(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 781 848**

(51) Int. Cl.:

A61P 37/02	(2006.01)
A61K 31/702	(2006.01)
A23L 29/30	(2006.01)
A23L 33/10	(2006.01)
A23L 33/125	(2006.01)
A61K 31/70	(2006.01)
A61K 31/732	(2006.01)
A23L 33/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2004** **E 10186333 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020** **EP 2305269**

(54) Título: **Oligosacáridos inmunomoduladores**

(30) Prioridad:

24.10.2003 EP 03078375
25.06.2004 EP 04076877

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.09.2020

(73) Titular/es:

N.V. NUTRICIA (100.0%)
Eerste Stationsstraat 186
2712 HM Zoetermeer, NL

(72) Inventor/es:

STAHL, BERND;
M'RABET, LAURA;
VOS, ARJAN PAUL;
GARSSEN, JOHAN y
BOEHM, GÜNTHER

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 781 848 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

Oligosacáridos inmunomoduladores

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a una composición para usar en la estimulación del sistema inmunitario de pacientes con cáncer que comprende oligosacáridos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] El sistema inmunitario tiene posibles maneras diferentes de reaccionar a un antígeno. Un paso decisivo para el tipo de respuesta inmune es la estimulación de diferentes subpoblaciones de células T. Las denominadas células Th1 producen predominantemente citocinas, que estimulan una respuesta inmune celular (IFN-γ, IL-12, IL-2). En cambio, las células Th2 producen predominantemente IL-4, IL-5 e IL-10. Estas citocinas estimulan una reacción alérgica e inflamación mediadas por IgE y se piensa también que están implicadas en el reclutamiento, la proliferación, la diferenciación, el mantenimiento y la supervivencia de los eosinófilos (es decir, leucocitos que aceptan una tinción de eosina), lo que puede resultar en una eosinofilia. La eosinofilia es una marca distintiva de muchas enfermedades mediadas por las Th2, como el asma, la alergia y la dermatitis atópica. Las citocinas relacionadas con las Th1 y las Th2 actúan de manera antagonista y las respuestas Th1/Th2 están, bajo circunstancias fisiológicas normales, en un equilibrio bien controlado. Ni la respuesta Th1 ni la Th2 prevalece. Si hay un desequilibrio, el dominio de una de las respuestas inmunes Th1 o Th2 juega un papel en, o es responsable de, varias condiciones patológicas.

[0003] Una respuesta inmune Th1 excesiva puede conducir eventualmente a la autoinmunidad, la descomposición de material del propio cuerpo de los individuos, por ejemplo la diabetes *mellitus* insulinodependiente, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn, el pénfigo vulgar, la púrpura trombocitopénica autoinmune, la anemia hemolítica autoinmune.

[0004] Una respuesta Th2 excesiva lleva a una sensibilidad extrema hacia componentes foráneos que no deberían llevar a ninguna reacción inmunológica, por ejemplo alergias y enfermedades relacionadas tales como la dermatitis atópica, el asma, el asma ocupacional, la alergia alimentaria (por ejemplo alergia a la leche de la vaca, alergia a las manzanas, a los cacahuetes y otras alergias a los frutos secos, alergia a los altramuces), la rinitis alérgica (por ejemplo alergia al polen), alergia a los ácaros del polvo y otras formas de hipersensibilidad como la anafilaxia sistémica y la urticaria aguda.

[0005] Un cambio relativo hacia una respuesta Th2 aumentada y/o una respuesta Th1 reducida se encuentra bajo circunstancias de estrés de cualquier tipo, que en consecuencia resulta en una tendencia hacia una respuesta Th2. Tal cambio relativo se observa, por ejemplo, en la inmunosenescencia, pacientes con cáncer, infecciones crónicas, una sobrecarga de ejercicio, conflictos sociales o altas cargas de trabajo, la exposición a componentes tóxicos o radiación y el estrés metabólico conducente a la desnutrición, la caquexia o la desnutrición causada por anorexia. (Janeway (2001) Immunobiology 5ª edición, Garland publishing ISBN 0-8153-3642-x; Roitt et al (2001) Immunology 6ª edición, Harcourt publishing limited, ISBN-0-7234-31892).

[0006] Los efectos bifidogénicos se consideran responsables de, por ejemplo, la reducción y/o la prevención de una infección bacteriana. Se sabe que los oligosacáridos pueden mostrar efectos bifidogénicos.

[0007] Se ha descrito que los oligosacáridos ácidos tienen efectos ventajosos. La WO 02/42484 describe hidrolizados de pectina esterificada para el tratamiento de una infección y/o la prevención de adhesiones de sustancias nocivas a células eucarióticas. La DE 4223613 describe un proceso para la preparación de urónidos insaturados a partir de sustancias similares a las pectinas a través de una fermentación anaeróbica, usando, por ejemplo, una pectato liasa. La preparación se puede usar para el tratamiento médico de una intoxicación por metales pesados.

[0008] También se han descrito combinaciones de oligosacáridos ácidos y neutros. La EP 1105002 describe una composición prebiótica que comprende transgalactooligosacáridos, inulina y oligosacáridos de ácido galacturónico. La US 6576251 describe una combinación de oligosacárido sialilado (disialolacto-N-tetraosa) y galactooligosacáridos, para la profilaxis de síntomas conectados con la adhesión de organismos tales como la gripe. La WO 01/60378

describe mezclas de hidrolizado de pectina insaturada y oligosacáridos neutros para la prevención de la adhesión de patógenos a superficies epiteliales.

