

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 617**

51 Int. Cl.:
A61K 36/88 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08015015 .4**
96 Fecha de presentación: **10.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **2033652**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.03.2009**

54 Título: **Fibras de Musa spp. para tratar el cáncer de colon**

30 Prioridad:
10.02.2003 GB 0302872

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.11.2012

73 Titular/es:
PROVEXIS (IBD) LIMITED (100.0%)
Kings Road House 2 Kings Road Windsor
Berkshire SL4 2AG, GB

72 Inventor/es:
RHODES, JONATHAN

74 Agente/Representante:
LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 390 617 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

Fibras de *Musa* spp. para tratar el cáncer de colon

5 La presente invención se relaciona con el tratamiento de cáncer de colon y en particular el tratamiento de cáncer de colon con extractos solubles derivados de plantas comestibles.

10 IBD es un término usado para describir la inflamación crónica, idiopática del tracto gastrointestinal e incluye dos fenotipos principales: la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerativa (UC). La enfermedad de Crohn se caracteriza por la inflamación granulomatosa que afecta cualquier parte del tracto gastrointestinal pero en particular el área ileocecal. La colitis ulcerativa es específica del colon y se asocia con el daño epitelial extenso, abscesos de las criptas y abundantes neutrófilos en la mucosa. Los pacientes con UC extensa o enfermedad de Crohn colónica tienen un riesgo aumentado aproximadamente de diez veces de desarrollar cáncer colorrectal, lo que representa la causa principal de mortalidad asociada a IBD.

15 La etiología de IBD no se entiende bien todavía. Sin embargo, existe un consenso creciente basado tanto en estudios de pacientes como de modelos de colitis con animales transgénicos en que la inflamación intestinal resulta de una respuesta anormal a bacterias intestinales no patogénicas. Algunas de las evidencias más sorprendentes de la participación de bacterias en la patogénesis de IBD provienen de estudios que demuestran la presencia de *E. coli* en biopsias de la mucosa ileal tomadas de pacientes con enfermedad de Crohn. Estos organismos, a pesar de que carecen de marcadores convencionales de patogenicidad bacteriana, son capaces de invadir el revestimiento de células intestinales y vivir en los macrófagos sin inducir la apoptosis. Otros estudios, que usaron una sonda ribosomal 16S de amplia especificidad durante la hibridación in situ para detectar bacterias de todas las especies, encontraron tanto en UC como CD un aumento en las bacterias no identificadas en la capa de moco.

25 Dada la naturaleza debilitante de IBD, así como la mortalidad asociada a IBD, existe una necesidad de proporcionar tratamientos nuevos y mejorados para estas afecciones. Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones útiles en la prevención o tratamiento de IBD.

30 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para el uso en la prevención o tratamiento de cáncer de colon que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una fibra soluble derivable del fruto de la *Musa* spp.

35 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de la fibra soluble derivable del fruto de la *Musa* spp. para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento del cáncer de colon.

40 Por "fibra soluble" se entiende fibras capaces de disolverse en un medio acuoso (y opcionalmente también en la corriente sanguínea) que comprenden polisacáridos u oligosacáridos solubles de una fuente sin almidón. Las fibras de ese tipo son capaces de pasar a través del estómago y el intestino delgado al intestino grueso sin que se digieran sustancialmente. Las fibras pueden después actuar como un sustrato fermentable para las bacterias en el intestino grueso. Los diferentes tipos de fibra soluble se pueden derivar de fuentes alimenticias comunes tales como frutos, especialmente manzanas y naranjas; verduras; salvado de avena; cebada y legumbres. Las fibras solubles de diferentes fuentes contendrán cantidades diversas de polisacáridos tales como hemicelulosas o pectinas, así como cantidades diversas de derivados monosacáridos y oligosacáridos. Aunque la composición de fibra soluble es característica de la fuente vegetal, variará en respuesta a factores tales como cultivar, madurez y origen geográfico. Por el contrario, las fibras insolubles se encuentran en la pared celular de las plantas y confieren la estructura de la planta. Una fuente común de alimento de fibra insoluble es el salvado de trigo y frutos con cáscaras y semillas comestibles, tales como fresas. Las fibras insolubles ayudan a la digestión. En primer lugar actúan como agente de carga (lo que resulta en un tiempo de tránsito más corto y aumento de la masa fecal), y retienen el agua también mientras se mueven a través del tracto intestinal (ablandando las heces y ayudando por lo tanto a prevenir el estreñimiento).

50 Se apreciará que la fibra soluble de acuerdo con la presente invención puede estar en forma pura o, como alternativa, se puede mezclar también con otros compuestos (siempre que los compuestos no inhiban las propiedades anti-inflamatorias de la fibra de acuerdo con la invención). Como consecuencia, la presente invención incluye composiciones que comprenden cantidades eficaces de fibra soluble así como fibra insoluble.

Se prefiere que la fibra soluble usada de acuerdo con la invención sea no gelificante.

60 Aunque sin intención de estar atados por cualquier hipótesis, el inventor cree que las fibras solubles son útiles en el tratamiento y prevención de cáncer de colon basado en su conocimiento de este campo científico y al trabajo presentado en el Ejemplo 1.

65 El inventor reconoció que la IBD (por ejemplo, colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn) puede representar una respuesta alterada a la flora microbiana intestinal normal. En particular, él cree que existe una posibilidad de que al parecer las bacterias "inofensivas" no patogénicas pueden causar inflamación si penetran la capa de moco que recubre

el intestino y se asocian estrechamente con las células de revestimiento del intestino. Un paso crítico en la colonización bacteriana del intestino es la adherencia de la bacteria a la mucosa a través de la fimbria y/o proteínas de superficie conocidas como adhesinas. Estas proteínas actúan como lectinas que reconocen motivos glicosilo expresados por glicolípido o glicoproteína de la superficie de la célula huésped y juegan un papel clave en la patogenicidad bacteriana.

5 La glicosilación aberrante de las glicoproteínas de la mucosa se demostró en la enfermedad colónica, con anomalías similares que se encontraron en la colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y cáncer de colon. El inventor cree que puede existir un sub-grupo de bacterias con adhesinas específicas para las estructuras de carbohidrato que se expresan en la mucosa en la enfermedad inflamatoria intestinal. Así, la glicosilación alterada de glicoproteínas de la mucosa colónica observada en IBD puede representar receptores para adhesinas específicas de *E. coli* asociados con

10 lesiones inflamatorias intestinales tempranas.

El inventor caracterizó por lo tanto, la adherencia de bacterias relacionadas a la enfermedad inflamatoria intestinal con las estructuras de los carbohidratos (ver Ejemplo 1). El inventor encontró que la adhesión de las bacterias de ese tipo con las superficies celulares se puede bloquear por algunos, pero no todos, los carbohidratos complejos. En particular,

15 encontró que las fibras solubles de acuerdo con la invención fueron eficaces para prevenir la adhesión bacteriana y como consecuencia tienen eficacia para prevenir o tratar el cáncer de colon. Como consecuencia, se cree que las fibras solubles pueden imitar o competir con los receptores bacterianos, previniendo así el reclutamiento bacteriano y la inflamación posterior.

20 La fibra soluble de acuerdo con la presente invención se puede derivar de gomas parcialmente hidrolizadas de bajo peso molecular (por ejemplo, goma guar, goma de algarrobo, goma de fenogreco o goma de okra y otras gomas comestibles adecuadas de baja viscosidad), mucina submaxilar bovina (BSM), alginato o carragenina parcialmente hidrolizada.

25 La fibra soluble de acuerdo con la presente invención se puede derivar también de un extracto del fruto, vegetal o cereal o una fracción activa de éstos. La fracción activa se puede obtener de un fruto o grano seleccionado del fruto o plantas de las familias *Solanaceae*, *Rutaceae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Musaceae*, *Anacardiaceae*, *Vitaceae*, *Arecaceae*, *Ericaceae*, *Lauraceae* y *Poaceae*.

30 Los ejemplos de frutos que se pueden usar de acuerdo con la presente invención son aquellos seleccionados de las familias *Solanaceae*, *Rutaceae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Musaceae*, *Anacardiaceae*, *Bromeliaceae*, *Vitaceae*, *Arecaceae*, *Ericaceae* y *Lauraceae*.

