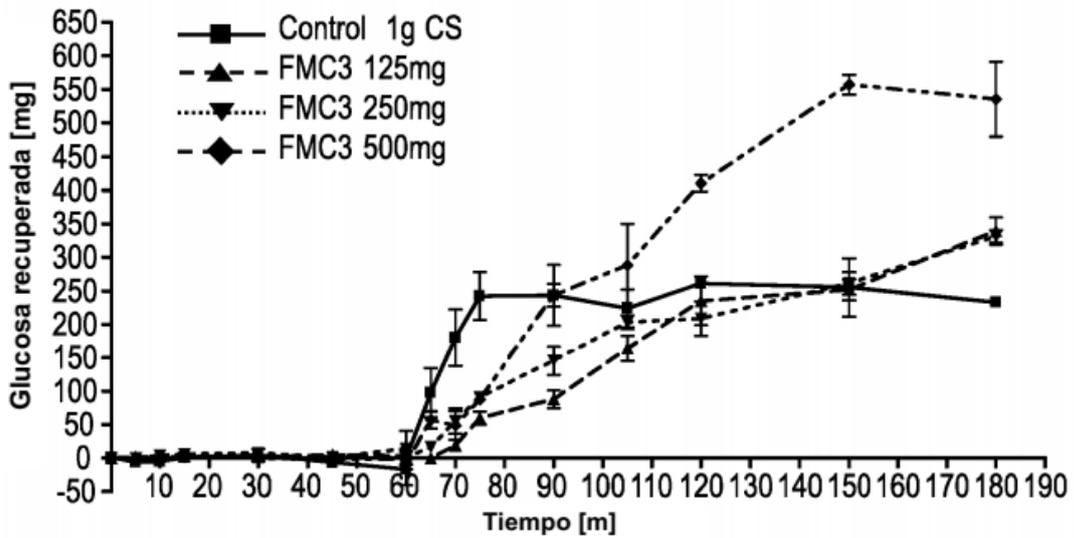


Figura 14

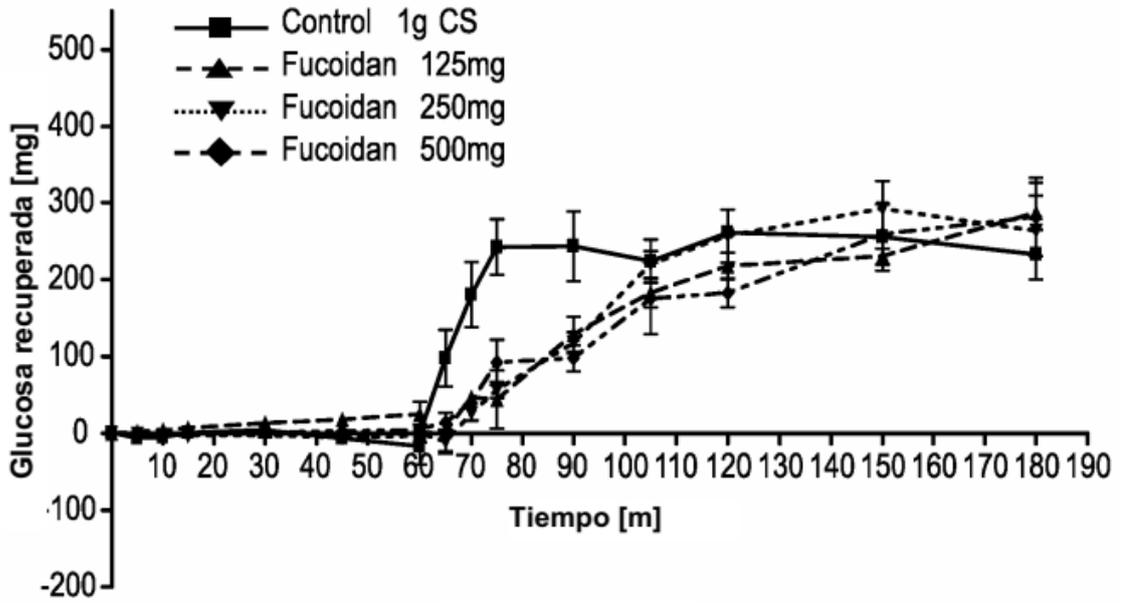


Figura 15