[0009] Se conocen fórmulas infantiles que contienen lípidos, proteínas, sacáridos, vitaminas y al menos uno seleccionado de entre disacáridos o sacáridos superiores que contienen galactosa, un derivado de los mismos, sacáridos que contienen ácido N-acetilneuramínico y un derivado de los mismos (EP 1332759).

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0010] Hasta ahora se ha supuesto que la administración de oligosacáridos (ácidos) proporciona un efecto ventajoso mediante la estimulación de la flora bifidogénica y mediante la prevención de la adhesión de patógenos a los tejidos epiteliales.

[0011] Los presentes inventores han descubierto ahora sorprendentemente que marcadores sistémicos para la función del sistema inmunitario se ven influenciados por la administración de oligosacáridos (ácidos). Este hallazgo abre un campo nuevo de aplicación de los oligosacáridos, particularmente para las enfermedades que se pueden tratar en el mejor de los casos por modulación del sistema inmunitario. Por "modulación" o "modulando" se pretende un aumento o reducción en un carácter, calidad, actividad, sustancia o respuesta particular. En otras palabras, se ha descubierto sorprendentemente que los oligosacáridos ácidos y los oligosacáridos neutros son capaces de estimular la respuesta inmune sistémica.

[0012] Los presentes inventores también han descubierto sorprendentemente que los diferentes oligosacáridos tienen diferentes efectos estimuladores sobre el sistema inmunitario. Se ha observado que la administración de oligosacáridos ácidos estimula (relativamente) la respuesta Th1 y reduce la liberación de citocinas Th2 (por ejemplo IL-10, IL-4 e IL-5). También se descubrió que la administración de una combinación de oligosacárido ácido y oligosacárido neutro estimula de forma sinérgica el sistema inmunitario, particularmente reduciendo la respuesta Th2 y aumentando la respuesta Th1.

[0013] Se ha observado que los oligosacáridos se pueden usar ventajosamente para restaurar el desequilibrio en las respuestas Th1/Th2 y para el tratamiento y la prevención de trastornos que están asociados con un desequilibrio Th1/Th2.

[0014] En particular, se descubrió sorprendentemente que la administración de un oligosacárido ácido, combinado con un oligosacárido neutro, es capaz de restaurar el desequilibrio Th1/Th2 y/o mantener un equilibrio Th1/Th2 favorable. También se descubrió que un oligosacárido ácido, en combinación con el oligosacárido neutro, es capaz de estimular la respuesta Th1. Los presentes inventores creen también que la administración de oligosacáridos ácidos y neutros estimula las Th3, es decir, mejora la actividad de las células T reguladoras. Se percibe que la estimulación de la respuesta Th1 se consigue en parte mediante la inhibición de la respuesta Th2.

[0015] En otras palabras, se puede decir así que un oligosacárido ácido tiene un efecto beneficioso sobre citocinas inflamatorias (respuesta Th1). Además, la combinación de un oligosacárido ácido y de un oligosacárido neutro tiene un efecto beneficioso sobre citocinas inflamatorias (respuesta Th2).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0016] La presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligosacárido ácido y un oligosacárido neutro, para usar en la estimulación del sistema inmunitario de pacientes con cáncer, en particular pacientes con cáncer que se someten o se han sometido a quimioterapia, radiación y pacientes con cáncer que están caquécticos, donde el oligosacárido ácido comprende al menos una unidad de ácido urónico terminal y donde la unidad de ácido urónico se selecciona del grupo que consiste en ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido gulurónico, ácido idurónico, ácido manurónico, ácido riburónico y ácido alturónico, y donde el oligosacárido ácido tiene un grado de polimerización de entre 1 y 10 y donde el oligosacárido neutro tiene un grado de polimerización de unidades de monosa superior a 2 y está por debajo de 60 unidades de monosa y donde el oligosacárido neutro se selecciona del grupo que consiste en galactooligosacárido, fructooligosacárido y transgalactooligosacárido.

[0017] La presente invención se refiere a una composición alimenticia para usar en la estimulación del sistema inmunitario de pacientes con cáncer, en particular pacientes con cáncer que se someten o se han sometido a quimioterapia, radiación y pacientes con cáncer que están caquécticos, que comprende entre un 5 y un 50 % en. de lípidos, entre un 10 y un 60 % en. de proteínas, entre un 15 y un 90 % en. de carbohidratos y preferiblemente una densidad calórica de entre 0,5 y 2 kcal/ml, un oligosacárido ácido y un oligosacárido neutro, donde dicho oligosacárido ácido comprende al menos una unidad de ácido urónico terminal, y donde la unidad de ácido urónico se selecciona del grupo que consiste en ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido gulurónico, ácido idurónico, ácido manurónico, ácido riburónico y ácido alturónico, y donde el oligosacárido ácido tiene un grado de polimerización de entre 1 y 10; y dicho oligosacárido neutro tiene un grado de polimerización de unidades de monosa superior a 2 y está por debajo de 60 unidades de monosa y donde el oligosacárido neutro se selecciona del grupo que consiste en galactooligosacárido, fructooligosacárido y transgalactooligosacárido.

