

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 825**

51 Int. Cl.:

A23C 9/152 (2006.01)

A23C 9/16 (2006.01)

A23L 33/00 (2006.01)

A23L 33/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.02.2016 PCT/CN2016/074813**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16141812**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2016 E 16761039 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3266310**

54 Título: **Composición de nucleótidos y aplicación en alimentos de la misma**

30 Prioridad:

06.03.2015 CN 201510099850

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2021

73 Titular/es:

INNER MONGOLIA YILI INDUSTRIAL GROUP CO., LTD. (50.0%)

No.1 Jinshan Road, Jinshan Development Zone, Hohhot

Inner Mongolia 010110, CN y

INNER MONGOLIA DAIRY TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

FANG, FANG;

LI, TING;

ZHAO, ZIFU;

QI, BINGLI;

SITU, WENYOU;

LI, WEI;

LIU, BIAO;

ZHAO, HONGXIA y

CHEN, QINGSHAN

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 805 825 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

Composición de nucleótidos y aplicación en alimentos de la misma

5 Campo técnico

Se proporciona una composición de nucleótidos para su uso en un método de promoción de la reparación de enterocitos después del daño provocado por la oxidación. También se proporciona un alimento para su uso en un método de promoción de la reparación de enterocitos después del daño provocado por la oxidación.

10

Antecedentes

En los últimos años, se han proporcionado muchos experimentos que muestran la importante función de los nucleótidos en un organismo vivo. Por ejemplo, pueden usarse nucleótidos para intensificar las funciones del sistema inmunitario y del tracto gastrointestinal del cuerpo. Mientras tanto, el sustituto de leche a base de leche de vaca es una fuente complementaria de importancia de alimento para el lactante. Debido al bajo contenido de nucleótido y derivado del mismo en la leche de vaca, es importante añadir nucleótidos foráneos en el sustituto de leche a base de leche de vaca para el crecimiento y desarrollo (por ejemplo, el desarrollo del tracto gastrointestinal) y la intensificación inmunitaria del cuerpo, especialmente para el del lactante.

15

20

El documento US 4.994.442 divulga que la adición de diversos nucleótidos en el alimento preparado para lactantes podría intensificar la respuesta inmunitaria de las células T. Sin embargo, los componentes de nucleótido (CMP, AMP, UMP, GMP e IMP) se añaden cada uno en el alimento preparado en una cantidad igual. El documento EP 1549158 divulga una composición de leche para lactantes, que comprende 3,2-15,4 mg/l de CMP, 1,8-11,0 mg/l de UMP, 1,8-8,0 mg/l de GMP, 0,1-2,2 mg/l de IMP y 2,5-13,2 mg/l de AMP. Sin embargo, esta composición sólo es útil para un recién nacido prematuro y no se describe ninguno de los posibles efectos.

25

El documento US 2010/284980 A1 divulga un preparado para lactantes en polvo que comprende una mezcla de nucleótidos junto con otros componentes, que puede usarse en la promoción del crecimiento y el desarrollo, así como en la promoción del crecimiento de microorganismos intestinales beneficiosos, especialmente en un lactante.

30

El documento WO 2014/042504 A1 se refiere a la obtención de un preparado nutricional para la alimentación de recién nacidos prematuros. El preparado comprende nucleótidos junto con otros componentes, en concentraciones suficientes para satisfacer los requisitos nutricionales de niños prematuros, además de que se tolera mejor.

35

El documento AU 93320 03 B divulga un agente farmacéutico capaz de promover el desarrollo de la capacidad de aprendizaje, que contiene, como principio activo, una mezcla de nucleótidos que comprende citidina monofosfato, uridina monofosfato, adenosina monofosfato, guanosina monofosfato, inosina monofosfato, etc.

40

El documento US 4 994 442 A se refiere a preparados para lactantes mejorados que se enriquecen con nucleósidos, nucleótidos, o mezclas de los mismos específicos y son para su uso en la intensificación de la respuesta inmunitaria de lactantes, la mejora de la inmunidad celular y la intensificación de la reparación intestinal en pacientes con enfermedades intestinales.

45

Partiendo de la base de la técnica anterior, para ejercer suficientemente la función de los nucleótidos sobre el crecimiento y el desarrollo y optimizar el efecto de los nucleótidos como aditivo alimentario, el presente inventor ha realizado extensos experimentos para ajustar los componentes y las proporciones de los nucleótidos en una composición de ácidos nucleicos para maximizar el efecto de la composición como aditivo complementario de nucleótidos. Mientras tanto, el presente inventor encontró sorprendentemente que, en comparación con los productos de la técnica anterior, la composición de nucleótidos según la presente invención tiene proporciones y componentes específicos y podría proporcionar mejores efectos.

50

Sumario

55 La presente invención proporciona una composición de nucleótidos para su uso en un método de promoción de la reparación de enterocitos después del daño provocado por la oxidación, tal como se define en la reivindicación 1.

La composición de nucleótidos para su uso en un método de promoción de la reparación de enterocitos después del daño provocado por la oxidación según la invención consiste en CMP, AMP, UMP y GMP, en la que, en la base en peso, las proporciones de los componentes son: CMP: el 58-72%, AMP: el 6-14%, UMP: el 10-18% y GMP: el 8-14%, siempre que la suma de los componentes sea del 100%, en la que el método implica administrar la composición de nucleótidos a un sujeto.

60

En una realización, la composición de nucleótidos para el uso según la invención consiste en CMP, AMP, UMP y GMP, en la que, en la base en peso, las proporciones de los componentes son: CMP: el 60-70% AMP: el 8-12%, UMP: el 12-16% y GMP: el 10-12%, siempre que la suma de los componentes sea del 100%.

65

ES 2 805 825 T3

En una realización adicional, la composición de nucleótidos para el uso según la invención consiste en CMP, AMP, UMP y GMP, en la que, en la base en peso, las proporciones de los componentes son: CMP: el 60-65%, AMP: el 10-12%, UMP: el 14-16% y GMP: el 11-12%, siempre que la suma de los componentes sea del 100%.

5 En una realización adicional, la composición de nucleótidos para el uso según la invención consiste en CMP, AMP, UMP y GMP, en la que, en la base en peso, las proporciones de los componentes son: CMP: el 65-70%, AMP: el 8-10%, UMP: el 12-14% y GMP: el 10-11%, siempre que la suma de los componentes sea del 100%.

10 En una realización preferible, la composición de nucleótidos para el uso según la invención consiste en CMP, AMP, UMP y GMP, en la que, en la base en peso, las proporciones de los componentes son: CMP: el 60%, AMP: el 12%, UMP: el 16% y GMP: el 12%.

15 En una realización preferible, la composición de nucleótidos para el uso según la invención consiste en CMP, AMP, UMP y GMP, en la que, en la base en peso, las proporciones de los componentes son: CMP: el 65%, AMP: el 10%, UMP: el 14% y GMP: el 11%.

20 En una realización preferible, la composición de nucleótidos para el uso según la invención consiste en CMP, AMP, UMP y GMP, en la que, en la base en peso, las proporciones de los componentes son: CMP: el 70%, AMP: el 8%, UMP: el 12% y GMP: el 10%.

25 La presente invención también proporciona un alimento para su uso en un método de promoción de la reparación de enterocitos después del daño provocado por la oxidación, en el que el alimento está en forma de un producto lácteo líquido y comprende, basándose en 100 g de producto lácteo líquido, 250 kJ-355 kJ de energía y los siguientes componentes: 1,75 g-4,26 g de proteína aparte de lactoferrina, 1,75 g-4,97 g de grasa, 42,5 µg-191,7 µg de vitamina A (RE), 0,625 µg-2,6625 µg de vitamina D, ≥0,375 mg de vitamina E (α-TE), ≥2,5 µg de vitamina K1, ≥27,5 µg de vitamina B1, ≥27,5 µg de vitamina B2, ≥27,5 µg de vitamina B6, ≥0,1 µg de vitamina B12, ≥275 µg de ácido nicotínico o nicotinamida, ≥2,5 µg de ácido fólico, ≥175 µg de ácido pantoténico, ≥4,5 mg de vitamina C, ≥1 µg de biotina, ≤71 mg de sodio, 45 mg-244,95 mg de potasio, 1,75 µg-124,25 µg de cobre, ≥3,5 mg de magnesio, 0,625 mg-1,775 mg de hierro, 0,25 mg-1,065 mg de zinc, ≥42,5 mg de calcio, ≥20,75 mg de fósforo, ≥3,5 µg de yodo, ≤184,6 mg de cloro, 5-13 mg de lactoferrina e hidratos de carbono;

30 en el que la composición de nucleótidos de la presente invención está presente en una cantidad de 2,64-7,66 mg y la cantidad de hidratos de carbono es tal que la energía proporcionada por los hidratos de carbono, la proteína y la grasa es de 250 kJ-355 kJ; y

35 en el que el método implica administrar el alimento a un sujeto.

40 También se describe a continuación (pero no forma parte de la presente invención) un procedimiento para preparar un alimento, que comprende añadir la composición de nucleótidos en la materia prima del alimento. El alimento puede ser un alimento para lactantes. El alimento puede estar en forma de producto lácteo, por ejemplo, en forma de leche en polvo o producto lácteo líquido, tal como la leche en polvo o el producto lácteo líquido útil para lactantes.

45 También se describe a continuación en el presente documento (pero no forma parte de la presente invención) el uso de la composición de nucleótidos para la fabricación de alimentos. El alimento puede ser un alimento para lactantes. El alimento puede estar en forma de producto lácteo, por ejemplo, en forma de leche en polvo o producto lácteo líquido, tal como la leche en polvo o el producto lácteo líquido útil para lactantes. El alimento puede usarse para proporcionar el efecto de inmunoestimulación. El alimento puede usarse para promover el crecimiento y desarrollo (tal como, el desarrollo del tracto gastrointestinal) del tracto intestinal después del daño. El alimento puede usarse para promover el crecimiento de microorganismos intestinales beneficiosos.

50 También se describe a continuación (pero no forma parte de la presente invención) un método para intensificar la inmunidad en un sujeto, promover el crecimiento y desarrollo (tal como, el desarrollo del tracto gastrointestinal) y/o promover el crecimiento de microorganismos intestinales beneficiosos en un sujeto y/o cualquier combinación de los mismos, que comprende administrar al sujeto la composición de nucleótidos o el alimento.

55 En una realización preferible, el sujeto es un humano, preferiblemente un lactante humano.

Figuras

60 La figura 1 muestra los resultados del experimento de tasa de supervivencia celular.

La figura 2 muestra los resultados del experimento de actividad de SOD.

65 La figura 3 muestra los resultados del experimento de actividad de LDH.

La figura 4 muestra los resultados del experimento de contenido de MDA.

La figura 5 muestra los resultados del experimento de proliferación celular.

5

Descripción detallada

A menos que se defina específicamente de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que aquellos usados habitualmente por un experto en el campo relevante. A menos que se defina específicamente de otra manera, las razones, proporciones (incluyendo los porcentajes) usados en el presente documento se calculan en base en peso.

10

Nucleótido

El término "nucleótido" usado en el presente documento se refiere al compuesto formado a partir de una base de purina o pirimidina, ribosa o desoxirribosa y grupo fosfato. Por ejemplo, según el grupo de azúcar, los nucleótidos pueden clasificarse como ribonucleótido y desoxirribonucleótido. Por ejemplo, según el grupo base, los nucleótidos pueden clasificarse como nucleótido de adenina, nucleótido de guanina, nucleótido de citosina, nucleótido de uracilo, nucleótido de timina y nucleótido de hipoxantina. Cuando hay un grupo fosfato en una molécula de nucleótido, se denomina nucleótido monofosfato (NMP). El grupo fosfato del 5'-nucleótido puede someterse a fosforilación adicionalmente para dar nucleótido difosfato (NDP) y nucleótido trifosfato (NTP).

20

El término "nucleótido" usado en el presente documento también abarca citosina (C), uracilo (U), adenina (A), guanina (G) y/o hipoxantina (I) presentes en la composición de nucleótidos para el uso según la invención en diversas formas, por ejemplo, ribonucleósido, ribonucleótido, ARN fosfato y derivados o precursores en cualquier otra forma, siempre que puedan transferirse o metabolizarse para dar sus correspondientes formas de nucleótido *in vivo* o *in vitro*.

25

Por ejemplo, en el campo de adición alimentaria, los nucleótidos usados son principalmente CMP (nucleótido de citosina), UMP (nucleótido de uracilo), AMP (nucleótido de adenina), GMP (nucleótido de guanina) o IMP (nucleótido de hipoxantina). Por ejemplo, los 5'-nucleótidos mixtos disponibles comercialmente comprenden 5'-adenosina monofosfato (AMP), 5'-citidina monofosfato (CMP), 5'-guanosina monofosfato (GMP), 5'-uridina monofosfato (UMP) y 5'-inosina monofosfato (IMP). Generalmente, cuando se usan en combinación, los 5'-nucleótidos mixtos pueden estar presentes, por ejemplo, en dos tipos: un tipo es que 5'-adenosina monofosfato y 5'-citidina monofosfato están en las formas de ácido libre mientras que los otros tres nucleótidos están en forma de sal de sodio, es decir, tipo dos ácido y tres sodio; el otro tipo que todos los nucleótidos están en forma de sal de sodio, es decir, tipo cinco sodio. Por consiguiente, el término "nucleótido" usado en el presente documento abarca su forma de sal, por ejemplo, sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, tales como sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, por ejemplo, sal de monosodio, sal de disodio, tal como CMPNa_2 , AMPNa_2 , UMPNa_2 , GMPNa_2 , IMPNa_2 y CMPK_2 , AMPK_2 , UMPK_2 , GMPK , IMPK_2 . Un experto en la técnica entenderá que los componentes en la composición de nucleótidos para el uso según la invención pueden estar presentes cada uno opcional e independientemente en forma de diversas sales, que comprenden, por ejemplo, el "tipo dos ácido y tres sodio" mencionado anteriormente; o los componentes y las sales de los mismos pueden estar presentes en cualquier combinación, por ejemplo, que sólo GMP esté en forma de sal o que sólo CMP esté en forma de sal. Opcionalmente, todos los componentes en la composición de nucleótidos para el uso según la invención pueden estar presentes en forma de sal, que comprenden, por ejemplo, el "tipo cinco sodio" mencionado anteriormente.

