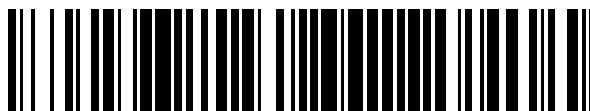


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 897**

51 Int. Cl.:
C12P 19/04 (2006.01)
C08B 37/06 (2006.01)
A23L 1/0524 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10000902 .6**
96 Fecha de presentación: **21.11.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **2192190**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2010**

54 Título: **YOGUR QUE CONTIENE PRODUCTOS DE LA HIDRÓLISIS DE LA PECTINA.**

30 Prioridad:
22.11.2000 DE 10057976

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.02.2012

73 Titular/es:
**N.V. NUTRICIA
EERSTE STATIONSSTRAAT 186
2712 HM ZOETERMEER, NL**

72 Inventor/es:
**Kunz, Markwart;
Munir, Mohammed y
Vogel, Manfred**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 374 897 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).

DESCRIPCION

Yogur que contiene productos de la hidrólisis de la pectina

- 5 La invención se refiere al empleo de hidrolizados de pectina como componente del yogur, y al yogur que contiene productos hidrolizados de la pectina.

10 Los organismos patógenos pero también las sustancias citotóxicas deben adherirse primero a la superficie de la célula diana, para poder provocar una infección o respectivamente un daño a las células atacadas. Esta fijación o adhesión está mediada por ejemplo mediante una relación ligando - receptor, en donde las glicoestructuras juegan un papel principal. Cuando estas glicoestructuras se bloquean sobre la superficie de las células diana o en los ligandos, la infección se puede prevenir.

15 Las glicoestructuras juegan también un papel importante en la formación de tumores y formación de metástasis (Liotta et al., Annu. Rev. Cell Biol., 55 (1986), 1037-1057). La formación de tumores comprende interacciones celulares que están mediadas por los componentes de la superficie celular, en particular las proteínas que se unen a los hidratos de carbono. Así por ejemplo la adhesión de las células tumorales está mediada por moléculas de adhesión celular. También muchas etapas de la formación de metástasis comprenden interacciones célula-célula o respectivamente interacciones entre células y matriz extracelular (ECM), las cuales están mediadas por componentes de la superficie celular. La matriz extracelular (ECM) se compone principalmente de laminina, fibronectina y proteoglicanos, de los cuales muchos están glicosilados, y sus paredes laterales de oligosacáridos ofrecen determinantes de reconocimiento para las moléculas de adhesión celular. La laminina es una glicoproteína unida a un N, que presenta secuencias poli-N-acetilactosamina. La formación de metástasis tiene lugar cuando los aglomerados circulantes de las células tumorales, los trombocitos y los linfocitos toman contacto con el endotelio en los capilares mediante moléculas de adhesión. Esta toma de contacto suministra la señal para la apertura de las funciones celulares endoteliales. Por ello las células tumorales pueden mediante otras moléculas de adhesión, unirse a los receptores sobre la membrana basal. Después de la destrucción de la membrana basal, las células tumorales reciben acceso directo al estoma, en donde de nuevo como en la primera invasión tumoral tienen lugar interacciones entre la laminina y la fibronectina y los correspondientes receptores.

30 Importantes representantes de las proteínas unidas a hidratos de carbono, son las lectinas unidas a galactósidos, la galectina-1 y la galectina-3 (Raz y Lotan, Cancer Metastasis Rev. 6 (1987), 433; Gabius, Biochim. Biophys. Acta, 1071 (1991), 1). De la galectina-3 es sabido que fomenta la dispersión tumoral embólica en el circuito sanguíneo, y aumenta la formación de metástasis. La galectina-3 se expresa sobre la superficie celular de muchas células tumorales, en las cuales la expresión de la galectina-3 aumenta con un progresivo desarrollo tumoral. La galectina-3 se expresa igualmente a partir de macrófagos activos y células transformadas o congénitas o respectivamente células de metástasis. La galectina-3 posee una alta afinidad para los oligosacáridos, los cuales comprenden la polilactosamina, en donde la galectina-3 se une en particular a dos glicoproteínas, las cuales se encuentran en varios tipos de células, por ejemplo las células del carcinoma del intestino grueso humano y las células del carcinoma de mama humano. Otro ligando de la galectina-3 es por ejemplo la laminina. La galectina-3, que se expresa también sobre la superficie de las células endoteliales, participa igualmente en la adhesión de las células tumorales a las células endoteliales.

45 La patente US 5.834.442 describe un procedimiento para el tratamiento de las enfermedades cancerígenas en los mamíferos, en particular para el tratamiento de carcinomas de próstata, en donde el tratamiento de las enfermedades cancerígenas incluida la inhibición de la formación de metástasis mediante la administración oral de pectina modificada, tiene lugar preferiblemente en la citruspectina de pH modificado, soluble en agua. Para la preparación de la pectina de pH modificado se despolimeriza una solución de pectina elevando el valor del pH a 10,0 y a continuación disminuyendo el valor del pH a 3,0. La pectina modificada posee un peso molecular de aproximadamente 1 a 15 kd. Ratas, a las cuales se administró citruspectina modificada en agua potable, mostraron en comparación con grupos de control sin tratar, una formación significativamente disminuida de metástasis pulmonares. Experimentos in vitro, mostraron que la adhesión de la galectina-3 que se expresa en células endoteliales MLL en las células endoteliales de la aorta de la rata (RAEC) en presencia de citruspectina modificada fue casi completamente inhibida. En otros experimentos se investigó la acción de la citruspectina de pH modificado sobre la formación de colonias de células endoteliales MLL. La capacidad de crecimiento de las células en un medio semisólido (con independencia de la fijación) puede emplearse como criterio para la transformación y el potencial de invasión de las células, puesto que el crecimiento de las células en un medio semisólido fomenta la migración de las células y la formación de colonias. A este respecto se estableció que la citruspectina modificada podría reducir tanto el número de colonias MLL formadas como también podía reducir significativamente su tamaño. La citruspectina modificada parece a este respecto ejercer más bien un efecto citostático que un efecto citotóxico. También se investigó el efecto de la citruspectina modificada sobre las relaciones recíprocas célula-célula y las acciones recíprocas célula-matriz, las cuales se basan en mecanismos inducidos por hidratos de carbono, en particular interacciones inducidas por la galectina-3. A este respecto, se mostró, que la citruspectina modificada al contrario de la citruspectina sin modificar, inhibió la adhesión de las células de melanoma B16-F1 en la laminina. De la laminina se conoce que sirve como ligando para la galectina-3, soluble.