[0018] La presente invención también se refiere a una composición líquida para usar en la estimulación del sistema inmunitario de pacientes con cáncer, en particular pacientes con cáncer que se someten o se han sometido a quimioterapia, radiación y pacientes con cáncer que están caquécticos, que comprende grasas, carbohidratos y proteínas y que comprende, por 100 ml de la composición líquida, entre 0,5 y 1 g de oligosacáridos no digeribles solubles, que comprende entre 0,4 y 0,7 g de $[galactosa]_n$-glucosa no digerible que comprende sacáridos con enlace β; donde n es un número entero entre 1 y 60, es decir, 2, 3, 4, 5, 6, ..., 59, 60; entre 0,01 y 0,1 g de carbohidrato polisacárido no digerible que comprende una cadena de al menos 10 unidades de fructosa con enlace β; y entre 0,04 y 0,3 g de oligosacáridos ácidos, donde dichos oligosacáridos ácidos comprenden al menos una unidad de ácido urónico terminal, y donde la unidad de ácido urónico se selecciona del grupo que consiste en ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido gulurónico, ácido idurónico, ácido manurónico, ácido riburónico y ácido alturónico, y donde el oligosacárido ácido tiene un grado de polimerización de entre 1 y 10.

[0019] Una cantidad terapéuticamente eficaz para un trastorno particular puede ser determinada rutinariamente por una persona experta en la materia a través de estudios de búsqueda de dosis.

Trastorno relacionado con el sistema inmunitario

[0020] Se acaba de descubrir que la administración de un oligosacárido ácido combinado con un oligosacárido neutro proporciona efectos sistémicos beneficiosos al sujeto. Sistémicos significa que afectan a todo el cuerpo como resultado de la circulación (sistémica) de la sangre y/o la linfa.

[0021] Fue particularmente sorprendente que la administración enteral de los presentes oligosacáridos proporciona los efectos sistémicos beneficiosos. Por lo tanto, el presente método comprende preferiblemente la administración enteral, aún más preferiblemente la oral, de oligosacárido ácido y neutro.

[0022] Otras características composicionales preferidas tales como proteína, carbohidrato, lípido, osmolalidad, viscosidad y densidad calórica de una composición que puede ser adecuadamente usada en este método se describen a continuación.

Oligosacáridos ácidos

[0023] El oligosacárido ácido tiene una, preferiblemente dos, unidades de ácido urónico terminales, que pueden estar libres o esterificadas. La unidad de ácido urónico terminal se selecciona del grupo que consiste en ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido gulurónico, ácido idurónico, ácido manurónico, ácido riburónico y ácido alturónico. Estas unidades pueden estar libres o esterificadas. En una forma de realización aún más preferida, la unidad de hexosa terminal tiene un enlace doble, que se sitúa preferiblemente entre la posición C_4 y C_5 de la unidad de hexosa terminal. Preferiblemente, una de las unidades de hexosa terminal comprende el enlace doble.

[0024] El oligosacárido ácido como se usa en el presente método tiene un grado de polimerización (DP) de entre 1 y 10. Se ha observado que un DP más bajo de los oligosacáridos mejora la palatabilidad y resulta en un producto de viscosidad reducida si el oligosacárido ácido se administra en forma líquida. El oligosacárido ácido puede ser un carbohidrato homogéneo o heterogéneo.

[0025] Los oligosacáridos ácidos usados en la invención se preparan preferiblemente a partir de pectina, pectato, alginato, condroitina, ácidos hialurónicos, heparina, heparano, carbohidratos bacterianos, sialoglicanos, fucoidano,

fucooligosacáridos o carragenano, preferiblemente a partir de pectina o alginato. Los oligosacáridos ácidos se pueden preparar por los métodos descritos en la WO 01/60378.

[0026] Los alginatos son polímeros lineales no ramificados que contienen residuos de ácido D-manurónico con enlace β-(1→4) y ácido L-gulurónico con enlace α-(1→4) con un amplio rango de pesos moleculares medios (100-100000 residuos). Las fuentes adecuadas de alginato incluyen algas y alginatos bacterianos.

[0027] La pectina se divide en dos categorías principales: pectina altamente metoxilada, que se caracteriza por un grado de metoxilación por encima del 50%, y pectina poco metoxilada, que tiene un grado de metoxilación por debajo del 50%. Como se utiliza en este caso, "grado de metoxilación" (también referido como DE o "grado de esterificación") se destina a referirse a la extensión a la que los grupos de ácido carboxílico libres contenidos en la cadena de ácido poligalacturónico se han esterificado (por ejemplo, por metilación). El presente oligosacárido ácido se prepara preferiblemente a partir de pectina altamente metoxilada.

[0028] Los oligosacáridos ácidos se caracterizan preferiblemente por un grado de metoxilación por encima del 20%, preferiblemente por encima del 50 %, aún más preferiblemente por encima del 70%. Preferiblemente, los oligosacáridos ácidos tienen un grado de metilación por encima del 20%, preferiblemente por encima del 50 %, aún más preferiblemente por encima del 70%.

[0029] El oligosacárido ácido se administra preferiblemente en una cantidad de entre 10 mg y 100 gramos al día, preferiblemente entre 100 mg y 50 gramos al día, aún más entre 0,5 y 20 gramos al día.

