

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 530**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/357** (2006.01)  
**A61K 31/352** (2006.01)  
**A61K 31/05** (2006.01)  
**A61K 31/716** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61P 1/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09712828 .4**  
96 Fecha de presentación: **20.02.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2254573**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2010**

54 Título: **Composiciones que comprenden fitoestrógenos selectivos para el receptor beta del estrógeno y de fibras alimentarias**

30 Prioridad:  
**22.02.2008 IT BA20080008**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.09.2012**

73 Titular/es:  
**CM&D Pharma Limited**  
**Thames House Portsmouth Road**  
**Esher Surrey KT10 9AD, GB**

72 Inventor/es:  
**DI LEO, Alfredo y**  
**BARONE, Michele**

74 Agente/Representante:  
**Isern Jara, Jorge**

ES 2 387 530 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

Composiciones que comprenden fitoestrógenos selectivos para el receptor beta del estrógeno y de fibras alimentarias

5

Campo de la invención

La presente invención hace referencia a compuestos que incluyen uno o más fitoestrógenos asociados a fibras alimentarias, insolubles y resistentes a la digestión enzimática; y a la utilización de dichas composiciones para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la mucosa intestinal y, en particular, de la adenopoliposis colónica, y de su progresión hacia el carcinoma colorrectal.

10

Antecedentes de la invención

El adenocarcinoma o el carcinoma colorrectal (CRC) es la tercera causa de muerte en el mundo. La patogenia del CRC incluye la formación de pólipos sobre la mucosa intestinal, que se consideran lesiones precancerosas. Habitualmente, cuando se diagnostican mediante colonoscopia, los pólipos intestinales se eliminan. Tras la polipectomía, la tasa de recurrencia es de aproximadamente el 10-15% por año. De los pólipos recurrentes, un 10% resultan ser adenomas avanzados, caracterizados por un diámetro de  $\geq 1$  cm y por ser vellosos histológicamente. La presencia de un adenoma avanzado, o la presencia de dos formaciones nuevas tras la polipectomía, independientemente de sus características histológicas, caracteriza a la población con el mayor riesgo de desarrollar un CRC (Vogelstein B et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. NEJM 1988, 319: 525-532).

15

20

La poliposis adenomatosa familiar humana (PAF) está causada por una mutación germinal del gen supresor de tumores APC (del inglés, *Adenomatous Polyposis Coli*). La PAF se caracteriza por el desarrollo de una gran cantidad (cientos o miles) de adenomas en el colon. Mientras que el sustrato genético favorece el inicio del proceso tumorigénico y no puede modificarse farmacológica o nutricionalmente, la promoción de la tumorigénesis puede controlarse, impidiendo así la progresión hacia la desdiferenciación celular y la transformación neoplásica. El objetivo principal del cribaje colonoscópico es la monitorización de los adenomas y su progresión hacia formas avanzadas y hacia CRC. Además del cribaje colonoscópico, la necesidad clínica de intervenciones quimiopreventivas, seguras y efectivas para mantener baja la tasa de recurrencia de los adenomas es desde luego elevada, pero aún desconocida. Pese a que la inhibición de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) a través de celecoxib y rofecoxib es efectiva, se asocia a un riesgo intolerable de efectos secundarios cardiovasculares (Lance P. Chemoprevention of colorectal cancer: some progress but a long way to go. Gastroenterology 2008, 134: 341-343).

25

30

35

Una mayor prevalencia de CRC en hombres y una incidencia reducida en mujeres bajo terapia hormonal sustitutiva (HRT) sostienen la hipótesis de que los estrógenos juegan un papel protector en el proceso tumorigénico colónico. Como prueba adicional del concepto de rol protector de los estrógenos en la mucosa intestinal, debe citarse la evidencia reciente de la regresión de los adenomas en una mujer joven afectada por la FAP, tras la terapia estroprogestínica con fines contraceptivos (Giardiello F, Hylind L, Trimbath J et al. Oral Contraceptives and Polyp Regression in Familial Adenomatous Polyposis. Gastroenterology 2005; 128:1077-1080). Desafortunadamente, en los estudios epidemiológicos llevados a cabo en mujeres posmenopáusicas bajo terapia estroprogestínica, se ha observado una elevada incidencia de cáncer de mama y de accidentes cardiovasculares, lo que requirió la finalización temprana del estudio para salvaguardar la salud de las pacientes inscritas (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. JAMA 2002, 288: 321-333).

40

45

Los receptores de estrógeno existen en dos formas: alfa ( $ER\alpha$ ) y beta ( $ER\beta$ ), localizados en lugares diferentes y expresados en diversos distritos anatómicos.  $ER\alpha$  se localiza principalmente en las mamas, el sistema cardiovascular, los huesos, el aparato urogenital y el sistema nervioso central, mientras que  $ER\beta$  se expresa en la próstata, las glándulas salivares, los testículos, los ovarios, el sistema inmunitario y, predominantemente, en el intestino. El  $17\beta$ -estradiol (estrógeno) es un ligando no selectivo de ambos receptores que lleva a cabo una actividad proliferativa en presencia de  $ER\alpha$  y antiproliferativa en presencia de  $ER\beta$  (Koehler KF et al. Reflections on the discovery and significance of Estrogen Receptor  $\beta$ . Endocr Rev 2005, 26: 465-478). Por consiguiente, los efectos beneficiosos observados en los estudios mencionados con anterioridad en relación con la incidencia reducida de CRC podrían depender específicamente de la activación de  $ER\beta$ .

55

60

La participación de  $ER\beta$  en la poliposis adenomatosa y en el CRC se demuestra por su expresión reducida, con respecto a la mucosa intestinal normal, en pacientes polipectomizados ya en la etapa precancerosa (Di Leo A et al.  $ER\beta$  expression in large bowel adenomas: implications in colon carcinogenesis. Dig Liver Dis 2008, C40: 260-266). Es significativo que la reducción de  $ER\beta$  se relaciona con una proliferación aumentada y una desdiferenciación celular progresiva, lo que demuestra que la silenciamiento de  $ER\beta$  está implicada en la progresión tumoral. Por lo tanto, las lesiones precancerosas colorrectales son advertencias tempranas del

65

desarrollo del CRC en una parte relevante de la población. También se observa un descenso dramático de ER $\beta$  en las etapas más avanzadas de la transformación neoplásica (Konstantinopoulos PA et al. Oestrogen receptor beta (ER $\beta$ ) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumor's dedifferentiation. Eur J Cancer 2003, 39: 1251-1258).

5

Estudios experimentales llevados a cabo con ratones transgénicos C57BU6J - APC<sup>Min/+</sup>, que llevan una mutación de la línea germinal en el gen APC, respaldan el rol protector de los estrógenos en la prevención de la transformación neoplásica de las células epiteliales colónicas. En particular, Weyant et al. (Weyant MJ et al. Reciprocal expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  is associated with estrogen-mediated modulation of intestinal tumorigenesis. Cancer Res 2001, 61: 2547-2551), demostraron mediante la utilización de ratones transgénicos hembra que los adenomas intestinales se desarrollan espontáneamente tras la ovariectomía. La ovariectomía dio lugar a un aumento del 77% de la neoformación de adenomas intestinales, mientras que la subsiguiente administración de 17- $\beta$ -estradiol causó una reducción de los adenomas intestinales.

10

Además de las causas genéticas, se sabe que la exposición a carcinógenos en la luz intestinal o a agentes potencialmente genotóxicos para las células epiteliales de la mucosa intestinal es un evento epigenético que facilita la inactivación de ambos alelos o la mutación somática del gen APC, en ambas formas, la PAF y la esporádica. Estas sustancias peligrosas se ingieren habitualmente en la dieta, o pueden formarse en la luz intestinal como un efecto de la digestión, en particular de grasas, o mediante la degradación de ácidos biliares.

15

20

Por esta razón, se considera que una dieta rica en fibras, que ejerce un efecto protector en la mucosa intestinal o que absorbe xenobióticos genotóxicos potenciales, es útil para la prevención del CRC (Robertson DJ et al. Fat, fiber, meat and the risk of colorectal adenomas. Am J Gastroenterol 2005, 100: 2789-2795). No obstante, las evidencias clínicas de tal eficacia no siempre son convincentes. Habitualmente, esto depende de la pobre calidad de los diversos protocolos experimentales, donde los efectos esperados no se comparan con el consumo de fibra alimentaria total, formado por fibras solubles e insolubles. Por lo tanto, los efectos esperados debidos a la adición a la dieta de una cantidad conocida de una fibra calificada por su estructura, grado de solubilidad y digestibilidad, con su propia viscosidad y propiedades de gelificación en la luz intestinal, son inciertos en gran medida. Todas las características mencionadas previamente (es decir, estructura, grado de solubilidad y digestibilidad, viscosidad y propiedades de gelificación) afectan profundamente a las propiedades de la fibra, así como a sus efectos biológicos en la fisiología intestinal de organismos complejos (Jones JR et al. Dietary reference intake: implication for fiber labeling and consumption: a summary of the international Life Sciences Institute North America Fiber workshop, Junio 1-2, 2004 Washington, DC. Nutr Rev 2006, 64k: 31-38).