A partir de la patente EP 0 716 605 B1, se conoce que mediante una sopa de zanahorias particularmente preparada, "Blasentee" ("té de burbujas"), leche de coco, etc., la adherencia de los microorganismos patógenos, como por ejemplo el E. coli, en células, en particular en las células epiteliales del tracto gastrointestinal y urogenital puede ser reducida esencialmente (es decir, hasta un 90%). Según ese documento, este efecto debe atribuirse a la pectina que se encuentra en los productos vegetales, en los cuales se trata esencialmente de galacturónidos unidos 1,4- α -glicosidicamente en cadenas, cuyos grupos ácidos están esterificados desde un 20 hasta un 80% con metanol, y pueden contener eventualmente junto al ácido galacturónico, otros elementos fundamentales de azúcar, como por ejemplo la glucosa, la galactosa, la xilosa, y la arabinosa. Además, puede todavía deducirse del documento, que el ácido monogalacturónico no muestra ningún bloqueo de la adhesión, mientras que con el digalacturónido y el trigalacturónido puede comprobarse un bloqueo de hasta el 91,7% ó respectivamente el 84,6%. En este documento se comprueba claramente que el ácido galacturónico monómero no presenta ningún bloqueo de la adhesión y que el efecto bloqueante deseado disminuye a la vez que aumenta el peso molecular de los galacturónidos. De ello se deduce que el grado de polimerización de los galacturónidos deseados es de DP 2 ó respectivamente 3. Además se reivindica que el grado de esterificación es < 2 %. Los productos de la hidrólisis de la pectina preparados según el método allí descrito, contienen sin embargo una parte muy pequeña de los di- y trigalacturónidos descritos como efectivos (aproximadamente el 12% referido al producto crudo). Este método de obtención consume recursos y conduce a problemas del medio ambiente, puesto que los productos secundarios, que se producen en gran proporción no son aprovechables y deben ser desechados.

El problema técnico que constituye el fundamento de la presente invención, consiste en preparar otros procedimientos y medios para la lucha contra las infecciones y para la disminución y/o inhibición de la adhesión de sustancias y organismos perjudiciales, en particular patógenos, en las células eucariotas, en particular células de mamíferos, así como para el bloqueo de acciones recíprocas entre células de mamíferos, en particular células tumorales, las cuales son inducidas mediante la molécula de galectina-3 unida a hidratos de carbono que se encuentran en la superficie de la célula, y son responsables del desarrollo particularmente de enfermedades tumorales, y para el tratamiento de enfermedades tumorales, particularmente para la inhibición de formaciones metastásicas en los mamíferos.

Este problema técnico se resuelve mediante los objetivos previstos según la invención de las reivindicaciones de la patente. La invención se refiere en particular al empleo de un producto de hidrólisis de la pectina con una parte de galacturónidos que contienen por lo menos una molécula de ácido galacturónico sin saturar en 4,5 y están esterificados con metanol ≥ 20 %, como componente del yogur. La invención se refiere también a un yogur que contiene producto de la hidrólisis de la pectina con una proporción de galacturónidos, los cuales por lo menos contienen una molécula de ácido galacturónico no saturado en 4,5 y están esterificados con metanol ≥ 20 %. Se prefiere que el producto de la hidrólisis de la pectina se obtenga mediante un procedimiento en el cual una pectina o un material vegetal que contenga pectina en solución o suspensión acuosa se trate en una primera etapa del procedimiento con una enzima A hidrolizadora de la pectina, y en otra etapa de procedimiento, con una enzima B. Se describen también procedimientos para la obtención de productos de la hidrólisis de la pectina los cuales conducen a la obtención de oligogalacturónidos con una proporción de monómeros lo más pequeña posible, una alta proporción de moléculas con por lo menos en cada caso un enlace doble así como con un grado de esterificación ≥ 20 %, y los cuales pueden efectuarse con un rendimiento esencialmente alto, como ya se ha descrito en el estado actual de la técnica. Se describe en particular, que una solución o suspensión acuosa de una pectina o de un material que contenga pectina, en particular un material vegetal, de preferencia de una pectina con un alto grado de esterificación, se trata en una primera etapa de procedimiento con una primera enzima A hidrolizadora de pectina y a continuación, en una segunda etapa de procedimiento se trata con una segunda enzima B hidrolizadora de pectina. Se obtiene un producto de la hidrólisis de la pectina definido anteriormente, el cual presenta magníficas propiedades como agente para la disminución o inhibición de la adhesión de gérmenes dañinos para las funciones vitales y/o las funciones de reproducción de las células, como por ejemplo sustancias u organismos patógenos, alérgenos, infecciosos o tóxicos, como por ejemplo, microorganismos como levaduras, hongos, gérmenes, bacterias, virus, esporas, viroides, priones.

En el caso de la enzima A empleada, puede tratarse por ejemplo de una pectinliasa (EC 4.2.2.10) ó una endopoligalacturonasa (EC 3.2.1.15) aunque de preferencia, se trata de una pectinliasa. En el caso de la enzima B empleada, puede tratarse de una endopoligalacturonasa o de una pectinliasa, aunque de preferencia sin embargo se trata de una endopoligalacturonasa.

Según la invención, se comprobó sorprendentemente que los galacturónidos, que tienen en la molécula enlaces dobles, en el caso de bloqueo de la adhesión de gérmenes por ejemplo patógenos y sustancias perjudiciales para la célula en las células epiteliales del tracto gastrointestinal y urogenital, son particularmente efectivos. Además, es necesario para una particularmente eficiente inhibición y/o disminución, por ejemplo el bloqueo, un mayor grado de esterificación, en particular ≥ 20 , de preferencia ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , con particular preferencia ≥ 60 , ≥ 65 , ≥ 70 ó ≥ 71 %. La forma de trabajar descrita en el estado actual de la técnica, conduce sin embargo solamente a galacturónidos, que no presentan ningún enlace doble y prácticamente están totalmente sin esterificar.

Bajo el concepto de grado de esterificación se entiende en relación con la presente invención, la proporción de grupos ácidos que existen en un galacturónido fundamental-mente disponibles para llevar a cabo una esterificación,

los cuales se esterifican con un alcohol, en particular, con metanol.

En relación con la presente invención se entiende como moléculas de ácido galacturónico no saturadas, en particular las moléculas de ácido galacturónico no saturadas en la posición 4,5.

En una forma de ejecución de la invención está previsto después del tratamiento con la enzima B, añadir un tratamiento con una tercera enzima C. En el caso de la enzima C aquí utilizada, se trata de una pectinesterasa (EC 3.1.1.11). Con dicho tratamiento puede ajustarse el grado de esterificación de los productos de forma particularmente adecuada.

En otra versión de la invención, está previsto que después del tratamiento enzimático efectuado según la invención, los componentes que permanecen sin disolver se separen de la solución mediante centrifugación y/o ultrafiltración. En otra versión, está previsto que después del tratamiento enzimático realizado según la invención, y clarificación mediante centrifugación o respectivamente ultrafiltración, la solución obtenida mediante uno de los métodos de por sí ya conocidos, se transforme en su forma seca, por ejemplo en forma molida, en grano, granulada o pulverulenta.