Oligosacáridos neutros

[0030] El término oligosacáridos neutros como se usa en la presente invención se refiere a sacáridos que tienen un grado de polimerización de unidades de monosa superior a 2, más preferiblemente superior a 3, aún más preferiblemente superior a 4, de la manera más preferible superior a 10, que no son digeridos, o solo parcialmente, en el intestino por la acción de ácidos o enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo superior humano (intestino delgado y estómago), sino que son fermentados por la flora intestinal humana y carecen preferiblemente de grupos ácidos. El oligosacárido neutro es estructuralmente (químicamente) diferente del oligosacárido ácido.
El término oligosacáridos neutros como se usa en la presente invención se refiere preferiblemente a sacáridos que tienen un grado de polimerización del oligosacárido por debajo de 60 unidades de monosa, preferiblemente por debajo de 40, aún más preferiblemente por debajo de 20, más preferiblemente por debajo de 10.
El término unidades de monosa se refiere a unidades que tienen una estructura anular cerrada, preferiblemente hexosa, por ejemplo, las formas de piranosa o furanosa.

[0031] El oligosacárido neutro se selecciona del grupo que consiste en fructooligosacáridos, galactooligosacáridos y transgalactooligosacáridos.

[0032] Los transgalactooligosacáridos (TOS) se venden, por ejemplo, bajo la marca registrada Vivinal™ (Borculo Domo Ingredients, Países Bajos).

[0033] Otras numerosas fuentes comerciales de oligosacáridos no digeribles están fácilmente disponibles y son conocidos por la persona experta. Por ejemplo, un transgalactooligosacárido está disponible de Yakult Honsha Co., Tokio, Japón.

[0034] Preferiblemente, el método comprende la administración de dos oligosacáridos neutros químicamente distintos, donde dichos oligosacáridos químicamente distintos tienen un DP diferente y/o un DP medio diferente, preferiblemente un DP medio diferente. En otra forma de realización, la administración de oligosacáridos neutros químicamente distintos con un DP medio diferente, proporciona un efecto de modulación inmunitaria aún más óptimo. Preferiblemente, el oligosacárido neutro a base de galactosa tiene un DP medio de entre 2 y 10, y los oligosacáridos neutros a base de fructosa y/o glucosa tienen un DP medio de entre 10 y 60.

[0035] El oligosacárido neutro se administra preferiblemente en una cantidad de entre 10 mg y 100 gramos al día, preferiblemente de entre 100 mg y 50 gramos al día, aún más preferiblemente de entre 0,5 y 20 gramos al día.

Efecto sinérgico de oligosacáridos ácidos y neutros

[0036] Se descubrió que los oligosacáridos ácidos y neutros tienen un efecto estimulador inmunitario sinérgico. Por lo tanto, el presente método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de oligosacáridos ácidos y oligosacáridos neutros.

[0037] La mezcla de oligosacáridos ácidos y neutros se administra preferiblemente en una cantidad de entre 10 mg y 100 gramos al día, preferiblemente de entre 100 mg y 25 gramos al día, aún más preferiblemente de entre 0,5 y 20 gramos al día.

[0038] Preferiblemente, los oligosacáridos ácidos y neutros se administran en una proporción en peso de entre 0,01:1 y 1:0,01, preferiblemente en una proporción en peso de entre 0,1:1 y 1:0,1.

LCPUFA

[0039] En una forma de realización preferida, el presente método comprende además la administración de un ácido poliinsaturado de cadena larga (LCPUFA). Como se cree que estos actúan en el sistema inmunitario a través de un mecanismo diferente de los oligosacáridos ácidos o de los oligosacáridos neutros, se cree que los oligosacáridos combinados con el LCPUFA actúan de forma sinérgica. El presente método comprende preferiblemente la administración de entre 0,1 y 100 g de LCPUFA al día, más preferiblemente de entre 1 y 25 gramos de LCPUFA al día.

Alimentos

[0040] Se ha observado que la mezcla sinérgica de oligosacáridos ácidos y neutros se puede aplicar ventajosamente en un alimento, tal como alimento para bebés y alimento clínico. Tal alimento comprende preferiblemente lípidos, proteínas y carbohidratos y se administra preferiblemente en forma líquida. El término "alimento líquido" como se usa en la presente invención incluye alimento seco (por ejemplo, polvos) que se acompañan con instrucciones en cuanto a mezclar dicha mezcla de alimento seco con un líquido adecuado (por ejemplo, agua).

[0041] Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición nutricional para el uso tal y como se ha definido antes que comprende preferiblemente entre un 5 y un 50 % en. de lípidos, entre un 10 y un 60 % en. de proteínas, entre un 15 y un 90 % en. de carbohidratos y los presentes oligosacáridos ácidos, en combinación con los oligosacáridos neutros. Preferiblemente, la presente composición nutricional contiene preferiblemente entre un 10 y un 30 % en. de lípidos, entre un 15 y un 40 % en. de proteínas y entre un 25 y un 75 % en. de carbohidratos (% en. es la forma abreviada del porcentaje de energía y representa la cantidad relativa con la que contribuye cada constituyente al valor calórico total de la preparación).