25

30

35

Tamura M, et al. (J. Nutr. Sci Vit., 2003, 49, 168-171) describen el efecto de los oligosacáridos de la soja sobre la actividad metabólica de la microflora intestinal en ratones alimentados con una dieta de oligosacáridos-isoflavonas de la soja y una dieta de celulosa-isoflavones, donde las isoflavonas son una mezcla de daidzeína y genisteína, mientras que Stangroom K. et al. (Can. J. Phys. Pharm., 1984, 62, 1219-1224) describen el efecto en ratas de una mezcla de coumestrol asociado a lignina sobre la toxicosis por zearalenona y la patente DE 102004054133 describe el efecto metabólico de una mezcla de silimarina, yacón y celulosa sobre el colesterol, los triglicéridos y la glucosa plasmáticos.

40

Se ha supuesto un efecto putativo de la silibinina como agente protector en el cáncer colorrectal y las metástasis hepáticas colorrectales basándose en los niveles detectables de silibinina en plasma y en hígado encontrados en un estudio clínico piloto con doce pacientes con carcinoma colorrectal y doce pacientes con metástasis hepáticas colorrectales tratados oralmente con un compuesto de silibinina formulado con fosfatidilcolina (dosis: 360, 720 o 1440 mg/día durante siete días) (Hoh C.S.I. et al., Proc. Am. Ass, Reunión Anual del Cancer Res., 2006, 47, 752).

45

El papel de Bax en la apoptosis inducida por resveratrol en el cáncer colorrectal se ha estudiado *in vitro* en células de carcinoma colónico humano HCT116, donde ambos alelos de Bax se inactivaron (Mahyar-Roemer M. et al., BMC Cancer 2002, 2, 1471-2407), así como se ha publicado en la literatura el papel de la genisteína (*in vitro* y en dosis comprendidas entre 0,01 y 10  $\mu$ M) en la regulación de 25-D-3-1 en las células tumorales mamarias (MCF-7) y colónicas (Caco-2) (Lechner D. y Cross H., Reunión anual del Proc. Am. Ass. Cancer Res., 2004, 45, 736).

50

55

Se han descrito los diferentes efectos metabólicos de la pectina, la celulosa y la lignina en el pH de las heces, el tiempo de transito y el peso (Hillman L. et al., Brit. J. Nutr., 1983, 50, 189-196). Basándose en estos hallazgos los autores asumieron que el análisis de diferentes tipos de componentes de la fibra alimentaria consumidos puede ser relevante para el entendimiento de la etiología del cáncer colorrectal.

60

En la patente EP 0846704 se reivindica una posible utilización de un compuesto de almidón retrógrado parcialmente degradado como suplemento alimentario para la prevención de enfermedades digestivas colorrectales, incluyendo el cáncer colorrectal, en base a la producción de n-butilato bajo condiciones de fermentación que simulan el colon humano.

65

Resumen de la invención

De acuerdo con los inventores, la necesidad terapéutica puede satisfacerse mediante la utilización de agentes de liberación local capaces de actuar como agonistas selectivos del receptor de estrógeno beta, involucrado en la progresión de la adenopolirosis hacia el cáncer colorrectal, lo que reduce significativamente la absorción sistémica de tales agentes y, por consiguiente, favorece su acción farmacológica sobre la mucosa intestinal.

Las composiciones para la administración oral que incluyen una asociación de al menos un fitoestrógeno, agonista selectivo para el receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ) o más fitoestrógenos con las propiedades anteriores, y fibras alimentarias insolubles, es decir, fibras resistentes a la digestión enzimática en el tracto intestinal, pueden satisfacer la necesidad en el campo médico de herramientas útiles para la prevención o el tratamiento de la condición de adenopolirosis colónica y su progresión hacia el cáncer colorrectal.

Por consiguiente, en un primer aspecto, es un objetivo de la presente invención los compuestos que incluyen al menos un fitoestrógeno o una mezcla de fitoestrógenos agonistas selectivos para el receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ), y al menos una fibra insoluble e indigerible o una mezcla de estas, seleccionadas a partir de un grupo que incluye polisacáridos distintos al almidón.

Además, es un objetivo adicional de la invención la utilización de tales compuestos administrados por vía oral para el tratamiento local de la mucosa intestinal, y en particular, para el tratamiento de las condiciones de adenopolirosis colónicas, y para la prevención de su progresión hacia el cáncer colorrectal.

Como se hará fácilmente aparente a partir de la descripción detallada de la invención descrita a continuación, en presencia de lesiones colónicas precancerosas caracterizadas por mutaciones del gen supresor de tumores APC, definidas como pólipos o adenomas, los compuestos para la administración oral pueden utilizarse provechosamente para reducir el número y el volumen de los pólipos y prevenir su progresión hacia la transformación neoplásica, reduciendo su grado de displasia.

Las composiciones para la administración oral objeto de la presente invención pueden utilizarse provechosamente para restablecer la expresión de los ER $\beta$  sobre la mucosa colónica, que son deficientes o están silenciados cuando aparecen los adenomas intestinales, y para restablecer la proporción de expresión entre los receptores de estrógeno beta y alfa en favor de la actividad antiproliferativa.

Además, la asociación de, al menos, un fitoestrógeno selectivo para el receptor de estrógeno beta y, al menos, una fibra alimentaria insoluble que forma los compuestos para la administración oral objeto de la presente invención representa un sistema de liberación preferible de los fitoestrógenos selectivos para el ER $\beta$  en el colon, donde se localiza preferiblemente la adenopolirosis, con enriquecimiento de los componentes sobre la mucosa intestinal y en los colonocitos. Por lo tanto, las composiciones orales objeto de la presente invención son sistemas de liberación efectivos y seguros para el tratamiento local de la mucosa intestinal en condiciones con un riesgo alto de desarrollo de adenomas y de progresión de estos hacia el adenocarcinoma, útiles, por consiguiente, para el tratamiento de sujetos afectados por la adenopolirosis colónica, en las formas familiar y esporádica, reclutados para el cribaje colonoscópico y tras la polipectomía, para prevenir el desarrollo de adenomas avanzados y para prevenir su potencial transformación neoplásica hacia adenocarcinoma, también conocido como cáncer colorrectal (CRS).

Breve descripción de las figuras

Figura 1. La figura muestra la expresión génica (RNA mensajero, mRNA) de los receptores de estrógeno en intestino de ratón<sup>Min/+</sup>. Los niveles de expresión de los mRNA de ER $\beta$  y ER $\alpha$  se expresan en forma de unidades de densidad óptica en comparación con las unidades de densidad óptica del mRNA constitutivo de 18S, relativo a una proteína estructural no modificada en las condiciones experimentales del presente estudio. Los resultados muestran: un aumento significativo del mRNA de ER $\beta$  en el grupo de silimarina 200 ppm (p=0,03), con respecto al grupo control alimentado con una dieta estándar; una disminución significativa e inesperada del mRNA de ER $\alpha$  en el grupo al que se administró fibra insoluble lignina sola (p=0,04); un aumento significativo de ER $\beta$  en el grupo al que se administró la composición formada por la asociación de lignina+silimarina (p=0,04).

Figura 2. La figura muestra la proporción entre los mRNAs de los receptores de estrógeno alfa y beta, en el intestino de ratones APC<sup>Min/+</sup>. En comparación con el grupo de animales que fueron tratados subcutáneamente con estrógenos (de los que se sabe que no son selectivamente activos sobre ER $\beta$  y ER $\alpha$ ), los resultados conforman la selectividad de la silimarina por ER $\beta$ , donde el receptor se incrementa por el ligando. Además, los resultados demuestran que la asociación de silimarina (incluso a dosis bajas) y de la fibra insoluble lignina, que por si sola es sorprendentemente activa en la reducción de la expresión de ER $\alpha$ , que posee una actividad proliferativa, facilita el restablecimiento de la proporción de la expresión entre los receptores de estrógeno en favor de la actividad antiproliferativa.

Figura 3. La figura muestra la proporción entre los niveles de las proteínas receptoras de estrógeno alfa y beta, en el intestino de ratones APC<sup>Min/+</sup>, detectados mediante la realización de Western Blot. Con respecto al grupo control de animales alimentados con una dieta estándar, se observa un aumento de la proteína ERβ con relación a ERα en animales alimentados con dietas diferentes, y este incremento es mayor en el grupo tratado subcutáneamente con 17β-estradiol; en el grupo al que se administró la silimarina; en el grupo al que se administró la lignina; en el grupo al que se administró la composición que contiene lignina + silimarina, incluso a dosis bajas.