La solución obtenida después del tratamiento enzimático según la invención, o el producto seco obtenido a partir de la misma, muestran una acción excelente en relación al bloqueo de la adhesión de por ejemplo gérmenes patógenos y sustancias dañinas para la célula, por ejemplo en células epiteliales del tracto gastrointestinal y urogenital en el ser humano y en animales. En consecuencia, pueden emplearse por ejemplo en piensos para animales por ejemplo, para la inhibición de enfermedades diarreicas en la cría de lechones.

La solución o suspensión empleada según la invención, de la pectina o respectivamente del material que contiene pectina, en particular vegetal, presenta un valor del pH en un margen de 3,5 a 5,5, o/y en otra versión preferida, una concentración de pectina del 3% al 25%.

Los tratamientos con las enzimas A y B y eventualmente C, se efectúan con un valor del pH de 3,5 a 5,5, con una duración de 2 horas a 24 horas, a una temperatura de 25 °C a 60 °C, y una concentración de las enzima A y B y eventualmente la C, de 10 a 30 ml/kg de pectina.

En otra versión preferida, está previsto que la proporción de galacturónidos en el hidrolizado de pectina (% en peso respecto a la substancias seca) sea por lo menos de un 60, ≥ 70 , ≥ 75 , ≥ 80 , ó en particular, de preferencia por lo menos de un 85% en peso.

En otra versión preferida, está previsto que en el hidrolizado de pectina, la proporción de hidratos de carbono con un DP-1 (monómeros) en el total de hidratos de carbono del hidrolizado de pectina sea < 25 , < 20 , < 10 , < 8 , < 5 , con particular preferencia, $< 4\%$ en peso (referido a la substancia seca).

En otra versión preferida, está previsto que la proporción en hidratos de carbono, en particular los galacturónidos con un grado de polimerización DP > 10 referido al contenido total de hidratos de carbono del hidrolizado de pectina, es menor de $10 < 8$, con particular preferencia $< 5\%$ en peso (referido a la substancia seca).

En otra versión preferida está previsto que la proporción de galacturónidos no saturados en el contenido total de los galacturónidos en el hidrolizado de pectina es por lo menos de un 10, de preferencia > 15 , > 20 , > 25 , > 30 , en particular, de un 36,5% en peso hasta un 46% en peso (referido a la substancia seca).

Los hidrolizados de pectina obtenidos según la invención presentan en una versión preferida una proporción de por lo menos un 60, ≥ 70 , ≥ 75 , ≥ 80 , ó con particular preferencia por lo menos un 85% (referido a la substancia seca) de hidratos de carbono, en particular galacturónidos con un grado de polimerización del 2 al 10, de preferencia del 3 al 8, con particular preferencia del 4,5 (% en peso de substancia seca, referida al contenido total de hidratos de carbono del hidrolizado de pectina).

La pectina empleada es, en una versión particularmente preferida, la citruspectina, pectina de manzana, o pectina de zanahoria azucarera.

El material empleado conteniendo pectina, en particular un material conteniendo pectina de origen vegetal, es en una versión preferida, orujo de manzana, rebanadas de zanahoria azucarera, o bolitas de citrus, y residuos secos, por ejemplo de la fabricación de zumo de naranja, zumo de limón, y/o zumo de lima.

Los hidrolizados de pectina obtenidos según la invención, a saber los productos de la hidrólisis de la pectina, son magníficamente adecuados para preparados farmacéuticos o respectivamente dietéticos para la lucha contra las enfermedades infecciosas o/y para la lucha contra la adición de sustancias dañinas y/o de organismos en células de mamíferos, en particular células del ser humano.

Los hidrolizados de pectina obtenidos según la invención son igualmente muy apropiados como preparados farmacéuticos para la inhibición de las interacciones célula-célula y/o interacciones entre células y la matriz

extracelular en un humano o en un mamífero, en particular aquellas acciones recíprocas que están inducidas por las moléculas de galectina-3 que se encuentran en la superficie de las células. Los productos de la hidrólisis de la pectina según la invención son por ello apropiados en particular para la inhibición de las acciones recíprocas célula-célula y/o las acciones recíprocas célula-matriz, a las cuales pertenecen las células tumorales, y las cuales son por

5
10
15
20

ello responsables del desarrollo de enfermedades, en particular enfermedades tumorales en un ser humano o en un mamífero. Los hidrolizados de pectina según la invención, así como también el preparado farmacéutico, son por lo tanto apropiados para el tratamiento de enfermedades tumorales, en particular para la reducción del crecimiento del tumor y/o para la reducción o la formación de metástasis en las enfermedades cancerosas, puesto que inhiben la adhesión a la célula tumoral inducida por la galectina-3 y/o el potencial de invasión de las células tumorales.

La invención se refiere por lo tanto también a los hidrolizados de pectina obtenidos según la invención, a saber, preparados farmacéuticos y preparados dietéticos que contienen productos de hidrolizado de pectina, los cuales pueden prepararse por ejemplo como alimentos o saborizantes, por ejemplo, productos lácteos según la invención, en particular yogur, y productos sin nada que ver con la invención, como cereales, artículos de pastelería, etc.

Se describe también al empleo de los antes citados productos de la hidrólisis de la pectina para la preparación de medicamentos para inhibir la adición o adhesión de sustancias y/o organismos dañinos para las células de mamíferos, en particular células humanas, en particular para combatirlos, es decir para la profilaxis y terapia de enfermedades infecciosas, envenenamientos, alergias, etc.

Se describe también al empleo de los antes citados productos de la hidrólisis de la pectina para la inhibición de la adición o adhesión de sustancias dañinas y/o por organismos, sobre las células de animales mamíferos, en particular células humanas, en particular para combatir las enfermedades infecciosas, envenenamientos, alergias, etc.

Las infecciones combatidas según la invención, pueden ser en particular infecciones del sistema sanguíneo, de las vías respiratorias, del tracto urogenital, de la cámara nasal y faríngea, o del tracto gastrointestinal.

Otro ámbito de empleo es el constituido por la alimentación humana, en donde por ejemplo, ayuda a la inhibición de enfermedades diarreicas en los lactantes pero también en los adultos.

Se describe también al empleo de los productos de la hidrólisis de la pectina antes citados para la inhibición de las acciones recíprocas célula-célula y/o las acciones recíprocas entre células y la matriz extracelular, en particular las relaciones recíprocas que son inducidas sobre las moléculas de galectina-3 unidas a hidratos de carbono que se encuentran en la superficie de la célula, y que son responsables del desarrollo de enfermedades humanas o de animales mamíferos, en particular enfermedades tumorales. En el caso de estas enfermedades se trata en particular de carcinomas de próstata, carcinomas de riñones, sarcoma de Kaposi, formas progresivas de la leucemia crónica, carcinomas de mama, adenocarcinomas de mama, sarcomas, carcinomas ovárico, carcinomas del recto, carcinomas de laringe, melanomas, tumores del intestino delgado, carcinomas del intestino grueso, tumores de vejiga, mastocitomas, carcinomas de pulmón, carcinomas bronquiales, carcinomas de epitelio en placas de laringe, carcinomas gastrointestinales y carcinomas de estómago. Los productos de la hidrólisis de la pectina según la invención pueden emplearse en particular para la reducción del potencial de invasión de células tumorales que producen metástasis y/o para la inhibición de la adhesión de células tumorales. De preferencia, los productos de la hidrólisis de la pectina preparados según la invención se administran por vía oral.