[0042] Tal alimento está preferiblemente en forma líquida y tiene una viscosidad limitada. Se ha observado que los alimentos que contienen los oligosacáridos ácidos combinados con los oligosacáridos neutros, proporcionan una nutrición líquida con una viscosidad suficientemente baja para que se pueda aplicar como, por ejemplo, alimentos líquidos para bebés y alimento líquido clínico que se puede administrar a través de un tubo o una paja, a la vez que retienen la viscosidad baja. En una forma de realización preferida, la presente composición tiene una viscosidad por debajo de 600 mPas, preferiblemente por debajo de 250 mPas, más preferiblemente por debajo de 50 mPas, de la manera más preferible por debajo de 25 mPas a una velocidad de cizalladura de 100 s^{-1} a 20°C. Siempre que el término viscosidad sea usado en el presente documento, este se refiere al parámetro físico que se determina según el método siguiente:
La viscosidad se puede determinar usando un reómetro Carri-Med CSL. La geometría usada es de forma cónica (cono acrílico de 6 cm y 2 grados) y el espacio entre la placa y la geometría se fija en 55 µm. Una velocidad de cizalladura de rampa continua lineal se usa de 0 a 150 s^{-1} en 20 segundos.

[0043] Se utilizan preferiblemente lípidos vegetales. El lípido vegetal es preferiblemente al menos uno seleccionado del grupo consistente en aceite de soja, aceite de palma, aceite de coco, aceite de alazor, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de canola y lecitinas. También se pueden añadir, si se desea, grasas animales tales como grasas lácteas.

[0044] Las proteínas usadas en la preparación nutricional se seleccionan preferiblemente del grupo de proteínas animales no humanas (tales como proteínas lácteas, proteínas de carne y proteínas de huevos), proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz y proteína de guisante), aminoácidos libres y sus mezclas derivadas. Se prefieren particularmente proteínas lácteas de vaca tales como la caseína y las proteínas del suero de leche.
Se puede añadir una fuente de carbohidrato digerible a la fórmula nutricional. Proporciona preferiblemente de aproximadamente un 40% a aproximadamente un 80% de la energía de la composición nutricional. Se puede usar cualquier carbohidrato adecuado (o fuente de carbohidrato adecuada), por ejemplo sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz y maltodextrinas, y sus mezclas derivadas.
La presente composición está preferiblemente sustancialmente libre de bacterias bifidogénicas viables.

[0045] Irregularidades intestinales (por ejemplo, heces duras, volumen de deposición insuficiente, diarrea) es un gran problema en muchos bebés y sujetos enfermos que reciben alimentos líquidos. Se ha observado que se pueden reducir los problemas de deposición administrando los presentes oligosacáridos en un alimento líquido que tiene una osmolalidad de entre 50 y 500 mOsm/kg, más preferiblemente de entre 100 y 400 mOsm/kg.
En vista de lo anterior, es también importante que el alimento líquido no tenga una densidad calórica excesiva, sin embargo, que aún así proporcione calorías suficientes para alimentar al sujeto. Por lo tanto, el alimento líquido tiene preferiblemente una densidad calórica de entre 0,1 y 2,5 kcal/ml, aún más preferiblemente una densidad calórica de entre 0,5 y 1,5 kcal/ml.

Oligosacáridos

[0046] El oligosacárido ácido se incluye preferiblemente en la composición para el uso según la invención en una cantidad superior al 0,1 % en peso, preferiblemente superior al 0,2 % en peso, más preferiblemente superior al 0,5 % en peso e incluso más preferiblemente superior al 1 % en peso con respecto al peso en seco total de la composición. Aunque la administración de cantidades considerables de oligosacáridos generalmente no llevará a efectos secundarios indeseables, la presente composición tiene preferiblemente un contenido de oligosacáridos por debajo del 20 % en peso, más preferiblemente por debajo del 10 % en peso, aún más preferiblemente por debajo del 5 % en peso.

[0047] El oligosacárido neutro se incluye preferiblemente en la composición para el uso según la invención en una cantidad superior al 0,1 % en peso, preferiblemente superior al 0,2 % en peso, más preferiblemente superior al 0,5 % en peso e incluso más preferiblemente superior al 1 % en peso con respecto al peso en seco total de la composición. Aunque la administración de cantidades considerables de oligosacáridos generalmente no llevará a efectos secundarios indeseables, la presente composición tiene preferiblemente un contenido de oligosacáridos por debajo del 20 % en peso, más preferiblemente por debajo del 10 % en peso, aún más preferiblemente por debajo del 5 % en peso.

[0048] Debido a que la estimulación del sistema inmunitario es de particular importancia en sujetos que sufren de cáncer, en particular aquellos pacientes que se someten o se han sometido a quimioterapia, radiación y aquellos pacientes que están caquécticos (como ocurre típicamente en la fase terminal del cáncer), la presente invención proporciona un método para el tratamiento de estos sujetos, donde dicho método comprende la administración enteral de los presentes oligosacáridos ácidos en combinación con los presentes oligosacáridos neutros. El presente oligosacárido se proporciona preferiblemente a estos sujetos en una matriz nutricional, es decir, una composición que comprende grasas, proteínas y carbohidratos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Configuración experimental

[0049] El efecto de las dietas que comprenden oligosacáridos ácidos, combinados opcionalmente con oligosacáridos neutros, se evaluó sobre la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), que es un parámetro para la respuesta inmunológica Th1 y se determina midiendo el aumento en la inflamación auricular después de una exposición local a un antígeno.

