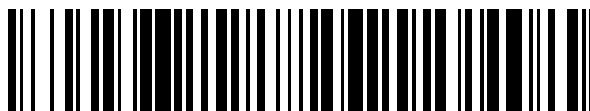


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 136**

51 Int. Cl.:

A61K 31/445	(2006.01) A61P 37/04	(2006.01)
A61K 31/7008	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)
A61K 31/7048	(2006.01)	
A61K 36/605	(2006.01)	
A61K 36/70	(2006.01)	
A61K 36/815	(2006.01)	
A61K 36/77	(2006.01)	
A61K 36/48	(2006.01)	
A61K 36/04	(2006.01)	
A23L 33/105	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2014** **PCT/EP2014/052802**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014** **WO14125013**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2014** **E 14704342 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 2956136**

54 Título: **D-fagomina para prevenir la aparición de enfermedades autoinmunes**

30 Prioridad:

18.02.2013 EP 13155586

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

30.04.2019

73 Titular/es:

PUMAROLA SEGURA, SERGIO (100.0%)
C/Tavern, 17-19
08006 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

PUMAROLA SEGURA, SERGIO;
ANTOLIN MATÉ, MARÍA, CARMEN;
LLOPIS PAGÉS, MARTA y
CALVO TORRAS, MARIA, DE LOS ANGELES

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 711 136 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

D-fagomina para prevenir la aparición de enfermedades autoinmunes

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de productos nutraceuticos o agentes funcionales con capacidad inmunoestimulante para desencadenar mecanismos de la respuesta inmunitaria a nivel mucosal. Más específicamente, se refiere al uso del compuesto D-fagomina como agente inmunoestimulante de la respuesta inmunitaria innata en la mucosa y para la prevención o profilaxis de la aparición de enfermedades autoinmunes por la estimulación del sistema inmunitario innato a nivel mucosal. La invención también se refiere a una composición que comprende D-fagomina para el uso al que se hace referencia anteriormente, tal como se define en las reivindicaciones.

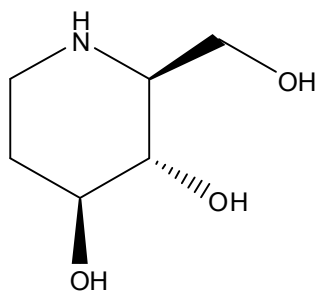
15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los productos nutraceuticos son productos derivados o aislados de fuentes naturales o alimentarias que proporcionan un beneficio para la salud de los individuos que los consumen o que previenen o retrasan la aparición de determinados trastornos o enfermedades, además del valor nutricional básico de los mismos. Esta es la razón por la que los consumidores reclaman cada vez más esta clase de productos y por la que la investigación y el desarrollo en el campo de los productos nutraceuticos se está volviendo más y más importante en la industria alimentaria, farmacéutica y veterinaria.

La investigación en el campo de los productos nutraceuticos y alimentos funcionales está dirigida a diferentes líneas, tales como la identificación y el desarrollo de microorganismos que pueden conferir un beneficio saludable en el hospedador, conocidos comúnmente como probióticos, o el aislamiento de sustancias o compuestos naturales presentes en productos naturales o alimentarios que ejercen un efecto beneficioso sobre la salud de la persona que los consume.

Uno de los compuestos naturales que han demostrado tener efectos beneficiosos en la salud es la D-fagomina.

La D-fagomina (2R, 3R, 4R)-2-hidroximetilpiperidina-3,4-diol, es un iminociclitol natural, una piperidina polihidroxilada que fue aislada por primera vez a partir de semillas de alforfón de *Fagopyrum esculentum* Moench y más tarde a partir de otras fuentes vegetales, tales como mora (*Morus alba*, Moraceae), goji (*Lyceum chinense*), *Castanospermum australe*, hojas de *Xanthocercis zambesiaca* y hojas de *Morus bombycis*. La D-fagomina (2R, 3R, 4R)-2-hidroximetilpiperidina-3,4-diol se muestra en la fórmula a continuación.