30

35

40

45

De manera similar, el término "nucleótido" usado en el presente documento comprende el solvato del mismo en diversas formas (tal como hidrato). Por consiguiente, cuando la composición de nucleótidos para el uso según la invención comprende otras formas tales como aquellas enumeradas anteriormente de los componentes de nucleótido, las proporciones de tales formas en la composición deberán calcularse según sus moléculas de nucleótido correspondientes. Por ejemplo, cuando CMP está presente en forma de sal de disodio (CMPNa_2), la razón en peso deberá calcularse después de transferirse para dar CMP.

50

55

Composición de nucleótidos

La composición de nucleótidos para el uso según la invención consiste en los siguientes componentes: CMP, AMP, UMP y GMP, y las proporciones en peso de los componentes son CMP: el 58-72%, AMP: el 6-14%, UMP: el 10-18% y GMP: el 8-14%, siempre que la suma de los componentes sea del 100%.

En una realización, en la composición de nucleótidos para el uso según la invención, CMP está presente en una cantidad de preferiblemente el 60-70% en peso, por ejemplo, el 60-65% en peso y el 65-70% en peso. Se entenderá que los intervalos comprenden todos los valores puntuales en los mismos, por ejemplo, el 59%, el 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69%, el 70% o el 71%; así como diversos subintervalos formados por tales valores puntuales, por ejemplo, el 60-63%, el 60-68% o el 63-70%. En una realización específica, en la composición de nucleótidos para el uso según la invención, CMP está presente en una cantidad del 60%, el 65% o el 70% en peso.

60

65

En una realización, en la composición de nucleótidos para el uso según la invención, AMP está presente en una cantidad de preferiblemente el 8-12% en peso, por ejemplo, el 8-10% en peso y el 10-12% en peso. Se entenderá que los intervalos comprenden todos los valores puntuales en los mismos, por ejemplo, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 11%, el 12% o el 13%; así como diversos subintervalos formados por tales valores puntuales, por ejemplo, el 8-9%, el 8-11% o el 9-12%. En una realización específica, en la composición de nucleótidos para el uso según la invención, AMP está presente en una cantidad del 8%, el 10% o el 12% en peso.

En una realización, en la composición de nucleótidos para el uso según la invención, UMP está presente en una cantidad de preferiblemente el 12-16% en peso, por ejemplo, el 12-14% en peso y el 14-16% en peso. Se entenderá que los intervalos comprenden todos los valores puntuales en los mismos, por ejemplo, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16% o el 17%; así como diversos subintervalos formados por tales valores puntuales, por ejemplo, el 12-15% o el 14-15%. En una realización específica, en la composición de nucleótidos para el uso según la invención, UMP está presente en una cantidad del 12%, el 14% o el 16% en peso.

En una realización, en la composición de nucleótidos para el uso según la invención, GMP está presente en una cantidad de preferiblemente el 10-12% en peso, por ejemplo, el 10-11% en peso y el 11-12% en peso. Se entenderá que los intervalos comprenden todos los valores puntuales en los mismos, por ejemplo, el 9%, el 10%, el 11%, el 12% o el 13%; así como diversos subintervalos formados por tales valores puntuales, por ejemplo, el 8-11% o el 10-14%. En una realización específica, en la composición de nucleótidos para el uso según la invención, GMP está presente en una cantidad del 10%, el 11% o el 12% en peso.

La composición de nucleótidos para el uso según la invención no comprende IMP.

Un experto en la técnica entenderá que los intervalos y valores específicos enumerados anteriormente para los diversos componentes pueden combinarse y seleccionarse opcionalmente, siempre que la suma de los componentes seleccionados sea del 100%. Por ejemplo, en la composición de nucleótidos para el uso según la invención, cuando el contenido de CMP es del 60-70%, tal como el 60-65% o el 65-70%, el contenido de AMP puede ser del 8-12%, tal como el 8-10% o el 10-12%. Del mismo modo, cuando el contenido de CMP y AMP están dentro de cualquiera de los intervalos anteriores, el contenido de UMP puede ser del 12-16%, tal como el 12-14% o el 14-16%. De manera similar, cuando el contenido de CMP, AMP y UMP están dentro de cualquiera de los intervalos anteriores, el contenido de GMP puede ser del 10-12%, tal como el 10-11% o el 11-12%. Según el mismo principio, cuando el contenido de CMP, AMP, UMP y GMP están dentro de cualquiera de los intervalos anteriores, el contenido de IMP es del 0% (es decir, la composición de nucleótidos para el uso según la invención no comprende IMP). Un experto en la técnica entenderá que las selecciones anteriores deben cumplir con el requisito de que la suma de los componentes seleccionados sea del 100%. La expresión "consiste sustancialmente en" significa que, además de los componentes de nucleótidos definidos, si es necesario, la composición de nucleótidos puede comprender opcionalmente un alimento o portador, excipiente o adyuvante fisiológicamente aceptable, por ejemplo, conservante, antioxidante, aglutinante, espesante o diluyente y diversas impurezas que existan posiblemente. El portador, excipiente o adyuvante y las impurezas son inertes para los principios activos en la composición (componentes de nucleótido) y su presencia o cantidad no debería alterar o alterar significativamente las funciones de los principios activos. Además, cuando se calculan las proporciones de los componentes de nucleótido en la composición de nucleótidos, el portador, excipiente o adyuvante y las impurezas que estén presentes opcionalmente no se considerarán. Además, un experto en la técnica entenderá que la expresión "consiste sustancialmente en..." abarca el significado de "consiste en...".

El término "opcional" u "opcionalmente" usado en el presente documento se refiere a un contenido que puede existir o no. Por ejemplo, "que comprende opcionalmente un alimento o portador, excipiente o adyuvante fisiológicamente aceptable" significa que la composición de nucleótidos puede comprender o no tal portador, excipiente o adyuvante.

Alimento

El término "alimento" usado en el presente documento tiene el significado común para un experto en la técnica y, por ejemplo, se refiere a un material comestible o que puede beberse por un humano, incluyendo el alimento que se procesa, semiprocésa o no se procesa.

El término "alimento para lactantes" usado en el presente documento se refiere al alimento, excepto la leche materna, adecuado para el lactante, al que se le añaden diversos componentes debido al requerimiento del crecimiento y desarrollo del lactante, por ejemplo, nucleótidos, ácidos grasos, vitaminas, hidratos de carbono, aceites vegetales o microelementos, tales como la composición de nucleótidos para el uso según la invención. Los ejemplos del alimento son producto lácteo (por ejemplo, leche en polvo y producto lácteo líquido), puré o harina de arroz. El alimento para lactantes puede estar en forma de producto lácteo, por ejemplo, leche en polvo o producto lácteo líquido, tal como leche en polvo o producto lácteo líquido para lactantes al que se le añade la composición de nucleótidos.

El término "lactante" usado en el presente documento se refiere generalmente a un sujeto humano de 0~3 años. Por ejemplo, la aplicación de la composición de nucleótidos para el uso según la invención se refiere a este intervalo de años. Si es necesario, la composición de nucleótidos para el uso según la invención o el alimento que contiene la

ES 2 805 825 T3

misma puede administrarse a un sujeto humano mayor, por ejemplo de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o mayor.

También se describe un procedimiento para preparar un alimento, que comprende añadir la composición de nucleótidos para el uso según la invención en el alimento. El alimento puede ser un alimento para lactantes. Según la invención, tal como se define en la reivindicación 6, el alimento está en forma de producto lácteo líquido, tal como el producto lácteo líquido para lactantes.

A lo largo de toda la descripción, los términos “producto lácteo líquido” y “leche líquida” tienen el mismo significado y se usan de manera intercambiable, refiriéndose al producto lácteo en forma líquida, y que comprenden diversos componentes nutricionales y energía útiles para un humano, tales como aquellos enumerados anteriormente.

Cuando se prepara la leche en polvo, la composición de nucleótidos se usa en una cantidad de 0,2~0,58 partes en peso (basándose en 1000 partes en peso de leche en polvo). Por ejemplo, la leche en polvo, basándose en 1000 partes en peso de la leche en polvo, comprende: 120~160 partes en peso de leche desnatada en polvo, 240~280 partes en peso de lactosa, 180~210 partes en peso de suero de leche desalado en polvo, 90~120 partes en peso de proteína de suero de leche en polvo (WPC34%), 155~180 partes en peso de aceite de semilla de girasol, 35~55 partes en peso de aceite de maíz, 40~60 partes en peso de aceite de soja, 0,35~0,5 partes en peso de composición de nucleótidos, 1~2,5 partes en peso de lecitina de soja, 0,1~0,15 partes en peso de *Bifidobacterium*, 4~5 partes en peso de oligofruktosa en polvo, 10~12 partes en peso de jarabe de galactooligosacáridos, una cantidad nutricional aceptable de vitaminas y una cantidad nutricional aceptable de microelementos.

El procedimiento principal para preparar la leche en polvo comprende principalmente: dosificar, calentar previamente, homogeneizar, concentrar y esterilizar, secar por pulverización, mezclar en seco y obtener el producto final, en el que la composición de nucleótidos para el uso según la invención se añade junto con DHA, ARA y *Bifidobacterium* en la leche en polvo después de secar por pulverización, que luego se mezclan.

El alimento para su uso según la presente invención está en forma de un producto lácteo líquido y comprende, basándose en 100 g de producto lácteo líquido, 250 kJ-355 kJ de energía y los siguientes componentes: 1,75 g-4,26 g de proteína aparte de lactoferrina, 1,75 g-4,97 g de grasa, 42,5 µg-191,7 µg de vitamina A (RE), 0,625 µg-2,6625 µg de vitamina D, ≥0,375 mg de vitamina E (α-TE), ≥2,5 µg de vitamina K1, ≥27,5 µg de vitamina B1, ≥27,5 µg de vitamina B2, ≥27,5 µg de vitamina B6, ≥0,1 µg de vitamina B12, ≥275 µg de ácido nicotínico o nicotinamida, ≥2,5 µg de ácido fólico, ≥175 µg de ácido pantoténico, ≥4,5 mg de vitamina C, ≥1 µg de biotina, ≤71 mg de sodio, 45 mg-244,95 mg de potasio, 17,5 µg-124,25 µg de cobre, ≥3,5 mg de magnesio, 0,625 mg-1,775 mg de hierro, 0,25 mg-1,065 mg de zinc, ≥42,5 mg de calcio, ≥20,75 mg de fósforo, ≥3,5 µg de yodo, ≤184,6 mg de cloro, 5-13 mg de lactoferrina e hidratos de carbono; en el que la composición de nucleótidos según la invención está presente en una cantidad de 2,64-7,66 mg y la cantidad de hidratos de carbono es tal que la energía proporcionada por los hidratos de carbono, la proteína y la grasa es de 250 kJ-355 kJ.

La grasa usada se proporciona por uno o más de grasa láctea anhidra, aceite de soja, aceite de maíz, semilla de girasol en cualquier razón y combinación. Además, para mejorar las propiedades del sistema de leche líquida como la estabilidad, puede añadirse algún aditivo alimentario aceptable, por ejemplo, un estabilizador de la emulsión. Preferiblemente, el aditivo alimentario y la cantidad del mismo en el presente documento comprenden, por ejemplo, uno o más del 0,005% en peso~0,05% en peso de carragenano, el 0,01% en peso~1% en peso de monoestearato de glicerina, el 0,01% en peso~0,1% en peso de goma guar, el 0,01% en peso~0,1% en peso de goma garrofín o cualquier combinación de los mismos.

Finalmente, se describe (pero no forma parte de la presente invención) el uso de la composición de nucleótidos para la fabricación del alimento. En una realización, el alimento es un alimento para lactantes. El alimento puede estar en forma de producto lácteo, por ejemplo, en forma de leche en polvo o producto lácteo líquido, tal como la leche en polvo o el producto lácteo líquido útiles para un lactante.

Inmunoestimulación (no según la presente invención)

La composición de nucleótidos y el alimento que contiene la misma pueden proporcionar el efecto de inmunoestimulación después del consumo. El efecto de “inmunoestimulación” en el presente documento se refiere a la función de intensificar la inmunidad en un sujeto, por ejemplo, en los aspectos de mejorar la función de transformación de linfocitos, intensificar la función de fagocitosis de macrófagos, intensificar la actividad de linfocitos citolíticos naturales, mejorar la respuesta inmunitaria y la producción de anticuerpos, tales como aquellos proporcionados en los ejemplos de la descripción.

Promoción del crecimiento y desarrollo y promoción de la reparación del tracto intestinal después del daño

La composición de nucleótidos y el alimento para el uso según la invención pueden promover la reparación de enterocitos después del daño provocado por la oxidación. El inventor, a partir del experimento *in vitro*, encontró que la composición de nucleótidos para el uso según la invención puede promover el crecimiento de enterocitos, promover

la proliferación de enterocitos y proteger a los enterocitos y hepatocitos del daño. Tal daño es daño oxidativo, tal como el provocado por especies reactivas de oxígeno. En una realización preferible, el sujeto es un humano y preferiblemente un lactante humano.

5 Promoción del crecimiento de microorganismos intestinales beneficiosos (no según la presente invención)

La composición de nucleótidos y el alimento que contiene la misma pueden promover el crecimiento de microorganismos intestinales beneficiosos (por ejemplo, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) en un sujeto después del consumo, por ejemplo, en los aspectos de ser beneficiosos para el crecimiento de *Bifidobacterium*, el aumento del contenido de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en el tracto intestinal y las heces (tal microbiota bacteriana puede inhibir la reproducción de bacterias patógenas acidófilas y *E. coli.*), la reducción de la proporción de bacterias dañinas para el tracto intestinal, beneficiándose así la salud del sujeto. El presente inventor encontró que mediante la adición de la composición en, por ejemplo, la condición del tracto intestinal *in vitro*, observando la cantidad de multiplicación de probióticos y *Lactobacillus* en el entorno, especialmente la de *Bifidobacterium*, la composición de nucleótidos muestra una promoción significativa del crecimiento de microorganismos intestinales beneficiosos.