Figura 4. La figura 4A compara la proporción entre los mRNA de ERβ y ERα en el intestino delgado de los grupos de tipo salvaje (WT) y APC<sup>Min/+</sup>, alimentados con dietas diferentes. La silimarina (SIL), la lignina (LIG) y la silimarina+lignina (SIL+LIG) restablecieron la proporción de mRNA ERβ/ERα a niveles comparables con las mucosas sanas de WT. La proteína ERβ también aumentó en todos los grupos con manipulaciones dietéticas (Fig. 4B), en comparación con los controles.

Figura 5. Ensayo TUNEL (A-C) y evaluación mediante la caspasa 3 (CC-3) escindida (D) de la actividad proapoptótica en mucosa no adenomatosa y adenomatosa de animales APC<sup>Min/+</sup> alimentados con una dieta estándar (control) o dietas diferentes (SIL, LIG, SIL+LIG), en comparación con los ratones de tipo salvaje (WT) alimentados con la dieta estándar. En la mucosa no adenomatosa, la silimarina, la lignina, y la combinación de ambas restablecieron la apoptosis a niveles comparables con los de la mucosa sana de los ratones WT. En la mucosa adenomatosa, sólo la asociación de silimarina y lignina restableció la apoptosis a valores comparables con la mucosa sana de los ratones WT. Mientras que CC-3 disminuyó marcadamente en los ratones APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta estándar, se observó un aumento sorprendente en los grupos con manipulaciones dietéticas.

#### Descripción detallada

De acuerdo con el estado de la materia descrito con anterioridad, y considerando los efectos secundarios potenciales experimentados con los agonistas no selectivos de los receptores de estrógeno, los compuestos orales objeto de la presente invención incluyen, al menos, un fitoestrógeno agonista selectivo para el receptor de estrógeno beta (ERβ), o mezclas de tales fitoestrógenos, respaldados por una amplia utilización que sostiene su claro perfil de seguridad y efectividad.

Para el propósito de la presente invención, los fitoestrógenos preferibles se seleccionan a partir de un grupo que incluye flavolignanicos, es decir, silimarina, silibinina, isosilibinina, silidianina, silicristina, la isoflavona genisteína, el flavonoide resveratrol, coumestrol y mezclas de los mismos. El fitoestrógeno o los fitoestrógenos que componen la mezcla pueden estar presentes en el compuesto tanto en su forma purificada como en forma de extracto de planta. Más preferiblemente, el fitoestrógeno es silimarina, tal cual o como extracto de la leche del cardo, lo más preferible, que sea el extracto de la leche del cardo que incluye una mezcla de flavolignanicos, silimarina, silibinina, isosilibinina, silidianina y silicristina.

Se sabe que la silimarina, una mezcla estandarizada de flavolignanicos extraídos de la leche de los frutos del cardo, utilizada ampliamente en la medicina tradicional como hepatoprotectora, posee un perfil documentado de seguridad y tolerabilidad, así como se han descrito propiedades de la misma como agonista selectivo de ERβ, sin ninguna actividad relevante sobre ERα (Seidlova-Wuttke D et al. *Sylimarin is a selective estrogen receptor β (ERβ) agonist and has estrogenic effect in the metaphysis of the femur but no or antiestrogenic effects in the uterus of ovariectomized (ovx) rats.* J Steroid Biochem Mol Biol 2003, 86: 179-188).

La "silimarina" es la denominación común utilizada para un extracto de planta que contiene una mezcla de flavolignanicos: silimarina, silibinina, isosilibinina, silidianina y silicristina en concentraciones y proporciones variables. En los compuestos objeto de la presente invención, "silimarina" significa una mezcla de flavolignanicos que componen el extracto, en diferentes concentraciones y proporciones, en particular, en referencia a un extracto de la leche del cardo con un perfil analítico caracterizado por un contenido de silimarina mayor al 70% y un contenido de silibinina A+B mayor al 30%. En general, los componentes adicionales a/o los sustitutos de la silimarina en los compuestos objeto de la presente invención son otros fitoestrógenos, proporcionados de manera que son selectivos para el ERβ y que tienen una actividad antiestrogénica que no induce una actividad proliferativa significativa en los tejidos que son dianas clásicas de los estrógenos, tales como los fitoestrógenos mencionados con anterioridad, en concentraciones similares a las de la silimarina.

El otro componente esencial de los compuestos para la administración oral de la presente invención es una fibra insoluble e indigerible, es decir, resistente a la digestión enzimática en el tracto gastrointestinal. La fibra insoluble puede presentarse en una forma purificada o como componente de un extracto natural, proporcionada de tal manera que, en los compuestos, el contenido de fibra insoluble es de entre el 1% y el 30%. Tal fibra se selecciona a partir de fibras de plantas con una naturaleza polisacárida distinta al almidón, y de entre estas fibras, preferiblemente fibras que se seleccionan a partir del grupo que incluye lignina polifenilpropanoide (llamada lignina en adelante), celulosa, inulina e inulina de cadena larga y mezclas de las mismas. Se da preferencia particular a la lignina. La fibra insoluble puede estar presente en forma de componente purificado así

como en forma de componente de un extracto. En el último caso, las fibras insolubles mencionadas con anterioridad pueden estar presentes como una mezcla y asociadas con otras sustancias nutricionales. En particular, las fibras pueden utilizarse en los compuestos de la invención de la siguiente manera: en el caso de la lignina, tal cual en la forma polidispersa o como salvado de trigo; en el caso de la celulosa, tal cual o como extracto de soja; en el caso de la inulina, se prefiere la inulina de cadena larga, con un grado de polimerización de 10-65 y una longitud media de la cadena de 25, tal cual o como extracto de la alcachofa, extracto de achicoria o polvo de raíz Dandelion.

Las fibras presentes en los compuestos orales objeto de la presente invención no han de considerarse complementos de la dieta sino que son independientes de la ingesta total de fibra alimentaria.

Las composiciones de acuerdo con las invenciones han mostrado propiedades biológicas inesperadas, ya que dichos compuestos, caracterizados sustancialmente por la asociación de, al menos, un fitoestrógeno agonista selectivo del receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ), o mezclas de los mismos, y al menos una fibra alimentaria insoluble seleccionada a partir de fibras que tienen una naturaleza polisacárida distinta al almidón, o mezclas de las mismas, han demostrado tener un efecto sinérgico sobre los parámetros utilizados para la validación experimental necesaria de su utilidad.

De hecho, la fibra alimentaria insoluble (en particular, la lignina) demostró ser activa en el mantenimiento de la expresión proteica de ER $\beta$ , evidencia desconocida hasta la fecha, y demostró ser sinérgica junto al fitoestrógeno silimarina para mantener significativamente bajo control algunos parámetros que son marcadores de la proliferación y la progresión neoplásica, tales como, por ejemplo, el volumen y el grado de displasia de los pólipos adenomatosos.

Además, se han observado efectos sinérgicos similares e inesperados entre los fitoestrógenos y las fibras en otros parámetros biológicos relevantes, tales como la restauración de la actividad proapoptótica sobre la mucosa adenomatosa, e incluso de manera más interesante, sobre la mucosa no adenomatosa, a niveles comparables con los que se observan en la mucosa intestinal sana. La proporción desequilibrada de proliferación/apoptosis observada en la mucosa intestinal no adenomatosa de los ratones APC<sup>Min/+</sup> alimentados con una dieta estándar – un modelo experimental validado para la evaluación de tanto los mecanismos patobiológicos como la eficacia de las intervenciones farmacéuticas y/o nutracéuticas con relevancia clínica humana – puede explicar la recurrencia clínicamente documentada de los pólipos en los pacientes que entraron en el programa de cribaje colonoscópico, a causa de la detección previa de pólipos y la realización de polipectomía; y se considera de alto riesgo para el desarrollo y progresión de CRC.

Los resultados obtenidos y mencionados anteriormente en el resumen respaldan ampliamente la utilización prevista de los compuestos objeto de la presente invención. En particular, en mamíferos, humanos o no humanos, un compuesto para la administración oral de acuerdo con la invención puede inducir la expresión del receptor de estrógeno beta, directamente sobre la mucosa intestinal mucosa, cuando tal receptor se expresa pobremente o está ausente a causa de la presencia de lesiones precancerosas en la mucosa colónica, debido a una mutación en el gen supresor de tumores APC, tal como en la adenopoliposis familiar (PAF) o la esporádica.