Entre otras funciones, se ha enseñado que la D-fagomina disminuye la glucemia posprandial sin estimular la secreción de insulina (Gómez L. et ál. Br. J. Nutr. 2012 Jun; 107(12):1739-46). Como tal, la D-fagomina se ha propuesto como un útil ingrediente dietético o componente de alimento funcional para reducir los riesgos para la salud asociados con una ingesta excesiva de hidratos de carbono de digestión rápida.

El documento WO201117362 divulga la capacidad de la D-fagomina de inhibir la adherencia bacteriana a la superficie mucosa. Puesto que la adherencia bacteriana a la mucosa es un importante prerrequisito para la colonización e infección, la D-fagomina se considera un agente valioso para la prevención y/o el tratamiento coadyuvante de una infección bacteriana. Además, este documento divulga que la D-fagomina también es útil para prevenir el desequilibrio de la microflora causado por bacterias patógenas respiratorias, orales o entéricas. Este efecto se debe al hecho de que la D-fagomina se adhiere a bacterias dañinas, tales como determinadas cepas del género *Escherichia*, *Salmonella* o *Streptococcus*, pero no a las saludables, tales como lactobacilos o bifidobacterias. En este sentido, las bacterias saludables tienen más tendencia a implantarse en la mucosa que las patógenas.

La investigación realizada (Gómez L, et ál.), también confirma que la D-fagomina no muestra actividad antimicrobiana, lo que quiere decir que, aunque hay un efecto específico sobre la adhesión de algunas bacterias, la viabilidad de estas bacterias no está afectada por la presencia de la D-fagomina. Otros documentos de la técnica anteriores también se refieren a la función biológica de la D-fagomina y sus derivados N-alkilados (Castillo J.A. et ál.: "Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-fagomine; N-alkylated derivatives, and

preliminary biological assays" Organic letter 2006 vol. 8 (26): 6067-6070). Castillo J.A et ál. describe que la D-fagomina y los derivados N-alkilados C₄, C₆, C₈, C₉ y Ph-CH₂ no muestran actividad antimicrobiana. CN-A-1 663448 divulga composiciones, tales como tabletas efervescentes o bebidas, conteniendo semillas de *Fagopyrum esculentum*, que mejoran la inmunidad en las personas.

Ahora, los autores de la presente invención han hallado una nueva función biológica de la D-fagomina. En particular, han descubierto que la D-fagomina tiene la capacidad para desencadenar mecanismos de respuesta inmunitaria innata a nivel de la mucosa. La mejora de los mecanismos de respuesta inmunitaria innata ayuda a los individuos a prevenir y reducir las infecciones de microorganismos patógenos potenciales cerca de la mucosa. Adicionalmente, esta mejora de los mecanismos naturales de la protección del sistema inmunitario innato a nivel de mucosa evita la sobreactivación no deseable de la respuesta inmunitaria humoral, que es el segundo nivel de defensa que aplica frente a los microorganismos. Dicha respuesta inmunitaria humoral, que se lleva a cabo por el sistema inmunitario adaptativo, es generalmente más potente y sistémica. Su sobreactivación contribuye a la aparición de situaciones de inflamación subclínica crónica.

La mejora de la respuesta inmunitaria innata es pertinente no solo para mantener bajo control bacterias, sino también virus y otros parásitos.

Se considera que los microorganismos mantienen el correcto nivel de actividad en nuestro sistema inmunitario innato. Se ha propuesto que un desarrollo anormal del sistema inmunitario y, en particular, del sistema inmunitario innato, da como resultado una predisposición incrementada a enfermedades autoinmunes. La enfermedad celíaca, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, por ejemplo, se han relacionado con esta respuesta anómala. La ausencia o el funcionamiento defectuoso de la respuesta inmunitaria innata contribuyen a la sobreactivación de la respuesta inmunitaria humoral que puede dar como resultado respuestas autoinmunes perjudiciales no controladas. Se han identificado hasta 100 tipos de enfermedades autoinmunes, incluyendo asma, esclerosis múltiple, lupus, artritis reumatoide y psoriásica, y diabetes.