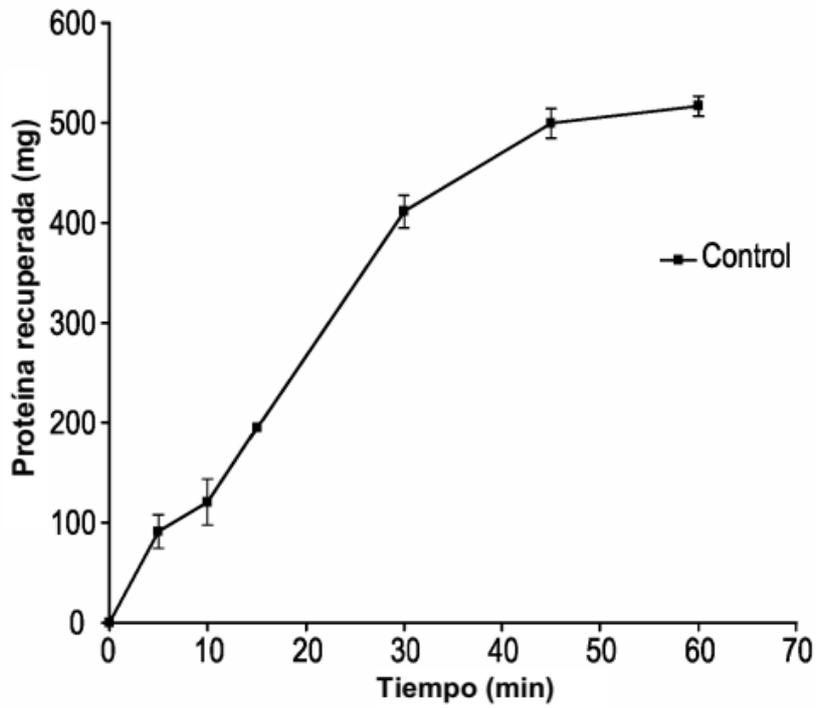


Figura 16

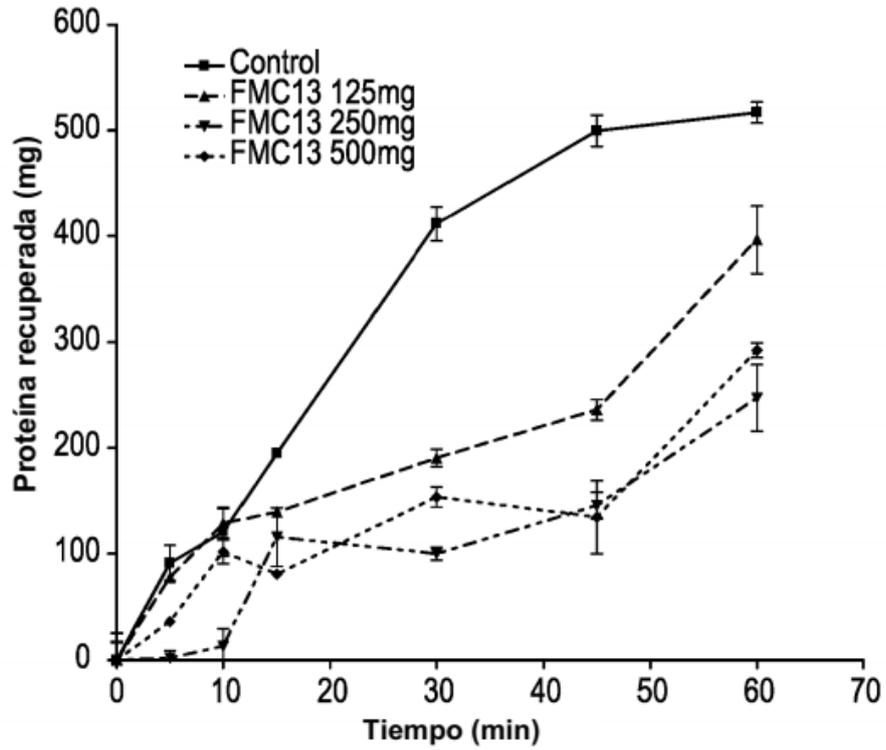


Figura 17