Los ejemplos de *Solanaceae* incluyen el tomate, por ejemplo la variedad de tomate inglés. Los ejemplos de *Rutaceae* incluyen las especies de *Citrus* tales como *Citrus paradisi* (toronja), *Citrus sinensis* (naranja), *Citrus limon* (limón) y *Citrus aurantifolia* (lima). Los ejemplos de *Cucurbitaceae* incluyen *Cucumis melo* (melón), por ejemplo, el melón francés. Los ejemplos de *Anacardiaceae* incluyen *Mangifera indica* (mango). Los ejemplos de *Rosaceae* incluyen *Pyrus sylvestris* (manzana), *Pyrus communis* (pera), *Malus domestica* o *Prunus persica* var. *nectarina* (nectarina), *Prunus armeniaca* (albaricoque), *Prunus domestica* (ciruela), *Prunus avium* (cerezo), *Prunus persica* (durazno), la fresa y la mora. Los ejemplos de *Musaceae* incluyen *Musa paradisiaca* (plátano). Los ejemplos de *Bromeliaceae* incluyen *Ananas sativus* (piña). Los ejemplos de *Lauraceae* incluyen *Persea gratissima* o *Persea americana* (aguacate). Los ejemplos de *Vitaceae* incluyen *Vitis vinifera* (uva). Los ejemplos de *Arecaceae* incluyen *Phoenix dactylifera* (dátil). Los ejemplos de *Ericaceae* incluyen los arándanos.

35

40

45 Los ejemplos particulares de frutos, los extractos o fracciones activas las cuales se encontraron que son útiles de acuerdo con la invención son el tomate, toronja, melón, mango, nectarina, fresa, ciruela, uva, pera, manzana y aguacate. Los ejemplos particulares de vegetales son la papa, zanahoria, chirivía, nabo, calabaza, calabacines y pimientos. Los ejemplos particulares de cereales son granos de trigo, granos de cebada, granos de maíz y granos de arroz.

50

Sin embargo los inventores encontraron que son particularmente útiles las fibras solubles derivadas de la familia *Musaceae* (es decir, los géneros *Musa* y *Ensete*). Las fibras solubles de la *Musa* spp (es decir, bananas o plátanos) tienen la mayor eficacia para tratar o prevenir el cáncer de colon. Se conocen once especies de *Musa*, pero las fibras solubles se derivan de preferencia de los cultivares de *Musa acuminata*, *Musa balbisiana*, *Musa paradisiaca* o *Musa sapientum*.

55

Una fibra soluble preferida para uso en el tratamiento o prevención del cáncer de colon se deriva de plátano o plátanos comestibles verdes (es decir, sin madurar).

60 La fibra soluble de acuerdo con la invención se puede preparar en su forma más simple homogenizando una fuente de la fibra (por ejemplo, pulpa de plátano) en una solución acuosa y decantando completamente después el sobrenadante acuoso. Este sobrenadante se puede usar después de acuerdo con la invención. Como alternativa, la mezcla se puede centrifugar para separar los sólidos de la solución acuosa que comprende la fibra soluble. Esta solución acuosa puede consistir esencialmente del jugo del fruto, opcionalmente con la adición extra de agua añadida durante la etapa de homogenización. Los extractos acuosos de ese tipo se pueden concentrar, enriquecer o condensar mediante, por

65

ejemplo, técnicas estándar, por ejemplo evaporación a presión reducida. Los ejemplos de concentrados son aquellos que son al menos 2 veces concentrados, más usualmente, al menos 4 veces, por ejemplo al menos 8 veces, o al menos 40 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces, o al menos 1000 veces.

5 La solución acuosa se puede fraccionar para aislar una o más fracciones activas que comprenden la fibra soluble en el mismo mediante, por ejemplo, filtración por peso molecular, o cromatografía sobre un soporte sólido adecuado, tal como un gel de sefarosa (por cromatografía de exclusión por tamaño) o columna de intercambio iónico usando HPLC sobre una sílice o alúmina tratada adecuadamente, por ejemplo sílice ODS recubierta; o por extracción con disolvente.

10 La fibra soluble de acuerdo con la invención se puede preparar siguiendo una o más de las etapas siguientes:

(A) Se prefiere que la fibra soluble se prepare macerando o rebanando el fruto (por ejemplo, plátano o banana) e hirviendo después el fruto en agua (de preferencia agua estéril) durante entre 2 y 60 minutos, de preferencia aproximadamente 30 minutos. Como alternativa el fruto seco se puede moler y hervir después en agua como se discutió anteriormente. En cierto modo estos tiempos de ebullición ayudan a romper el almidón (el inventor encontró que es indeseable tener un alto contenido de almidón en las fibras solubles). Después de la ebullición, la solución se debe centrifugar (por ejemplo, a 10,000 g durante 10 minutos) para separar el material insoluble del sobrenadante. El sedimento se debe desechar después y el sobrenadante se puede usar como fibra soluble de acuerdo con la presente invención. El hecho de que el sobrenadante sea útil es en particular sorprendente a la luz de la técnica anterior que sugiere que la pulpa (es decir el material sedimentado) puede ser médicamente útil. Por ejemplo, Rabbini y otros (2001) Gastroenterology 121 págs 554-560 sugieren que la pulpa de banana se puede usar para tratar la diarrea. Sin embargo, se debe apreciar que el inventor encontró que la ebullición a 100 °C no es esencial para preparar la fibra soluble de acuerdo con la invención. Los ejemplos ilustran que el fruto homogenizado tal como se describe anteriormente puede producir fibra soluble usable (en particular cuando las etapas se llevan para eliminar el almidón como se discute más abajo) sin necesariamente hervir la muestra.

(B) La fibra soluble preferida se puede someter a una etapa de tratamiento con una enzima capaz de hidrolizar el almidón y por lo tanto eliminar el almidón de la fibra soluble. Las enzimas que degradan el almidón tales como α -amilasas de fuentes animales, bacterianas o fúngicas, o amiloglucosidasas, pululanasas se pueden usar para un propósito de este tipo, individualmente o en combinación. En consecuencia, un protocolo preferido para producir la fibra soluble involucra la fibra soluble que se extrae de los plátanos hervidos y que se tratan con una enzima de digestión de almidón, o enzimas, para eliminar el almidón y producir una fracción de Polisacárido Sin Almidón (NSP).

(C) Una etapa adicional que se puede emplear en la preparación y enriquecimiento de la fibra soluble de acuerdo con la invención, es una etapa de precipitación. Una etapa de ese tipo se puede emplear para precipitar la fibra soluble para que se pueda separar de otros contaminantes solubles en agua. La fibra soluble precipitada se puede mantener después en forma de polvo (ver a continuación) o, como alternativa, se puede resuspender en un líquido de una composición y volumen definido (regulando de ese modo la concentración de la fibra soluble). El inventor encontró que una forma ideal de precipitar la fibra soluble es añadir etanol al 80% a un extracto crudo de la fibra soluble. Como una alternativa a la precipitación, se apreciará que se puede emplear la diálisis.

Se apreciará que los pasos mencionados anteriormente (-A) - (C) para aislar la fibra soluble de acuerdo con la invención se pueden combinar para proporcionar un protocolo útil para producir la fibra soluble. Un protocolo de ese tipo puede comprender:

(1) cortar el fruto fresco y eliminar las cáscaras y colocar en una solución acuosa; o liofilizar el fruto entero (excepto cáscaras), molerlo y colocar en una solución acuosa; o moler el fruto desecado y colocar en una solución acuosa.

(2) La solución de (1) se puede calentar después (por ejemplo, hervir a 100 °C) para gelatinizar el almidón y dispersar cualquier gránulo de almidón.

(3) El material se puede hidrolizar también con enzimas que digieren el almidón para asegurar que se elimina todo/la mayoría del almidón.

(4) La fracción líquida remanente comprende Polisacáridos Sin Almidón (NSP) que se pueden usar como fibra soluble de acuerdo con la invención.

(5) La fracción líquida se puede precipitar y lavar con etanol al 80% y centrifugar (a aproximadamente 10,000 g - se apreciará que se pueden emplear fuerzas centrífugas inferiores). El sobrenadante alcohólico se desecha después y el residuo (que contiene tanto NSP soluble como insoluble) se liofiliza o seca por aspersion. El producto seco (que representa también la fibra soluble de acuerdo con la invención) puede almacenarse después y reconstituirse cuando se desee.

(6) Cuando la fibra soluble se requiere en solución, el residuo seco puede hervirse en agua; centrifugar (por ejemplo a 10,000 g durante 10 minutos) y usar el sobrenadante según se requiera.

El sobrenadante (6) puede opcionalmente ser liofilizado o secarse por aspersion de nuevo para preparar una fibra soluble preferida (en polvo) de acuerdo con la invención.

Un protocolo preferido que involucra la eliminación del almidón y que representa un método preferido para producir fibra soluble, comprende:

(i) las cáscaras de plátano se eliminan de los plátanos y el fruto entero (excluyendo las cáscaras) se liofiliza y muele después.

5 (ii) El material molido se hierva después (100 °C) durante aproximadamente 30 minutos en agua para gelatinizar el almidón y dispersar cualquier gránulo de almidón.