Se describe también el empleo de los productos de la hidrólisis de la pectina según la invención, para el tratamiento de enfermedades tumorales de un ser humano o de un animal mamífero. Los hidrolizados de pectina descritos se pueden emplear de preferencia para el tratamiento de aquellos tumores, que se basan en interacciones célula-célula y/o interacciones entre las células y la matriz extracelular, en particular aquellas interacciones que son inducidas por las moléculas de galectina-3 unidas a hidratos de carbono que se encuentran sobre la superficie celular. Con el empleo de los hidrolizados de pectina según la invención pueden ser tratados por lo tanto de preferencia los carcinomas de próstata, los carcinomas de riñones, el sarcoma de Kaposi, las formas progresivas de la leucemia crónica, los carcinomas de mama, los adenocarcinomas de mama, los sarcomas, los carcinomas ováricos, los carcinomas del recto, los carcinomas de faringe, los melanomas, los tumores del intestino delgado, los carcinomas del intestino grueso, los tumores de la vesícula, los mastocitomas, los carcinomas de pulmón, los carcinomas bronquiales, los carcinomas epiteliales en placas de la faringe, los carcinomas gastrointestinales y los carcinomas del estómago. El empleo de los hidrolizados de pectina según la invención para el tratamiento de tumores tiene por finalidad en particular la inhibición de la adhesión de las células tumorales y/o la disminución del potencial de invasión por metástasis de las células tumorales.

Se describe igualmente el empleo de los productos de la hidrólisis de pectina antes citados para la preparación de un preparado farmacéutico para la inhibición de las interacciones célula-célula y/o las interacciones entre las células y la matriz extracelular, en particular aquellas interacciones que son inducidas por las moléculas de galectina-3 unidas a hidratos de carbono que se encuentran en la superficie de la célula, y las cuales son responsables del desarrollo de enfermedades humanas o de mamíferos, en particular las enfermedades tumorales antes descritas. El preparado farmacéutico para la inhibición de las interacciones célula-célula y/o las interacciones entre las células y

la matriz extracelular, se administra preferentemente por vía oral.

Se describe también el empleo de los productos de la hidrólisis de la pectina según la invención para la preparación de un preparado farmacéutico que puede ser empleado para el tratamiento de las enfermedades tumorales antes descritas, a saber para el tratamiento de tumores que se basan sobre las interacciones célula-célula y/o las interacciones entre células y la matriz extracelular, en particular aquellas interacciones que son inducidas por las moléculas de galectina-3 unidas a hidratos de carbono que se encuentran en la superficie de la célula. Según la invención está previsto que el preparado farmacéutico para la reducción del crecimiento tumoral y/o para la reducción de la formación de metástasis puede emplearse, en donde el preparado según la invención inhibe en particular la adhesión de células tumorales y/o reduce el potencial de invasión de las células tumorales. De preferencia, el preparado farmacéutico según la invención se administra por vía oral.

Se describe igualmente un procedimiento para el bloqueo de la adición de sustancias u organismos dañinos, en particular patógenos, a las células de un cuerpo humano o de un mamífero, el cual comprende la administración de los productos de la hidrólisis de la pectina preparados según la invención, a un ser humano o a un mamífero en una cantidad, la cual es suficiente para bloquear la adición de las sustancias u organismos perjudiciales a las células de mamíferos, e inhibir la aparición de una infección. De preferencia los productos de la hidrólisis de la pectina preparados según la invención, se administran por vía oral.

Se describe igualmente un procedimiento para la inhibición de las acciones recíprocas célula-célula y/o las acciones recíprocas entre células y la matriz extracelular, las cuales son inducidas por las moléculas de galectina-3 unidas a hidratos de carbono que se encuentran sobre la superficie celular, y son responsables del desarrollo de enfermedades en humanos o animales mamíferos, en particular las antes citadas enfermedades tumorales, el cual procedimiento comprende la administración de los productos de la hidrólisis de la pectina preparados según se ha descrito, para un ser humano o a un mamífero con una enfermedad tumoral, en una cantidad suficiente para reducir y/o inhibir las interacciones célula-célula y/o célula-matriz inducidas por la galectina-3. De preferencia, los productos de la hidrólisis de la pectina preparados como se ha descrito, se administran por vía oral.

Se han descrito también preparados farmacéuticos que contienen los productos de la hidrólisis de la pectina como se ha descrito, en cantidades farmacéutica o terapéuticamente activas. En conexión con la presente invención, se entiende con la expresión "preparado farmacéutico", una mezcla empleada para fines diagnósticos, terapéuticos y/o profilácticos, la cual contiene como sustancias activas los productos de la hidrólisis de la pectina como se ha descrito, en una forma de cómoda aplicación tanto para un paciente como para un mamífero. El preparado farmacéutico puede ser una mezcla tanto sólida como también líquida. La expresión "en cantidades farmacéutica o terapéuticamente activas", significa que las sustancias activas contenidas en el preparado farmacéutico están contenidas en una dosis suficiente para impedir la aparición de una enfermedad, por ejemplo una enfermedad infecciosa o una enfermedad tumoral, para curar el estado de una enfermedad de este tipo, para interrumpir la progresión de una enfermedad de este tipo y/o para aliviar los síntomas de una enfermedad de este tipo. Los preparados farmacéuticos según la invención presentan en una versión preferida, además de los productos de la hidrólisis de la pectina según la invención, soportes farmacéuticamente compatibles, así como eventualmente diluyentes, separadores, suavizantes, auxiliares, cargas, edulcorantes, sustancias aromáticas, colorantes, saborizantes, u otras sustancias farmacéuticamente activas.

En los preparados dietéticos descritos, los productos de la hidrólisis de la pectina se emplean igualmente en una cantidad farmacéuticamente activa.

Otras versiones preferidas se mencionan en las reivindicaciones secundarias.

La invención se aclara con más detalle con la ayuda de los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1:

A 1 litro de una solución de pectina de citrus (30 g de pectina altamente esterificada en 1 litro de agua) se añadieron 0,3 ml de una pectiniliasa (por ejemplo Rohapect PTE de Röhm), y la solución se incubó, agitando a pH 5,0 y 45 °C durante dos horas. A continuación se añadieron 0,75 ml de una endopoligalacturonasa (por ejemplo, la pectinasa PL de Amano), y sin variar las condiciones de reacción, se incubó durante 3 horas más. A continuación se inactivaron las enzimas, elevando la temperatura a 95 °C. El residuo inso-luble se separó por centrifugación, la solución clara se evaporó hasta sequedad y se pesó la sustancia sólida resultante. La pesada fue de 25,8 g (correspondiente a un rendimiento de 75,6% referido a la primera materia empleada).