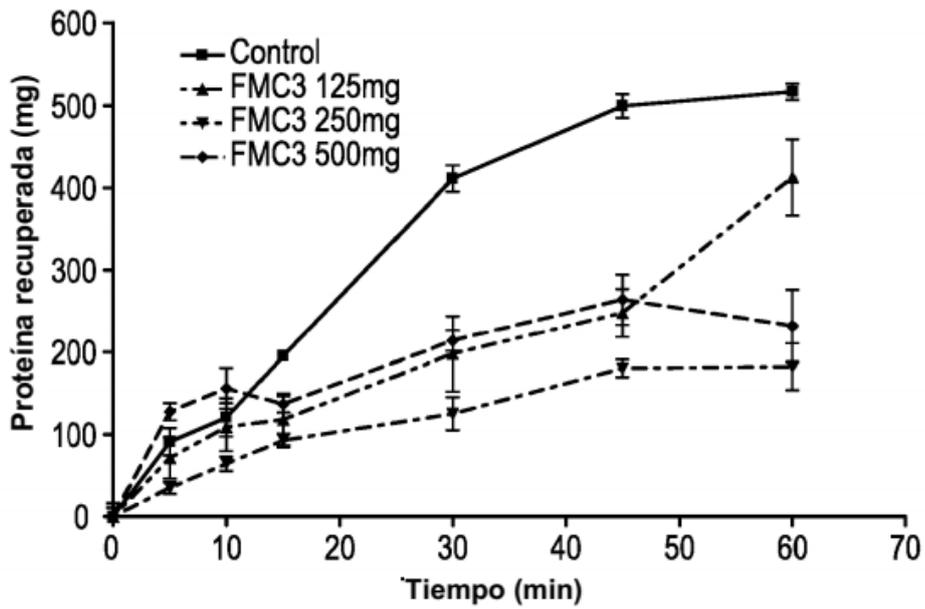


Figura 18

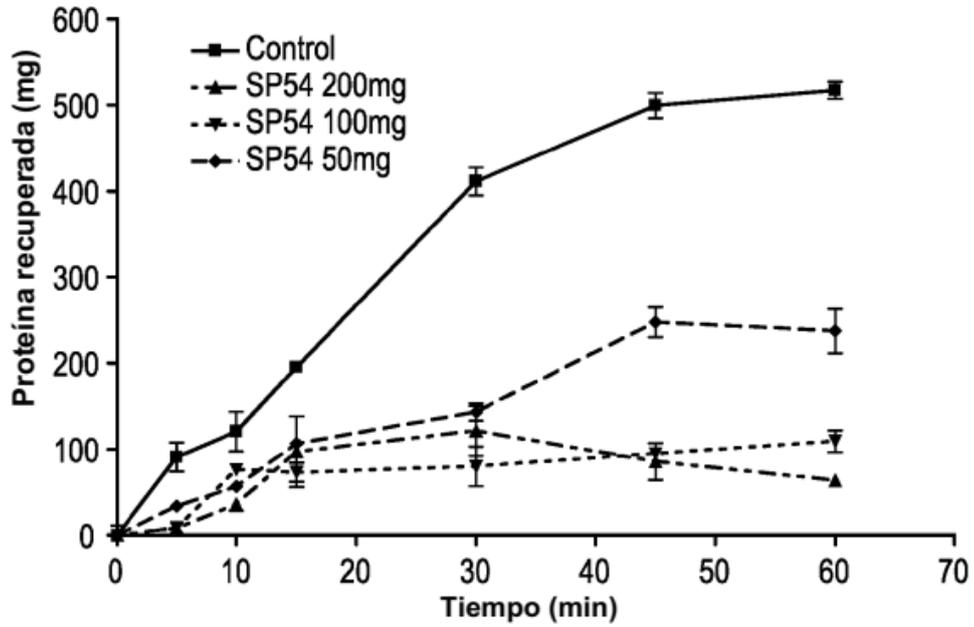


Figura 19