(iii) El material se hidroliza después con amilasa pancreática porcina (a 40 °C) para asegurar que se elimine todo/la mayoría del almidón. Es más preferible que la fibra soluble para consumo humano se trate con α -amilasa, amiloglucosidasa y pululanasa de bacterias u hongos.

10 (iv) La fracción líquida restante comprende Polisacáridos Sin Almidón (NSP). Esto se precipita después y lava con etanol al 80% y se centrifuga (a aproximadamente 10,000 g - se apreciará que se puedan emplear fuerzas de centrífugas inferiores). El sobrenadante alcohólico se desecha después y el residuo (que contiene tanto NSP soluble como insoluble) se seca por aspersión o se liofiliza. Este producto secado por aspersión o liofilizado (que representa la fibra soluble de acuerdo con la invención) se puede almacenar después y reconstituir cuando se desee.

15 (v) Cuando la fibra soluble se requiere en solución, el residuo seco por aspersión o liofilizado se hierva en agua durante aproximadamente 30 minutos; centrifuga a 10,000 g durante 10 minutos y se usa el sobrenadante según se requiera.

20 El sobrenadante (v) puede ser opcionalmente liofilizado de nuevo para preparar una fibra soluble preferida (en polvo) de acuerdo con la invención.

25 El inventor encontró que la materia comestible de plátanos (es decir, todo menos las cáscaras) constituye aproximadamente 50% del plátano y la materia seca constituye aproximadamente 31%. Los inventores encontraron que el rendimiento de NSP (siguiendo los protocolos anteriores) es aproximadamente 3-4% y aproximadamente 40% de esta NSP que representa la fibra soluble de acuerdo con la invención.

30 El inventor encontró también que un pH eficaz para una solución de fibra soluble está alrededor de pH 7. Un aumento en el pH aumenta la solubilidad pero se encontró excesiva alcalinidad para degradar los polisacáridos u oligosacáridos en la fibra soluble y resulta en una disminución de la eficacia.

35 La Tabla 1 ilustra el contenido en azúcar de una fibra soluble típica obtenida de acuerdo con las etapas (i)-(v) del protocolo discutido anteriormente. El análisis del contenido de azúcar de una fibra soluble proporciona una "huella digital" para la fibra soluble, de una fuente en particular. Es posible distinguir entre la fibra soluble derivada de plátano y otras plantas (por ejemplo, cáscara de guisante o trigo). Por tanto, se apreciará que la fibra soluble preferida derivada de *Must* tiene un contenido de azúcar similar al que se da en la Tabla 1.

Tabla 1

Azúcares constituyentes del polisacárido sin almidón (g/100 g materia seca)										NSP total
Rhamnosa	Fucosa	Arabinosa	Xilosa	Mannosa	Galactosa	Glucosa	Ácido glurónico	Ácido galacturónico	g/100g	
0,1-0,3	0,1	0,3-0,5	0,2	0,6	0,3-0,5	0,9	0,1	0,8-1,3	3,4-4,5	

Es más preferido que el contenido de azúcar sea similar a aquel dado en la Tabla 2:

Tabla 2

Azúcares constituyentes del polisacárido sin almidón (g/100 g materia seca)								NSP total	
Rhamnosa	Fucosa	Arabinosa	Xilosa	Mannosa	Galactosa	Glucosa	Ácido glurónico	Ácido galacturónico	g/100g
0,1	0,1	0,3	0,2	0,6	0,3	0,9	0,1	0,8	3,4

Las preparaciones de fibra soluble más preferidas para el uso de acuerdo con la invención se describen en los Ejemplos.

5 El cáncer de colon puede tratarse usando fibra soluble derivada de una fuente natural (por ejemplo preparado a partir de banana o plátano). Como alternativa los azúcares sintéticos se pueden usar con la misma o similar composición, a la fibra soluble preparada de fuentes naturales.

10 Se apreciará que una preparación cruda se derivó de la ebullición, o incluso homogenizando solamente el fruto en una solución acuosa. Los sólidos del fruto se pueden sedimentar por centrifugación y el sobrenadante (que contiene la fibra soluble) se puede usar de acuerdo con la invención.

15 Las necesidades clínicas pueden dictar que una preparación cruda de ese tipo (con relación al sobrenadante mencionado anteriormente) pueda necesitar que se use sustancialmente "puro" o incluso diluido. Cuando este es el caso, el sobrenadante (ya sea diluido o no) se puede mezclar con un número de otros agentes que se puede añadir por razones nutricionales, razones médicas o incluso para los propósitos de ajustar las cualidades de sabor de las fibras solubles para el consumo por el individuo que se trata.

20 Por ejemplo, la fibra soluble se puede formular con un producto diario (por ejemplo, leche, un batido de leche o yogur) o un jugo de fruta (por ejemplo jugo de naranja, o similar) para producir una bebida/trago grato al paladar con el beneficio añadido de que contiene la fibra soluble y por lo tanto, será muy adecuado como un refrigerio para los que sufren de cáncer de colon.

25 Como alternativa, la preparación cruda puede incluirse en un líquido nutritivo para la alimentación enteral. Por ejemplo, el sobrenadante se puede mezclar con solución salina o una solución acuosa (se pueden incluir otras vitaminas, minerales y nutrientes) para la alimentación enteral de los individuos.

Se apreciará que puede requerirse la concentración de la preparación cruda del primer protocolo o como alternativa se desea una composición en polvo. Cuando este es el caso, el extracto/sobrenadante crudo necesitará que se concentre/deshidrate.

30 Las composiciones que comprenden la fibra soluble pueden formularse como polvos, gránulos o semisólidos para la incorporación en cápsulas. Para la presentación en la forma de una fibra soluble, semi-sólida se puede disolver o suspender en un líquido viscoso o vehículo semisólido tal como un polietilenglicol, o un portador líquido tal como un glicol, por ejemplo, propilenglicol, o glicerol o un aceite vegetal o de pescado, por ejemplo un aceite seleccionado de aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de onagra, aceite de soja, aceite de hígado de bacalao, aceite de arenque, etc. Esto se puede rellenar después en cápsulas ya sea del tipo de gelatina dura o de gelatina blanda o preparada a partir de equivalentes de gelatina dura o blanda, siendo preferidas para líquidos viscosos o rellenos semisólidos las cápsulas de gelatina blanda o equivalente gelificante.

40 Los polvos que comprenden la fibra soluble de acuerdo con la invención son particularmente útiles para la preparación de productos farmacéuticos o nutritivos que se pueden usar para prevenir o tratar el cáncer de colon.

45 La liofilización o secado por aspersion representan los métodos preferidos para producir un polvo que comprende las fibras solubles de acuerdo con la invención. Secar por aspersion resulta en mezclas de polvo granular de flujo libre con buenas propiedades de flujo y características de disolución rápida.

50 Se apreciará que el polvo secado por aspersion o liofilizado producido por los protocolos discutidos anteriormente representa la fibra soluble en polvo preferida de acuerdo con la invención. Un polvo preferido se deriva de una solución de fibra soluble reconstituida producida por las etapas (i) - (v) (ver anteriormente) que es posteriormente liofilizada o secada por aspersion.

La fibra soluble en polvo se puede reconstituir como una bebida/trago de baja viscosidad clara/transparente. La reconstitución puede ser en agua o productos lácteos o jugos de fruta como se discutió anteriormente. Se apreciará que el polvo se puede envasar en una bolsita y reconstituir como una bebida por un individuo cuando lo requiera o desee.

55 Las mezclas de polvo representan modalidades preferidas de la invención. Las mezclas de ese tipo comprenden la fibra soluble en polvo (como se describió anteriormente) mezclada con otros ingredientes. Los ingredientes de ese tipo se pueden añadir por razones nutricionales o médicas o para mejorar las cualidades del sabor. La fibra soluble en polvo se puede mezclar con azúcares granulados de diversos tamaños de partículas para obtener mezclas de polvo de flujo libre de diversos dulzores.

60 Como alternativa los edulcorantes naturales o edulcorantes artificiales (por ejemplo aspartamo, sacarina y similares) pueden mezclarse con la fibra soluble en polvo para la reconstitución como una bebida endulzada de caloría reducida/baja en calorías. La mezcla en polvo puede comprender un suplemento mineral. El mineral puede ser uno cualquiera de calcio, magnesio, potasio, zinc, sodio, hierro, y sus diversas combinaciones.

Las mezclas en polvo pueden contener también agentes tampones tales como tampones de citrato y fosfato, y agentes efervescentes formados de carbonatos, por ejemplo, bicarbonatos tales como bicarbonato de sodio o amonio, y un ácido sólido, por ejemplo ácido cítrico o una sal ácida de citrato.

5 La fibra soluble se puede presentar como suplementos alimenticios o aditivos alimenticios, o se puede incorporar en alimentos, por ejemplo alimentos funcionales o suplementos alimenticios. Los productos de ese tipo se pueden usar como alimentos básicos así como bajo circunstancias en las que puede ser una necesidad clínica.