El producto empleado fue investigado mediante los métodos de análisis conocidos en general, resultando la siguiente composición:

Hidratos de carbono	DP 1	3,6 %
Galacturónidos		83,9 %
de los cuales hay sin saturar, un		46,0 %

(suponiendo un DP medio = 4,5)

DP 2 – 10	80,4 %
DP > 10	16,0 %
Grado de esterificación	72,0 %
5 Contenido en sales	3,0 %
Proteína en crudo	1,7 %
Contenido en agua	4,6 %

Ejemplo 2:

10 A 1 litro de una solución de pectina de citrus (30 g de pectina altamente esterificada en 1 litro de agua), se añadieron 0,3 ml de una pectinliasa (por ejemplo el Rohapect PTE de Rohm), y la solución se incubó, agitando, a pH 5,0 y 45 °C durante 2 horas. A continuación, se añadieron 0,75 ml de una endopoligalacturonasa (por ejemplo la pectinasa PL de Amano), y sin alterar las condiciones de reacción se incubó durante otras 3 horas. A continuación se
15 inactivaron las enzimas aumentando la temperatura a 95 °C.

El residuo insoluble se separó por centrifugación y la solución clara se ultrafiltró (límite de separación 10.000). El permeato se secó, resultando 22,8 g de sustancia sólida (rendimiento 66,8% referido a la materia prima empleada).

20 Hidratos de carbono	DP 1	3,0 %
Galacturónidos		84,1 %
De los cuales hay sin saturar, un		36,5 %
(suponiendo un DP medio = 4,5)		
25 DP 2 – 10		93,0 %
DP > 10		4,0 %
Grado de esterificación		72,0 %
Contenido en sales		6,7 %
Proteína en crudo		1,3 %
30 Contenido en agua		4,4 %

Ejemplo 3:

35 A 1 litro de una solución de pectina de citrus (30 g de pectina altamente esterificada en 1 litro de agua), se añadieron 0,3 ml de una pectinliasa (por ejemplo el Rohapect PTE de Röhm), y la solución se incubó, agitando, a pH 5,0 y 45 °C durante 2 horas. A continuación, se añadieron 0,75 ml de una endopoligalacturonasa (por ejemplo la pectinasa PL de Amano), y sin alterar las condiciones de reacción se incubó durante otras 3 horas. A continuación se añadieron 0,5 ml de una pectinesterasa (por ejemplo la Rheozyme de Novo Nordisk) y se incubó durante otros 45 minutos. A continuación se inactivaron las enzimas aumentando la temperatura a 95 °C. El residuo insoluble se
40 separó por centrifugación y la solución clara se evaporó a sequedad.

El producto obtenido se investigó mediante los métodos de análisis ya conocidos en general. Se comprobó, a diferencia del ejemplo 1, un grado de esterificación del 35%.

Ejemplo 4:

45 Mondaduras secas de naranja o bolitas de citrus se trituraron hasta un tamaño de partícula de aproximadamente 1 - 5 mm, y 100 g de los mismos se introdujeron en 400 ml de agua, removiendo, y se dejaron en remojo. A continuación, se añadió ácido nítrico concentrado (10 g) y la suspensión se calentó a 85 °C y a esta temperatura se agitó durante 1,5 horas. A continuación, se enfrió a 45 °C, se aumentó el valor del pH con NaOH a 4,5 y después de
50 la adición de 0,3 ml de una pectinliasa (por ejemplo el Rohapect PTE de Röhm), se incubó durante 2 horas. A continuación se añadieron 0,75 ml de una endopoligalacturonasa (por ejemplo la pectinasa PL de Amano), y manteniendo inalteradas las condiciones de reacción se incubó durante 3 horas más. A continuación se inactivaron las enzimas aumentando la temperatura a 95 °C, se concentró, y la suspensión se secó en un secador de cilindros.

Ejemplo 5:

55 Mondaduras secas de naranja o bolitas de citrus se trituraron hasta un tamaño de partícula de aproximadamente 1 - 5 mm, y 100 g de las mismas se introdujeron en 400 ml de agua removiendo, y se dejaron en remojo. A continuación, se añadió HCl concentrado (8 g) y la suspensión se calentó a 85 °C y a esta temperatura se agitó
60 durante 1,5 horas. A continuación, se enfrió a 45 °C, se aumentó el valor del pH a 4,5 con NaOH y después de la adición de 0,3 ml de una pectinliasa (por ejemplo el Rohapect PTE de Röhm), se incubó durante 2 horas. A continuación se añadieron 0,75 ml de una endopoligalacturonasa (por ejemplo la pectinasa PL de Amano), y manteniendo inalteradas las condiciones de reacción se incubó durante 3 horas más. A continuación se inactivaron las enzimas aumentando la temperatura a 95 °C, se concentró, y la suspensión se secó en un secador de cilindros.

Ejemplo 6:

Inhibición de la adhesión de microorganismos patógenos en células epiteliales humanas.

- 5 Para este ensayo se emplearon células uroepiteliales humanas, obtenidas mediante centrifugación de la orina matutina, así como dos cepas de *Staphylococcus aureus* y dos cepas de *E. Coli*, cada una en forma de suspensión con 10^9 gérmenes/ml.

10 Ejecución del ensayo

- 10 Las células epiteliales y la suspensión de gérmenes se incubaron juntamente, a 37 °C durante 30 minutos. A continuación se separaron las células epiteliales de los gérmenes no adherentes mediante filtración por membrana (8μ). Los filtros se lavaron varias veces, se introdujeron en solución fisiológica de sal común, y las células epiteliales se suspendieron en la misma. Después de centrifugar la suspensión en solución de sal común, se colocó la bolita formada sobre el portaobjetos, y se tiñó según la técnica de May-Grünwald y Giemsa. Se contó el número de gérmenes adheridos a 50 células epiteliales. El número dió el valor del blanco. Como controles se emplearon las células epiteliales sin adición de la suspensión de gérmenes.

- 20 En el ensayo principal, se incubaron células epiteliales en primer lugar con soluciones acuosas de diferentes concentraciones, preparadas según la invención (correspondientes al ejemplo 1), de los productos de la hidrólisis de la pectina, durante 1, 2, ó respectivamente 3 horas). A continuación, se incorporaron juntamente con la suspensión de gérmenes, y siguieron tratándose como se ha descrito más arriba. El número de gérmenes adheridos a las 50 células epiteliales dió el valor de medición.

25 Resultado

- 30 En el caso de los hidratos de carbono "neutrales" empleados como comparación, como por ejemplo la rafinosa, nistosa e isomelecitosa, no se comprobó ninguna disminución de los gérmenes adheridos a las células epiteliales. Con los productos de la hidrólisis de la pectina según la invención se impidió casi completamente la adherencia de todos los microorganismos ensayados (bloqueo: > 95%).