Ejemplos

En los ejemplos, las muestras de prueba tienen los siguientes componentes y las siguientes proporciones (en la base en peso):

Composición de nucleótidos para su uso según la invención:

Muestra 1: CMP: el 60%, AMP: el 12%, UMP: el 16% y GMP: el 12%

Muestra 2: CMP: el 65%, AMP: el 10%, UMP: el 14% y GMP: el 11%

Muestra 3: CMP: el 70%, AMP: el 8%, UMP: el 12% y GMP: el 10%

Composición de nucleótidos de la técnica anterior:

Muestra comparativa 1: CMP: el 33,7%, AMP: el 20,3%, UMP: el 23,1%, GMP: el 7,6% e IMP: el 15,3%

Muestra comparativa 2: CMP: el 60%, AMP: el 14,5%, UMP: el 18,2% y GMP: el 7,3%

Muestra comparativa 3: CMP: el 42,7%, AMP: el 13,4%, UMP: el 24,2% y GMP: el 19,7%

Ejemplo de referencia 1: efecto de inmunoestimulación (I)

El fin de este ejemplo de referencia es someter a prueba el efecto de inmunoestimulación de la composición de nucleótidos, y el principio y las etapas se basan en los requisitos y las especificaciones de "Technical standards of examination and evaluation for healthcare food (2003)", segunda parte, "Functional test method", capítulo I.

1. Materiales y métodos

1.1. Reactivos principales

Reactivos principales usados en este ejemplo: medio RPMI-1640 (Gibco); suero de ternera fetal (Gibco); concanavalina A (ConA) (Sigma); líquido de separación de linfocitos, sangre completa y diluyente de tejidos, disolución de lavado celular (Tian Jin Hao Yang Biological Manufacture CO., LTD); suspensión de eritrocitos de gallina al 5% (preparada por el laboratorio); kit MTT, disolución de Hank (Beyotime Institute of Biotechnology); licor de colorante de Giemsa (Zhuhai BASO Biotech CO., LTD); tubo de anticoagulante EDTA (BD); placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning); cápsula de calostro de Baicheng (Shanghai Fuzheng Biotech CO., LTD); muestras de nucleótidos (Nanjing Tongkaizhaoye Biotech CO., LTD).

1.2. Instrumentos principales

Incubadora de CO₂ (Sanyo MCO-18AIC(UV)); mesa de laboratorio limpia (AIRTECH); microscopio invertido (OLYMPUS); centrífuga horizontal Hitachi (himac-CT6EL); lector de microplacas (modelo 680 de BIO-RAD); microscopio OLYMPUS (BX51); incubadora termostática DNP (Shanghai Jinghong Lab instrument CO., LTD).

1.3. Animales

160 ratones macho KM de 5~6 semanas, proporcionados por Shanghai SLAC Laboratory Animal Co., Ltd.

1.4. Agrupamiento de animales

ES 2 805 825 T3

Se adaptaron los ratones KM durante 7 días y luego se dividieron aleatoriamente en 8 grupos, 20 animales en cada grupo: grupo de control de blanco, grupo de control positivo, grupos de dosificación alta, media y baja de la muestra 1 y grupos de dosificación alta, media y baja de la muestra comparativa 1. Los animales en cada grupo recibieron alimentación por sonda de agua estéril disuelta con cada muestra (a continuación) y el grupo de control de blanco recibió alimentación por sonda de agua estéril al mismo volumen, una administración por día, durante 30 días.

El grupo de dosificación alta recibió una dosis de $67,37 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, el grupo de dosificación media recibió una dosis de $41,82 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, el grupo de dosificación baja recibió una dosis de $23,23 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y el grupo de control positivo recibió una dosis de $150,17 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

El grupo de control positivo: cápsula de calostro.

Grupo de prueba: la muestra 1 es una composición de nucleótidos para el uso según la invención. La muestra comparativa 1 es una composición de nucleótidos que se preparó según los componentes de nucleótido y las proporciones de un alimento para lactantes disponible comercialmente al que se le añadieron nucleótidos.

1.5. Ensayo

Ensayo de transformación de linfocitos:

En el día 38^o, se tomaron aleatoriamente 10 ratones de cada grupo. Se extrajo sangre mediante la retirada del globo ocular con un tubo de anticoagulante EDTA de 2 ml y se separaron los linfocitos bajo esterilización con centrifugación con un gradiente de densidad Ficoll. Se mezcló de manera uniforme 1 ml de sangre fresca anticoagulada con sangre completa y diluyente de tejidos a 1:1, que se añadió con cuidado a la superficie del líquido de separación de linfocitos al mismo volumen. Después de la centrifugación a 1500 rpm durante 15 min con una centrífuga horizontal, se recogió la capa cíclica de linfocitos blancos de la leche, que luego se lavó dos veces con disolución de lavado celular. Se usó medio líquido completo RPMI-1640 para preparar una concentración de $1 \times 10^7/\text{ml}$, que se añadió en una placa de cultivo celular de 96 pocillos, 100 μl en cada pocillo y 6 pocillos por ratón, en la que a 3 pocillos se les añadió ConA (concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y otros 3 pocillos sin adición como control. Después de 68 h de incubación en una incubadora de CO₂ con el 5% de CO₂ y 37°C, se añadió disolución de MTT (5 mg/ml) disolución (10 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$), después de una incubación adicional durante 4 h, se añadieron 100 μl de disolución de formazán a cada pocillo, seguido por una incubación adicional en una incubadora de CO₂ a 37°C hasta la disolución total del formazán. Se determinó el valor de DO a 570 nm en un lector de microplacas y se calculó el índice de estimulación (SI): $SI = DO$ promedio en el tubo de estimulación con ConA/ DO promedio en el tubo de control.

Ensayo de fagocitosis de macrófagos por enterocelia:

En el día 38^o, se tomaron aleatoriamente 10 ratones de cada grupo. Se inyectó a cada ratón 1 ml de suspensión de eritrocitos de gallina al 5% en la cavidad abdominal. Después de 30 min, se sacrificó el animal mediante luxación cervical. Se inyectó en la cavidad abdominal 1 ml de solución salina normal y se frotó suavemente el abdomen durante 1 min. Se cortó la piel de la pared abdominal con la ranura abierta en la capa muscular. Se usó un tubular para aspirar 1 ml de líquido peritoneal de la cavidad abdominal, que se colocó gota a gota sobre un portaobjetos limpio. Se colocó el portaobjetos en una caja de esmalte con una almohadilla de tela húmeda y luego se incubó en una incubadora a 37°C durante 30 min. Se sacó el portaobjetos y se lavó para retirar el sobrenadante y las células que no se habían unido al portaobjetos y se secó al aire bajo temperatura ambiente. Después de la fijación con disolución de acetona/metanol 1:1, se colocó el portaobjetos en disolución de colorante de Giemsa durante 15~30 min y luego se lavó y se secó al aire. Se contaron los macrófagos bajo aumento alto, y se contaron 100 células por portaobjetos para calcular el porcentaje de fagocitosis y el índice de fagocitosis.

Porcentaje de fagocitosis (%) = (número de macrófagos que se toman de eritrocitos de gallina/número de macrófagos contados) \times 100

Índice de fagocitosis = (número total de eritrocitos de gallina que se han tomado/número de macrófagos contados)

1.6. Análisis estadístico

Los datos se mostraron como $\bar{x} \pm s$, se realizó análisis de varianza con el software estadístico SPSS 13.0, se realizó comparación por parejas con el método SNK, y el nivel de prueba es $\alpha=0,05$.

2. Resultados

2.1. Influencia de las muestras sobre la proliferación de linfocitos

ES 2 805 825 T3

Tabla 1: Influencia de las muestras sobre la proliferación de linfocitos en ratones ($\bar{X} \pm S$, n = 10)

| Grupo | Índice de estimulación (SI) |
|---|-----------------------------|
| Grupo de control de blanco | 1,24±0,19 |
| Grupo de control positivo | 2,13±0,47* |
| Grupo de dosificación alta de la muestra 1 | 2,09±0,23* |
| Grupo de dosificación media de la muestra 1 | 1,87±0,26* |
| Grupo de dosificación baja de la muestra 1 | 1,46±0,34* |
| Grupo de dosificación alta de la muestra comparativa 1 | 1,51±0,18* |
| Grupo de dosificación media de la muestra comparativa 1 | 1,30±0,22 |
| Grupo de dosificación baja de la muestra comparativa 1 | 1,27±0,15 |

Nota: * significativo en comparación con el grupo de control de blanco (p <0,05)

5 Según la tabla 1, los valores de SI de los grupos de dosificación alta, media y baja de la muestra 1 fueron significativamente mayores que los del grupo de control de blanco (p<0,05) y mostraron dependencia de la dosis. El valor de SI del grupo de dosificación alta de la muestra comparativa 1 es significativamente mayor que el del grupo de control de blanco (p<0,05), los valores de SI de los grupos de dosificación media y baja de la muestra comparativa 1 no se distinguieron significativamente de los del grupo de control de blanco (p>0,05). El valor de SI del grupo de dosificación baja de la muestra 1 es significativamente mayor que el del grupo de dosificación media de la muestra comparativa 1 (p<0,05).

10 Los resultados mostraron que el uso de la composición de nucleótidos puede intensificar significativamente la proliferación de linfocitos en ratones y mostró un efecto mejor que la muestra comparativa.

15 2.2. Influencia de las muestras sobre la fagocitosis de macrófagos

Tabla 2: Influencia de las muestras sobre la fagocitosis de macrófagos en ratones ($\bar{X} \pm S$, n = 10)

| Agrupamiento | Porcentaje de fagocitosis (%) | Índice de fagocitosis |
|---|-------------------------------|-----------------------|
| Grupo de control de blanco | 35,2±4,2 | 0,43±0,06 |
| Grupo de control positivo | 52,7±8,6* | 0,62±0,10* |
| Grupo de dosificación alta de la muestra 1 | 50,1±2,5* | 0,59±0,01* |
| Grupo de dosificación media de la muestra 1 | 48,7±3,2* | 0,57±0,13* |
| Grupo de dosificación baja de la muestra 1 | 46,7±3,1* | 0,53±0,07* |
| Grupo de dosificación alta de la muestra comparativa 1 | 49,8±2,0* | 0,50±0,22* |
| Grupo de dosificación media de la muestra comparativa 1 | 34,9±1,7 | 0,44±0,12 |
| Grupo de dosificación baja de la muestra comparativa 1 | 35,1±3,9 | 0,42±0,19 |

20 Nota: * significativo en comparación con el grupo de control de blanco (p <0,05)

25 Según la tabla 2, el porcentaje de fagocitosis y el índice de fagocitosis de los grupos de dosificación alta, media y baja de la muestra 1 son significativamente mayores que los del grupo de control de blanco (p<0,05). El porcentaje de fagocitosis y el índice de fagocitosis del grupo de dosificación alta de la muestra comparativa 1 son significativamente mayores que los del grupo de control de blanco (p<0,05). El porcentaje de fagocitosis y el índice de fagocitosis de los grupos de dosificación media y baja de la muestra comparativa 1 no se distinguen significativamente de los del grupo de control de blanco (p>0,05). El porcentaje de fagocitosis y el índice de fagocitosis del grupo de dosificación baja de la muestra 1 son significativamente mayores que los del grupo de dosificación media de la muestra comparativa 1 (p<0,05).

30 Los resultados mostraron que el uso de la composición de nucleótidos puede intensificar significativamente la función de fagocitosis de macrófagos por enterocelia en ratones y mostró un efecto mejor que la muestra comparativa.

35 3. Conclusión

Según los resultados de los experimentos, la composición de nucleótidos puede mejorar significativamente la función de transformación de linfocitos, intensificar la función de fagocitosis de macrófagos por enterocelia, mediante lo cual muestra el efecto de intensificación de la función de inmunidad y tal efecto de inmunorregulación es significativamente mejor que la muestra comparativa.

En otro aspecto, un efecto de inmunorregulación más potente significa que puede lograrse el mismo efecto o similar con menos dosificación, lo que muestra una ventaja significativa con respecto al coste en producción industrial a gran escala.

5 Sobre esta base, se repiten los experimentos anteriores, en los que la muestra 1 se reemplazó por la muestra 2 y la muestra 3. En cuanto a la muestra 2 y la muestra 3, se obtuvieron resultados similares a la muestra 1.

10 Ejemplo de referencia 2: efecto de inmunoestimulación (II)

El fin de este ejemplo es someter a prueba el efecto de inmunoestimulación de la composición de nucleótidos, y el principio y las etapas se basan en los requisitos y las especificaciones de "Technical standards of examination and evaluation for healthcare food (2003)", segunda parte, "Functional test method", capítulo I.

15 1. Materiales y métodos

1.1. Instrumentos principales

20 Centrífuga refrigerada de alta velocidad (SIGMA 3-30K), agitador (Vortex4 digital), pipeta (Eppendorf, Alemania), analizador de células de sangre completa (Urit, U-2900PLUS), incubadora de CO₂ (Thermo 311), lector de microplacas (Biotek H4), espectrofotómetro (Shanghai JingKe 722s), mesa de laboratorio limpia (Shangyu Xingxing Instrument CO., LTD SW-CJ-2D), esterilizador de autoclave (Sanyo Japan MLS-3781-PC 75L), refrigeradora criogénica (Hangzhou Aipu Instrument CO., LTD DW-40L058), microscopio invertido (Nikon Japan Eclipse Ti-S), compás calibrador Vernier (Standard Gage, EE.UU.), balanzas electrónicas (Sartorius BSA124S-CW), volúmetro de los dedos de la pata (Jinan Yiyuan Science Development CO., LTD ILS-7C), analizador de imágenes automático de placas hemolíticas (Beijing Antai Yongxin Medical Technology CO., LTD AT-Spot 5100), citometría de flujo (BD, US FACSCalibur).