10 Los polvos se pueden incorporar en barras de comida ligera por ejemplo barras de frutos, barras de frutos secos y barras de cereales. Para la presentación en forma de barras de comida ligera, el polvo se puede mezclar con alguno o más ingredientes seleccionados de frutos secos tales como tomates secados al sol, pasas y pasas de Esmirna, nueces molidas o cereales tales como avena y trigo.

15 Se apreciará que la fibra soluble se puede formular ventajosamente como un producto farmacéutico para uso como un medicamento (que requiere una prescripción o de cualquier otra forma).

20 La fibra soluble en polvo o fibra soluble líquida concentrada se puede incorporar también en comprimidos, pastillas, dulces u otros productos alimenticios para la ingestión oral. Se apreciará también que la fibra soluble en polvo de ese tipo o fibra soluble líquida concentrada se pueden incorporar en cápsulas de liberación lenta o dispositivos que se pueden ingerir y son capaces de liberar la fibra soluble dentro de los intestinos durante un largo período de tiempo.

25 Además, las fibras solubles se pueden microencapsular. Por ejemplo, la encapsulación puede ser por formación de cápsula de gel de alginato de calcio. Se pueden usar como excipientes para la micro-encapsulación la Kappa-carragenina, goma gelana, gelatina y almidón.

30 Las preparaciones crudas, líquidos concentrados, polvos y similares se pueden combinar con agentes terapéuticos conocidos para tratar el cáncer de colon. Como tal la fibra soluble de acuerdo con la invención se puede usar en una terapia de combinación muy eficaz. Se apreciará que la fibra soluble en solución puede actuar como un vehículo ideal para otros agentes terapéuticos para tratar el cáncer de colon.

35 La fibra soluble se puede incluir también en terapias de combinación/simbióticas que incluyen una parte probiótica. Las bacterias contenidas dentro de muchas mezclas probióticas no poseen propiedades adhesivas así es que no serían afectadas por la inclusión de la fibra soluble del plátano.

40 Las composiciones de la invención se pueden presentar en la forma de formas de dosis unitarias que contienen una concentración definida de fibra soluble. Las formas de dosis unitarias de ese tipo se pueden seleccionar para lograr un nivel deseado de actividad biológica.

45 La cantidad de una fibra soluble requerida por un individuo se determina por la actividad biológica y biodisponibilidad que a su vez depende de la formulación, modo de administración, las propiedades fisicoquímicas de las fibras solubles y si la fibra soluble está siendo usada como una monoterapia o en una terapia combinada. Generalmente, una dosis diaria para un adulto humano debería estar entre 0,1g y 100g de polvo liofilizado o secado por aspersión (sin embargo formulado), con mayor preferencia la dosis diaria está entre 1g y 30g (por ejemplo, aproximadamente 5g, 10g, o 15g según se requiera).

Una forma de dosis sólida o semisólida de la presente invención puede contener hasta aproximadamente 1000mg de extracto seco que contiene la fibra soluble, por ejemplo hasta aproximadamente 800mg.

50 La frecuencia de administración se afectará también por los factores mencionados anteriormente y en particular la vida media y las fibras solubles en el individuo que se trata. Por ejemplo, la vida media se afectará por el estado de salud del individuo, la motilidad intestinal y otros factores.

55 La fibra soluble es en particular útil cuando se incluyen en la formulación farmacéutica tal como un comprimido o una cápsula. Las formulaciones de ese tipo pueden requerir ser recubiertas enteralmente si la biodisponibilidad impone esto. Los procedimientos conocidos, tales como aquellos empleados convencionalmente por la industria farmacéutica (por ejemplo, experimentación *in vivo*, ensayos clínicos, etc.), se pueden usar para establecer formulaciones específicas de composiciones farmacéuticas y regímenes terapéuticos precisos (tales como dosis diarias de los compuestos y la frecuencia de administración).

60 Se apreciará que se pueden emplear procedimientos "nutracéuticos" convencionales para crear bebidas líquidas, mezclas de polvos y productos alimenticios que comprenden la fibra soluble.

65 Las dosis diarias se pueden administrar como una administración única (por ejemplo, un comprimido diario para el consumo oral o como una bebida líquida única). Como alternativa, la fibra soluble usada puede requerir la administración dos veces o más veces durante un día. Como un ejemplo, una bebida de naranja de 100ml que contiene de 0,1-20g de fibra soluble seca por aspersión (de preferencia 0,3 - 10g de fibra soluble seca por aspersión y con

mayor preferencia 0,5-3,0g) se puede usar para saciar la sed a intervalos regulares durante todo el día y entregar así una dosis recomendada.

5 Se apreciará que los productos nutritivos suplementados con fibra soluble representan un medio ideal para proporcionar individuos con, o en riesgo de desarrollar cáncer de colon, con la fibra soluble de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, de acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un producto nutritivo para uso en la prevención o tratamiento de cáncer de colon que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivable de fibra soluble derivada de la fruto de la *Musa* spp

10 El producto nutritivo puede comprender:

(a) una bebida clara, de baja viscosidad, similar al agua, estable, listo para el uso, embotellada, carbonatada o no carbonatada; o un líquido claro concentrado para la reconstitución que contiene una fibra soluble no gelificante derivable de la fruto de *Musa* spp;

15 (b) una mezcla en polvo/granular que se reconstituye con agua o cualquier otro líquido ingerible por vía oral como un líquido bebible, que contiene una fibra soluble no gelificante derivable del fruto de *Musa* spp; o

(c) una mezcla de polvo granular mezclado en un producto alimenticio (por ejemplo, una barra de chocolate, pastilla o similar).

20 El producto nutritivo puede ser como se describió anteriormente y puede o no contener vitaminas solubles en agua, suplementos minerales adicionales, compuestos nutritivos, antioxidantes o saborizantes.

La presente invención se ilustrará además, en forma de ejemplos, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 ilustra la expresión de la fimbria por una *E. coli* asociada a la mucosa usando microscopía electrónica (algunas indicadas mediante flechas) en el Ejemplo 1;

25 La Figura 2 es un gráfico que muestra un aumento significativo de la bacteria asociada a mucosa en pacientes con enfermedad de Crohn en el Ejemplo 1;

La Figura 3 muestra de modo significativo que más *E. coli* aisladas del tejido de la enfermedad de Crohn posee actividad hemaglutinante en comparación con las *E. coli* aisladas de pacientes del control en el Ejemplo 1;

30 La Figura 4 muestra que las cepas de *E. coli* aglutinantes son capaces de adherirse e invadir las células 1-407 a un nivel significativamente más alto que las cepas de *E. coli* no aglutinantes (esto válida el uso del ensayo de hemaglutinación para evaluar la inhibición de la adhesión bacteriana)

La Figura 5 es un gráfico que ilustra que la fibra soluble del plátano reduce significativamente la unión bacteriana a células en el Ejemplo 1; y

35 La Figura 6 es un gráfico que ilustra que la fibra soluble del plátano reduce significativamente la invasión bacteriana a células en el Ejemplo 1.

Ejemplo 1

40 Los inventores llevaron a cabo estudios con el propósito de investigar las biopsias de IBD para la presencia de poblaciones bacterianas que estuvieran ya sea dentro de la capa de moco; estrechamente asociadas con la mucosa, o las que invadieron la capa mucosa. Las bacterias cultivadas se caracterizaron completamente y las identificadas como de *E. coli* se estudiaron para determinar su capacidad para adherirse a glóbulos rojos humanos. Las *E. coli* adherentes se caracterizaron además por la presencia de genes de patogenicidad y adhesinas conocidas, sus especificidades de unión y su capacidad para invadir líneas de células intestinales humanas.

1.1 Materiales y métodos

1.1.1 Pacientes

50 Se estudiaron 60 pacientes. 18 con colitis ulcerativa, 14 con enfermedad de Crohn y 28 controles normales. Las biopsias se tomaron durante la colonoscopia o sigmoidoscopia para la mayoría de los pacientes, un conjunto de biopsias se tomó una muestra de la resección de un paciente normal con inercia crónica

1.1.2 Cultivo bacteriano

55 Cuatro biopsias se tomaron ya sea de muestras de tejidos extirpados (un paciente) o en la colonoscopia (59 pacientes). Las biopsias se colocaron en 10 ml de solución salina fisiológica y transportaron sobre hielo al laboratorio. Las biopsias se colocaron en un eppendorf de 1,5 ml que contenía 500µl de solución de ditiotreitól (DTT) al 0,016% durante 15 minutos para eliminar la capa de moco. 50µl del sobrenadante de DTT se sembró en agar MacConkey e incubó a 37°C durante 24 horas. Las biopsias se separaron después en dos eppendorfs de 1,5 ml que contienen ya sea 500µl de solución salina estéril o 500µl de gentamicina (50 mg/ml). Después de 30 minutos las biopsias se lavaron 4 veces transfiriéndolos a eppendorfs de 1,5 ml consecutivos que contienen 500µl de solución salina. Después del cuarto lavado, una biopsia de cada eppendorf (es decir, una de las biopsias tratada con gentamicina y una de las biopsias sin tratar con gentamicina) se colocó en agua destilada estéril y desionizada, la otra biopsia de cada eppendorf se colocó en 60 500µl de solución salina. Después de otros 30 minutos adicionales, 50µl de solución de cada uno de los eppendorfs

5 finales se sembraron en placas de agar MacConkey. Después de 24 horas de incubación a 37°C, se realizaron los recuentos de colonias.