También se considera que la inflamación subclínica crónica derivada de una interacción alterada entre la microbiota intestinal y el hospedador potencia la respuesta inflamatoria humoral, y se estima que es la causa que controla la tasa de progresión del síndrome metabólico y otras enfermedades, tales como obesidad, hipertensión, diabetes de tipo II, esteatosis hepática, Alzheimer o cáncer (p.ej. mama, colon).

Es entonces de gran interés descubrir nuevas maneras de reforzar de manera natural la respuesta inmunitaria innata al nivel mucosal local, disminuyendo, al mismo tiempo, el riesgo de una respuesta inmunitaria humoral potente no deseable.

El sistema inmunitario innato representa la primera línea de defensa del organismo y comprende las células y mecanismos que defienden al hospedador de infección por otros organismos de una manera no específica. Esto quiere decir que las células del sistema innato reconocen y responden a patógenos de un modo genérico, pero, a diferencia del sistema inmunitario adaptativo, no confiere inmunidad protectora o permanente al hospedador. Los sistemas inmunitarios innatos proporcionan defensa inmediata frente a la infección. Está formado por diferentes tipos de células, tales como mastocitos, fagocitos (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas), basófilos y eosinófilos y linfocitos citolíticos naturales (células NK), así como por mecanismos bioquímicos, tal como el sistema de complemento.

Las funciones principales del sistema inmunitario innato de los vertebrados incluyen:

- a) Reclutar inmunocitos a sitios de infección, a través de la producción de factores químicos, incluyendo mediadores químicos especializados, llamados citocinas.
- b) Activación de la cascada del complemento para identificar bacterias, activar células y promover la eliminación de células muertas o complejos de anticuerpos.
- c) La identificación y retirada de sustancias extrañas presentes en órganos, tejidos, la sangre y linfa, mediante glóbulos blancos especializados.
- d) Activación del sistema inmunitario adaptativo a través de un proceso conocido como presentación de antígeno.
- e) Actuar de barrera física y química frente a agentes infecciosos.

La presente invención se basa en la demostración hecha por los inventores de que las células del sistema inmunitario innato presentes en la mucosa liberan citocinas, tal como TNF- α , en presencia de la D-fagomina.

La potenciación de la respuesta inmunitaria innata en la mucosa representa un mecanismo natural de protección frente a los patógenos, ya que mantiene una defensa natural que evita desencadenar la respuesta más potente, agresiva y sistémica del sistema inmunitario adaptativo frente a patógenos capaces de evitar u ocultarse a las defensas naturales de la mucosa. La presencia de un sistema inmunitario innato "activado" evita desencadenar mecanismos de respuesta aguda frente a determinadas bacterias patógenas tan adaptadas al medio que con el transcurso del tiempo son responsables de procesos inflamatorios subclínicos crónicos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: representa la recuperación de E.coli 434 de la mucosa del colon. Se usó un control negativo sin adición de E.coli a la preparación. Se usó como control positivo una muestra con E.coli pero sin D-fagomina. Además, se sometieron a prueba tres muestras diferentes de E. Coli con D-fagomina a diferentes dosis (50, 500 y 5000 µg/ml). Los resultados demuestran que la D-fagomina tiene propiedades antiadherentes frente a E.coli de una manera dependiente de la dosis.