Además, los compuestos orales de acuerdo con la presente invención podrían ser un sistema útil para dirigir preferentemente la liberación de los fitoestrógenos hacia el área intestinal afectada por el desarrollo de pólipos, y este área es el intestino delgado en modelos experimentales con ratones y el colon en humanos, donde las fibras insolubles se digieren parcialmente. Las fibras insolubles contenidas en Las composiciones de acuerdo con la presente invención, y en particular la lignina, actúan como protectores en el tracto gastrointestinal superior, donde, por otra parte, se absorben los fitoestrógenos preferiblemente. Además, este efecto protector permite un contacto prolongado de los fitoestrógenos contenidos en Las composiciones de acuerdo con esta invención sobre la mucosa intestinal y sobre los colonocitos. Como prueba de concepto, mientras que la fibra insoluble, y particularmente la lignina, era de por sí inefectiva en la lucha contra la neoplasia intestinal, tal y como se evaluó mediante el número de pólipos desarrollados y su volumen, Las composiciones de acuerdo con la invención, y particularmente la combinación de silimarina a la dosis efectiva más baja y de lignina, determinaron una reducción máxima en el número de pólipos y su volumen en comparación con lo que se obtiene mediante la adición de la dieta estándar con silimarina a la dosis efectiva más elevada.

Las composiciones de acuerdo con la invención pueden por lo tanto emplearse de forma útil, ya sea como productos farmacéuticos o nutracéuticos, en el tratamiento de pacientes afectados por adenomas colónicos, diagnosticados mediante un examen colonoscópico, con el objetivo de reducir el número y el volumen de los pólipos, o en la prevención de su progresión hacia adenomas avanzados y, posiblemente, hacia el adenocarcinoma. Las composiciones de acuerdo con la invención también pueden emplearse para prevenir o reducir el desarrollo de nuevos pólipos y para prevenir su progresión hacia una forma avanzada, y posiblemente, hacia el adenocarcinoma, en pacientes polipectomizados que actualmente siguen un programa de cribaje por colonoscopia, en el periodo entre las colonoscopias de cribaje programadas. Los compuestos para la administración oral de la presente invención pueden estar tanto en forma líquida como sólida. Independientemente del tipo de fitoestrógenos utilizado y de la forma de estos (es decir, en forma purificada o

como extracto), los fitoestrógenos y las mezclas de estos están contenidos entre un 0,1% y un 10% del peso en dichos compuestos, más preferiblemente entre un 0,5% y un 5%, y lo más preferible entre un 1% y un 2%.

5 De hecho, cuando el fitoestrógeno es la silimarina, tales compuestos orales sólidos y líquidos preferiblemente contienen entre un 0,1% y un 10% del peso, más preferiblemente entre un 0,5% y un 5%, y lo más preferible entre un 1% y un 2% de silimarina, independientemente del extracto de la misma utilizado.

10 En el caso de utilizar la genisteína como fitoestrógeno, los compuestos sólidos y líquidos de la presente invención preferiblemente contienen entre un 0,1% y un 10% del peso en dichos compuestos, más preferiblemente entre un 0,5% y un 5%, y lo más preferible entre un 1% y un 2% de genisteína, independientemente del extracto de la misma utilizado.

15 Las composiciones sólidas y líquidas de la presente invención preferiblemente contienen entre un 0,1% y un 10% del peso, más preferiblemente entre un 0,5% y un 5%, y lo más preferible entre un 1% y un 2% de coumestrol, independientemente del extracto utilizado.

20 Las composiciones sólidas y líquidas de la presente invención preferiblemente contienen entre un 0,1% y un 10% del peso, más preferiblemente entre un 0,5% y un 5%, y lo más preferible entre un 1% y un 2% de fitoestrógenos mezclados, independientemente del extracto utilizado.

25 Con relación al componente de fibra insoluble, las composiciones sólidas de la presente invención, preferiblemente, contienen entre un 1% y un 30% del peso, más preferiblemente entre un 5% y un 25%, y lo más preferible entre un 10% y un 20% de fibra alimentaria indigerible, independientemente del tipo de extracto utilizado (es decir, purificado o tal cual).

30 Preferiblemente, las composiciones líquidas de la presente invención contienen entre un 1% y un 20%, más preferiblemente entre un 2% y un 15%, y lo más preferible entre un 5% y un 10% de fibra alimentaria indigerible e insoluble, independientemente del tipo de extracto utilizado (es decir, purificado o tal cual).

35 Las composiciones sólidas pueden estar en forma de polvo, polvo efervescente o tabletas masticables. Las formas en polvo pueden estar, a su vez, en paquetes de dosis múltiples (botellas, recipientes, jarras) y de dosis únicas (sobres). Las formas líquidas pueden estar en forma de jarabes, soluciones, suspensiones o dispersiones acuosas. En tales formulaciones, los compuestos pueden incluir de forma adicional excipientes, disolventes, conservantes, aromatizantes, agentes espumantes, agentes correctores del pH, etc de tipo farmacéutico o de grado alimentario, en relación a la forma escogida, apropiada para la administración oral.

40 Además, las composiciones de la presente invención pueden incluir de forma adicional probióticos, tal como, por ejemplo, lactobacilos y/o bifidobacterias, ya sea vivos o tinalizados, con el propósito de contribuir a la normalización de la microflora intestinal y a la fermentación intestinal de la fibra, ya que se sabe que estos efectos contribuyen a la formación de microambientes sanos en este distrito anatómico. Los probióticos se añaden como adyuvantes para mantener o equilibrar la fisiología intestinal y para ayudar a la metabolización de la fibra indigerible e insoluble.

45 Las composiciones de acuerdo con la presente invención se muestran en los ejemplos de trabajo 1-10. Los ejemplos de trabajo 1-7 hacen referencia a formulaciones sólidas, y los ejemplos de trabajo 8-10 a formulaciones líquidas. A menos que se especifique lo contrario, las proporciones de los componentes que incluyen los compuestos en los ejemplos de trabajo representan los porcentajes del peso de los componentes respectivos con relación al producto final. Los siguientes ejemplos describen y demuestran adicionalmente las realizaciones de la presente invención. Los ejemplos se aportan con el único fin de ilustrar, y no tienen la intención de limitar el ámbito de la presente invención, ya que se permiten algunas variaciones de la presente invención sin desviarse del espíritu y el ámbito de la invención.

55 Formulaciones sólidas

Ejemplo 1: polvo efervescente

Componente	Cantidad %
Silimarina de HLPC al 70% del extracto seco de la leche del cardo	2,00
Correspondiente a la silimarina	1,40
Lignina	20,00
Maltodextrinas	70,90
Citrato de sodio	4,50

## ES 2 387 530 T3

Citrato de potasio	0,50
Ácido cítrico	1,00
Dióxido de silicona	0,10
Aromatizante	1,00

Ejemplo 2: polvo efervescente

Componente	Cantidad %
Silimarina de HLPC al 70% del extracto seco de la leche del cardo	2,00
Correspondiente a la silimarina	1,40
Fibra de oligosacáridos (inulina)	20,00
Maltodextrinas	70,90
Citrato de sodio	4,50
Citrato de potasio	0,50
Ácido cítrico	1,00
Dióxido de silicona	0,10
Aromatizante	1,00

5

Ejemplo 3: polvo efervescente

Componente	Cantidad %
Silimarina de HLPC al 70% del extracto seco de la leche del cardo	2,00
Correspondiente a la silimarina	1,40
Lignina o inulina de cadena larga	20,00
<i>Lactobacillus Acidophilu</i> , tindalizado	Equivalente a 10 MLD
Maltodextrinas	71,90
Bicarbonato de sodio	2,60
Ácido tartárico	1,40
Dióxido de silicona	0,10
Aromatizante	2,00

10 Ejemplo 4: polvo dispersable en agua

Componente	Cantidad %
Silimarina	1,40
Polvo de raíz Dandelion	35,00
Maltodextrinas	61,50
Dióxido de silicona	0,10
Aromatizante	2,00

Ejemplo 5: polvo efervescente

Componente	Cantidad %
Silimarina de HLPC al 70% del extracto seco de la leche del cardo	1,00
Correspondiente a la silimarina	0,70

## ES 2 387 530 T3

Genisteína	0,70
Fibra alimentaria o de oligosacáridos (inulina)	20,00
Maltodextrinas	70,90
Citrato de sodio	4,50
Citrato de potasio	0,50
Ácido cítrico	1,00
Dióxido de silicona	0,10
Aromatizante	1,00

Ejemplo 6: polvo efervescente

Componente	Cantidad %
Coumestrol de HLPC al 10% del extracto seco de AlfaAlfa	7,00
Correspondiente al coumestrol	0,70
Salvado de trigo	30,00
Maltodextrinas	55,90
Citrato de sodio	4,50
Citrato de potasio	0,50
Ácido cítrico	1,00
Dióxido de silicona	0,10
Aromatizante	1,00

5 Ejemplo 7: polvo dispersable en agua

Componente	Cantidad %
Silimarina	0,70
Genisteína	0,70
Polvo de raíz Dandelion	35,00
Maltodextrinas	61,50
Dióxido de silicona	0,10

Formulaciones líquidas

10 Ejemplo 8: jarabe

	Cantidad en 100 ml
Componente	Gramos
Silimarina	0,90
Lignina, celulosa o inulina	10,00
Sorbato de potasio	0,10
Ácido ascórbico	0,50
Ácido cítrico anhidro	0,05
Fructosa	35,00
Aromatizante	0,35
Agua	Q.S.