5 1.1.3 Identificación bacteriana

Después de que se realizaron los recuentos de colonias, se caracterizaron las colonias bacterianas y 5 de cada tipo de colonia se subcultivaron en agar nutriente. La tinción de Gram se realizó y cualquier bacteria identificada como bacilos Gram negativos se identificaron además usando estuches de identificación bacteriana API20E (BioMérieux, Francia). Las muestras bacterianas de cada colonia subcultivadas se almacenaron en esferas protectoras a -80°C

10 1.1.4 Ensayo de resistencia a antibióticos

15 Usando colonias de bacterias extraídas de una placa de agar nutriente se suspendió en 5 ml de solución salina estéril una única colonia bacteriana bien aislada. 100µl de la suspensión bacteriana se sembró en placas de agar para sensibilidad. Los discos de antibióticos se dispensaron entonces después en la placa. Los siguientes antibióticos se usaron: gentamicina, trimetoprim, sulfonamida, ampicilina, penicilina, tetraciclina, ácido nalidíxico, cloranfenicol. Las placas bacterianas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se midieron los diámetros del cultivo bacteriano alrededor de los discos y se calculó el grado de resistencia bacteriana a antibióticos.

20 1.1.5 Condiciones de cultivo bacteriano para la máxima expresión de la fimbria

La máxima expresión de la fimbria se observó después del crecimiento de las colonias bacterianas en agar nutriente durante toda la noche, se suspendió en solución salina estéril, y después se dejó a temperatura ambiente durante 48 horas. La expresión de la fimbria se confirmó usando EM y se puede observar en la Figura 1.

25 1.1.6 Ensayos de hemaglutinación

30 Se extrajo sangre de un voluntario humano sano y se colocó en un recipiente heparinizado. La sangre se lavó tres veces en PBS mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos y resuspendió el sedimento en PBS fresco. Después del tercer lavado, el sedimento se resuspendió en PBS para dar una solución de glóbulos rojos al 1%. La bacteria identificada como *E. coli*, y 5 cepas de *E.coli*, asociadas a CD-íleal se cultivaron con el fin de obtener la máxima expresión fimbria (ver anteriormente). Las bacterias se suspendieron en solución salina para dar una DO igual al estándar 5 de MacFarland. Diluciones dobles de suspensión bacteriana se realizaron en placas de hemaglutinación de 96 cavidades con fondo en U (Dynex Technologies) hasta un volumen final de 100µl por cavidad. 50µl de eritrocitos al 35 1% se añadió a cada pocillo. La placa se golpeó suavemente para mezclar el contenido de los cavidades y se dejó a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas.

1.1.7 Ensayos de hemaglutinación usando el panel de eritrocito humano

40 Todos los *E. coli* se ensayaron frente a un panel de eritrocitos de tipo antigénico conocido. Estos incluyeron el panel 1 de ID (26 antígenos que incluyen Lewis, Lutheran, M, N, S, P, K, Kidd, Rhesus y otros), células Alrr, células Brr (grupos sanguíneos ABO) (NBS reagents, Liverpool, Reino Unido) y células ii adultas (Diagnostics Scotland, Edimburgo, Reino Unido).

45 1.1.8 Ensayos de hemaglutinación con diferentes oligosacáridos/fibras

50 La caracterización adicional de la hemaglutinación bacteriana se llevó a cabo usando un panel de oligosacáridos/fibras. Las estructuras probadas fueron: manosa (0,4 M), fucosa (0,4 M), galactosa (0,4 M), fetuina (50µg/ml), asialofetuina (50µg/ml), mucina submaxilar bovina (BSM), BSM hidrolizada, mucina submaxilar ovina (OSM), lactosa, lactulosa, siail-Tn, GalGalNAc, ácido N-Glicolineuramínico, ácido N-acetilneuramínico, 3'-n-acetilneuraminil-lactosa, 6'-n-acetilneuraminil-lactosa, melibiosa, plátano, estaquiosa, leche derivada de galacto-oligosacárido, rafinosa pectina, ácido poligalacturónico, y paralacto-n-hexosa

55 1.1.9 PCR

Las bacterias identificadas como *E. coli* aglutinantes se chequearon tanto para los genes de patogenicidad asociados con cepas virulentas de *E. coli* como para los genes de adhesinas conocidas. Estos fueron: VT1, VT2, VT2e, STI, STII, LTI, Einv, Eagg, CnF1, CNF11, EaeA, EaeB, EAF, Bfp, CDT, EAST, Hly, HlyA, pap, sfa, afa, aglutinina-M, fimH.

60 1.1.10 Electroforesis en gel de campo pulsado

Las cepas de *E. coli* aglutinantes se probaron para determinar la clonalidad usando electroforesis en gel de campo pulsado.

1.1.11 Ensayos de adherencia e invasión

Las bacterias aglutinantes se probaron para determinar su capacidad de adherirse a e invadir las líneas de células intestinales y I-407 y HT-29. *Shigella sonnei* se usó como control positivo para la invasión y *E. coli* K12, una *E. coli* adherente pero no invasiva, se usó como un control negativo para la invasión. Las células se mantuvieron en DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco - Sigma, Reino Unido) a 37°C, 5% de CO₂, suplementado con suero fetal bovino al 10% (volumen/volumen) inactivado por calor (Sigma, Reino Unido), L-glutamina al 1%, penicilina y estreptomina. Las monocapas se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 24 cavidades (Costar, Reino Unido), con 4x10⁵ células/cavidad. Las células se incubaron durante 20 horas. Las monocapas se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS). Las bacterias se cultivaron con el fin de maximizar la expresión de la fimbria (48 horas en solución salina). Cada monocapa se infectó con aproximadamente 7x10⁶ bacterias/cavidad en medio de cultivo sin antibiótico. Después de 3 horas de incubación a 37°C, las monocapas se lavaron tres veces con PBS. Para determinar la invasión bacteriana, los cavidades se trataron con medio de cultivo fresco que contiene gentamicina (100µg/ml), el propósito de esto es matar las bacterias extracelulares como la gentamicina no puede penetrar las células humanas. Después de una hora a 37°C, las monocapas se lavaron tres veces en PBS estéril. Las monocapas se lisaron añadiendo agua desionizada que contiene Tritón X-100 al durante 5 minutos. Se realizaron diluciones de diez veces del lisado celular y 50µl se sembró en placas de agar nutriente. Las placas se incubaron a 37°C y se contaron las unidades formadoras de colonias (CFU) después de 24 horas. La adherencia bacteriana se calculó como recuentos totales de CFU multiplicado por el factor de dilución, esto se expresó también como un por ciento del número total de bacterias usadas para inocular las cavidades. La invasión bacteriana se definió como el por ciento de bacterias acopladas que sobrevivió al tratamiento con gentamicina. Una cinética de adherencia bacteriana e invasión se determinó usando sólo células I-407 durante un período de 5 horas.

1.1.12 Efecto de la fibra soluble del plátano en la adherencia e invasión de las bacterias

Se estudió el efecto de la pre-incubación de las bacterias con el plátano en la adherencia e invasión de *E. coli*

1.1.12.1 Preparación de fibra soluble de plátano liofilizada: Las cáscaras se retiraron de los plátanos y la fruta entera (excluyendo las cáscaras) se liofilizó y molió después. Se hirvió después (100°C) durante aproximadamente 30 minutos en agua para gelatinizar el almidón y dispersar cualquiera de los gránulos de almidón. Se hidrolizó después con amilasa pancreática porcina (a 40 °C) para asegurar que se eliminó todo el almidón. La fracción de polisacáridos sin almidón (NSP) se precipitó y lavó con etanol al 80% y centrifugó (aproximadamente 10,000 g). El sobrenadante alcohólico se desechó y el residuo (que contiene tanto NSP soluble como insoluble) se liofilizó. Esta muestra liofilizada representa una fibra soluble en polvo de acuerdo con la invención.