Figura 2: representa la liberación de TNF-alfa por las células del sistema inmunitario innato presentes en la mucosa del colon. La TNF se midió a partir del sobrenadante. Como en la figura 1, se usó el control negativo sin adición de E.coli a la preparación y el control positivo con E.coli pero sin D-fagomina. De nuevo, se sometieron a prueba tres muestras diferentes de E.coli con D-fagomina a diferentes dosis (50, 500 y 5000 µg/ml). Los resultados demuestran que la D-fagomina tiene la capacidad de estimular la liberación de TNF-alfa y que cuanto más baja sea la dosis más potente es dicha liberación. Esta es una indicación directa de que la D-fagomina tiene un efecto inmunoestimulante sobre el sistema inmunitario innato que ayuda al sistema inmunitario a detectar y atacar microorganismos a nivel de mucosa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier materia que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos.

Un primer aspecto de la invención se refiere al compuesto D-fagomina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una sal veterinaria del mismo o una sal comestible del mismo, para su uso en la prevención de la aparición de enfermedades autoinmunes por la estimulación del sistema inmunitario innato a nivel mucosal.

La inmunoestimulación del sistema inmunitario innato a nivel mucosal tiene la ventaja de que disminuye la incidencia de respuestas inmunitarias humores más potentes y potencialmente perjudiciales. Como tal, la D-fagomina ayuda a prevenir la aparición de enfermedades autoinmunes, tales como diabetes, psoriasis, síndrome metabólico, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, polimialgia o artritis reumatoide. También se revela que D-fagomina reduce la progresión de enfermedades relacionadas con una respuesta inflamatoria humoral anómala, como es el síndrome metabólico y otras enfermedades, tales como obesidad, hipertensión, diabetes de tipo II, esteatosis hepática, Alzheimer o cáncer (p.ej. mama, colon).

Las sales de D-fagomina que se pueden usar dentro del contexto de la presente invención son sales de tartrato, hemitartrato, citrato, hemicitrato, clorhidrato, malato, o acetato.

Se ha demostrado que la D-fagomina produce una respuesta inmunoestimulante del sistema inmunitario innato a nivel de mucosa, que es la primera barrera que los patógenos se encuentran en el proceso infeccioso. La D-fagomina activa la respuesta del sistema inmunitario innato a nivel de todos los tipos de la mucosa, a saber, la mucosa oral, la mucosa esofágica, la mucosa gástrica, mucosa entérica, la mucosa colónica, la mucosa nasal, la mucosa bronquial, la mucosa uretral o la mucosa uterina.

En un modo de realización particularmente preferente la respuesta de activación del sistema inmunitario innato tiene lugar en la mucosa nasal. La activación de la respuesta inmunitaria innata en la mucosa nasal es favorable como coadyuvante para mejorar la eficacia de la vacuna nasal frente a una bacteria como *Streptococcus pneumonia* o virus como la gripe. En otro modo de realización particularmente preferente, la respuesta de activación del sistema inmunitario innato tiene lugar en la mucosa entérica. La activación de la respuesta inmunitaria innata en la mucosa entérica es favorable como coadyuvante para mejorar la eficacia de la vacuna oral frente a algunos microorganismos, tales como cepas de vibrión, tuberculosis o virus de la poliomielitis.

En el modo de realización más preferente, la respuesta de activación del sistema inmunitario innato tiene lugar a nivel de la mucosa del colon. El uso de D-fagomina es especialmente interesante para desencadenar localmente la respuesta inmunitaria innata a nivel del colon por diferentes razones. Una primera es que el colon es una de las regiones con una concentración más abundante y con más presencia de bacterias y también una de las regiones con la presencia de patógenos más oportunistas, incluyendo E coli que es omnipresente en seres humanos. En este sentido, el colon es también una de las regiones más sensibles y con más probabilidad de infección, por tanto, es importante que el sistema inmunitario innato se active y esté bajo vigilancia a este nivel del tubo gastrointestinal. La segunda razón es que, aunque otra clase de hidratos de carbono puede tener una clase similar de actividad inmunoestimulante del sistema inmunitario innato, normalmente no llegan al colon, ya que se consumen o degradan por las bacterias entéricas durante su tránsito a través del tubo gastrointestinal. Por el contrario, la D-fagomina es un iminoazúcar que no se puede metabolizar por las bacterias entéricas y como tal es capaz de llegar al colon, donde puede ejercer su función inmunoestimulante a nivel local, incluso a concentraciones muy bajas.