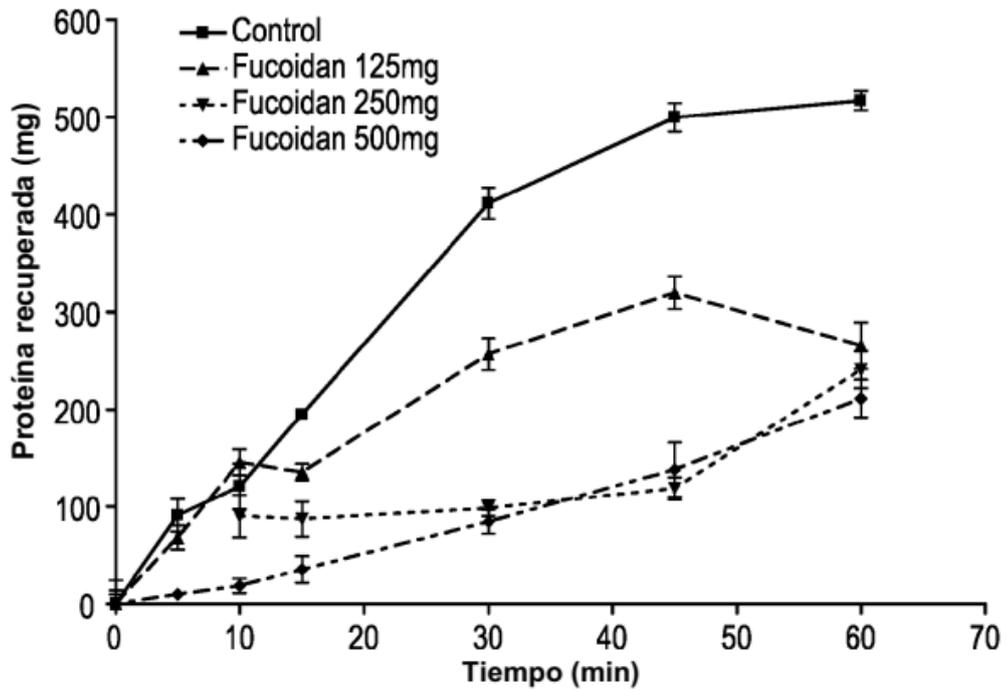


Figura 20

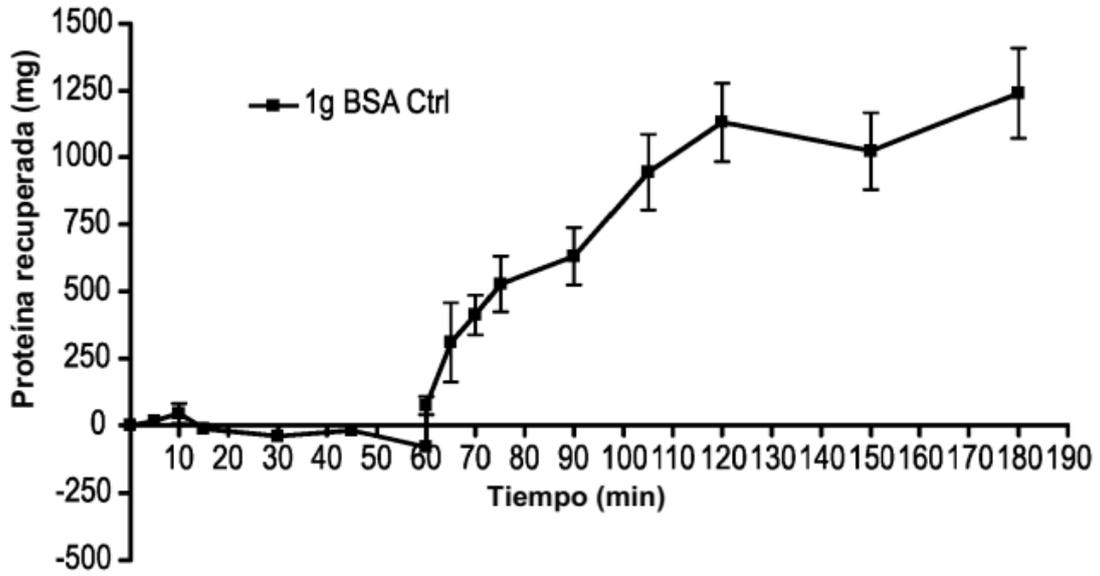


Figura 21