Ejemplo 7:

- 35 Se disolvieron 1,5 g del permeato seco obtenido en el ejemplo 2, en 100 ml de solución de acetato de Na 50 mM, con un valor del pH de 5,0, y a continuación se añadieron a una columna (2,6 x 30 cm) llena con el intercambiador de aniones AG 1 X2 (de la firma BioRad), la cual había sido equilibrada con solución 50 mM de acetato de Na con un valor del pH de 5,0. Se analizaron las cabezas eluidas de la columna mediante HPAEC (cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución), así como se hidrolizaron con HCl 1 N a 95 °C durante una hora.

40 Resultado:

En comparación con la Raftiline (de la firma Orafti) como estándar, los oligosacáridos eluidos de la columna presentaron una distribución del DP de 2 - 12.

- 45 El análisis de los hidrolizados mediante un analizador de azúcares (de la firma Biotronik) dió como resultado del contenido de monosacáridos, principalmente la galactosa (70 %), junto con arabinosa (23 %) así como trazas de glucosa y manosa. En total se obtuvieron 8,3 % de productos conteniendo galacturónidos como oligosacáridos conteniendo azúcares neutros en las cabezas.

50 **Ejemplo 8:**

Crecimiento de las líneas celulares del carcinoma de colon sobre la matriz extracelular (ECM) en presencia de hidrolizado de pectina

- 55 Se sembraron líneas celulares del carcinoma de colon humano HT-29 ó respectivamente Caco-2, con una densidad de células de 1×10^4 /ml, sobre cápsulas de Petri de 15 mm, y se cultivaron en medio RPMI 1640 con adición del 10% de suero bovino fetal (FCS) (HT-29), ó respectivamente MEM, con adición del 10% de FCS (Caco-2) a 37 °C en una atmósfera conteniendo el 5% de CO₂. Las células se dejaron crecer hasta la confluencia, durante 1 a 2 días. A continuación se lavaron las cápsulas una vez con PBS, a continuación se incubaron con PBS y 0,5% de Tritón X-100 durante 30 minutos a temperatura ambiente, en un dispositivo de agitación, y a continuación se lavaron 3 veces con PBS. A continuación se sembraron de nuevo las líneas celulares descritas anteriormente sobre las cápsulas con las capas de ECM así preparadas. Se determinó entonces la influencia del hidrolizado de pectina sobre el crecimiento de las células por medición del número de células. A continuación se disolvieron de nuevo las células después de 48 horas mediante una solución de tripsina/EDTA en HBSS (10 minutos) y se lavaron en solución de PBS. A continuación se tiñeron el número de células vivas con solución de azul Tryphan (650 mg de azul Tryphan en 400 ml

de NaCl al 0,9%, 1:1 (v/v) en una cámara de contaje Neubauer. Como controles se efectuaron experimentos con glucosa. Los resultados están resumidos en la tabla 1.

De la tabla 1 se desprende que la glucosa no tuvo ninguna influencia sobre el crecimiento de las líneas celulares HT 29 y Caco-2, mientras que el hidrolizado de pectina redujo el crecimiento de las células en función de la concentración empleada, alrededor de hasta un 75%.

Tabla 1

Concentración	Reducción del crecimiento de las células			
	HT 29		Caco-2	
	Hidrolizado de pectina	Glucosa	Hidrolizado de pectina	Glucosa
0,01 %	30 %	0 %	25 %	0 %
0,1 %	45 %	1 %	43 %	0 %
1,0 %	75 %	0 %	70 %	0 %

Ejemplo 9:

Reducción de la capacidad de invasión de las células Caco-2 mediante el hidrolizado de pectina

Se investigó la acción del hidrolizado de pectina sobre la capacidad de invasión de las células de Caco-2 mediante el empleo del ensayo de invasión descrito por Erkel y Schirmacher (Cancer Research ("Investigación del cáncer"), 48 (1988), 6933-6937). El ensayo se basa en la migración de las células a través de los poros de un filtro de policarbonato Nucleopore en un gel de proteína, el cual contiene proteínas de diferentes ECM como por ejemplo el colágeno tipo I y III, fibronectina y laminina, sobre un filtro de nitrocelulosa. Las células se añadieron juntamente con el hidrolizado de pectina en el sistema de ensayo y a continuación, se evaluaron cuantitativamente las células migradas a través de la capa de proteína a la capa inferior de nitrocelulosa. Para el control se investigó el efecto de la glucosa sobre la capacidad invasora de las células de Caco-2.

Los resultados de estas investigaciones están representados en la tabla 2. Los resultados muestran que el hidrolizado de pectina según la invención puede reducir en parte considerablemente la capacidad de invasión de las células Caco-2 en función de la concentración empleada, mientras que la glucosa solamente en concentraciones más altas, ocasiona una muy pequeña reducción de la capacidad de invasión de las células Caco-2.

Tabla 2

Concentración	Reducción de la capacidad de invasión de las células Caco-2	
	Hidrolizado de pectina	Glucosa
0,01 %	30 %	0 %
0,1 %	69 %	2 %
1,0 %	88 %	3 %

Ejemplo 10:

Unión del anticuerpo anti-galectina-3 mediante el hidrolizado de pectina

Se determinó la expresión de la galectina-3 sobre las células del carcinoma de colon mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal específico anti-galectina-3 (Ig de ratón) y un correspondiente anticuerpo secundario copulado anti-ratón-FITC, mediante el procedimiento de inmunofluorescencia/citometría de flujo. Concentraciones crecientes del hidrolizado de pectina y de glucosa como controles fueron incubados juntamente con el anticuerpo primario sobre células diana, y a continuación se midió el efecto inhibitorio de la sustancia de azúcar soluble sobre la unión anti-galectina-3.

El efecto del hidrolizado de pectina sobre la unión anti-galectina-3, está mostrado en la tabla 3. A partir de la tabla 3, se desprende que la glucosa no reduce, o solamente reduce muy poco, la reacción de unión del anticuerpo monoclonal anti-galectina-3, mientras que el hidrolizado de pectina disminuye en parte considerablemente la unión del anticuerpo en función de la concentración empleada.