Ejemplo 9: jarabe

	Cantidad en 100 ml
Componente	Gramos
Silimarina	0,45
Genisteína	0,45
Lignina, celulosa o inulina	10,00
Sorbato de potasio	0,10
Ácido ascórbico	0,50
Ácido cítrico anhidro	0,05
Fructosa	35,00
Aromatizante	0,35
Agua	Q.S.

5

Ejemplo 10: jarabe

	Cantidad en 100 ml
Componente	Gramos
Silimarina de HLPC al 70% del extracto seco de la leche del cardo	1,38
Correspondiente a la silimarina	0,90
Polvo de raíz Dandelion	20,00
Sorbato de potasio	0,10
Benzoato de sodio	1,0
Ácido ascórbico	0,5
Ácido cítrico	0,15
Sorbitol	20,00
Sacarina	0,013
Aromatizante	0,20
Agua purificada	Q.S.

Parte experimental

10 El ratón transgénico C57BL/6J APC<sup>Min/+</sup> es un modelo animal experimental excelente para la PAF, ya que el gen mutado APC es homólogo al humano. Incluso en las formas más comunes del CRC, es decir, las esporádicas, el 85% de los casos muestran la mutación somática del gen supresor de tumores APC. Por consiguiente, se reconoció el modelo animal transgénico con el gen APC mutado como el más significativo para el estudio de los mecanismos patogenéticos que caracterizan la poliposis adenomatosa en el colon, tanto en la forma PAF como en la esporádica, y se considera un modelo animal validado para la configuración de intervenciones nutricionales y farmacológicas dirigidas a controlar el desarrollo de adenomas y a prevenir su progresión hacia CRC (Levy DB et al. Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors. Cancer Res 1994, 54: 5953-5958; Paulsen JE et al. Qualitative and quantitative relationship between dysplastic aberrant crypt foci and tumorigenesis in the Min/+ mouse colon). Por esta razón, los inventores utilizaron el modelo de ratón transgénico C57BL/6J APC<sup>Min/+</sup> mencionado con anterioridad para la preparación de las formulaciones orales objeto de la presente invención, y para la evaluación de su seguridad y eficacia. A continuación, se describen los datos que muestran el efecto en ratones transgénicos C57BL/6J - APC<sup>Min/+</sup>, a los que se administró silimarina por vía oral en adición a las dietas, que contienen fibras solubles e insolubles en diferentes proporciones, con el propósito de destacar las propiedades diferenciales de la fibra insoluble e indigerible.

25 Las tres dietas bajo estudio, formuladas con el propósito de mimetizar un régimen dietético rico en grasas, eran de la siguiente manera:

- Dieta 5K20 [Mucedola Srl, Settimo Milanese (MI)], que contiene un 4,50% de fibra total, compuesta por fibras solubles e insolubles;
- Dieta purificada que contiene un 6,24% de fibra insoluble, constituida por lignina;
- Dieta purificada que contiene un 6,24% de fibra soluble, constituida por cáscara de Plantago ovata.

5

Se añadió silimarina, hasta 200 mg/kg, a cada dieta. Las dietas se administraron por vía oral durante 10 semanas a 114 ratones macho transgénicos C57BL/6J - APC<sup>Min/+</sup> de 5-6 semanas de edad. Estos ratones tienen una mutación en el gen APC y son propensos a desarrollar poliposis adenomatosa. El objetivo del estudio era verificar la capacidad del compuesto de acuerdo con la presente invención para reducir significativamente el desarrollo de pólipos y para prevenir la progresión hacia formas displásicas severas, que son marcadores de transformación neoplásica, en un modelo animal reconocidamente comparable a la situación patológica humana. El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante el análisis simple de la varianza y las pruebas de t-Student, considerando como estadísticamente significativa una p<0.05.

10

15

Los animales se dividieron en 14 grupos, tal y como se describe en la tabla 1. Cada tratamiento oral duró 10 semanas. El esquema de tratamiento se diseñó con el fin de destacar los efectos del tipo de fibra, asociada o no a cantidades crecientes de silimarina. Como control positivo se utilizó un grupo de ratones transgénicos alimentados con una dieta estándar (5K20, Mucedola) y a los que se implantó subcutáneamente un botón que contiene 1,5 mg de 17β-estradiol (estrógeno).

20

Tabla 1. Número de animales por grupo (sil= silimarina, ppm=partes por millón)

	Dieta estándar	Dieta con cáscara de Plantago ovata	Dieta con lignina
+ sil 0 ppm	15	10	10
+ sil 10 ppm	6	6	6
+ sil 50 ppm	6	6	6
+ sil 200 ppm	15	6	6
+ sil 600 ppm	7		
+ estrógeno (s.c., control)	9		

25

No se describió ninguna diferencia en la ingesta dietética diaria (aproximadamente 30,1 g/día) entre los animales de los diferentes grupos. Durante el periodo de tratamiento, la tasa de mortalidad fue baja en los grupos alimentados con la dieta estándar o con la dieta complementada con los compuestos descritos en esta solicitud de patente (7,1%), mientras que la mortalidad fue muy alta (>50%) en los grupos alimentados con dieta complementada con cáscara de Plantago ovata.

30

La tabla 2 enumera las medias y las derivaciones estándar del peso de los animales de los diferentes grupos dietéticos en el momento del sacrificio. En el ingreso a la casa de animales su peso medio era de 19 +/- 1,2 g.

Tabla 2. Media y derivación estándar de los pesos corporales en el momento del sacrificio.

	Dieta estándar	Dieta con lignina
+ sil 0 ppm	22,0 +/- 3,8 g	25,0 +/- 1,9 g
+ sil 10 ppm	26,0 +/- 1,9 g	25,2 +/- 2,3 g
+ sil 50 ppm	24,6 +/- 3,3 g	26,9 +/- 2,1 g
+ sil 200 ppm	23,5 +/- 2,6 g	27,9 +/- 1,7 g
+ sil 600 ppm	24,3 +/- 2,4 g	-
+ estrógeno (s.c., control)	24,9 +/- 2,8 g	

35

A diferencia de los grupos de animales alimentados con la dieta que contiene fibra soluble de cáscara de P. ovata, en los que se observó una tasa de mortalidad alta y una no reducción en el número de pólipos, la asociación de silimarina y lignina, que constituye uno de Las composiciones de acuerdo con la presente invención, demostró que es segura y que se tolera bien, y resultó altamente efectiva en el mantenimiento de un número, volumen y grado de displasia bajos de los pólipos adenomatosos en el modelo animal de ratón transgénico C57BL/6J - APC<sup>Min/+</sup>. Además, la fibra alimentaria insoluble (en este caso, lignina) demostró que es

40

activa en el mantenimiento de la expresión proteica de ER $\beta$ , evidencia desconocida hasta la fecha, y demostró que es sinérgica junto a la silimarina para mantener significativamente bajo control los parámetros que son marcadores de la proliferación y la progresión neoplásica, tal como por ejemplo, el volumen y el grado de displasia de los pólipos adenomatosos.

5

Tras 10 semanas de tratamiento, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 0,75 mg de Bromodesoxiuridina (BrdU), equivalente a 30 mg/kg, para verificar la migración de la células de la mucosa intestinal a lo largo de eje veloso (desde la cripta en el fondo de la papila luminal). Este parámetro permite la verificación de la fisiología exfoliativa normal de la mucosa intestinal, mediante la cual la mucosa se mantiene compuesta por células sanas y vitales.

10

Para este fin, los animales se sacrificaron 24, 48 y 72 horas después de la inyección. Se tomó intestino delgado y colon de cada animal sacrificado. El intestino delgado se dividió en tres secciones: proximal, medial y distal. El tracto proximal se dividió adicionalmente en dos porciones que se rasparon subsiguientemente. Una de estas dos se sumergió en RNAlater® y se almacenó a -20°C y la otra se almacenó en nitrógeno líquido. Las dos muestras se utilizaron para el análisis mediante PCR a tiempo real y Western Blot, respectivamente. Los tractos medial y distal, junto con el colon, se utilizaron para el análisis histológico. Después de un tratamiento de 3 horas de fijación con formol, se observaron los tractos intestinales bajo examen con un estereomicroscopio STM1 y un aumento de 3x. Dos observadores de tipo ciego midieron el número y el tamaño de los pólipos.