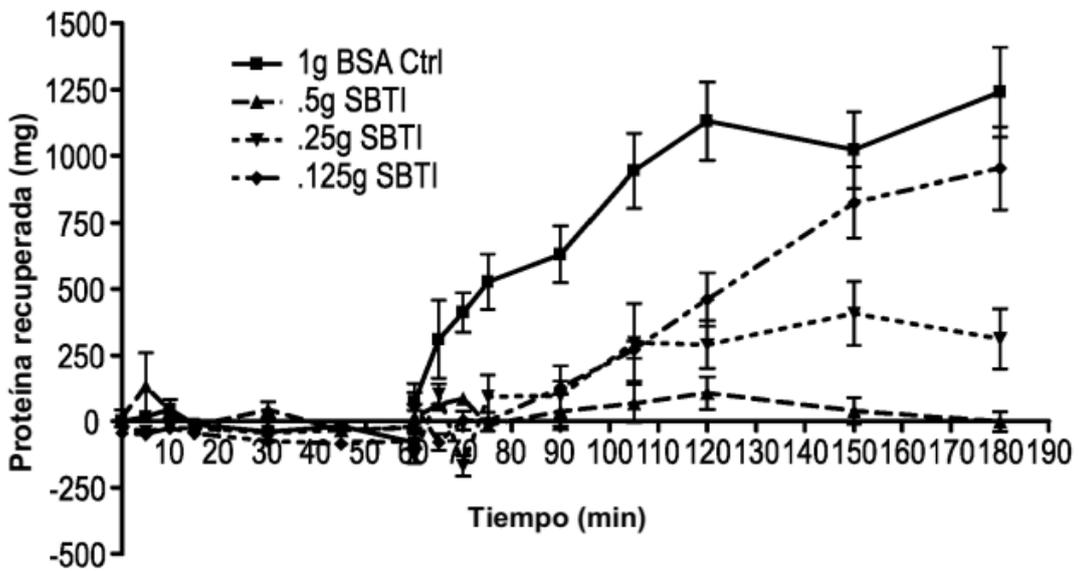


Figura 22

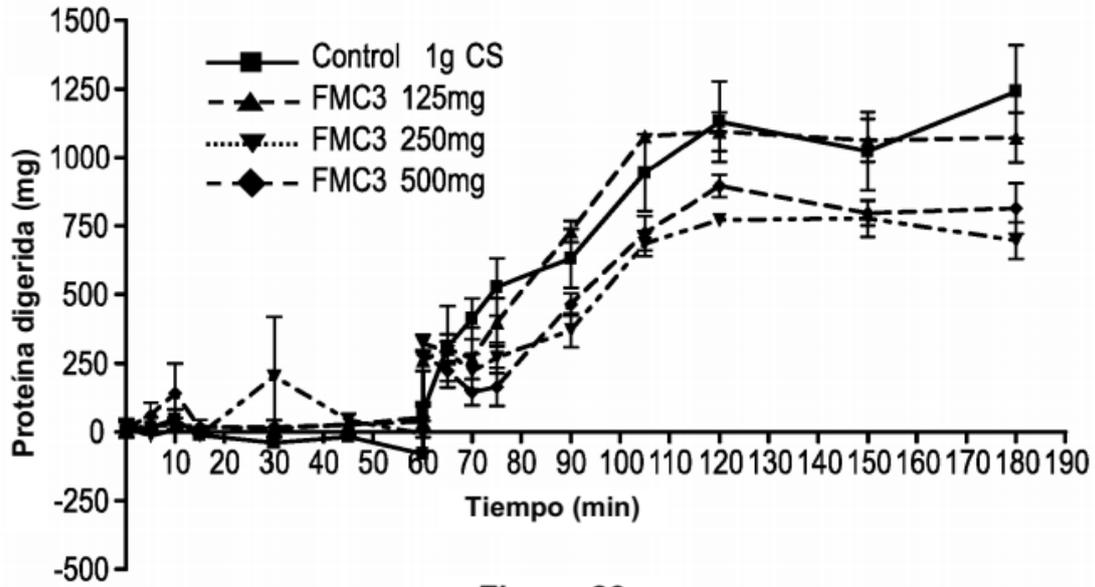


Figura 23