30 1.2 Reactivos principales

35 Ciclofosfamida (Jiangsu Hengrui Medicine CO., LTD), etilendiamina-tetraacetato de dipotasio (fábrica Beijing Reagent), medio celular líquido RPMI1640 (Shanghai Yuanlong Biology Technology Company), suero de ternera bovino, 2-mercaptoetanol, penicilina, estreptomina, disolución de ConA (Beijing Mengyimei Biology Technology CO., LTD), disolución de Hank estéril, disolución de marcador BrdUp (Beijing Mengyimei Biology Technology CO., LTD), dinitrofluorobenceno (Beijing Qingshengda Chemical Engineering Technology CO., LTD), sulfuro de bario, eritrocitos de oveja (SRBC), suero de cobaya, tinte Indian (Shanghai Yuanmu Biotechnology CO., LTD), células YAC-1 (Shanghai Enzyme Research Biotechnology CO., LTD), tampón Tris-HCl (Beijing Mengyimei Biology Technology CO., LTD).

40 1.3 Animales

Se proporcionaron 770 ratones BALB/c macho sanos de 3-4 años y un peso de 11-13 g por Beijing Huafukang Bioscience CO., LTD y se acomodaron en el nivel 2 del animalario de la Chinese Academy of Medical Science, Union Institute of Materia Medica: temperatura ambiente (25±2°C), % de humedad relativa (55±2), iluminación 12 h/12 h, acceso libre a alimento y agua, 4-5 animales por jaula. La prueba se inició después de una adaptación durante 3 días.

45 Se alimentaron los 770 animales en 5 grupos inmunitarios grandes, 154 en cada grupo grande, que se dividieron aleatoriamente en 11 grupos (dosificación alta y baja para 5 muestras de nucleótidos, 10 grupos en total y un grupo como grupo de control), 14 en cada grupo. Grupo inmunitario 1: hipersensibilidad de tipo retardada; grupo inmunitario 2: ensayo de transformación de linfocitos en ratones, ensayo de actividad de linfocitos citolíticos naturales, razón de los órganos con respecto al cuerpo; grupo inmunitario 3: valor a la mitad de la hemólisis, número de células productoras de anticuerpos; grupo inmunitario 4: prueba de aclaramiento de carbono; grupo inmunitario 5: ensayo de macrófagos de la cavidad abdominal de ratones que toman microesferas fluorescentes. Cada muestra se administró mediante alimentación por sonda durante 28 días, una vez por día, siendo el volumen de alimentación por sonda 0,2 ml/10 g. El grupo de control recibió agua destilada mediante alimentación por sonda. Después de la administración, se sacrificaron los ratones y se determinaron diversos indicadores inmunitarios.

50 1.4 Muestras de prueba

Las muestras 1-3 eran una composición de nucleótidos para el uso según la invención. Las muestras comparativas 2 y 3 eran otras dos composiciones de nucleótidos divulgadas en la técnica anterior. Cada muestra se ajustó para los grupos de dosificación baja y alta como 120,7 mg/kg y 1207,0 mg/kg, respectivamente.

55 1.5 Artículos de prueba e indicador

65 1.5.1 Razón en peso órganos/cuerpo: Se pesaron los ratones inicialmente y en el día 28º después de la administración como peso inicial y peso final. Se sacrificaron los ratones por luxación y se extrajeron el bazo y el timo y se retiró la

ES 2 805 825 T3

fascia. Se absorbió la sanguinolencia sobre la superficie mediante papel de filtro y se pesaron los órganos para calcular la razón en peso bazo/cuerpo y la razón en peso timo/cuerpo.

5 1.5.2 Hipersensibilidad de tipo retardada (engrosamiento de los dedos de la pata, DTH): después de la administración sucesiva durante 28 días, se le inyectó a cada ratón en la cavidad abdominal un volumen de concentrado de eritrocitos al 2% de SRBC (v/v, formulado en solución salina normal) de 0,2 ml de SRBC. Cuatro días después de la sensibilización, se midió el grosor de la fascia plantar de la pata trasera izquierda y se calculó el valor promedio según 3 mediciones en el mismo sitio. En el sitio de la medición, se inyectaron por vía subcutánea 20 μ l de SRBC al 20%. 24 h después de la inyección, se midió el grosor de la fascia plantar de la pata trasera izquierda y se calculó el valor promedio según 3 mediciones. La diferencia en el grosor antes y después de la exposición (grado de hinchamiento de los dedos de la pata) se usó para el grado de DTH presente.

15 1.5.3 Transformación de linfocitos en ratones inducida por ConA (método de MTT): después de la administración sucesiva durante 28 días, se sacrificaron los ratones. Después de la esterilización en alcohol al 75% en un vaso de precipitados, se extrajo el bazo en condiciones estériles y se colocó en una placa con cuatro capas de gasa de 3 cm \times 3 cm (esterilizada en autoclave), a la que se le añadió la cantidad apropiada de disolución de Hank. Se envolvió el bazo con gasa y se molió con pinzas acodadas para preparar una suspensión de células individuales, que se lavó dos veces con disolución de Hank y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. Se suspendieron las células en 2 ml de medio líquido completo y se contaron las células viables para ajustar la concentración celular para que fuera de 5×10^6 /ml. Se añadieron las suspensiones celulares en una placa de cultivo de 24 pocillos en pocillos duplicados, 1 ml en cada pocillo. Se añadieron 75 μ l de disolución de ConA (correspondiente a 7,5 μ g/ml) en un pocillo y el otro pocillo se usó como control. Se incubaron las células con el 5% de CO₂, 37°C durante 72 h. 4 h antes del final de la incubación, se aspiraron suavemente 0,7 ml de sobrenadante de cada pocillo y luego se añadieron 0,7 ml de medio de cultivo líquido RPMI 1640 libre de suero de ternera bovino. Al mismo tiempo, se añadieron 50 μ l de MTT (5 mg/ml)/pocillo y se continuó la incubación durante 4 h. Después de la incubación, se añadió 1 ml de isopropanol ácido a cada pocillo con batido para homogeneidad de manera que se disolvió completamente el cristal de color violeta. El sistema se dividió en una placa de cultivo de 96 pocillos, teniendo cada pocillo 3 pocillos paralelos. Se determinó el valor de densidad óptica a 570 nm con detector de inmunoadsorción ligado a enzimas. La capacidad de proliferación de linfocitos se expresó como el valor de densidad óptica del pocillo con ConA menos el del pocillo sin ConA.

30 1.5.4 Ensayo de células productoras de anticuerpos: después de la administración sucesiva durante 28 días, se lavó la sangre de oveja tres veces con solución salina normal y se inyectó a cada ratón en la cavidad abdominal un volumen de concentrado de eritrocitos al 2% (v/v, formulado en solución salina normal) de 0,2 ml de SRBC para la inmunización. Cuatro días después de la inmunización con SRBC, se sacrificaron los ratones y se extrajo el bazo para preparar una suspensión celular de 5×10^6 células/ml. Se calentó agarosa para disolución y se mezcló con cantidades dobles de disolución de Hank, que luego se dividió en tubos, 0,5 ml en cada tubo. En el tubo se añadió volumen de concentrado de eritrocitos al 20% (v/v, formulado en solución salina normal) de 50 μ l de SRBC, 200 μ l de suspensión de células del bazo. Después del mezclado rápido, se vertió la mezcla en una placa de 6 pocillos recubierta con una capa fina de agarosa. Después de la solidificación del agar, se colocó la placa en una incubadora de CO₂ durante 1 h, luego se añadió complemento diluido con tampón SA (1:10) y se realizó la incubación durante 2 h. Se contó el número de placas hemolíticas.

45 1.5.5 Valor a la mitad de la hemólisis (CH₅₀) de hemolisina sérica: después de la administración sucesiva durante 28 días, se lavó la sangre de oveja tres veces con solución salina normal y se inyectó a cada ratón en la cavidad abdominal un volumen de concentrado de eritrocitos al 2% (v/v, formulado en solución salina normal) de 0,2 ml de SRBC para la inmunización. Después de cuatro días, se extrajo sangre mediante la retirada del globo ocular en un tubo de centrifuga de 1,5 ml, que se colocó a 4°C durante 1 h para permitir una separación suficiente del suero. Se centrifugó el tubo a 2000 rpm durante 10 min y se recogió el suero. Se diluyó el suero 100 veces con tampón SA. Se añadió el suero diluido en una placa de 96 pocillos, 100 μ l en cada pocillo, a los que se les añadió sucesivamente 50 μ l de SRBC al 10% (v/v), 100 μ l de complemento diluido con tampón SA (1:8). Se incubó la placa en un baño de agua termostático a 37°C durante 30 min y luego se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. Se añadieron 50 μ l de sobrenadantes de los pocillos de muestra y del pocillo de control de blanco en otra placa de 96 pocillos, a la que se le añadieron 150 μ l de reactivo de VanKampen-Zijlstra. Al mismo tiempo, se ajustó el pocillo a la mitad de la hemólisis, al que se añadieron 12,5 μ l de SRBC al 10% (v/v) y luego reactivo de VanKampen-Zijlstra hasta 200 μ l. Se mezcló de manera homogénea la mezcla con un agitador y se dejó reposar durante 10 min. Los valores de la densidad óptica de cada pocillo a 540 nm se determinaron con un lector de microplacas automático.

La cantidad de hemolisina se muestra como el valor a la mitad de la hemólisis (CH₅₀) y se calcula como:

60 CH₅₀ de la muestra = (valor de densidad óptica de la muestra/valor de densidad óptica tras la mitad de la hemólisis de SRBC) \times razón de dilución

65 1.5.6 Ensayo de macrófagos de la cavidad abdominal de ratones que toman microesferas fluorescentes: después de la administración sucesiva durante 28 días, cuatro días antes del final de la alimentación por sonda, se le inyectaron a cada ratón 0,2 ml de SRBC al 2% para activar los macrófagos. En el día de la prueba, se sacrificaron los ratones

ES 2 805 825 T3

con luxación de la columna cervical, a cuya cavidad abdominal se le inyectó disolución de Hank añadida con suero de ternera bovino, 3 ml/animal. Se amasó el abdomen suavemente 20 veces para lavar los macrófagos de la cavidad abdominal suficientemente. Se cortó la pared abdominal con una pequeña ranura abierta, y se aspiraron 2 ml de líquido de lavado abdominal y se filtraron en un tubo con un filtro de 75 µm. Se ajustó el número de macrófagos a 4~6×10⁵/ml. Se usó una pipeta para transferir 1 ml de líquido de lavado abdominal en una placa de cultivo de 6 pocillos, a la que se le añadieron las microesferas fluorescentes acondicionadas previamente (1×10⁷/placa). Se incubó la placa en una incubadora de CO₂ a 37°C en la oscuridad durante 120 min. Después de la incubación, se descartó el sobrenadante (que contenía células que no eran adherentes y microesferas fluorescentes en exceso). Se usó 1,0 ml de tampón PBS para lavar suavemente dos veces. Después de la retirada del sobrenadante, se añadieron 0,3 ml de tampón PBS a 4°C. Se rascaron las células adherentes con un rascador de células y se filtraron con un filtro de 75 µm después de un batido suave. Las células estaban listas para el análisis.

Los resultados se calcularon como

Porcentaje de fagocitosis (%) = (número de macrófagos que toman microesferas fluorescentes/número de macrófagos contados) × 100

Índice de fagocitosis = (número total de microesferas fluorescentes que se han tomado/número de macrófagos contados)

1.5.7 Ensayo de actividad de linfocitos citolíticos naturales (método de deshidrogenasa láctica (LDH)):

Después de la administración sucesiva durante 28 días, 24 h antes de la prueba, las células diana YAC-1 se sometieron a cultivo de paso. Antes del uso, se lavaron las células dos veces con disolución de Hank y se ajustaron a la concentración de 1 × 10⁵/ml (células diana) con medio líquido completo RPMI 1640 que contenía suero de ternera bovino al 10%. Se sacrificaron los ratones por luxación cervical y se extrajo el bazo en condiciones estériles para preparar la suspensión de células del bazo, que se lavó dos veces con disolución de Hank, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y volvió a suspenderse con 2 ml de medio líquido RPMI 1640 que contenía suero de ternera bovino al 10%. Se usó azul de tripano para realizar el recuento por tinción de células viables (las células viables deberían estar por encima del 95%) y la concentración celular se ajustó a 1 × 10⁷/ml (células efectora) de manera que la razón de células efectoras con respecto a células diana era de 100:1. Se añadieron 100 µl de células diana y células efectoras, respectivamente, a una placa de cultivo de 96 pocillos en forma de U. Al pocillo de liberación natural diana se le añadieron 100 µl de células diana y medio líquido, respectivamente, y al pocillo de liberación máxima diana se le añadieron 100 µl de células diana y NP40 al 1%, respectivamente. Estos pocillos se ajustaron con tres pocillos paralelos y se incubaron en una incubadora con el 5% de CO₂ a 37°C durante 4 h. Se centrifugó la placa de cultivo de 96 pocillos a 1500 rpm durante 5 minutos, se aspiraron 100 µl de sobrenadante de cada pocillo y se colocaron en una placa de cultivo plana de 96 pocillos, a la que se añadieron 100 µl de disolución base de LDH. Se realizó la reacción durante 3 minutos y a cada pocillo se le añadieron 30 µl de disolución de HCl 1 mol/l para extinguir la reacción. Se determinó el valor de DO a 490 nm con un lector de microplacas y se calculó la actividad de linfocitos citolíticos naturales según la siguiente fórmula.