[0050] Los oligosacáridos ácidos (AcOl) usados, con un DP medio de entre 2 y 10, se obtuvieron por el método descrito en la WO 02/42484 (véase el ejemplo 1). Se evaluaron dietas con un 1 % en peso, un 2,5 % en peso, un 5 % en peso y un 10% en peso de AcOl con respecto al peso total de la dieta. Se usó una mezcla de oligosacáridos neutros (GF) que contiene galactooligosacáridos (GOS) (Vivinal-GOS™ (Borculo Domo Ingredients, Países Bajos) y fructooligosacáridos (FOS) (Raftiline HP™, Orafti, Tienen, Bélgica) en una proporción en peso GOS:FOS de 9:1. Se evaluaron dietas con un 1, un 2,5 y un 5 % en peso de GF con respecto al peso total de la dieta. Los efectos de una combinación de oligosacáridos ácidos y neutros (GF y AcOl) se evaluaron en una dieta con un 1 % en peso de GF y un 1 % en peso de AcOl con respecto al peso total de la dieta.

[0051] Todos los datos se presentan como porcentajes relativos a los valores de control, es decir, los valores relativos del grupo suplementado con oligosacáridos en comparación con el grupo que recibe la dieta de control (sin oligosacáridos).

Animales y dietas

[0052] Ratones C57B1/6 hembras, de 6 semanas de edad (Harlan Nederland BV, Horst, Países Bajos) se alojaron en grupos bajo un régimen regular de 12 horas de luz/oscuridad. El tamaño del grupo fue de 10 animales por grupo y 3 animales en los grupos de control negativo. A los animales se les dio dietas semisintéticas (Research Diet Services, Wijk bij Duurstede, Países Bajos). Se prepararon las dietas de control según las especificaciones AIN93G (Reeves et al (1993) Development and Testing of the AIN93 purified diets for rodents: results on growth kidney calcification and bone mineralisation in rats and mice. J Nutrition 123(11): 1923-31), las dietas suplementadas con oligosacáridos se basaron en estas especificaciones. El contenido de carbohidratos de las dietas suplementadas se mantuvo constante mediante el intercambio de carbohidratos totales por los oligosacáridos en función del peso. Los componentes de carbohidratos separados se sustituyeron en función de su proporción normal en la dieta. Los carbohidratos en la dieta normal consisten en almidón de maíz (40% del peso total), almidón de maíz dextrinizado (13,2%), sacarosa (10%) y celulosa (5%).

Protocolo de vacunación

[0053] Las vacunaciones se iniciaron después de un periodo de dos a cuatro semanas de adaptación al alojamiento y las dietas nuevos. El día 0, se recogió una muestra de sangre antes de la vacunación. El día 1, se administró subcutáneamente la primera vacunación. Después de tres semanas, se recogió una muestra de sangre (día 21) y se dio una vacuna de refuerzo (día 22). Nueve días después de la inyección de refuerzo (día 31), se midió el grosor auricular basal con un micrómetro exterior Digimatic (Mitutoyo, Veenendaal, Países Bajos) y se indujo una respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) inyectando una solución de antígeno i.c. (intracutánea) en el pabellón auricular del ratón. 24 h después (día 32), se midió la respuesta DTH, se tomó una muestra de sangre y se sacrificaron los ratones. Se aislaron los bazos y se prepararon para reestimulaciones *ex vivo*.

[0054] Las vacunaciones consistieron en una inyección i.c. (intracutánea) de 100 µl de una mezcla 1:1 de solución de antígeno y adyuvante Stimune (Specol, Cedi-diagnostics BV, Lelystad, Países Bajos). La solución de antígeno fue una dilución 1:100 de Influvac 2002/2003 (Solvay Pharmaceuticals, Weesp, Países Bajos) en PBS. Influvac es una vacuna proteica trivalente, que contiene 3x30 µg/ml de hemaglutinina de tres cepas de gripe diferentes. Para las respuestas DTH, se les inyectó i.c. a los ratones 25 µl de Influvac dializado en ambas orejas como una provocación de DTH.

Cultivos celulares

[0055] Los esplenocitos se aislaron de los bazos usando filtros celulares de malla fina (Becton Dickinson, Erembodegem, Bélgica). Los glóbulos rojos se lisaron durante 5 minutos de incubación en hielo. Después de lavar con medio de cultivo sin rojo de fenol, las células se contaron (Coulter Counter, Beckman Coulter, Países Bajos) y se mantuvieron en hielo. Los cultivos se establecieron usando 0,1 µg/ml de Influvac dializado como un estímulo. Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos con $1 \cdot 10^6$ células por pocillo. El medio de cultivo consistió en RPMI-1640 con tampón HEPES y 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica) con suero fetal de ternera (FCS) al 10%. Los cultivos se incubaron durante 5 días a 37°C en CO_2 al 5%. Luego se cosecharon los sobrenadantes y se congelaron a -80°C hasta el análisis. La proliferación celular se midió en cultivos en paralelo por incorporación de ^{3}H-timidina, que se añadió a los cultivos durante las últimas 18 horas a 0,4 µCu/pocillo. Después de 5 días, las células se cosecharon usando una cosechadora Filtermate (Perkin Elmer, Zaventem, Bélgica) y se contaron en un contador Micro-Beta (Perkin Elmer, Zaventem, Bélgica). El decaimiento radioactivo se midió durante 1 minuto por pocillo y los recuentos por minuto (CPM) se registraron como una medida de la velocidad de proliferación.