15

20

La tabla 3 enumera la media y la desviación estándar (DE) del número de pólipos observados en los animales alimentados con las diferentes dietas. Debe tenerse en cuenta que la adición de silimarina a 200 ppm a la dieta estándar reduce significativamente el número de pólipos ( $p=0,005$ ), a un nivel comparable con la reducción observada en los ratones transgénicos del grupo control que fueron tratados subcutáneamente con estradiol. La lignina sola es inefectiva sobre este parámetro, pero la asociación de lignina y silimarina, objeto de la presente invención, reduce significativamente el número de pólipos, a una dosis de silimarina (50 ppm) cuatro veces inferior a la que se requiere para obtener los mismos resultados que con la dieta estándar (200 ppm).

25

Tabla 3. Número de pólipos intestinales en animales alimentados con las diferentes dietas

30

	Dieta estándar	Dieta con Plantago	Dieta con lignina
+ sil 0 ppm	64,8 +/- 20,2	43,6 +/- 9,5	46,8 +/- 14,0
+ sil 10 ppm	44,0 +/- 21,8	46,4 +/- 23,8	43,8 +/- 19,0
+ sil 50 ppm	55,4 +/- 26,2	51,5 +/- 20,5	34,0 +/- 10,7*
+ sil 200 ppm	57,2 +/- 9,0*	50,0 +/- 4,7	48,5 +/- 2,5
+ sil 600 ppm	52,6 +/- 24,6		
Estrógeno (control)	32,33 +/- 12,06*		

La tabla 4 enumera el contenido de silimarina (expresado como  $\mu\text{g/g}$  de silibinina en el tejido, determinado mediante HPLC) en el tracto duodenal, donde se sabe que se absorbe preferentemente la silimarina, y en el íleon después de siete días de la administración e 200 ppm de silimarina a ratones C57BL/6J ( $n=6$ ), o un compuesto que contiene 200 ppm de silimarina y una fibra polisacárida distinta al almidón (lignina) como complemento a la dieta estándar. La asociación de silimarina y una fibra insoluble causó un transporte preferencial de fitoestrógenos en la región ileal, que es el área intestinal donde se desarrollan típicamente los pólipos en el ratón transgénico. Además, se sabe que tal condición mimetiza el desarrollo de adenopoliposis en el colon humano. Por consiguiente, los compuestos objeto de la presente invención pueden ser un sistema efectivo para el tratamiento espacial del área afectada por las formaciones adenomatosas.

35

40

Tabla 4. Media y derivación estándar de la concentración tisular de silimarina en intestino de ratón

	Duodeno ( $\mu\text{g/g}$ )	Íleon ( $\mu\text{g/g}$ )
Silimarina 200 ppm, 7 días	6,54 +/- 2,34	2,84 +/- 2,03
Silimarina 200 ppm + Lignina, 7 días	2,47 +/- 2,38	3,13 +/- 2,71

45

La tabla 5 enumera la media y la derivación estándar (SD) del volumen de los pólipos intestinales. Asumiendo que la forma de los pólipos es esférica, se puede calcular su volumen, expresado en  $\text{mm}^3$ , mediante la medición

de su diámetro. Sorprendentemente, la lignina sola es capaz de reducir el volumen de los pólipos ( $p=0,0001$ ). La asociación de silimarina y lignina es capaz de reducir significativamente el volumen de los pólipos ( $p=0,0001$ ). Además, la asociación es sinérgica para ambos componentes, tal y como se sugiere por el hecho de que, con la utilización de dosis menores de fitoestrógeno, se observa el mismo efecto que con dosis superiores de un sólo componente. Cabe destacar que el estradiol demostró ser inefectivo en este parámetro, probando que el compuesto objeto de la presente invención, que contiene un fitoestrógeno agonista selectivo de  $ER\beta$ , es efectivo en este parámetro.

Tabla 5. Comparación de volumen de los pólipos ( $mm^3 \pm SD$ ) en animales alimentados con las diferentes dietas

	Dieta estándar	Dieta con lignina
+ sil 0 ppm	242,1 $\pm$ 105,1	92,3 $\pm$ 81,8*
+ sil 10 ppm	145,0 $\pm$ 100,6	121,0 $\pm$ 72,6
+ sil 50 ppm	158,4 $\pm$ 60,3	99,0 $\pm$ 53,13*
+ sil 200 ppm	120,2 $\pm$ 69,0*	138,0 $\pm$ 63,3
+ sil 600 ppm	162,07 $\pm$ 89,35	
Estrógeno (control)	141,78 $\pm$ 79,1	

Las preparaciones histológicas de secciones de intestino escogidas al azar de todos los animales de los diferentes grupos de tratamiento fueron observadas por patólogos de tipo ciego, que clasificaron la displasia de las formaciones adenomatosas presentes como menor, moderada y grave. En los animales tratados con estradiol, el 70% mostró pólipos con displasia clasificable como grave, frente al 21,4% de animales alimentados con una dieta estándar complementada con 200 ppm de silimarina, el 30% en animales alimentados con una dieta con lignina, y el 20% en animales alimentados con una dieta con lignina complementada con 50 ppm de silimarina.

La tabla 6 enumera los resultados en relación a la HLC (célula marcada más alta) en los grupos experimentales. Los datos muestran que la tasa de migración celular, y consecuentemente, la tasa de exfoliación de enterocitos en la luz intestinal, está aumentada significativamente en el grupo tratado con lignina y silimarina (incluso a dosis bajas).

Tabla 6. Porcentaje de migración de los colonocitos desde la cripta al ápice de la vellosidad en animales transgénicos de los diferentes grupos

	Migración en 24 horas (%)
Dieta estándar	28 $\pm$ 2,6
+ estrógeno	47,3 $\pm$ 10,5*
+ sil 200 ppm	46,6 $\pm$ 7,0*
+ lignina	35 $\pm$ 13,8
+ (lignina + sil 50 ppm)	44,4 $\pm$ 11,8*

Con respecto al mecanismo de acción de la asociación de silimarina y lignina, los datos demuestran por primera vez una potenciación de la expresión de  $ER\beta$  en la mucosa intestinal. Los resultados de la PCR a tiempo real se muestran en la figura 1. Los niveles de expresión del RNA mensajero de  $ER\beta$  y  $ER\alpha$  se describen como una tasa promedio entre la densidad óptica del mensajero de cada receptor y del rRNA de 18S, relacionado con la  $\beta$ -actina, una proteína estructural que no se modifica en las condiciones experimentales del estudio.

Los resultados muestran un aumento significativo del mRNA de  $ER\beta$  en el grupo de silimarina a 200 ppm ( $p=0,03$ ) respecto al grupo alimentado con una dieta estándar.

De manera sorprendente, los inventores demostraron por primera vez que el mRNA de  $ER\alpha$  disminuye significativamente en el grupo tratado con la fibra insoluble ( $p=0,04$ ); la reducción es más pronunciada en el grupo al que se administró la composición que contiene la asociación silimarina-lignina ( $p=0,04$ ). En comparación con el grupo tratado subcutáneamente con estrógenos (activos tanto en  $ER\beta$  como en  $ER\alpha$ ), los datos confirman que la silimarina es un ligando selectivo para  $ER\beta$  y demuestran que la asociación de silimarina (incluso a dosis

bajas) y lignina – ésta última es sorprendentemente activa en la reducción de la expresión de ER $\alpha$ , que se sabe que ejerce propiedades proliferativas – facilita adicionalmente el restablecimiento de la proporción entre los dos receptores de estrógeno en favor de la actividad antiproliferativa, tal y como se muestra en la figura 2 y se demostró en los datos de las tablas 3-6.

5

La figura 3 muestra el nivel de expresión intestinal de los receptores de estrógeno en forma de proporción entre las proteínas ER $\beta$  y ER $\alpha$ , determinado mediante la utilización del método Western Blot. En comparación con el grupo de animales alimentados solamente con la dieta estándar, se observó un aumento de ER $\beta$  en forma de proteína en comparación con la proteína ER $\alpha$ , y este aumento es más marcado en el grupo tratado subcutáneamente con 17 $\beta$ -estradiol, confirmando así la hipótesis del rol protector de los estrógenos; en el grupo tratado con silimarina, confirmando así sus propiedades como fitoestrógeno selectivo para ER $\beta$ ; y, sorprendentemente, en ambos grupos tratados con lignina y con lignina + silimarina, incluso a dosis bajas.