De hecho, aunque la presencia de la D-fagomina en concentraciones de 5000 µg/ml o menos sea suficiente para producir un efecto inmunoestimulante del sistema inmunitario innato en la mucosa, sorprendentemente se ha observado que cuanto más baja sea la concentración de D-fagomina más potente es la respuesta inmunitaria innata. De hecho, en un modo de realización preferente, se usa D-fagomina en concentraciones de 500 µg/ml o menos. En

un modo de realización todavía más preferente se usa D-fagomina en concentraciones de 50 µg/ml o menos. En concentraciones de 50 µg/ml o menos, la producción de la citocina TNF-α se incrementa sorprendentemente. La producción de TNF-α es una indicación de la activación del sistema inmunitario innato, es decir, de la inmunestimulación del mismo.

5 Como un agente capaz de mantener el sistema inmunitario innato en “alerta”, el consumo regular de D-fagomina contribuye a la profilaxis y prevención de procesos inflamatorios relacionados con patógenos oportunistas. En particular, puede ser muy útil para prevenir situaciones de inflamación crónica o subcrónica causadas por bacterias capaces de escapar del sistema inmunitario por la formación de biopelículas que pueden ocultar las colonias del sistema inmunitario. Esta clase de situación tiende a facilitar la infección y desencadena respuestas inmunitarias no solo a nivel mucosal, sino también a nivel serosal. La existencia de este tipo de respuestas serosales es el origen del estado inflamatorio crónico.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende D-fagomina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una sal veterinaria de la misma o una sal comestible de la misma, y al menos un aditivo para su uso como un agente inmunestimulante del sistema inmunitario innato a nivel mucosal y como agente para la prevención de la aparición de enfermedades autoinmunes por la estimulación del sistema inmunitario innato a nivel mucosal.

15 Las sales de D-fagomina que se pueden usar en la composición de la invención son sales de tartrato, hemitartrato, citrato, hemicitrato, clorhidrato, malato, o acetato.

20 La composición para su uso en la invención puede estar en forma sólida o en forma de una composición líquida, preferentemente una composición acuosa.

25 En el caso de composición líquida o preferentemente acuosa, la D-fagomina está en una concentración de 5000 µg/ml o menos, preferentemente de 500 µg/ml o menos, y más preferentemente de 50 µg/ml o menos.

30 La D-fagomina para su uso en la composición de la invención puede ser sintética o puede ser de origen natural, en forma de extracto enriquecido a partir de una fuente natural. En el caso de un extracto enriquecido a partir de fuentes naturales, la D-fagomina preferentemente se extrae o se produce en alimentos a partir de semillas de *Fagopyrum esculentum* o *Fagopyrum tataricum*, hojas de *Morus bombycis* o *Morus alba*, raíces de *Lycium chinense*, raíces y hojas de *Xanthocercis zambesiaca*, frutos de *Angylocalyx pinaertii*, hojas de *Baphia nitida*, semillas de *Castanospermum austral* o raíces de *Lonchocarpus latifolius*.

35 En un modo de realización particularmente preferente, la composición para su uso en la invención comprende D-fagomina de un extracto de semillas de *Fagopyrum esculentum*.

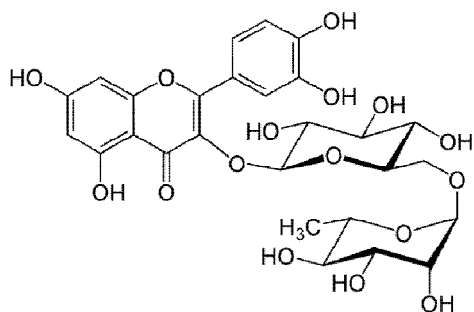
40 La composición para su uso en la invención se puede formular bien como una composición farmacéutica, veterinaria o alimentaria, siendo la última el tipo preferente de composición.