1.1.12.2 Preparación de fibra soluble de plátano en solución: Cuando una muestra de fibra soluble se requirió el residuo liofilizado (1.1.12.1) se hirvió en agua durante 30 minutos, centrifugó a 10,000 g durante 10 minutos y se tomó el sobrenadante como la fibra soluble de plátano.

1.1.12.3 Preparación de fibra soluble de plátano refinada liofilizada: el sobrenadante (1.1.12.2) se liofilizó (como se describió anteriormente) para formar una fibra soluble en polvo preferida de acuerdo con la invención

1.1.13 Preparación de bacteria para usar en ensayos de unión e invasión.

1 ml de los cultivos bacterianos, que se cultivaron en solución salina estéril para lograr la máxima expresión de la fimbria, se pipetearon en dos eppendorfs. Los tubos se centrifugaron a 10 000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento de un tubo se resuspendió en 1 ml de solución de plátano soluble. El otro sedimento se resuspendió en 1 ml de solución salina estéril. Ambos eppendorfs se rotaron en el agitador celular durante 30 minutos. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron como antes y los sedimentos se lavaron dos veces con solución salina estéril. Los sedimentos se resuspendieron finalmente en 1 ml de solución salina estéril y se usaron en el ensayo de adherencia e invasión como anteriormente.

1.2 Resultados

1.2.1 Aumento de las bacterias asociadas a la mucosa en la enfermedad de Crohn

Las bacterias se identificaron usando las técnicas microbiológicas descritas en la sección de Métodos.

En total, de 707 colonias bacterianas sub-cultivadas, 406 fueron Gram negativas y 292 de estas se identificaron como *E. coli*. La sensibilidad a antibióticos tales como gentamicina, trimetoprim, sulfonamida, ampicilina, penicilina, tetraciclina, ácido nalidíxico y cloranfenicol se examinó para caracterizar adicionalmente a las bacterias (datos no mostrados).

Las bacterias asociadas al mucosa se cultivaron a partir de las biopsias tratadas con el sobrenadante de ditiotreitól (DTT) (el DTT elimina la capa de moco de la biopsia que expone la mucosa). No se encontró diferencia significativa en los números de bacterias asociadas al moco entre los grupos de pacientes (datos no mostrados). Sin embargo la Figura

2 muestra un aumento significativo en las bacterias asociadas a mucosa en pacientes con enfermedad de Crohn en comparación con los pacientes control con 79% (11/14) de los pacientes CD siendo positivos para las bacterias asociadas a la mucosa en comparación con 39% (11/28) de los pacientes control (P = 0,038; Chi cuadrado). Las bacterias asociadas a la mucosa son las que se pueden recuperar de la superficie de la mucosa después que se eliminó la superficie del moco por tratamiento con DTT y lavado intenso.

Estos datos indican, como se sospechó por los inventores, de que existe en IBD un incremento en las bacterias asociadas a la mucosa.

10 1.2.2 *E. coli* asociada a la mucosa expresa hemaglutininas

La Figura 3 ilustra de modo significativo que más *E. coli* aisladas a partir del tejido de la enfermedad de Crohn poseen actividad hemaglutinante en comparación con las *E. coli* aisladas de pacientes del control. Las *E. coli* hemaglutinantes se identificaron en 39% (5/14) de los pacientes con EC en comparación con 4% (1/28) de los controles (P = 0,01). Un aumento del número de bacterias a partir de los pacientes con UC fue también capaz de aglutinar.

Se encontró también que las bacterias capaces de aglutinar glóbulos rojos (eritrocitos) de un voluntario humano sano, fueron capaces de aglutinar también los eritrocitos de un panel de eritrocitos de tipo antigénico conocido suministrado por el banco de sangre. Las cepas de *E. coli* asociadas a la enfermedad de Crohn mostraron también que tienen unión selectiva al panel de eritrocito. El patrón de unión de esta *E. coli* sugiere que posee una adhesina específica al grupo sanguíneo 'M'. Esta bacteria se caracterizó además usando PCR.

Estos datos sugieren que la *E. coli* asociada a la mucosa interactúa con las células intestinales mediante interacción con proteínas glicosiladas en la superficie de la célula. Esto confirmó además la hipótesis de los inventores en relación con el mecanismo por el cual las bacterias invaden el intestino en IBD.

1.2.3. *E. coli* asociada a la mucosa se adhiere e invade las células intestinales en cultivo

16 cepas diferentes de *E. coli* aglutinantes se caracterizaron de acuerdo con los métodos 1.1.4, 1.1.9 y 1.1.10 y se sometieron a ensayos de adherencia e invasión de acuerdo con el método 1.1.11. La línea celular de colon humano, HT29 y la línea celular intestinal humana 1-407 se usaron en los experimentos.

Todas las *E. coli* aglutinantes mostraron adherirse tanto a las líneas celulares HT29 como 1407, pero la invasión en general, se observó sólo en las células 1407 (ver la Tabla 2). La invasión y la adherencia se calcularon usando la media del número de unidades formadoras de colonias (CFU) recuperadas de las células sin tratar con gentamicina y tratadas con gentamicina (n= 4). (La gentamicina mata todas las *E. coli* no invasoras pero no puede penetrar las células intestinales de esta manera deja intactas a las bacterias que invadieron). LF82 es una *E. coli* adherente e invasiva (AIEC) aislada de una lesión íleal de la enfermedad de Crohn. *Shigella sonnei* se usó como un control positivo para la invasión, y *E. coli* K12 se usó como un control negativo para la invasión. Se conoce que se adhiere a las células a través de una adhesina de unión a manosa, pero no es invasiva

Experimentos adicionales se realizaron para comparar las *E. coli* aglutinantes (tales como aquellas a partir de sujetos con IBD) con las *E. coli* no aglutinantes con relación a su capacidad para adherirse e invadir las células 1-407. La Figura 4 ilustra una correlación entre la capacidad de una bacteria para aglutinar y adherirse a las células intestinales. Por lo tanto, esto sugiere además que las bacterias en IBD invaden la mucosa mediante un mecanismo que apunta a la participación de las glicoproteínas.

TABLA 3: Invasión y adherencia de las bacterias aglutinantes

Cepas de <i>E. coli</i> hemaglutinante (excepto *)	Inóculo original (Bacteria x 10 ⁷ /cavidad)	NÚMERO DE BACTERIAS ADHERIDAS (x 10 ⁴ /cavidad)		% DE INVASIÓN	
		Células I-407	Células HT-29	Células I-407	Células HT-29
1	2.20	1.27 ± 0.83	0.05 ± 0.1	14.62 ± 18.89	0.00
2	10.40	5.56 ± 3.25	0.33 ± 0.19	0.99 ± 2.99	0.00
3	7.60	7.23 ± 3.99	0.025 ± 0.05	4.23 ± 6.54	0.00
4	22.00	2.49 ± 1.32	0.58 ± 0.27	1.00 ± 2.87	0.00
5	3.80	35.4 ± 14.14	28.00 ± 0.57	0.23 ± 0.74	0.00
6	7.00	0.34 ± 0.36	0.16 ± 0.19	0.00	0.00
7	1.20	1.18 ± 11.79	0.01 ± 0.02	2.98 ± 3.50	0.00
8	1.80	29.70 ± 11.74	3.00 ± 11.95	0.03 ± 0.10	0.17 ± 0.51
9	3.60	78.40 ± 4.53	4.73 ± 0.71	0.31 ± 1.49	0.11 ± 1.42
10	8.80	4.82 ± 1.62	0.31 ± 0.25	1.77 ± 5.75	0.00
11	15.00	2.51 ± 1.32	0.03 ± 0.04	6.79 ± 9.05	0.00
12	2.40	11.30 ± 2.69	0.31 ± 0.23	9.87 ± 21.71	0.00
13	6.60	27.60 ± 10.75	3.54 ± 0.70	0.65 ± 1.50	1.98 ± 13.57
14	21.80	15.00 ± 3.11	0.25 ± 0.27	10.9 ± 6.61	0.00
15	2.20	0.29 ± 0.22	0.44 ± 0.57	0.00	0.00
16	4.80	3.04 ± 1.82	0.47 ± 0.28	2.30 ± 4.96	0.00
LF10	9.00	56.30 ± 3.25	61.20 ± 12.16	0.82 ± 7.22	0.00
LF82	11.60	2.06 ± 0.94	0.45 ± 0.33	12.90 ± 38.99	12.36 ± 29.87
K12	9.40	9.80 ± 3.11	0.40 ± 0.25	0.00	0.00
* <i>Shigella sonnei</i>	4.00	2.34 ± 1.91	3.64 ± 1.13	40.38 ± 30.43	3.99 ± 15.57

5 1.2.4 El efecto de la fibra soluble en las bacterias aisladas de individuos con IBD

La fibra soluble (preparada de acuerdo con 1.1.12.2) y otros carbohidratos se probaron por su capacidad para modular la aglutinación, adherencia e invasión de células de individuos con IBD.