Tabla 3

Concentración	Reducción de la unión del anticuerpo monoclonal anti-galectina-3 en %			
	HT-29		Caco-2	
	Hidrolizado de pectina	Glucosa	Hidrolizado de pectina	Glucosa
0,01 %	34	0	28	0
0,1 %	67	0	63	0
1 %	85	2	82	0

- 5 Se describen también los siguientes aspectos:
- 10 Aspecto 1: para la obtención de productos de hidrólisis de la pectina, en donde una pectina o un material vegetal conteniendo pectina en solución o suspensión acuosa, se trata en un primer paso de procedimiento con una enzima A hidrolizadora de la pectina, y en un segundo paso de procedimiento con una enzima B hidrolizadora de la pectina, en donde los productos de hidrólisis de la pectina se obtienen con una proporción de galacturónidos que por lo menos contienen una molécula de ácido galacturónico no saturado en 4,5, y se esterifican con metanol \geq 20%.
- 15 Aspecto 2: procedimiento para la obtención de productos de hidrólisis de la pectina según el aspecto 1, en donde los productos de la hidrólisis líquidos obtenidos a partir del segundo paso de procedimiento se tratan en un tercer paso de procedimiento con una enzima C.
- 20 Aspecto 3: procedimiento para la obtención de los productos de la hidrólisis de la pectina según el aspecto 1 ó 2, en donde los productos de la hidrólisis líquidos obtenidos en el segundo o tercer paso de procedimiento se liberan mediante filtración y/o centrifugación de los componentes insolubles y se convierte en en la forma seca.
- 25 Aspecto 4: procedimiento según uno de los aspectos 1 hasta 3, **caracterizado porque**, en el caso de la pectina empleada, se trata de la pectina de citrus, la pectina de manzana o la pectina de remolacha azucarera.
- 30 Aspecto 5: procedimiento según uno de los aspectos 1 hasta 4, **caracterizado porque**, en el caso del material conteniendo pectina se trata de pulpa de remolacha azucarera, pulpa de manzana o residuos secos de la obtención de zumo de naranja, zumo de limón, y/o zumo de lima.
- 35 Aspecto 6: procedimiento según uno de los aspectos 1 hasta 5, **caracterizado porque**, en el caso de la enzima A se trata de una endopoligalacturonasa o de una pectinilasa (EC 4. 2. 2. 10).
- 40 Aspecto 7: procedimiento según uno de los aspectos 1 hasta 6, **caracterizado porque**, en el caso de la enzima B se trata de una endopoligalacturonasa (EC 3. 2. 1. 15) ó de una pectinilasa.
- 45 Aspecto 8: procedimiento según uno de los aspectos 2 hasta 7, caracterizado porque, en el caso de la enzima C se trata de una pectinesterasa (EC 3. 1. 1. 11).
- 50 Aspecto 9: productos de la hidrólisis de la pectina, obtenibles según uno de los procedimientos según uno de los aspectos 1 hasta 8.
- 55 Aspecto 10: . Preparado farmacéutico o dietético, que contiene un producto de la hidrólisis de la pectina según el aspecto 9, eventualmente junto con un soporte farmacéuticamente compatible.
- Aspecto 11: Empleo de los productos de la hidrólisis de la pectina, obtenidos según uno de los procedimientos según uno de los aspectos 1 a 8, para la elaboración de un preparado farmacéutico para el bloqueo de la acumulación de sustancias u organismos dañinos en las células de los mamíferos, en particular para la lucha contra la infección.
- Aspecto 12: empleo de un producto de la hidrólisis de la pectina obtenido según uno de los procedimientos según uno de los aspectos 1 a 8, para el bloqueo de la acumulación de sustancias u organismos dañinos en las células de los mamíferos, en particular para la lucha contra la infección.
- Aspecto 13: empleo de los productos de la hidrólisis de la tina obtenidos según uno de los procedimientos según uno de los aspectos 1 a 8, como componente de determinados productos nutritivos para la alimentación humana.
- Aspecto 14: empleo de los productos de la hidrólisis de la pectina obtenidos según uno de los procedimientos según

uno de los aspectos 1 a 8 como componente de piensos animales.

5 Aspecto 15: empleo de los productos de la hidrólisis de la pectina obtenidos según un procedimiento según uno de los aspectos 1 a 8 para la inhibición de las interacciones célula-célula y/o de las interacciones entre células y la matriz extracelular en un ser humano o un animal mamífero.

10 Aspecto 16: empleo según el aspecto 15 en donde las interacciones célula-célula y/o célula-matriz son mediadas por las moléculas de galectina-3 unidas a los hidratos de carbono que se encuentran en la superficie de las células.

15 Aspecto 17: empleo según el aspecto 15 ó 16, en donde las células son células tumorales y las interacciones célula-célula y/o célula-matriz son responsables del desarrollo de enfermedades tumorales de los humanos o de los animales mamíferos.

20 Aspecto 18: empleo según uno de los aspectos 15 a 17, en donde las enfermedades tumorales son, los carcinomas de próstata, los carcinomas de riñones, los sarcomas de Kaposi, las formas del transcurso de la leucemia crónica, los carcinomas de mama, los adenocarcinomas de mama, los sarcomas, los carcinomas del ovario, los carcinomas del recto, los carcinomas de garganta, los melanomas, los tumores del intestino delgado, los carcinomas del intestino grueso, los tumores de la vejiga, los mastocitomas, los carcinomas del pulmón, los carcinomas bronquiales, los carcinomas de células escamosas de la garganta, los carcinomas gastrointestinales y/o los tumores del estómago.

25 Aspecto 19: empleo según uno de los aspectos 15 a 18, en donde los hidrolizados de la pectina inhiben la adhesión de las células tumorales y/o reducen la potencial invasión de las células tumorales productoras de metástasis.

30 Aspecto 20: empleo de los productos de la hidrólisis de la pectina obtenidos según un procedimiento según uno de los aspectos 1 a 8 para el tratamiento de las enfermedades tumorales de un ser humano o de un animal mamífero.

35 Aspecto 21: empleo según el aspecto 20, en donde las enfermedades tumorales están basadas sobre las interacciones célula-célula y/o las interacciones entre las células y la matriz extracelular.

40 Aspecto 22: empleo según el aspecto 20 ó 21, en donde las interacciones célula-célula y/o célula-matriz están mediadas por las moléculas de galectina-3 unidas a hidratos de carbono que se encuentran sobre la superficie de las células.

45 Aspecto 23: empleo según uno de los aspectos de 20 a 22, en donde las enfermedades tumorales son, los carcinomas de próstata, los carcinomas de riñones, los sarcomas de Kaposi, las formas del transcurso de la leucemia crónica, los carcinomas de mama, los adenocarcinomas de mama, los sarcomas, los carcinomas del ovario, los carcinomas del recto, los carcinomas de garganta, los melanomas, los tumores del intestino delgado, los carcinomas del intestino grueso, los tumores de la vejiga, los mastocitomas, los carcinomas del pulmón, los carcinomas bronquiales, los carcinomas de células escamosas de la garganta, los carcinomas gastrointestinales y/o los tumores del estómago.

50 Aspecto 24: empleo según uno de los aspectos 20 a 23, en donde los hidrolizados de pectina inhiben la adhesión de las células tumorales y/o reducen la potencial invasión de las células tumorales productoras de metástasis.

55 Aspecto 25: empleo de los productos de la hidrólisis de la pectina obtenidos según uno de los procedimientos según uno de los aspectos de 1 a 8 para la obtención de un preparado farmacéutico para la inhibición de las interacciones célula-célula y/o las interacciones entre las células y la matriz extracelular en un ser humano o en un animal mamífero.

60 Aspecto 26: empleo según el aspecto 25, en donde las interacciones célula-célula y/o célula-matriz están mediadas por moléculas de galectina-3 unidas a hidratos de carbono que se encuentran en la superficie de las células.