45 En un modo de realización preferente, la composición farmacéutica es un colutorio, un gel, una loción de limpieza dental líquida, una pasta de dientes, una goma de mascar, un limpiador de dentaduras postizas o una crema para la adherencia de prótesis. En un modo de realización más preferente, la composición farmacéutica es una goma de mascar.

Además, es posible usar la D-fagomina como parte de un alimento, alimento para animales de compañía y pienso con composición nutricional. La composición alimentaria para su uso en la invención también se puede presentar como un alimento o un aditivo de bebidas para producir un alimento funcional o una bebida funcional. En esta forma se puede añadir a productos alimentarios líquidos o concentrados o polvos, tales como leche y productos líquidos similares a la leche, diversas bebidas, incluyendo zumos, refrescos, bebidas para deportistas, bebidas alcohólicas, y similares. Es especialmente útil tener una composición de D-fagomina para su uso en la invención como parte de un alimento para un lactante, preferentemente como parte de una fórmula para lactantes. Además, cuando la composición de D-fagomina procede de un extracto purificado de alforfón (*Fagopyrum esculentum*) puede ser parte de una cerveza, cerveza sin alcohol, bebida similar al té, bebida similar a la leche, yogur, pasta, galletas, pastas, barras de cereales, granos inflados, pan, crepes, tartas, cremas, postres, cereales del desayuno y otros. La composición alimentaria o aditivo de alimentos para su uso en la invención también se puede producir de un modo natural, p.ej., teniendo un animal doméstico tal como una vaca u otro animal que produzca D-fagomina en su leche. Esto se puede lograr alimentando al animal con *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum*, *Morus alba* o D-fagomina purificada.

60 En otro modo de realización, la composición para su uso en la invención también comprende rutina u otros flavonoles polifenoles en su formulación (es decir, hesperidina). La rutina es el glucósido compuesto por el flavonol quercetina y el disacárido rutinosa (α-L-rhamnopiranosil-(1→6))-β-D-glucopiranososa) y tiene la siguiente fórmula.

65



Cuando la rutina se administra por vía oral tiende a ser estable en el intestino delgado, pero rápidamente se desglucosila para liberar la quercetina a nivel del colon (Kim H. et ál. "Metabolic and pharmacological Properties of rutin, a dietary quercetin glycoside for treatment of inflammatory bowel disease" Pharmaceutical research, 2005, vol. 22 n.º 9). Se ha enseñado que la quercetina tiene efecto antiinflamatorio, en especial, en el tratamiento de estados inflamatorios crónicos, tal como la enfermedad intestinal inflamatoria y, como tal, el uso de rutina en la composición como una fuente de quercetina proporciona un efecto sinérgico en el tratamiento y la prevención de la inflamación, en especial, a nivel del colon donde, por un lado, se libera quercetina y, por otro lado, la D-fagomina puede llegar a ejercer su efecto inmunoestimulante. La presencia de rutina ayuda de alguna manera a mantener bajo control la respuesta inmunitaria desencadenada por la D-fagomina.

Además, se advierte que la rutina está presente, como la D-fagomina, en el alforfón (*Fagopyrum esculentum*) y también *Fagopyrum tataricum* que normalmente presenta cantidades más altas de rutina que *F. esculentum*. En este sentido, en el modo de realización preferente de la invención, la composición para su uso en la invención se elabora a partir de un extracto de *Fagopyrum esculentum* enriquecido en D-fagomina y rutina.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: actividad biológica de la D-fagomina en una muestra de colon humano

El objetivo de la presente investigación era determinar los efectos "ex vivo" de la D-fagomina sobre la adhesión de *E. coli* a muestras de mucosa del colon humano y su posible influencia sobre la liberación de mediadores inflamatorios en un intervalo de dosis como una indicación de la activación de la respuesta inmunitaria innata.