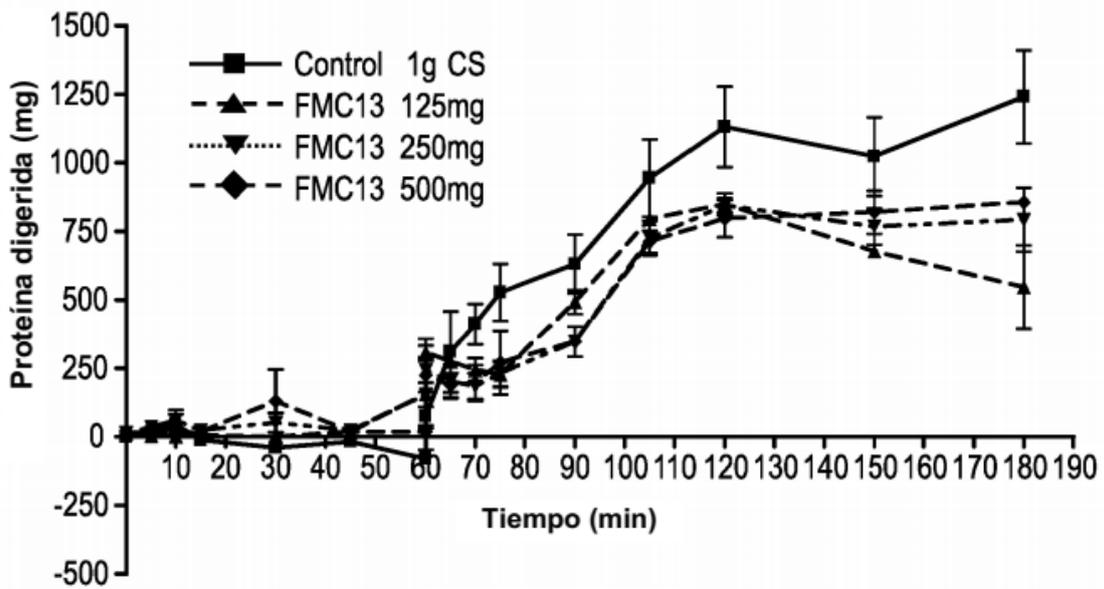


Figura 24

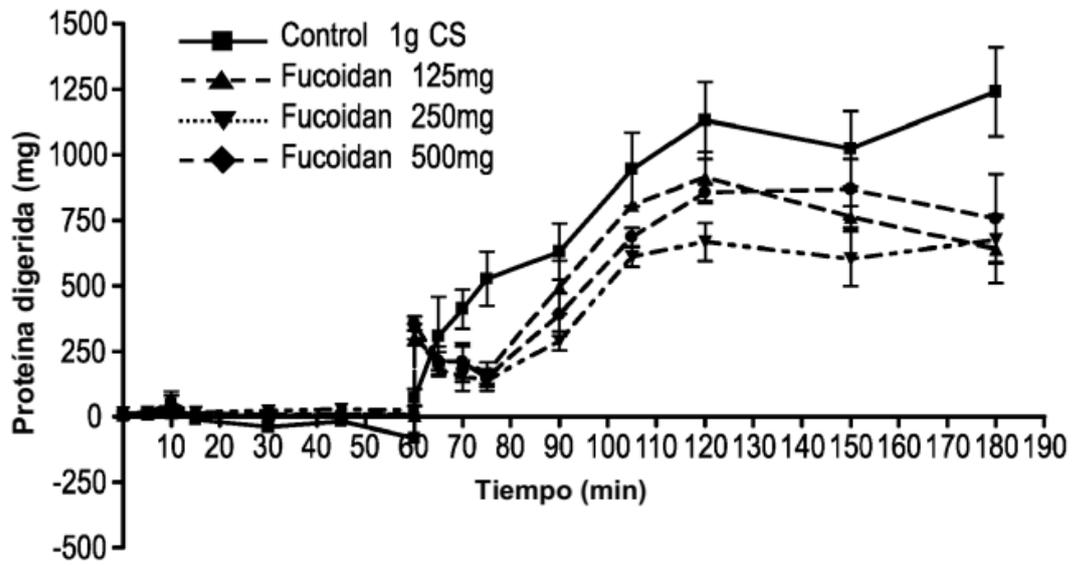


Figura 25