[0056] Las citocinas se analizaron en sobrenadantes de cultivos estimulados con Influvac. IL-2, IL-5, IL-10 e IFN-gamma se midieron usando el sistema Bio-Plex con un conjunto de esferas mixto adaptado para las citocinas mencionadas (Bio-Rad, Veenendaal, Países Bajos). Las citocinas se midieron según las especificaciones del fabricante. IL-4 se midió por ELISA usando el kit para IL-4 de ratón Pharmingen OptEIA (Becton Dickinson, Erembodegem, Bélgica), conforme a las especificaciones del fabricante.

Resultados

Respuesta de DTH de oligosacáridos ácidos

[0057] Las dietas con dosificaciones de un 1 % en peso, un 2,5 % en peso y un 5 % en peso de AcOl indujeron un aumento estadísticamente significativo en la respuesta de DTH, que muestra un aumento dependiente de la dosis (véase la tabla 1). El efecto observado es indicativo del uso ventajoso de oligosacáridos ácidos en el presente método.

TABLA 1

% en peso de oligosacáridos ácidos en la dieta	Respuesta de DTH (%)
0 (control)	100
1	122
2,5	136*
5	140*
* indica significativamente diferente (P<0,05) del control	

Respuesta de DTH de oligosacáridos ácidos y neutros

[0058] La combinación de un 1 % en peso de GF y un 1 % en peso de AcOl induce un aumento estadísticamente significativo en la DTH (véase la tabla 2). Como el efecto es significativamente superior a las respuestas de DTH de las dietas que contienen los oligosacáridos ácidos o neutros solos, estos resultados son indicativos del efecto sinérgico proporcionado por la administración de oligosacáridos ácidos y neutros. El efecto observado es indicativo del uso ventajoso de una combinación de oligosacáridos ácidos y neutros en el presente método.

TABLA 2

% en peso de oligosacáridos en la dieta	Respuesta de DTH (%)
0 (control)	100
1 % en peso de GF	132*
1 % en peso de AcOl	122
2,5 % en peso de GF	129*
2,5 % en peso de AcOl	136*
1 % en peso de GF y 1 % en peso de AcOl	159*
* indica significativamente diferente (P<0,05) del control	

Proliferación específica de Influvac de los oligosacáridos ácidos

[0059] La administración de dietas con un 2,5 % en peso y un 5 % en peso de oligosacáridos ácidos (AcOl) indujo un efecto de disminución significativo sobre la proliferación específica de Influvac *ex vivo* (véase la tabla 3). El efecto observado es indicativo del uso ventajoso de los oligosacáridos ácidos en el presente método.

Proliferación específica de Influvac de una combinación de oligosacáridos ácidos y neutros

[0060] La administración de una combinación de un 1 % en peso de GF y un 1 % en peso de AcOl indujo efectos de disminución significativos sobre la proliferación específica de antígeno (véase la tabla 3). Como el efecto está mejorado significativamente sobre las respuestas de DTH de las dietas con los oligosacáridos ácidos o neutros solos, estos resultados son indicativos del efecto sinérgico proporcionado por la administración de oligosacáridos ácidos y neutros. El efecto observado es indicativo del uso ventajoso de una combinación de oligosacáridos ácidos y neutros en el presente método. La proliferación reducida es indicativa de la reducción de la respuesta Th2, y el efecto de compensación Th1/Th2 del presente método.

TABLA 3

% en peso de oligosacáridos en la dieta	Proliferación específica de Influvac (%)
0 (control)	100
1 % en peso de GF	100
1 % en peso de AcOl	92
2,5 % en peso de AcOl	61*
5 % en peso de AcOl	54*
1 % en peso de GF y 1 % en peso de AcOl	50*
* indica significativamente diferente (P<0,05) del control	

Equilibrio Th1/Th2: perfiles de citocinas después de la administración de oligosacáridos ácidos

[0061] Se midieron los perfiles de citocina en los sobrenadantes de los cultivos de los esplenocitos específicos de Influvac. Los datos se presentan como el porcentaje relativo a los valores del grupo de control (es decir, que no recibieron ningún oligosacárido) vacunado. En comparación con los controles, las dietas con un 2,5 % en peso y un 5 % en peso de AcOl resultaron en una reducción en las citocinas relacionadas con Th2 IL-4, IL-5 e IL-10, mientras que, de las citocinas relacionadas con Th1, IL-2 aumentó e IFN-γ no se redujo significativamente (véase la tabla 4). Estos resultados son indicativos del efecto de compensación Th1/Th2 de los oligosacáridos ácidos e indicativos del uso ventajoso de oligosacáridos ácidos en el presente método, por ejemplo, para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades con una inmunidad Th1 relativamente baja.