% de actividad de linfocitos citolíticos naturales = (DO del pocillo de reacción – DO del pocillo de liberación natural)/(DO del pocillo de liberación máxima – DO del pocillo de liberación natural) × 100%

1.5.8 Ensayo de aclaramiento de carbono: se administró de manera sucesiva a los animales durante 28 días y se pesaron. Se inyectó tinte Indian a través de la vena de la cola. 2, 10 min después de la inyección del tinte, se extrajeron 20 µl de sangre y se añadieron en 2 ml de disolución de carbonato de sodio al 0,1% y se determinó el valor de DO a 600 nm. Se sacrificaron los ratones y se extrajeron el hígado y el bazo, y se absorbió la sanguinolencia sobre la superficie mediante un papel de filtro y se pesaron los órganos.

Se usó el índice de fagocitosis para presentar la capacidad de aclaramiento de carbono en los ratones y se calculó según la siguiente fórmula:

$$k = \frac{\lg DO_1 - \lg DO_2}{t_2 - t_1}$$

$$\text{Índice de fagocitosis} = \frac{\text{peso corporal}}{\text{peso del hígado} + \text{peso del bazo}} \times \sqrt[3]{k}$$

1.6 Criterios: en cuanto a los cuatro aspectos principales de la inmunidad celular, la inmunidad humoral, la función de monocitos-macrófagos y la actividad de linfocitos citolíticos naturales, si cualesquiera dos aspectos tuvieron resultados positivos, debe considerarse que la muestra tiene la función de intensificar la inmunidad. En los artículos del ensayo de la función de inmunidad celular, si dos resultados de la prueba fueron positivos, o dos grupos de dosificación de cualquier prueba tuvieron un resultado positivo, el ensayo de la función de inmunidad celular tuvo un resultado positivo. En los artículos del ensayo de la función de inmunidad humoral, si dos resultados de la prueba fueron positivos o si

ES 2 805 825 T3

dos grupos de dosificación de cualquier prueba tuvieron un resultado positivo, el ensayo de la función de inmunidad humoral tuvo un resultado positivo. En los artículos del ensayo de función de monocitos-macrófagos, si dos resultados de la prueba fueron positivos, o si dos grupos de dosificación de cualquier prueba tuvieron un resultado positivo, el ensayo de función de monocitos-macrófagos tuvo un resultado positivo. En cuanto al ensayo de actividad de linfocitos citolíticos naturales, si uno o más grupos de dosificación tuvieron un resultado positivo, el ensayo de actividad de linfocitos citolíticos naturales tuvo un resultado positivo.

5

2. Resultados:

10 Después de la administración oral de las muestras de prueba durante 28 días, las mediciones de los artículos de la función inmunitaria fueron de la siguiente manera:

Las razones de peso corporal y órganos no se distinguieron significativamente de los grupos normales.

15 Los resultados positivos y negativos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

| Agrupamiento | inmunidad celular | | inmunidad humoral | | Función de monocitos-macrófagos | | Actividad de linfocitos citolíticos naturales |
|---|---|-------------------------------------|------------------------------------|---|-----------------------------------|-------------------------------------|---|
| | Ensayo de transformación de linfocitos del bazo | Hipersensibilidad de tipo retardado | Células productoras de anticuerpos | Valor a la mitad de la hemólisis CH ₅₀ | Ensayo de aclaramiento de carbono | Ensayo de fagocitosis de macrófagos | |
| Dosificación baja de la muestra 1 | positivo | negativo | positivo | positivo | positivo | negativo | positivo |
| Dosificación baja de la muestra 2 | negativo | negativo | negativo | positivo | positivo | positivo | positivo |
| Dosificación baja de la muestra 3 | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo | negativo |
| Dosificación baja de la muestra comparativa 2 | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo |
| Dosificación baja de la muestra comparativa 3 | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo | positivo |
| Dosificación alta de la muestra 1 | positivo | negativo | positivo | negativo | positivo | positivo | positivo |
| Dosificación alta de la muestra 2 | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo | positivo | positivo |
| Dosificación alta de la muestra 3 | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo | positivo | positivo |
| Dosificación alta de la muestra comparativa 2 | positivo | negativo | negativo | negativo | positivo | negativo | positivo |

ES 2 805 825 T3

| | | | | | | | |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Dosificación alta de la muestra comparativa 3 | positivo | negativo | negativo | negativo | positivo | positivo | positivo |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|

Según los resultados de la tabla 3, a partir de los criterios para los cuatro aspectos principales (es decir, los cuatro aspectos principales en la sección 1.6), las muestras 1, 2, 3 y la muestra comparativa 3 se consideraron positivas y, por tanto, tuvieron el efecto de inmunoestimulación. Por el contrario, la muestra comparativa 2 no se consideró positiva.

5 Sobre esta base, al igual que para las muestras 1-3 y la muestra comparativa 3, desde el punto de los grupos de dosificación anteriores (sección 1.6), la composición de nucleótidos tuvo más indicadores positivos de inmunoestimulación, mostrando un efecto de inmunoestimulación más potente y más completo. Por ejemplo, 1) la muestra 1 tuvo el efecto de inmunidad celular, mientras que otras muestras no; 2) la muestra 1 tuvo un efecto de inmunidad humoral, mientras que otras muestras no; 3) las muestras 1 y 2 fueron positivas para el ensayo de aclaramiento de carbono, mientras que otras muestras no lo fueron; 4) las muestras 2, 3 y la muestra comparativa 3 tuvieron función de fagocitosis de macrófagos, mientras que otras muestras no; 5) las muestras 1, 2, 3 y la muestra comparativa 3 fueron positivas para la actividad de linfocitos citolíticos naturales.

15 A partir de los resultados anteriores, la composición de nucleótidos fue eficaz en la estimulación de la función de inmunidad y mostró un efecto mejor que las composiciones de la técnica anterior. De manera similar, tal como se indicó anteriormente en el ejemplo 1, un efecto de inmunorregulación más potente significa que puede lograrse el mismo efecto o uno similar con menos dosificación, lo que muestra una ventaja significativa con respecto al coste en la producción industrial a gran escala.

20 Ejemplo 3: protección frente al daño y reparación de la composición de nucleótidos

El fin de este ejemplo es someter a prueba el efecto de la composición de nucleótidos para el uso según la invención en proporcionar protección frente al daño y reparación.

25 1. Materiales y métodos

1.1 Instrumentos y reactivos

30 El medio RPMI-1640 y el medio con alto contenido de azúcar DMEM se adquirieron de Gibco. 5'-AMP (A1752), 5'-CMP-Na₂ (C1006), 5'-GMP-Na₂ (G8377), 5'-UMP-Na₂ (U6375), azul de tiazolilo (MTT) e insulina se adquirieron de Sigma. El suero de ternera fetal se adquirió de Sijiqin Hanzhou. Los kits usados en el ejemplo, tales como los kits LDH, SOD, MDA, se adquirieron del Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute. El kit de ensayo de tripsina, doble anticuerpo y proteína BCA se adquirieron de Beyotime. Otros reactivos, tales como dimetilsulfóxido (DMSO) y peróxido de hidrógeno, eran productos domésticos con pureza analítica y se adquirieron de Sinopharm Chemical Reagent CO., LTD, Shanghai. El frasco de cultivo de 25 cm², la placa de cultivo celular de 96 pocillos, la placa de cultivo celular de 6 pocillos, la placa de cultivo celular de 60 mm, el tubo de centrifuga de 50 ml y el tubo de centrifuga de 15 ml se adquirieron de Corning, EE.UU. El filtro de jeringa desechable se adquirió de Millipore. Los instrumentos principales fueron la cabina de bioseguridad Heal Force (Heal Force Bio-Meditech Holdings Limited, Hong Kong, China), el contador de células Countstar (Inno-Alliance Biotech, EE.UU.), el microscopio de fluorescencia EVOS FL (Thermo Fisher), el lector de microplacas (Finnpipette), el espectrofotómetro visible 721 (Shanghai INESA Analytical Instrument CO., LTD), el baño de agua termostático (Shanghai Boxun), la unidad de craqueo ultrasónica (Ningbo Xinzhi Bioscience CO., LTD), el microscopio invertido (Nikon, Japón), la centrifuga refrigerada (Thermo Fisher).

45 1.2 Materiales

La célula epitelial de la cripta del intestino delgado de rata (célula IEC-6) se obtuvo de la Chinese Academy of Medical Science, Cell Research Institute. El hepatocito normal de rata (célula BRL 3A) se obtuvo de la Chinese Academy of Medical Science, Cell bank en Shanghai.

50 1.3 Muestra de prueba

Las muestras 1-3 eran la composición de nucleótidos para el uso según la invención. Las muestras comparativas 2 y 3 eran composiciones de nucleótidos divulgadas en la técnica anterior (anteriormente). Cada muestra se ajustó con tres concentraciones de baja, media y alta (62,5, 250, 1000 μmol/l, respectivamente).

55 1.4 Modelo e indicadores

60 El daño por oxígeno es uno de los daños más comunes y típicos para un organismo vivo (por ejemplo, daño en el tracto intestinal). Se sabe que muchas enfermedades como las del sistema digestivo de humanos y animales están

estrechamente asociadas con radicales y especies reactivas de oxígeno, por ejemplo, se ha demostrado que el daño por oxígeno es una de las causas de la enteropatía inflamatoria. La reacción redox en la célula se mantiene en equilibrio bajo un estado fisiológico normal, y los radicales de oxígeno y el sistema antioxidante en el cuerpo son importantes para el equilibrio. Si se producen en gran medida radicales de oxígeno o se reduce la función del sistema antioxidante, se provocará daño a las células tisulares. La SOD (superóxido dismutasa) es una antioxidasa importante, que puede aclarar el O_2^- producido por el peróxido y protege a las células del daño y, por tanto, es esencial para el equilibrio de oxidación/antioxidante en la célula. En cuanto al daño provocado por el óxido/peróxido, la deshidrogenasa láctica (LDH) es el indicador para la integridad de la membrana celular o necrosis celular. Además, el óxido/peróxido en las células puede atacar a los ácidos grasos poliinsaturados en las películas biológicas, lo que conduce a la peroxidación lipídica y a la formación de peróxido lipídico, por ejemplo, malondialdehído (MDA). Los radicales de oxígeno no sólo provocan daño celular por la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las películas biológicas, sino que conducen al daño celular por el producto de descomposición del hidroperóxido lipídico, y, por tanto, la cantidad de MDA puede reflejar generalmente el grado de peroxidación lipídica, mostrando así el grado de daño celular. Por tanto, las concentraciones, las actividades o los cambios de las mismas de las sustancias y la tasa de supervivencia celular pueden usarse para evaluar los efectos protectores de la composición de nucleótidos para el uso según la invención. Véase, "Study on Healing effect of *Rheum Tanguicum* Polysaccharides (RTP) on intestinal epithelial cell injury and its mechanism", Tesis del Dr. Liu Lin-na, Fourth Military Medical University, 1 de mayo de 2005; "Protection of Longyanshe Polysaccharide on CCl_4 - induced Damage of Primary Cultured Hepatocytes in Rats", Duan Xiaoqun *et. al*, China Pharmacy, 2006 vol. 17, n.º 15, págs. 1132-1143; "In vitro Protective Effects of Baoganning On Injury of Liver Cells Induced by Hydrogen Peroxide in Rats" Zhao Jinjun *et. al*, Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2002, vol. 19, n.º 3, págs. 211-213.

Además, según los experimentos del inventor, el H_2O_2 a 600 $\mu\text{mol/l}$ disminuirá significativamente la tasa de supervivencia de las células BRL 3A ($P < 0,01$). Por tanto, en la prueba de daño oxidativo de BRL 3A, se usó H_2O_2 a 600 $\mu\text{mol/l}$ para inducir daño oxidativo celular. De manera similar, el H_2O_2 a 100 $\mu\text{mol/l}$ se usó para inducir daño oxidativo celular para la célula IEC-6.

Según la información anterior, en este ejemplo, se investigó el efecto protector de la composición para el uso según la invención frente al daño oxidativo celular tratando las células con composición de nucleótidos e induciendo daño oxidativo celular a través de H_2O_2 . Para células BRL 3A, se sometieron a prueba la tasa de supervivencia celular y la actividad de SOD. Para las células IEC-6, se sometieron a prueba la actividad de LDH y el contenido de MDA.

1.5 Cultivo celular y preparación de muestras

La célula IEC-6 se cultivó a 37°C, incubadora con el 5% de CO_2 , con medio RPMI-1640 que contenía FBS al 5%, insulina 2 mg/l, y el pase se realizó cada cuatro días. La célula BRL 3A se cultivó a 37°C, incubadora con el 5% de CO_2 , con medio con alto contenido de azúcar DMEM que contenía FBS al 10%, y el pase se realizó cada cinco días. Se formuló la composición de nucleótidos como 50 mmol/l de disolución madre con PBS, que se filtró para esterilización y se almacenó a -20°C para su uso.

1.6 Procedimientos

En cuanto a la tasa de supervivencia celular, se inocularon las células en fase logarítmica en una placa de 96 pocillos a 5000/pocillo. Después de la adherencia, se incubaron las células con medio que contenía diversas concentraciones de composiciones de nucleótidos durante 24 h (cada conjunto de concentraciones con 6 repeticiones). En la prueba, hubo control normal sin H_2O_2 y control positivo con sólo H_2O_2 . Después de 24 h, se añadió H_2O_2 para inducir daño oxidativo celular, respectivamente. Después de 2 h, se usó el método de MTT para determinar la tasa de supervivencia celular. Tasa de supervivencia celular = valor de DO del grupo de prueba / valor de DO del control normal \times 100%.

Para otros indicadores, se inocularon las células en fase logarítmica en una placa de cultivo celular de 60 mm a 7 \times 10⁵/placa. Después de la adherencia, se incubaron las células con medio que contenía diversas concentraciones de composiciones de nucleótidos durante 24 h (cada conjunto de concentraciones con 3 repeticiones). En la prueba, hubo control normal sin H_2O_2 y control positivo con sólo H_2O_2 . Después de 24 h, se añadió H_2O_2 a una determinada concentración para inducir daño oxidativo celular, respectivamente, y se continuó el cultivo. Después de 2 h, se aspiró el medio líquido y se centrifugó, y se tomó el sobrenadante para un análisis relevante. Se digirieron las células con tripsina y se lavaron con PBS una vez después de la centrifugación y luego volvieron a suspenderse en 700 μl de PBS, que luego se rompieron mediante craqueo supersónico y se sometieron a prueba para determinar todos los indicadores en un plazo de 2 días.