10

15

Se recopilaron experimentos adicionales con el fin de proporcionar evidencias de: A) la alteración de la actividad proliferativa y apoptótica incluso en la mucosa no adenomatosa de animales APC<sup>Min/+</sup>, en comparación con la mucosa intestinal de tipo salvaje (WT) singénica C57BL/6J, sin mutación en APC (considerada normal y sana), donde ambos grupos fueron alimentados con la dieta estándar; B) la capacidad de los compuestos orales objeto de la presente invención de restablecer la expresión de ER $\beta$ , la actividad proliferativa y la actividad apoptótica en ratones APC<sup>Min/+</sup>, a niveles comparables con los que se observan en la mucosa normal de los animales WT alimentados con la dieta estándar. Por consiguiente, estas pruebas respaldan de forma adicional la utilización de tales compuestos orales como un complemento útil del programa de cribaje colonoscópico en pacientes previamente polipectomizados, con un riesgo aumentado de desarrollar nuevos pólipos (recurrencia). La figura 4 (A, B) muestra la proporción entre los mRNA de ER $\beta$  y ER $\alpha$  y el nivel de expresión de ambos receptores como proteínas, en la mucosa no adenomatosa de WT y APC<sup>Min/+</sup> controles alimentados con la dieta estándar, o APC<sup>Min/+</sup> alimentados con diferentes dietas. La figura 5 (A-D) demuestra que: i) la mucosa no adenomatosa de los ratones APC<sup>Min/+</sup> alimentados con la dieta estándar ha perdido el control proapoptótico sobre la proliferación celular cuando se compara con los ratones WT alimentados con la dieta estándar, tal y como se detecta con los marcadores de la apoptosis, como el número reducido de células positivas en el ensayo TUNEL y la expresión de la proteína caspasa 3 escindida, ii) los compuestos orales objeto de la presente invención, con referencia particular a la asociación de silimarina y lignina, restablecen el control apoptótico sobre la proliferación celular a niveles similares a los observados en la mucosa intestinal normal y sana de ratones WT.

20

25

30

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que incluye, al menos, un fitoestrógeno agonista selectivo del receptor de estrógeno beta y, al menos, una fibra insoluble e indigerible o una mezcla de éstas, seleccionadas de un grupo que incluye polisacáridos distintos al almidón, para su utilización en el tratamiento profiláctico o terapéutico local de condiciones patológicas de la mucosa intestinal, seleccionadas de un grupo que incluye la adenopoliposis y su progresión hacia los adenomas avanzados y el adenocarcinoma, mediante la administración oral.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde los fitoestrógenos, en forma purificada o de extractos, se seleccionan del grupo que incluye la silimarina, la silibinina, la isosilibinina, la silidianina, la silicristina, la genisteína, el resveratrol, el coumestrol y las mezclas de estas.
- 15 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde el fitoestrógeno es la silimarina del extracto de la leche del cardo, que consiste en una mezcla de silimarina, silibinina, isosilibinina, silidianina, silicristina.
- 20 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde las fibras insolubles e indigeribles, en forma purificada o de extractos, se seleccionan del grupo que incluye lignina, celulosa, inulina, inulina de cadena larga y las mezclas de las mismas.
- 25 5. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 2-4, donde el fitoestrógeno es la silimarina y la fibra insoluble e indigerible es la lignina.
- 30 6. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, donde los fitoestrógenos se encuentran en un rango que va del 0,1 al 10 % del peso total de dicho compuesto.
- 35 7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, donde los fitoestrógenos se encuentran en un rango que va del 0,5 al 5% del peso total de dicho compuesto.
- 40 8. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, donde los fitoestrógenos se encuentran en un rango que va del 1 al 2% del peso total de dicho compuesto.
- 45 9. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, donde las fibras insolubles e indigeribles se encuentran en un rango que va del 1 al 30% del peso total de dicho compuesto.
- 50 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, donde las fibras se encuentran en un rango que va del 5 al 25% en formulaciones sólidas.
- 55 11. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, donde las fibras se encuentran en un rango que va del 10 al 20% en las formas sólidas.
- 60 12. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, donde las fibras se encuentran en un rango que va del 2 al 15% en las formas líquidas.
13. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, donde las fibras se encuentran en un rango que va del 5 al 10% en las formas líquidas.
14. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-13, donde además se añaden probióticos, vivos o tinalizados.
15. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-14, en combinación con excipientes farmacológicamente aceptables y/o diluyentes adecuados para las formas sólidas, seleccionadas del grupo que incluye polvos, polvos efervescentes, tabletas masticables y tabletas.
16. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-14, en combinación con excipientes de calidad alimentaria y/o diluyentes adecuados para las formas sólidas, seleccionadas del grupo que incluye polvos, polvos efervescentes, tabletas masticables y tabletas.
17. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-14, en combinación con excipientes farmacológicamente aceptables y/o diluyentes adecuados para las formas líquidas, seleccionadas del grupo que incluye jarabe, soluciones, suspensiones y dispersiones acuosas.

18. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-14, en combinación con excipientes de calidad alimentaria y/o diluyentes adecuados para las formas líquidas, seleccionadas del grupo que incluye jarabe, soluciones, suspensiones y dispersiones acuosas

5

19. La utilización de, al menos, un fitoestrógeno agonista selectivo del receptor de estrógeno beta y, al menos, una fibra insoluble e indigerible o una mezcla de éstas, seleccionadas de un grupo que incluye polisacáridos distintos al almidón, para la preparación de las composiciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el tratamiento profiláctico o terapéutico local de condiciones patológicas de la mucosa intestinal, seleccionadas de un grupo que incluye la adenopoliposis y su progresión hacia los adenomas avanzados y el adenocarcinoma, mediante la administración oral.