Equilibrio Th1/Th2: perfiles de citocinas después de la administración de oligosacáridos ácidos y neutros

[0062] En comparación con los controles, la administración de una combinación de un 1 % en peso de GT y un 1 % en peso de AcOl resultó en una reducción en las citocinas relacionadas con Th2 IL-4, IL-5 e IL-10, mientras que las citocinas relacionadas con Th1 IL-2 e IFN-γ no se redujeron (véase la tabla 4, donde los datos se presentan como el porcentaje relativo a los valores del grupo de control (es decir, que no recibieron ningún oligosacárido) vacunado). Estos resultados son indicativos del efecto de compensación Th1/Th2 de una combinación de oligosacáridos ácidos y neutros e indicativos del uso ventajoso de oligosacáridos ácidos en el presente método, por ejemplo, para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades con una inmunidad Th1 relativamente baja. Particularmente la proporción IL-4/IFN refleja el equilibrio Th2/Th1. En otras palabras, una proporción inferior es indicativa de la estimulación de Th1 y/o la inhibición de Th2 y en cualquier caso indicativa del efecto de compensación Th1-Th2 de los presentes oligosacáridos.

TABLA 4

% en peso de oligosacáridos en la dieta	citocina					
	IFN-γ (%)	IL2 (%)	IL10 (%)	IL4 (%)	IL5 (%)	proporción IL4/IFN-γ
0 (control)	100	100	100	100	100	100
1 % en peso de AcOl	100	196*	70	83	72	85

2,5 % en peso de AcOl	75	116	58*	55	66	75
5 % en peso de AcOl	69	161*	44*	33*	56*	51*
1 % en peso de GF y 1 % en peso de AcOl	93	123	45*	44*	55*	45*
* indica significativamente diferente (P<0,05) del control						

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de oligosacárido ácido y oligosacárido neutro, para usar en la estimulación del sistema inmunitario de pacientes con cáncer, en particular pacientes con cáncer que se someten o se han sometido a quimioterapia, radiación y pacientes con cáncer que están caquécticos, donde el oligosacárido ácido comprende al menos una unidad de ácido urónico terminal y donde la unidad de ácido urónico se selecciona del grupo que consiste en ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido gulurónico, ácido idurónico, ácido manurónico, ácido riburónico y ácido alturónico, y donde el oligosacárido ácido tiene un grado de polimerización de entre 1 y 10, y donde el oligosacárido neutro tiene un grado de polimerización de unidades de monosa superior a 2 y está por debajo de 60 unidades de monosa, y donde el oligosacárido neutro se selecciona del grupo que consiste en galactooligosacárido, fructooligosacárido y transgalactooligosacárido.

2. Composición para el uso según la reivindicación 1, donde el uso de la estimulación del sistema inmunitario de pacientes con cáncer implica la restauración y/o el mantenimiento de un equilibrio Th1/Th2 favorable.

3. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende dos oligosacáridos neutros químicamente distintos, uno seleccionado del grupo que consiste en un oligosacárido neutro a base de galactosa y uno seleccionado del grupo de oligosacáridos a base de fructosa.

4. Composición para el uso según la reivindicación 3, que comprende un fructooligosacárido y al menos uno seleccionado de entre un transgalactooligosacárido y un galactooligosacárido.

5. Composición alimenticia para usar en la estimulación del sistema inmunitario de pacientes con cáncer, en particular pacientes con cáncer que se someten o se han sometido a quimioterapia, radiación y pacientes con cáncer que están caquécticos, que comprende entre un 5 y un 50 % en. de lípidos, entre un 10 y un 60 % en. de proteínas, entre un 15 y un 90 % en. de carbohidratos, un oligosacárido ácido y un oligosacárido neutro, donde dicho oligosacárido ácido comprende al menos una unidad de ácido urónico terminal, y donde la unidad de ácido urónico se selecciona del grupo que consiste en ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido gulurónico, ácido idurónico, ácido manurónico, ácido riburónico y ácido alturónico, y donde el oligosacárido ácido tiene un grado de polimerización de entre 1 y 10 y dicho oligosacárido neutro tiene un grado de polimerización de unidades de monosa superior a 2 y está por debajo de 60 unidades de monosa, y donde el oligosacárido neutro se selecciona del grupo que consiste en galactooligosacárido, fructooligosacárido y transgalactooligosacárido.

6. Composición líquida para usar en la estimulación del sistema inmunitario de pacientes con cáncer, en particular pacientes con cáncer que se someten o se han sometido a quimioterapia, radiación y pacientes con cáncer que están caquécticos, que comprende grasas, carbohidratos y proteínas y que comprende, por 100 ml de la composición líquida, entre 0,5 y 1 g de oligosacáridos no digeribles solubles, que comprende entre 0,4 y 0,7 g de $[galactosa]_n$-glucosa no digerible que comprende sacáridos con enlace β; donde n es un número entero entre 1 y 60, es decir, 2, 3, 4, 5, 6, ..., 59, 60; entre 0,01 y 0,1 g de carbohidrato de polisacárido no digerible que comprende una cadena de al menos 10 unidades de fructosa con enlace β; y entre 0,04 y 0,3 g de oligosacáridos ácidos, donde dichos oligosacáridos ácidos comprenden al menos una unidad de ácido urónico terminal, y donde la unidad de ácido urónico se selecciona del grupo que consiste en ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido gulurónico, ácido idurónico, ácido manurónico, ácido riburónico y ácido alturónico, y donde el oligosacárido ácido tiene un grado de polimerización de entre 1 y 10.