1.7 Análisis de datos

Todos los datos se mostraron como promedio \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm s$) y el análisis estadístico se realizó con el software SPSS17.0, las comparaciones de diferencias entre grupos utilizaron el análisis de varianza unidireccional. $P < 0,05$ significa significación estadística y $P < 0,01$ significa significación estadística alta.

2. Resultados

2.1 Ensayo de tasa de supervivencia celular

5 Los resultados de la tasa de supervivencia celular de la célula BRL 3A se muestran en la figura 1. Según esta figura, el tratamiento con H₂O₂ redujo significativamente la tasa de supervivencia celular de BRL 3A ($P < 0,01$). Al tratar las células con muestras de composición de nucleótidos, las tasas de supervivencia celular aumentaron en diversos grados, especialmente las muestras 1 y 2. Los resultados estadísticos mostraron que, para todos los grupos de concentración de la muestra 1, los grupos de concentración baja y media de la muestra 2 y el grupo de concentración baja de la muestra 3, las tasas de supervivencia celular fueron significativamente mayores que las del control de H₂O₂ ($P < 0,01$ o $P < 0,05$). Además, para todos los grupos de concentración de la muestra 1 y el grupo de concentración baja de la muestra 2, las tasas de supervivencia celular fueron significativamente mayores que las de todos los grupos de concentración de las muestras comparativas 2 y 3 ($P < 0,01$ o $P < 0,05$). Por consiguiente, el tratamiento de células con la composición de nucleótidos para el uso según la invención puede aumentar de manera eficaz la tasa de supervivencia de las células con daño oxidativo, indicando un efecto protector frente al daño oxidativo y mostrando además la reparación de la promoción de las células después del daño. Además, el efecto protector es mejor que la composición de nucleótidos de la técnica anterior.

2.2 Ensayo de actividad de SOD

20 Los resultados de la actividad de SOD de la célula BRL 3A se muestran en la figura 2. Según esta figura, el tratamiento con H₂O₂ redujo significativamente las actividades de SOD en las células ($P < 0,01$). Al tratar las células con muestras de composición de nucleótidos, las actividades de SOD en las células aumentaron en diversos grados. Para todos los grupos de concentración de la muestra 1 ($P < 0,05$), el grupo de concentración media de la muestra 2 ($P < 0,05$), los grupos de concentración media y alta de la muestra 3 ($P < 0,01$), las actividades de SOD en las células fueron significativamente mayores que las del control de H₂O₂. Además, para el grupo de concentración media de la muestra 3, las actividades de SOD en las células fueron significativamente mayores que las de los grupos de concentración media y alta de la muestra comparativa 2 ($P < 0,05$) y todos los grupos de concentración de la muestra comparativa 3 ($P < 0,05$). En cuanto al grupo de concentración alta de la muestra 3, las actividades de SOD en las células fueron significativamente mayores que las del grupo de concentración alta de la muestra comparativa 2 ($P < 0,05$) y grupos de concentración baja y alta de la muestra comparativa 3 ($P < 0,01$). Por consiguiente, la composición de nucleótidos para el uso según la invención puede aumentar significativamente la concentración de sustancia activa antioxidante (por ejemplo, SOD) en células con daño oxidativo, indicando un efecto protector frente al daño oxidativo. Además, el efecto protector es mejor que la composición de nucleótidos de la técnica anterior.

2.3. Ensayo de actividad de LDH

40 Los resultados de la actividad de LDH de la célula IEC-6 se muestran en la figura 3. Según esta figura, el tratamiento con H₂O₂ hizo que el contenido de LDH en el sobrenadante del medio líquido fuera significativamente mayor que el del control normal ($P < 0,01$). Al tratar las células con composición de nucleótidos, el contenido de LDH en el sobrenadante se redujo en diversos grados. En cuanto al grupo de concentración baja de la muestra 2 y el grupo de concentración media de la muestra 3, el contenido de LDH disminuyó más significativamente, sin mostrar diferencias estadísticas en comparación con el control normal. Además, en comparación con el control de H₂O₂, en el grupo de concentración media de la muestra 1 ($P < 0,05$), los grupos de concentración baja y alta de la muestra 2 ($P < 0,01$ o $P < 0,05$), los grupos de concentración baja y media de la muestra 3 ($P < 0,01$), el contenido de LDH se redujo significativamente. Además, en comparación con la concentración alta de la muestra comparativa 2, el contenido de LDH del grupo de concentración baja de la muestra 2 ($P < 0,05$) y el grupo de concentración baja y media de la muestra 3 ($P < 0,01$) se redujo significativamente. Por consiguiente, la composición de nucleótidos para el uso según la invención puede reducir de manera eficaz la concentración de la sustancia indicativa de indicador no deseado (por ejemplo, LDH) en el sobrenadante de las células con daño oxidativo, indicando un efecto protector frente al daño oxidativo. Además, el efecto protector es mejor que la composición de nucleótidos de la técnica anterior.

2.4. Ensayo de concentración de MDA

55 Los resultados de la concentración de MDA de la célula IEC-6 se muestran en la figura 4. Según esta figura, el tratamiento con H₂O₂ de las células aumentó significativamente el contenido de MDA en las células ($P < 0,01$). Al tratar las células con muestras de composición de nucleótidos, como para todos los grupos de concentración de las muestras 1-3, el contenido de MDA disminuyó en algún grado y fueron significativamente menores que el control de H₂O₂. Por el contrario, los grupos de concentración media y alta de las muestras comparativas 2 y 3 no se distinguieron significativamente del control de H₂O₂. Por consiguiente, la composición de nucleótidos para el uso según la invención puede reducir de manera eficaz la concentración de la sustancia indicativa de indicador no deseado (por ejemplo, MDA de peróxido lipídico) en células con daño oxidativo, indicando un efecto protector frente al daño oxidativo. En particular, la composición de nucleótidos para el uso según la invención puede mostrar efectos protectores significativos y consistentes bajo todos los intervalos de concentración. Por el contrario, la composición de nucleótidos en la técnica anterior no puede mostrar efecto protector bajo concentraciones relativamente altas (por ejemplo, concentraciones medias y altas). Este hecho muestra además la ventaja de la composición de nucleótidos para el uso

según la invención sobre la técnica anterior.

3. Análisis

5 Según los resultados anteriores, el tratamiento con la composición de nucleótidos para el uso según la invención puede aumentar la tasa de supervivencia de las células con daño oxidativo, aumentar la actividad/concentración del factor con efecto protector frente a la oxidación (por ejemplo, SOD) en las células, disminuir la actividad/concentración del factor indicativo de un efecto no deseado (por ejemplo, LDH y MDA). Tales hechos significan que la composición de nucleótidos para el uso según la invención puede proporcionar un efecto protector frente al daño oxidativo celular y el efecto es mejor que la composición de nucleótidos en la técnica anterior. Mientras tanto, al aumentar la actividad del factor con efecto protector y disminuir el contenido de factor no deseado, la composición de nucleótidos puede promover la recuperación del estado de equilibrio de la célula antes del daño, mediante lo cual se promueve la reparación después del daño. Además, los efectos de la composición de nucleótidos para el uso según la invención no sólo pueden mostrarse en los enterocitos sino también en otra parte del sistema digestivo (por ejemplo, el hígado), mostrando así un efecto positivo en todo el sistema digestivo.

Ejemplo 4: efecto de proliferación celular

20 Los instrumentos y reactivos usados en este ejemplo se refieren al ejemplo 3, en el que se usó la célula IEC-6 para verificar la promoción de la proliferación celular de la composición de nucleótidos para el uso según la invención.

25 En este ejemplo, se usó el método de MTT para detectar la influencia de la composición de nucleótidos en la célula IEC-6. Se digirieron las células IEC-6 en fase logarítmica con tripsina, que se prepararon después de la centrifugación en suspensión celular. Usando el contador celular, se inocularon las células en una placa de 96 pocillos a 5000/pocillo, que se incubó durante la noche a 37°C, el 5% de CO₂ tal que las células fueran adherentes. El medio líquido se cambió al día siguiente y se añadió a cada pocillo 200 µl de medio líquido celular que contenía diversas concentraciones de composiciones de nucleótidos (cada muestra se ajustó con tres concentraciones de 62,5, 250, 1000 µmol/l). Cada concentración de cada muestra se ajustó con 6 repeticiones. También se ajustaron el grupo de control sin adición de composición de nucleótidos y el pocillo cero sin células (sólo adición de medio normal). El medio líquido se cambió cada 24 h. A las 24 h del tratamiento con la composición de nucleótidos, a cada pocillo de la placa de 96 pocillos se le añadieron 10 µl de MTT con agitación suave y se incubó la placa en una incubadora durante 4 h. Se descartó el sobrenadante después de 4 h y se añadieron 150 µl de DMSO/pocillo. Se agitó la placa en la oscuridad. Después de la disolución del cristal de formazán de color violeta azulado, se colocó la placa en un lector de microplacas y se determinó el valor de DO a una longitud de onda de 490 nm. El cero se ajustó con el grupo de blanco sin células y la curva se dibujó con el valor de DO.

35 Todos los datos se mostraron como promedio \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm s$) y el análisis estadístico se realizó con el software SPSS 17.0, las comparaciones de diferencias entre grupos utilizaron el análisis de varianza unidireccional. $P < 0,05$ significa significación estadística y $P < 0,01$ significa significación estadística alta.

40 Los resultados se muestran en la figura 5. Según esta figura, después de la adición de la muestra de nucleótidos, la proliferación de células IEC-6 cambió significativamente en comparación con el control. En cuanto al grupo de concentración alta de la muestra 1, todos los grupos de concentración de la muestra 3, las velocidades de proliferación celular fueron significativamente mayores que las del control normal ($P < 0,01$); la velocidad de proliferación celular del grupo de concentración media de la muestra 2 fue más rápida que el control normal ($P < 0,05$). La velocidad de proliferación celular del grupo de concentración baja de la muestra comparativa 2 fue significativamente menor que la del grupo de concentración alta de la muestra 1, los grupos de concentración baja y media de la muestra 2, los grupos de concentración baja, media y alta de la muestra 3 ($P < 0,01$). La velocidad de proliferación celular del grupo de concentración alta de la muestra 2 fue significativamente mayor que la del grupo de concentración baja de la muestra comparativa 2 ($P < 0,05$). Por consiguiente, la composición de nucleótidos para el uso según la invención puede promover la proliferación celular, especialmente promover la proliferación y el crecimiento de células del tracto intestinal, mostrando así el efecto de promoción del crecimiento de enterocitos e intensificación de la proliferación de enterocitos. El efecto fue mejor que la composición de nucleótidos en la técnica anterior.

Ejemplo de referencia 5: efecto sobre la microbiota bacteriana beneficiosa del tracto intestinal

Este ejemplo muestra que la composición de nucleótidos tiene estimulación sobre el microbiota bacteriana beneficiosa del tracto intestinal. Cada muestra se ajustó con 2 concentraciones (dosis baja: 1 g/100 ml; dosis alta: 2 g/100 ml) y no hubo nucleótidos en el grupo de control.

1. Materiales y métodos

1.1. Reactivos principales

65 Agar con eosina y azul de metileno (EMB); agar tripton-sulfito-cicloserina (TSC); medio de agar para *Bifidobacterium*

ES 2 805 825 T3

(BBL); hidróxido de sodio; ácido clorhídrico; emulsión de yema de huevo al 50%; D-cicloserina; muestras de nucleótidos (Nanjing Tongkaizhaoye).

1.2. Instrumentos principales

5 Esterilizador de vapor vertical automático (LDZX-30FBS, fábrica de aparatos médicos Shanghai Shenan); incubadora de CO₂ (HH.CP-TW9, Shanghai Shenxian Thermostatic Equipment); balanzas electrónicas (XS1003S, Swiss); mesa de laboratorio limpia (VS-130L-U, Suzhou Antai Airtech CO., LTD.); contador de colonias (DIGITAL S 4905000, Selecta Spain); caja de cultivo sellada (C-32, Mitsubishi Japan).

2. Procedimientos

2.1. Obtención de microbiota del tracto intestinal

15 En una mesa de laboratorio estéril, se tomaron 0,5 g de muestra de heces del ano de cinco ratones SPF y se colocaron en un tubo estéril, al que se le añadieron tres perlas de vidrio estériles. Se agitó la mezcla con vórtex y luego se sometió a dilución en gradiente hasta 10⁻² y se usa como disolución de semillas para pruebas adicionales.

2.2. Preparación del medio líquido

20 Se usó medio líquido de peptona de extracto de carne de vacuno como medio base, en el que se añadieron muestras de nucleótidos a 1 g/100 ml, 2 g/100 ml, y la disolución de semilla preparada en la sección 2.1 se añadió al 1% (volumen).

2.3. Recuento de microbiota bacteriana

25 Con medio selectivo específico (agar BBL), se cultivaron las *Bifidobacterium* en medio líquido en condiciones anaerobias durante 48 h a 36 ± 1°C y luego se realizó el recuento de microbiota bacteriana y se expresó como Lg UFC/ml.