10 1.2.4.1 **Agglutinación:** En todos los casos se inhibió la aglutinación con la fibra soluble de plátano y mucina submaxilar bovina (BSM) pero no seguido de la hidrólisis ácida suave de BSM para eliminar ácido siálico y fucosa.

15 Una variedad de otros carbohidratos y glicoconjugados, que incluyen manosa, fucosa, galactosa, lactosa, lactulosa, sialosil-Tn, Galβ1-3GalNAc, ácido N-glicolineuramínico, ácido N-acetilneuramínico, 3'-n-acetilneuraminil-lactosa, 6'-n-acetilneuraminil-lactosa, melibiosa, estaquiosa, galacto-oligosacáridos derivados de la leche, rafinosa, ácido poligalacturónico, y paralacto-n-hexaosa, fetuína, asialofetuína, mucina submaxilar ovina y pectina no fueron inhibitorios.

20 1.2.4.2 **Inhibición de la adherencia bacteriana por fibra soluble de plátano:** Las cepas bacterianas 9, 12 y 14 (como se identificó en la Tabla 3) ilustraron en la Figura 4 que la fibra soluble de plátano redujo significativamente la adherencia bacteriana de las cepas bacterianas 9 y 12 a las células I-407. No se puede observar diferencia significativa para la cepa 14, aunque se observó adherencia limitada para esta cepa en la presencia o ausencia de fibra soluble.

25 1.2.4.3 **Inhibición de invasión bacteriana por plátano:** La Figura 5 ilustra que la invasión bacteriana se reduce por la pre-incubación de cada una de las tres cepas bacterianas (cepas 9, 12 y 14 de la Tabla 2) con fibra soluble de plátano.

25 13 Discusión

30 Estos datos demuestran que IBD, tal como la enfermedad de Crohn se asocia con un aumento de la prevalencia de la *E. coli*. asociada a la mucosa. Estas *E. coli*. carecieron de genes de patogenicidad conocidos pero incluyen una alta proporción que expresan hemaglutininas que les permiten adherirse, e invadir, las líneas de células epiteliales intestinales. Los inventores creen que la naturaleza adherente e invasiva de la bacteria causa una afección inflamatoria y caracterizan de ese modo a la IBD

35 Los inventores establecieron un enlace entre IBD y la capacidad para aglutinar de las bacterias de los individuos con IBD. Por lo tanto, razonaron que la unión de las bacterias en IBD debe estar regulada por los carbohidratos y probaron muchos oligosacáridos para evaluar si pueden o no inhibir los efectos negativos de *E. coli* en IBD. La mayoría de los azúcares/oligosacáridos probados falló para modular las bacterias. Sin embargo, de manera sorprendente, la fibra soluble de plátano inhibió la *E. coli*. Esto condujo a los inventores a comprender que la fibra soluble de acuerdo con la invención comprende oligosacáridos que modifican las bacterias para uso terapéutico en IBD tal como la enfermedad de Crohn.

40 Se apreciará que estos datos sugieren que la fibra soluble de acuerdo con la invención será útil también para tratar o prevenir el desarrollo de otras afecciones gastrointestinales que se pueden caracterizar por la adhesión e invasión

bacteriana (por ejemplo, cáncer de colon, enfermedad diarreica/infecciones, gastroenteritis o enfermedad de almacenamiento del glucógeno Tipo 1.

Ejemplo 2: Producción de un polvo de fibra soluble de plátano para uso de acuerdo con la invención.

250g de pulpa de plátano picada se vertió en 1,000ml de ebullición y después se trató como se describió en 1.1.12.1. El rendimiento de la fibra soluble liofilizada (1.1.12.2) fue aproximadamente de 4,0g.

Ejemplo 3: Producción de una mezcla de polvo de fibra soluble de plátano para uso de acuerdo con la invención

3,0g de polvo liofilizado de fibra soluble (Ejemplo 2) se mezcló con 0,5g de ácido cítrico en polvo, 26,3g de azúcar granulada y 0,2g de una mezcla de saborizante estándar secada por aspersión.

Esta mezcla representa una formulación en polvo sin fluidez (que contiene 3,0g de fibra soluble) que es adecuada para envasar en un sachet. La mezcla en polvo se puede diluir hasta gustar y beber cuando sea requerido por un individuo que sufre de cáncer de colon.

Ejemplo 4: Producción de una mezcla de polvo alternativa de fibra soluble de plátano para uso de acuerdo con la invención

3,0g de polvo de fibra soluble secado por aspersión (Ejemplo 1.1.12.1) se mezcló con 0,5g de ácido cítrico en polvo, 26,3g de azúcar granulada y 0,2g de una mezcla de saborizante estándar secado por aspersión

Esta mezcla representa una formulación en polvo sin fluidez (que contiene 3,0g de fibra soluble) que es adecuada para envasar en un sachet. La mezcla en polvo se puede diluir hasta gustar y beber cuando sea requerido por un individuo que sufre de cáncer de colon.

Ejemplo 5: Producción de una bebida de naranja para uso de acuerdo con la invención

- (a) 100ml de preparación cruda (preparada de acuerdo al método 1.1.12.2) se mezcló con 100ml de jugo de naranja doble concentrado (jugo de naranja concentrado diluido en agua hasta el doble de fuerza).
- (b) 3,5g de polvo liofilizado (preparado de acuerdo con el método 1.1.12.1) se disolvió en 100ml de jugo de naranja (o, como alternativa, con jugo de naranja concentrado y agua).
- (c) 2,5 g de polvo liofilizado (preparado de acuerdo con el método 1.1.12.3) se disolvió en 100 ml de jugo de naranja (o, como alternativa, con jugo de naranja concentrado y agua).

Las preparaciones de la bebida de naranja (a, b o c) se pueden consumir inmediatamente por un individuo, refrigerar para consumo posterior o sellar en una botella o cartón para una vida útil más larga.

Se apreciará que el jugo de naranja se puede sustituir fácilmente con una alternativa grata al paladar.

Ejemplo 6: Producción de una formulación líquida nutritiva que contiene fibra soluble de plátano para uso en la alimentación enteral

Una mezcla líquida nutritiva se puede producir para su uso en la alimentación enteral en la que el contenido total del NSP (método como en el Ejemplo 1.1.12.1) está entre 0,1 y 10% del contenido total de materia seca de la mezcla de alimentación. Para la alimentación enteral de los individuos el NSP puede mezclarse con solución salina o una solución acuosa, y se pueden incluir otras vitaminas, minerales y nutrientes cuando sea requerido. Las formulaciones líquidas entéricas de este tipo se pueden envasar en bolsitas (por ejemplo, que contienen 100ml-2,000ml) para uso en un goteadero o para la inserción en una bomba de alimentación.

Ejemplo 7

Experimentos adicionales (siguiendo los protocolos descritos en el Ejemplo 1) se llevaron a cabo para probar la eficacia de la fibra soluble de acuerdo con la invención que se preparó homogeneizando/extrayendo la fibra a pH 7 (columna 3 de la Tabla 4); calentando la solución a 40°C ó 100°C (columna 4 de la Tabla 4); tratando la solución calentada para eliminar el almidón (columna 5 de la Tabla 4); aislando la fibra soluble (columna 3 de la Tabla 4).

Tabla 4

Número del Tubo	2 gramos de muestra	pH de Extracción	Temperatura de Extracción	Tratamiento enzimático (1h)	Precipitación etanólica (Sobrenadante desechado)	Título de Aglutinina (6=+ en 1/64 ediln)
A	HM 233 (aislamiento UC)					6
1	Pulpa de plátano	7	40°C	Cero	80%	4
2	Pulpa de plátano	7	40°C	Termamil	80%	0
3	Pulpa de plátano	7	40°C	Cero	Cero	0
4	Pulpa de plátano	7	100°C	Pancreatina	80%	0
5	Pulpa de plátano	7	100°C	Pancreatina	Cero	1
6	Pulpa de plátano	7	100°C	Termamil	80%	0
7	Pulpa de plátano	7	100°C	Termamil	Cero	0
8	Banana cruda	N/A		Cero	Cero	0
9	Plátano crudo	N/A		Cero	Cero	2

Número del Tubo	Muestra	pH	Temperatura	Tratamiento enzimático	Precipitación etanólica	Título de Aglutinina
A	Infección Control (233:UC)					6
5B	Blanco	7	100°C	Pancreatina	80%	5
6B	Blanco	7	100°C	Pancreatina	Cero	5
7B	Blanco	7	100°C	Termamil	80%	5.5
8B	Blanco	7	100°C	Termamil	Cero	6

5

El volumen final es aproximadamente 10ml correspondiéndose con 200 mg de pulpa de plátano por ml.