10

FIGURA 1

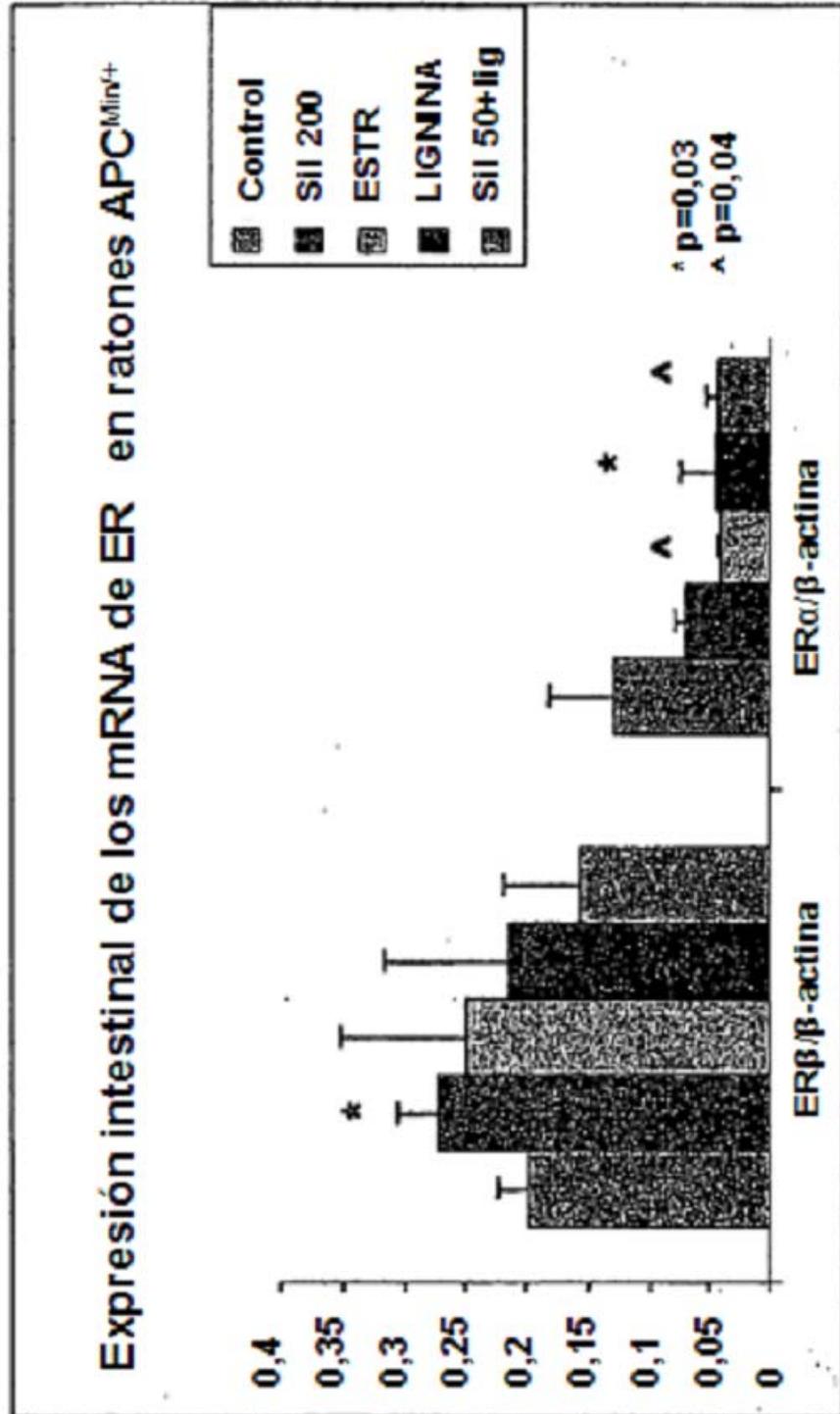


FIGURA 2

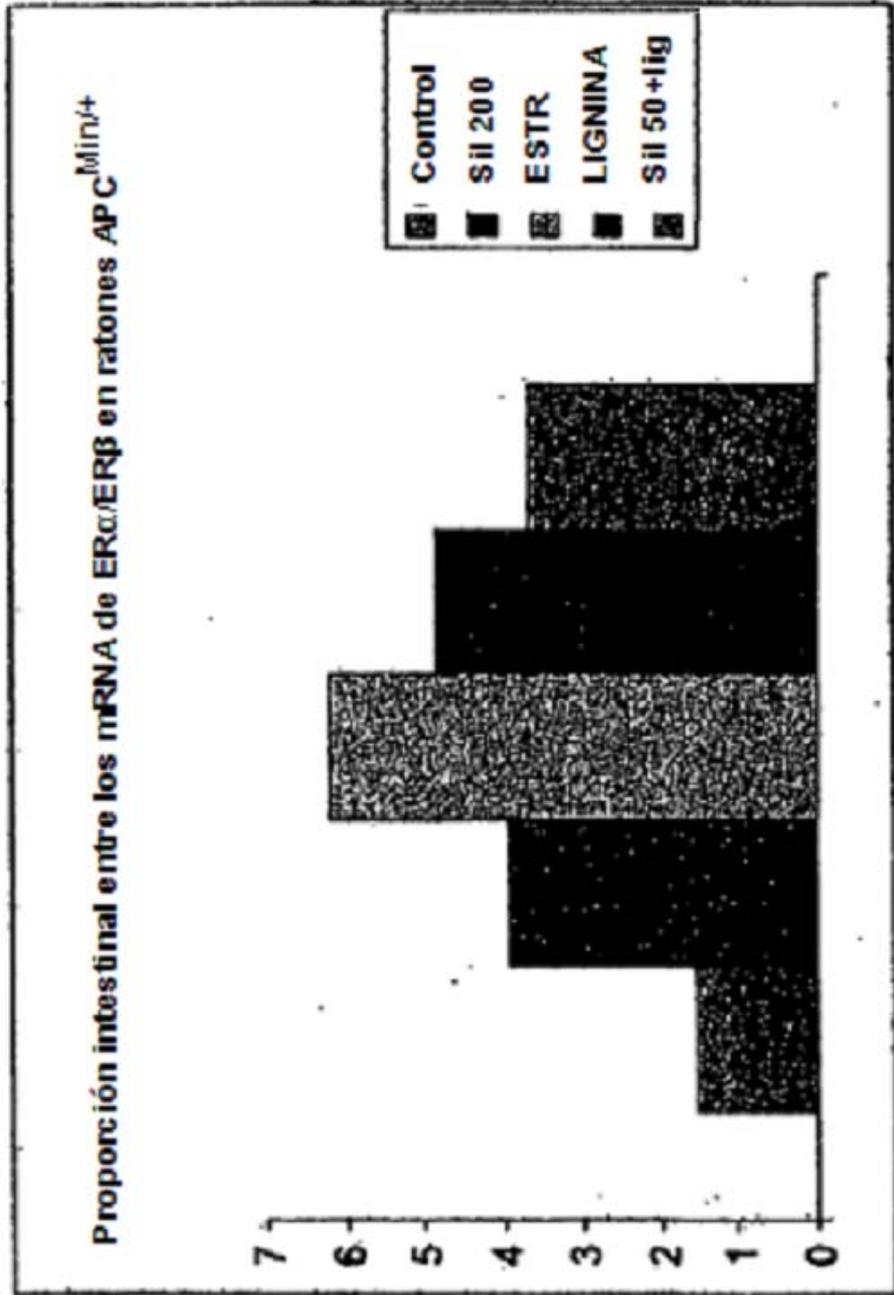


FIGURA 3

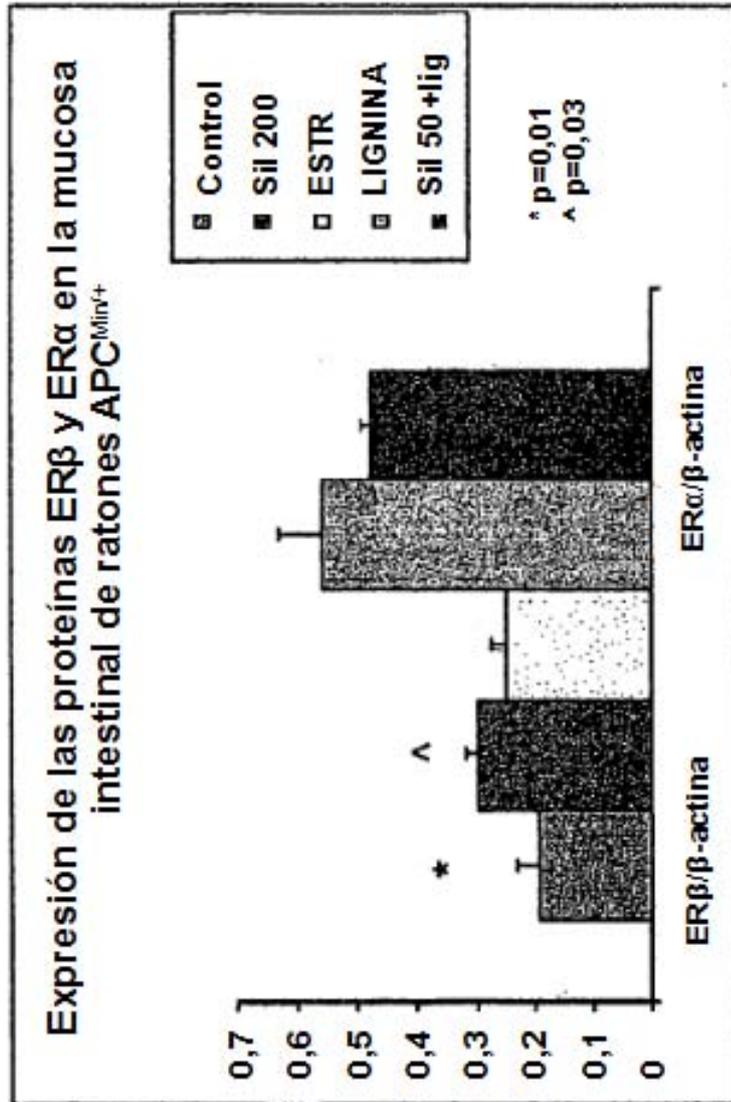


FIGURA 4

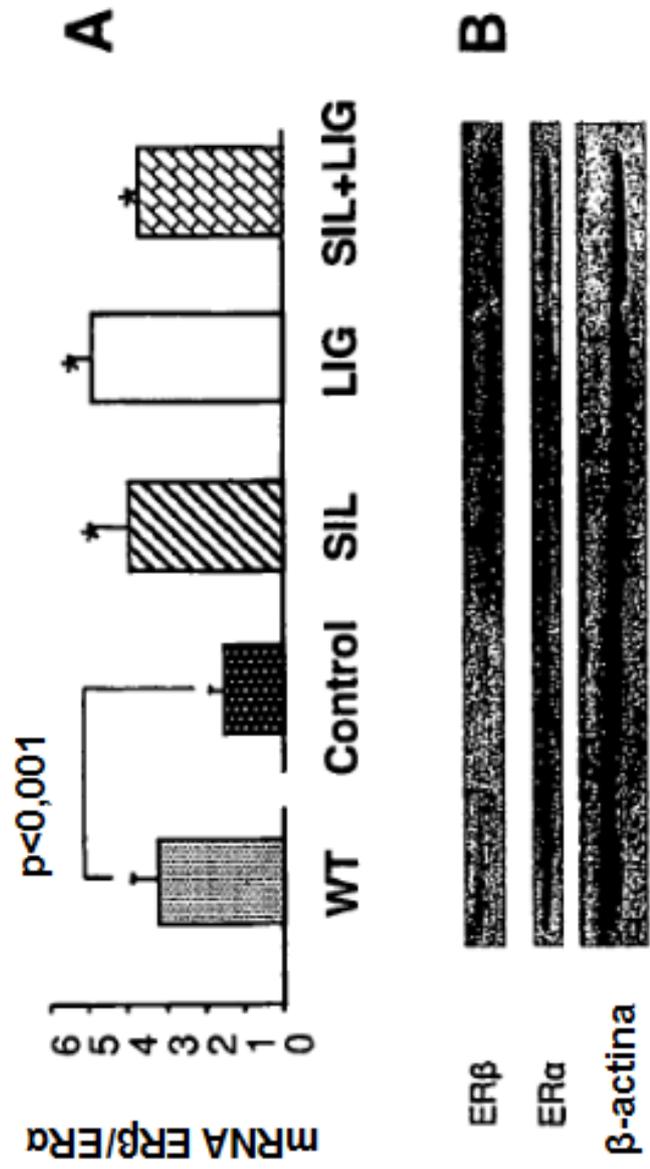


FIGURA 5