2.4. Estadística de datos

30 El análisis estadístico se realizó con el software SPSS17.0 y se usó el análisis de varianza unidireccional para comparar los datos de diversos grupos, en el que $\alpha=0,05$ se usó como criterio para la determinación de diferencias. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

| Agrupamiento | Dosificación | <i>Bifidobacterium</i> |
|------------------|-------------------|------------------------|
| Grupo de control | | 7,00±0,00 |
| Muestra 1 | dosificación baja | 7,15±0,17 |
| | dosificación alta | 8,30±0,35* |
| Muestra 2 | dosificación baja | 7,89±0,47* |
| | dosificación alta | 8,24±0,28* |
| Muestra 3 | dosificación baja | 7,63±0,17* |
| | dosificación alta | 7,80±0,23* |

* Aumento significativo

40 Los resultados estadísticos mostraron que, tomando *Bifidobacterium* como un ejemplo, después del tratamiento con la composición de nucleótidos, el crecimiento de *Bifidobacterium* aumentó significativamente en comparación con el control (Lg UFC), indicando que la composición de nucleótidos puede estimular el crecimiento de la microbiota bacteriana beneficiosa del tracto intestinal.

Ejemplo de referencia 6: preparación de leche en polvo para lactantes (1000 kg, adición en seco)

50 Los materiales de partida de la leche en polvo fueron: 140 kg de leche desnatada en polvo, 260 kg de lactosa, 200 kg de suero de leche desalado en polvo, 100 kg de proteína de suero de leche en polvo (WPC34%), 52 kg de aceite de maíz, 42 kg de aceite de soja, 170 kg de aceite de semilla de girasol, 4,8 kg de oligofructosa en polvo, 12 kg de jarabe de galactooligosacáridos, 6,4 kg de nutrientes mixtos y 2 kg de lecitina de soja. Después de un mezclado homogéneo, se sometieron los materiales de partida anteriores a pasteurización, homogenización, evaporación y concentración y secado por pulverización para formar un semiproducto como polvo, al que se le añadieron 0,38 kg de composición de

ES 2 805 825 T3

nucleótidos, 0,1 kg de *Bifidobacterium*, 4,32 kg de DHA, 6,0 kg de ARA. Después del mezclado con una mezcladora en seco, se envasó la leche en polvo mezclada de manera uniforme con nitrógeno para obtener el producto final.

Ejemplo de referencia 7: preparación de leche en polvo para lactantes (1000 kg, adición en seco)

5 Se mezclaron de manera uniforme 150 kg de leche desnatada en polvo, 250 kg de lactosa, 190 kg de suero de leche desalado en polvo, 110 kg de proteína de suero de leche en polvo (WPC34%), 44 kg de aceite de maíz, 44 kg de aceite de soja, 175 kg de aceite de semilla de girasol, 4,5 kg de oligofructosa en polvo, 11 kg de jarabe de galactooligosacáridos, 7 kg de nutrientes mixtos, 2 kg de lecitina de soja, y luego se sometieron a pasteurización, homogenización, evaporación y concentración y secado por pulverización para formar un semiproducto como polvo. 10 Luego, se añadieron 0,5 kg de composición de nucleótidos, 0,1 kg de *Bifidobacterium*, 5,2 kg de DHA y 6,7 kg de ARA. Después del mezclado con mezcladora en seco, se envasó la leche en polvo mezclada de manera uniforme con nitrógeno para obtener el producto final.

Ejemplo de referencia 8: preparación alimenticia de leche en polvo para lactantes (1000 kg, adición en húmedo)

Se mezclaron de manera uniforme 150 kg de leche desnatada en polvo, 250 kg de lactosa, 190 kg de suero de leche desalado en polvo, 110 kg de proteína de suero de leche en polvo (WPC34%), 43 kg de aceite de maíz, 44,7 kg de aceite de soja, 178 kg de aceite de semilla de girasol, 4,5 kg de oligofructosa en polvo, 11 kg de jarabe de galactooligosacáridos, 7 kg de nutrientes mixtos, 0,4 kg de composición de nucleótidos y 2 kg de lecitina de soja, y se sometieron a pasteurización, homogenización, evaporación y concentración y secado por pulverización para formar un semiproducto como polvo, al que se le añadieron 0,1 kg de *Bifidobacterium*, 3,9 kg de DHA y 5,4 kg de ARA. Después del mezclado con mezcladora en seco, se envasó la leche en polvo mezclada de manera uniforme con nitrógeno para obtener el producto final.

Ejemplo 9: preparación de leche líquida para lactantes (basándose en 100 g de leche líquida)

La leche líquida contenía los siguientes componentes nutricionales: 2,2 g de proteína, 3,0 g de grasa, 9,0 g de lactosa, 80 µg de vitamina A (RE), 1,5 µg de vitamina D, 1 mg de vitamina E (α-TE), 6 µg de vitamina K1, 70 µg de vitamina B1, 70 µg de vitamina B2, 200 µg de vitamina B6, 0,5 µg de vitamina B12, 350 µg de ácido nicotínico, 3,5 µg de ácido fólico, 200 µg de ácido pantoténico, 7 mg de vitamina C, 2 µg de biotina, 50 mg de sodio, 70 mg de potasio, 80 µg de cobre, 30 mg de magnesio, 1 mg de hierro, 0,7 mg de zinc, 80 mg de calcio, 45 mg de fósforo, 20 µg de yodo, 100 mg de cloro, 10 mg de lactoferrina y 2,7 mg de la composición de nucleótidos para el uso según la invención, en la que la energía es de aproximadamente 300 kJ.

Se proporciona grasa mediante grasa láctea anhidra, aceite de soja, aceite de maíz, semilla de girasol en cualquier razón y combinación, en la que, basándose en 100 g de los componentes totales, se incluyeron 0,5 g de ácido linoleico. El procedimiento de preparación fue de la siguiente manera (los materiales de partida y el procedimiento cumplen con las normas nacionales pertinentes):

1. Recibir, comprobar y optimizar las materias primas.

2. (1) Disolver la proteína (incluyendo caseína, proteína de suero de leche, lactoferrina), vitaminas B y vitamina C, y la composición de nucleótidos para el uso según la invención con agua tibia;

(2) disolver las materias primas de hidratos de carbono y los aditivos alimentarios como carragenano, monoestearato de glicerilo y goma guar con agua tibia; disolver los minerales con agua tibia; disolver otras materias primas con líquido de alimentación graso a 40°C~50°C; y mezclar los tres líquidos de alimentación disueltos anteriores de manera uniforme;

(3) someter el líquido de alimentación obtenido en la etapa (1) a filtración con membranas para esterilización;

(4) someter el líquido de alimentación obtenido en la etapa (2) que se ha mezclado de manera uniforme a UHT (esterilización instantánea a temperatura ultra-alta) para esterilización;

(5) mezclar los líquidos de alimentación obtenidos en la etapa (3) y la etapa (4) en condiciones estériles y dosificarlos a la cantidad total de los componentes con agua;

(6) someter los líquidos de alimentación mezclados anteriores a homogenización estéril; y

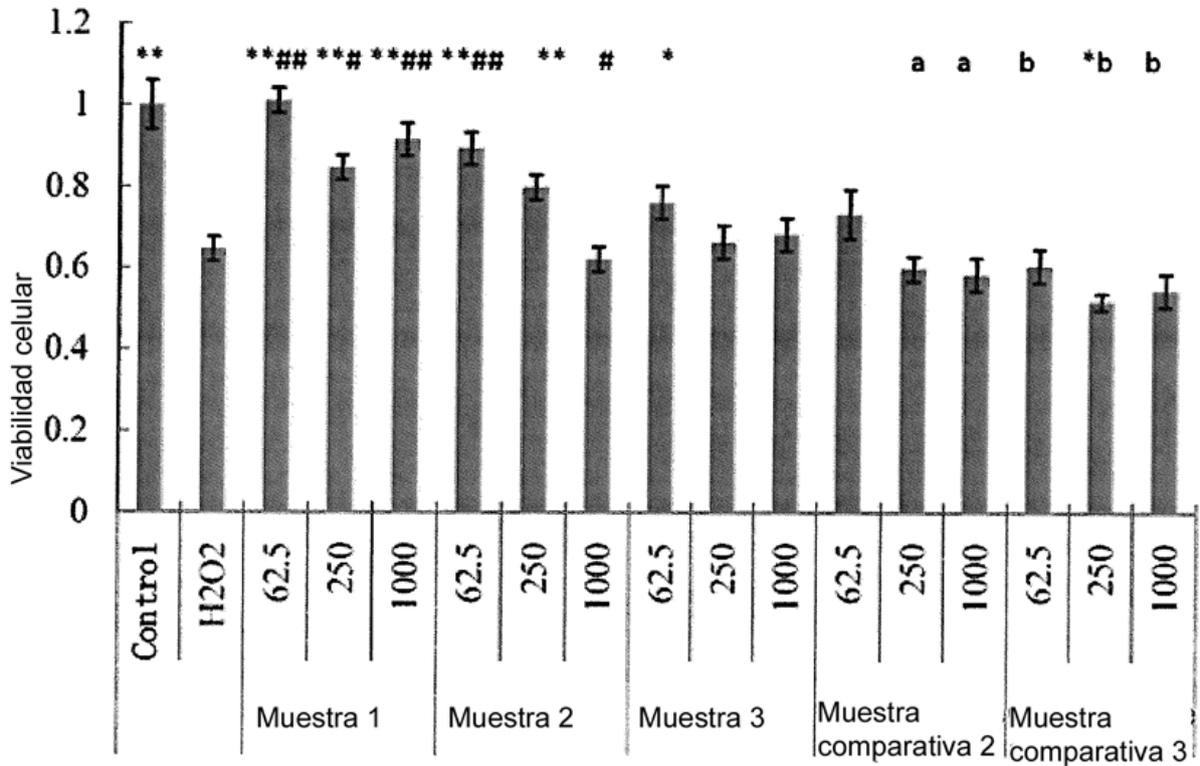
(7) rellenar en condiciones estériles y envasar.

ES 2 805 825 T3

REIVINDICACIONES

1. Composición de nucleótidos para su uso en un método de promoción de la reparación de enterocitos después del daño provocado por la oxidación, en la que, en la base en peso, la composición consiste en CMP, AMP, UMP y GMP, y las proporciones de los componentes son CMP: el 58-72%, AMP: el 6-14%, UMP: el 10-18% y GMP: el 8-14%, siempre que la suma de los componentes sea del 100%, en la que el método implica administrar la composición de nucleótidos a un sujeto.
5
2. Composición de nucleótidos para su uso según la reivindicación 1, en la que las proporciones de los componentes son CMP: el 60-70%, AMP: el 8-12%, UMP: el 12-16% y GMP: el 10-12%, siempre que la suma de los componentes sea del 100%.
10
3. Composición de nucleótidos para su uso según la reivindicación 1, en la que las proporciones de los componentes son CMP: el 60-65%, AMP: el 10-12%, UMP: el 14-16% y GMP: el 11-12%, siempre que la suma de los componentes sea del 100%.
15
4. Composición de nucleótidos para su uso según la reivindicación 1, en la que las proporciones de los componentes son CMP: el 65-70%, AMP: el 8-10%, UMP: el 12-14% y GMP: el 10-11%, siempre que la suma de los componentes sea del 100%.
20
5. Composición de nucleótidos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que las proporciones de los componentes son
25
CMP: el 60%, AMP: el 12%, UMP: el 16% y GMP: el 12%; o
CMP: el 65%, AMP: el 10%, UMP: el 14% y GMP: el 11%; o
CMP: el 70%, AMP: el 8%, UMP: el 12% y GMP: el 10%.
30
6. Alimento para su uso en un método de promoción de la reparación de enterocitos después del daño provocado por la oxidación,
35
en el que el alimento está en forma de un producto lácteo líquido y comprende, basándose en 100 g de producto lácteo líquido, 250 kJ-355 kJ de energía y los siguientes componentes: 1,75 g-4,26 g de proteína aparte de lactoferrina, 1,75 g-4,97 g de grasa, 42,5 µg-191,7 µg de vitamina A (RE), 0,625 µg-2,6625 µg de vitamina D, ≥0,375 mg de vitamina E (α-TE), ≥2,5 µg de vitamina K1, ≥27,5 µg de vitamina B1, ≥27,5 µg de vitamina B2, ≥27,5 µg de vitamina B6, ≥0,1 µg de vitamina B12, ≥275 µg de ácido nicotínico o nicotinamida, ≥2,5 µg de ácido fólico, ≥175 µg de ácido pantoténico, ≥4,5 mg de vitamina C, ≥1 µg de biotina, ≤71 mg de sodio, 45 mg-244,95 mg de potasio, 17,5 µg-124,25 µg de cobre, ≥3,5 mg de magnesio, 0,625 mg-1,775 mg de hierro, 0,25 mg-1,065 mg de zinc, ≥42,5 mg de calcio, ≥20,75 mg de fósforo, ≥3,5 µg de yodo, ≤184,6 mg de cloro, 5-13 mg de lactoferrina e hidratos de carbono;
40
en el que la composición de nucleótidos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, está presente en una cantidad de 2,64-7,66 mg y la cantidad de hidratos de carbono es tal que la energía proporcionada por los hidratos de carbono, la proteína y la grasa es de 250 kJ-355 kJ; y
45
en el que el método implica administrar el alimento a un sujeto.