10

Los datos ilustrados en la Tabla 4 demuestran que la fibra soluble derivada de plátano y preparada como se describió en la presente descripción (es decir, Tubos 1-7) tuvo eficacia para reducir la aglutinación bacteriana. Este efecto es indicativo para un experto de que la fibra soluble es útil para la prevención o tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Los Tubos 8 & 9 fueron el control positivo mientras que los tubos A y 5B-8D representan controles negativos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para el uso en la prevención o tratamiento de cáncer de colon que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una fibra soluble derivable del fruto de la *Musa* spp.
2. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde la fibra soluble se deriva de una solución acuosa que se decanta del fruto homogenizado.
- 10 3. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en donde la fibra soluble se deriva de la ebullición del fruto.
4. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3 en donde la fibra soluble se trata para eliminar el almidón.
- 15 5. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 4 en donde el almidón se elimina mediante la digestión enzimática del almidón.
6. La composición para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en donde la fibra soluble se deriva del precipitado de una solución acuosa tratada con etanol.
- 20 7. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6 en donde la solución acuosa se somete a una etapa de precipitación con etanol al 80%.
- 25 8. La composición para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la fibra soluble se obtiene al:
- 30 (1) cortar el fruto fresco y eliminar las cáscaras y colocar en una solución acuosa; o liofilizar el fruto entero (excluyendo las cáscaras); molerlo y colocarlo dentro de una solución acuosa; moler el fruto disecado y colocarlo en una solución acuosa; o tomar la harina preparada a partir del fruto y colocar en una solución acuosa;
- (2) tomar la solución de (1) y calentar para gelatinizar el almidón y dispersar cualquiera de los gránulos de almidón;
- (3) enfriar la solución calentada (2) e hidrolizar con enzimas de digestión del almidón para asegurar que se elimina todo/mayoría del almidón;
- 35 opcionalmente, la solución (3) se puede precipitar después y lavar con etanol al 80% y centrifugar; el sobrenadante alcohólico se desecha después y el residuo se liofiliza o seca por aspersion.
9. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 8 donde la fibra soluble se obtiene al:
- 40 (a) liofilizar y moler el fruto entero pelado;
- (b) hervir el material molido para gelatinizar cualquier almidón y dispersar cualquier gránulo de almidón;
- (c) hidrolizar con amilasa el almidón en el material;
- (d) precipitar y lavar el material con etanol y liofilizar o secar por aspersion para producir un residuo; y
- 45 (e) reconstituir el residuo liofilizado o secado por aspersion, hervir y centrifugar; en donde el sobrenadante de la centrifugación (e) comprende la fibra soluble.
10. La composición para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en forma de polvo.
- 50 11. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 10 en donde el polvo comprende el residuo seco de la reivindicación 9(d) o el sobrenadante de la reivindicación 9(e), que se seca por aspersion o liofiliza.
12. La composición para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende además al menos un saborizante, azúcares, edulcorante, anti-oxidantes, minerales o vitaminas.
- 55 13. La composición para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la fibra soluble es del fruto de la *Musa* spp.
14. Un uso de la fibra soluble derivable del fruto de la *Musa* spp. para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento del cáncer de colon.
- 60 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 en donde el medicamento es una composición de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-13 en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

ES 2 390 617 T3

16. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 ó 15 en donde el medicamento es un líquido, cápsula o comprimido para el consumo oral.
- 5 17. Un producto nutritivo para el uso en la prevención o tratamiento de cáncer de colon que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una fibra soluble derivable del fruto de la *Musa* spp.
18. Un producto nutritivo para el uso de acuerdo con la reivindicación 17 en la forma de un trago o bebida.
- 10 19. El producto nutritivo para el uso de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende entre 1g/100ml y 30g/100ml de la fibra soluble.
20. Un producto nutritivo para el uso de acuerdo con la reivindicación 17 en forma de un polvo o mezcla de polvo.
- 15 21. Un producto nutritivo para el uso de acuerdo con la reivindicación 17 en la forma de una barra alimenticia u otro producto alimenticio sólido.

FIGURA.3

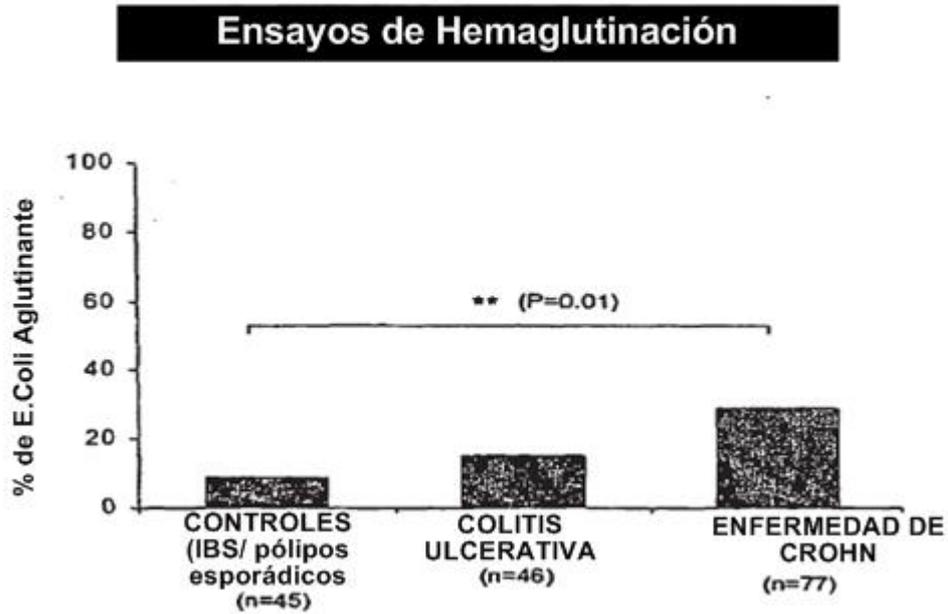


FIGURA.4

Comparación entre adherencia e invasión de aglutinadores y no aglutinadores

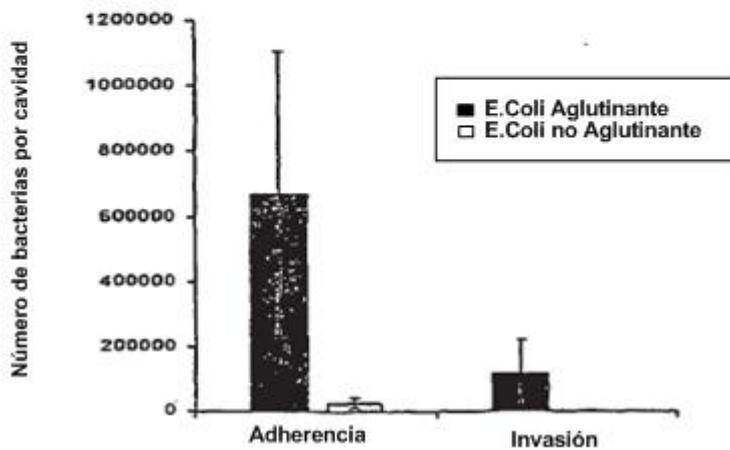


Figura. 5

Efecto del Plátano en la adherencia bacteriana a las células I-407

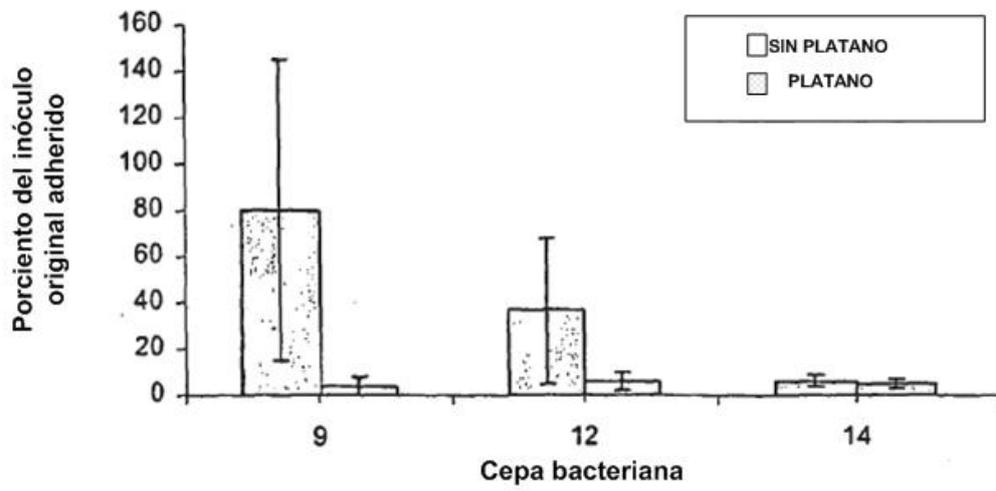


Figura. 6