65 Aspecto 27: empleo según el aspecto 25 ó 26, en donde las células son células tumorales y las interacciones célula-célula y/o célula-matriz son responsables del desarrollo de enfermedades tumorales del ser humano o de un animal mamífero.

Aspecto 28: empleo según uno de los aspectos 25 a 27, en donde las enfermedades tumorales son los carcinomas de próstata, los carcinomas de riñones, los sarcomas de Kaposi, las formas del transcurso de la leucemia crónica, los carcinomas de mama, los adenocarcinomas de mama, los sarcomas, los carcinomas del ovario, los carcinomas del recto, los carcinomas de garganta, los melanomas, los tumores del intestino delgado, los carcinomas del intestino grueso, los tumores de la vejiga, los mastocitomas, los carcinomas del pulmón, los carcinomas bronquiales, los carcinomas de células escamosas de la garganta, los carcinomas gastrointestinales y/o los tumores del estómago.

Aspecto 29: empleo según uno de los aspectos 25 a 28, en donde los hidrolizados de pectina inhiben la adhesión de las células tumorales y/o reducen la potencial invasión de células tumorales productoras de metástasis.

5 Aspecto 30: empleo según uno de los aspectos 25 a 29, en donde el preparado farmacéutico se administra por vía oral.

10 Aspecto 31: empleo de los productos de la hidrólisis de la pectina obtenidos según uno de los procedimientos según uno de los aspectos 1 a 8 para la obtención de un preparado farmacéutico para el tratamiento de enfermedades tumorales de un ser humano o de un animal mamífero.

15 Aspecto 32: empleo según el aspecto 31, en donde las enfermedades tumorales están basadas sobre interacciones célula-célula y/o interacciones entre células y la matriz extracelular.

20 Aspecto 33: empleo según el aspecto 31 ó 32, en donde las interacciones célula-célula y/o célula-matriz están mediadas por moléculas de galectina-3 unidas a hidratos de carbono que se encuentran en la superficie de las células.

25 Aspecto 34: empleo según uno de los aspectos 31 a 33, en donde las enfermedades tumorales son los carcinomas de próstata, los carcinomas de riñones, los sarcomas de Kaposi, las formas del transcurso de la leucemia crónica, los carcinomas de mama, los adenocarcinomas de mama, los sarcomas, los carcinomas del ovario, los carcinomas del recto, los carcinomas de garganta, los melanomas, los tumores del intestino delgado, los carcinomas del intestino grueso, los tumores de la vejiga, los mastocitomas, los carcinomas del pulmón, los carcinomas bronquiales, los carcinomas de células escamosas de la garganta, los carcinomas gastrointestinales y/o los tumores del estómago.

30 Aspecto 35: empleo según uno de los aspectos 31 a 34, en donde se emplea un preparado farmacéutico para la reducción del crecimiento tumoral, en particular para la inhibición de la adhesión de las células tumorales.

35 Aspecto 36: empleo según uno de los aspectos 31 a 35, en donde el preparado farmacéutico se emplea para la reducción de la formación de metástasis, en particular para la reducción del potencial de invasión de las células tumorales.

40 Aspecto 37: Empleo según uno de los aspectos 31 a 36, en donde el preparado farmacéutico se administra por vía oral.

45 Aspecto 38: Procedimiento para el bloqueo de la adición de sustancias o organismos dañinos a las células del cuerpo de un ser humano o de un animal mamífero, el cual comprende la administración de productos de la hidrólisis de la pectina obtenidos según uno de los aspectos 1 a 8 a un ser humano o a un animal mamífero en una cantidad, que es suficiente para bloquear la adición de sustancias u organismos dañinos para los animales mamíferos y en particular para inhibir el desarrollo de una enfermedad infecciosa.

50 Aspecto 39: procedimiento según el aspecto 38, en donde los productos de la hidrólisis de la pectina se administran por vía oral.

55 Aspecto 40: procedimiento para la inhibición de las interacciones célula-célula y/o de las interacciones entre células y la matriz extracelular, las cuales están mediadas por moléculas de galectina-3 unidas a hidratos de carbono que se encuentran en la superficie de las células, y son responsables del desarrollo de enfermedades de los seres humanos o de los animales mamíferos, en particular enfermedades tumorales, que comprenden la administración de los productos de la hidrólisis de la pectina obtenidos según uno de los aspectos numero 1 al 8 en un hombre o un animal mamífero con una enfermedad tumoral, en una cantidad que es suficiente para reducir y/o inhibir las interacciones célula-célula y/o célula-matriz mediadas por la galectina-3.

Aspecto 41: Procedimiento según el aspecto 40, en donde los productos de la hidrólisis de la pectina se administran por vía oral.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Empleo de un producto de la hidrólisis de la pectina con una proporción de galacturónidos, los cuales contienen por lo menos una molécula de ácido galacturónico sin saturar en 4, 5, y está esterificado con metanol hasta $\geq 20\%$, como componente de un yogur.
- 10 2. Empleo según la reivindicación 1, en donde el producto de hidrólisis de la pectina puede obtenerse mediante un procedimiento en donde una pectina o un material vegetal que contiene pectina en solución o suspensión acuosa se trata en un primer paso de procedimiento con una enzima A hidrolizadora de la pectina y un segundo paso de procedimiento con una enzima B hidrolizadora de la pectina.
- 15 3. Empleo según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la proporción de galacturónidos con un grado de polimerización $DP > 10$ referido al contenido total de hidratos de carbono del hidrolizado de pectina es inferior al 10% en peso (referido al peso en seco).
- 20 4. Empleo según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque, en el caso de la enzima A se trata de una endopoligalacturonasa o de una pectinilasa (EC 4. 2. 2. 10).
5. Empleo según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque, en el caso de la enzima B se trata de una endopoligalacturonasa (EC 3. 2. 1. 15) ó una pectinilasa.
- 25 6. Yogur conteniendo un producto de la hidrólisis de la pectina con una proporción de galacturónidos, que por lo menos contienen una molécula de ácido galacturónico sin saturar en 4,5, y están esterificados con metanol hasta un $\geq 20\%$.
- 30 7. Yogur según la reivindicación 6, en donde el producto de la hidrólisis de la pectina, puede obtenerse con un procedimiento en donde la pectina o el material vegetal que contiene la pectina, en solución o suspensión acuosa, se trata en un primer paso de procedimiento con una enzima A hidrolizadora de pectina y en un segundo paso de procedimiento, con una enzima B hidrolizadora de pectina.
- 35 8. Yogur según una de las reivindicaciones 6 ó 7, en donde la proporción de galacturónidos con un grado de polimerización $DP > 10$ referido al contenido total de hidratos de carbono del hidrolizado de pectina es inferior al 10% en peso (referido al peso seco).
9. Yogur según una de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado porque, en el caso de la enzima A se trata de una endopoligalacturonasa o de una pectinilasa (EC 4. 2. 2. 10).
- 40 10. Yogur según una de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado porque, en el caso de la enzima B se trata de una endopoligalacturonasa (EC 3. 2. 1. 15) ó de una pectinilasa.