Tasa de supervivencia celular (célula BRL 3A)



Concentraciones de composiciones de nucleótidos (µmol/l)

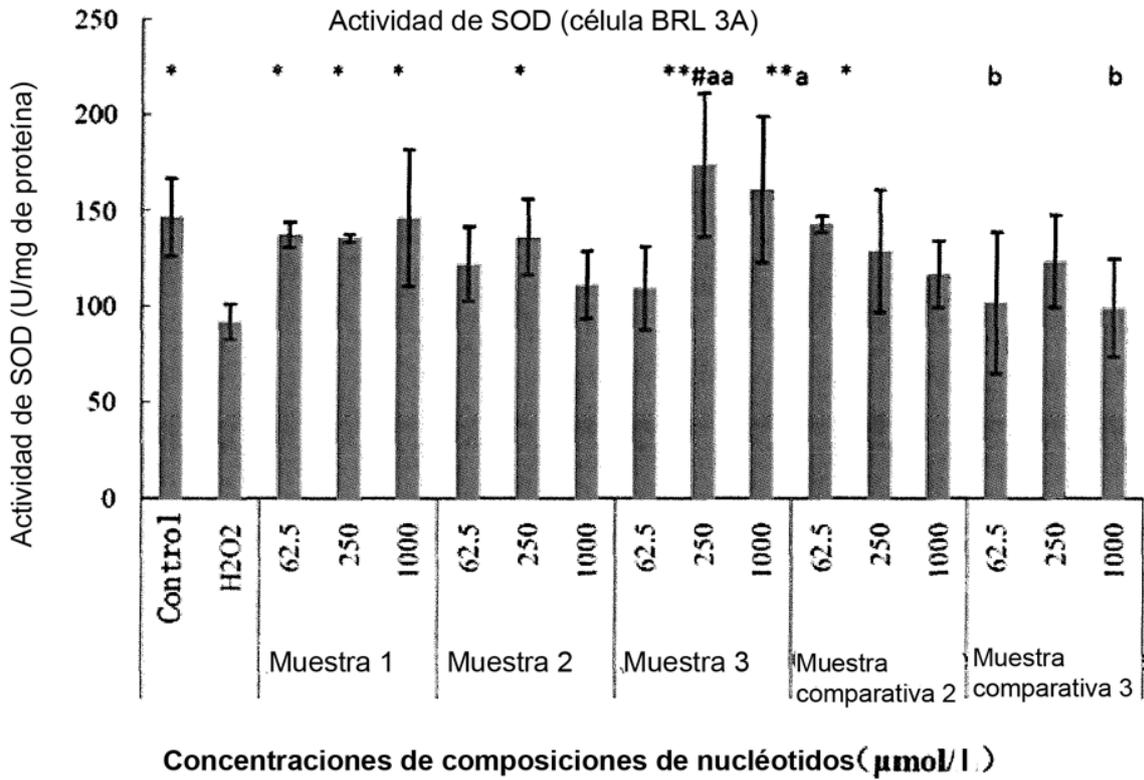
*P<0.05, **P<0.01, en comparación con el control de H₂O₂

#P<0.05, ##P<0.01, en comparación con la muestra comparativa 2 de concentración baja

^aP<0.01, en comparación con la muestra 1 de concentración baja, media, alta, la muestra 2 de de concentración baja, media y la muestra 3 de concentración baja

^bP<0.01, en comparación con la muestra 1 de concentración baja, media, alta y la muestra 2 de concentración baja, media

Figura 1



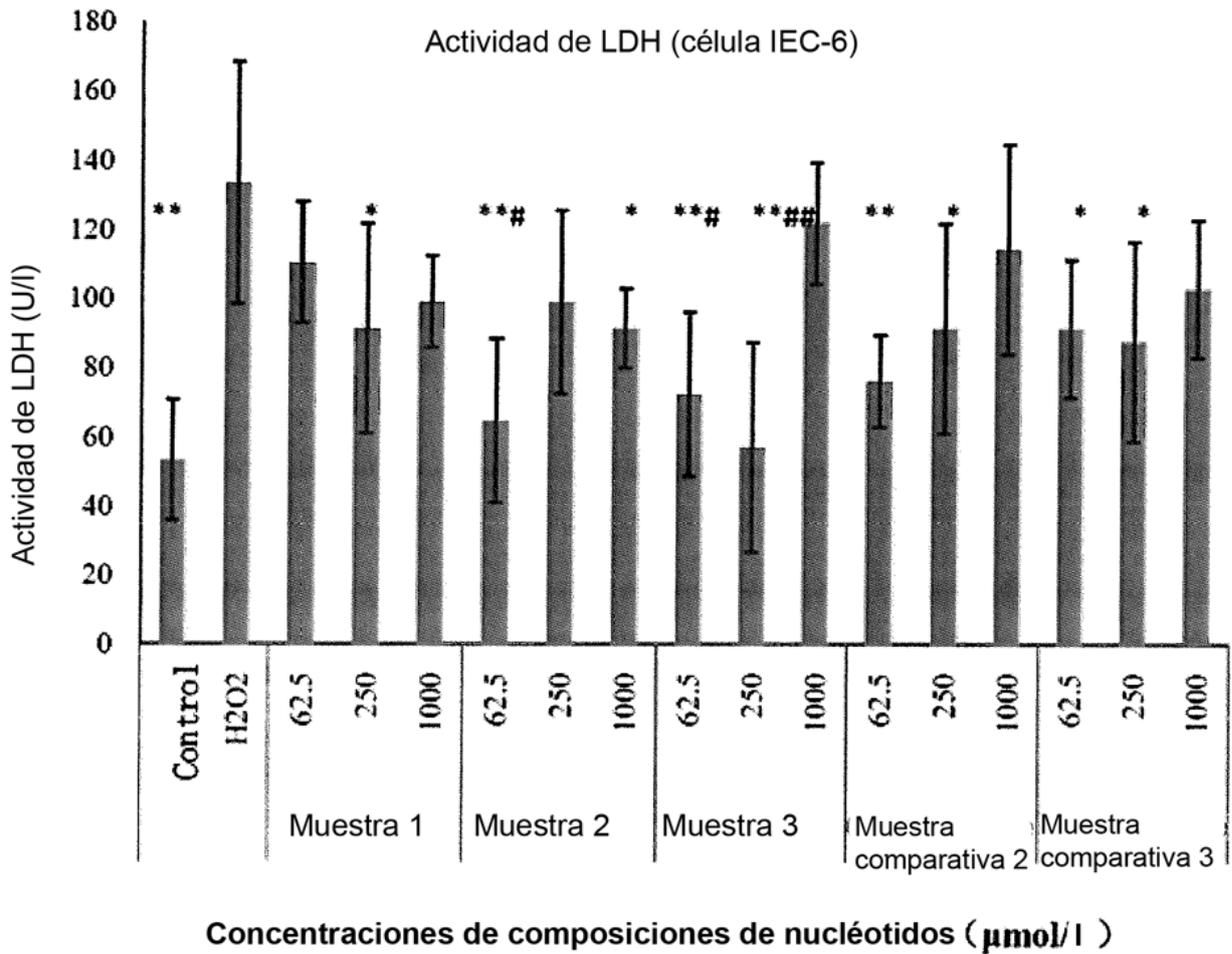
*P<0.05, **P<0.01, en comparación con el control de H₂O₂

#P<0.05, en comparación con la muestra comparativa 2 y la muestra comparativa 3 de concentración media

^aP<0.05, ^{aa}P<0.01, en comparación con la muestra comparativa 2 de concentración alta

^bP<0.01, en comparación con la muestra 3 de concentración media, alta

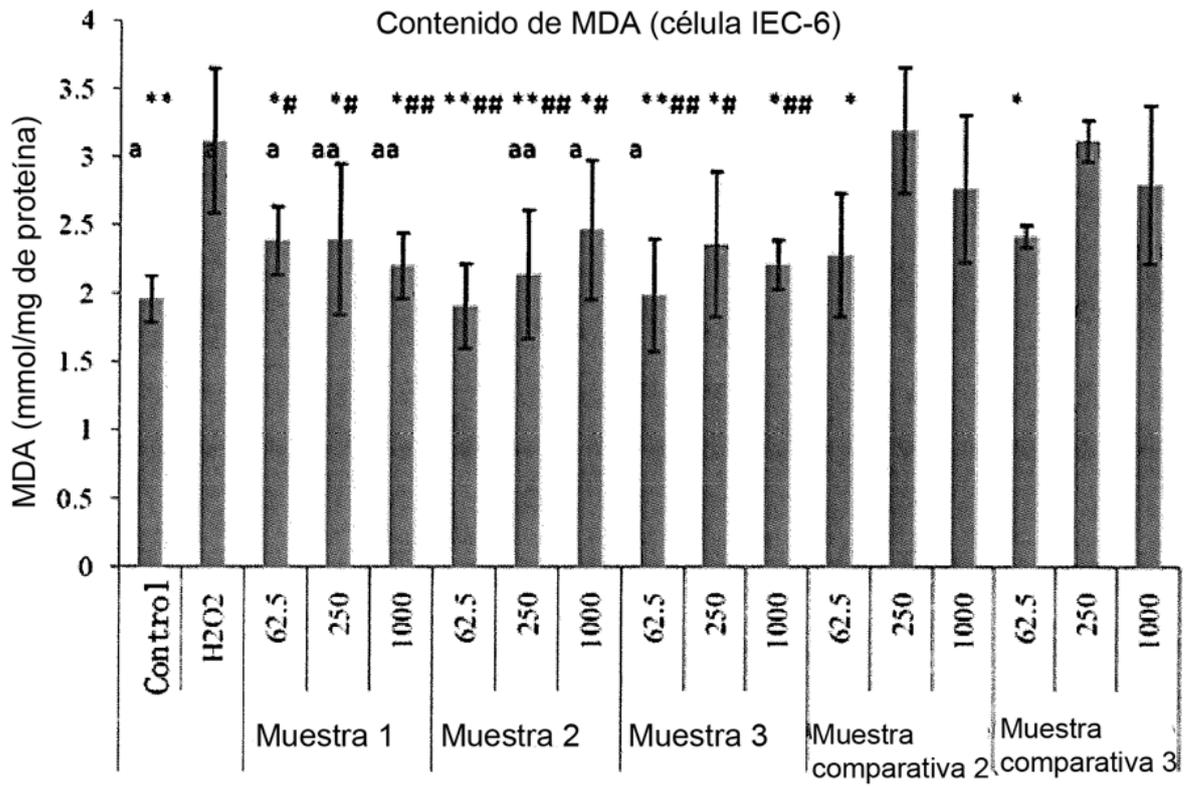
Figura 2



*P<0.05, **P<0.01, en comparación con el control de H₂O₂

#P<0.05, ##P<0.01, en comparación con la muestra comparativa 2 de concentración alta

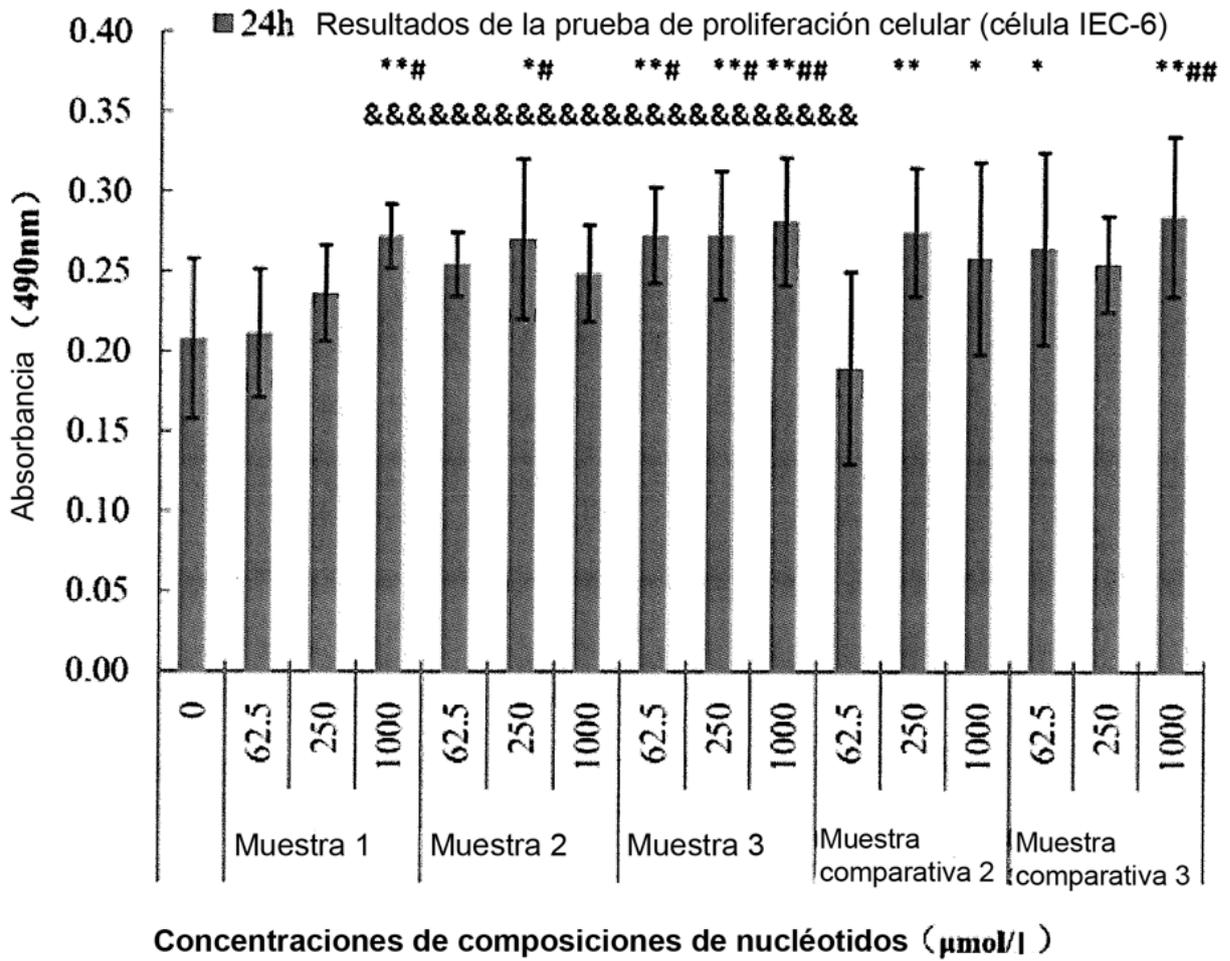
Figura 3



Concentraciones de composiciones de nucleótidos ($\mu\text{mol/l}$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, en comparación con el control de H_2O_2
 # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, en comparación con la muestra comparativa 2 de concentración media
^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, en comparación con la muestra comparativa 3 de concentración media

Figura 4



*P<0.05, **P<0.01, en comparación con el control

#P<0.05, ##P<0.01, en comparación con la muestra 1 de concentración baja

&P<0.05, &&P<0.01, en comparación con la muestra comparativa 2 de concentración baja

Figura 5