El enfoque incluía la incubación de una cepa de *E.coli* con muestras de la mucosa colónica obtenidas mediante intervención quirúrgica. La intención era preservar toda la estructura de muestras de mucosa incluyendo las múltiples poblaciones celulares, tales como células epiteliales y células inmunocompetentes (macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas y linfocitos), conservando todas ellas su estructura y disposición originales para las interacciones célula-célula. En otras palabras, el enfoque estaba destinado a imitar las condiciones "in vivo" de la mucosa del colon.

En el diseño del estudio se sometieron a prueba dosis de 0, 50, 500 y 5000 µg/ml de D-fagomina.

Se usaron cepas patógenas de *E coli*. Las diferencias principales de cepas patógenas de *E coli* frente a otras no patógenas están relacionadas con su capacidad para evitar el sistema inmunitario.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

CULTIVO DE ORGANOS: se obtuvieron muestras de mucosa colónica macroscópicamente normal durante la intervención quirúrgica de pacientes que se estaban sometiendo a colectomía para cáncer de colon. Las zonas libres de enfermedad se recogieron en solución salina helada y se transfirieron de inmediato al laboratorio de la Unidad de Investigación Digestiva del Hospital Vall d'Hebron (Barcelona). Después de lavar con solución salina, la mucosa se le seccionó la capa muscular y se colocaron fragmentos de entre 25 y 30 mg, superficie arriba, en pocillos de cultivo (pocillos de 15 mm de diámetro con malla de 500 µm de fondo, sistemas de cultivo Netwell, Costar, Cambridge, MA), y se orientaron de modo que la superficie epitelial estuviera boca arriba. Los filtros se suspendieron sobre podillos que contenían 1,5 ml de medio RPMI (CanSera, Rexdale, Ontario, Canadá) complementado con suero bovino fetal (FCS; Gibco-BRL, Eggenstein, Alemania) al 10 %, glutamina 2 mM y antibióticos: 100 U/ml de penicilina, 100 microg/ml de estreptomina y 50 microg/ml de gentamicina (todos de Normon, Madrid, España). Este volumen es solo para mantener la humedad de la superficie, pero no para hundir por debajo de la superficie.

Las biopsias se incubaron a 37 °C en una atmósfera del 95 % de O₂ + 5% de CO₂ y se estimularon durante 1 h con PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) e ionomicina (100/1000 ng/ml), ambos disponibles de Sigma.

A continuación, el medio se reemplazó por medio RPMI 1640 (sin glucosa) recién preparado complementado con FCS al 10 % y bicarbonato de sodio en 24 mmol/l.

La cepa de bacterias *E. coli* (10-8 CFU/ml) y la fagomina (50, 500 y 5000 µg/ml) se añadieron con cuidado a los explantes. Después de 4 h de cultivo de tejidos con *E. coli*, se recogieron los sobrenadantes para la medida de recuperación de *E. coli*, liberación de TNF-α, LDH (viabilidad) y el pH. Además, los tejidos se aclararon, homogeneizaron y sometieron a ensayo para determinar la recuperación de *E. coli* y LDH (para estudiar la viabilidad del tejido).

CEPAS DE BACTERIAS: la cepa de referencia de *E. Coli* patógena (CECT 434, (Migula 1895) Castellani y Chalmers 1919) fue proporcionada por la Dra. María Angeles Calvo (laboratorio de Microbiología, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, España).

INÓCULO de *E. coli*: el día antes del experimento con tejido, la cepa de *E. coli* se inoculó en caldo Luria Bertani (Farmacia, Hospital Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, España) a 37 °C en condiciones aerobias durante 24 h. El día del experimento las bacterias se recogieron en la fase estacionaria, los recuentos celulares en la suspensión bacteriana se estimaron mediante densidad óptica a 600 nm de absorbancia, y las bacterias se añadieron a los pocillos de cultivo de tejido en la dilución apropiada.

LAVADO del TEJIDO: a fin de cuantificar solo las bacterias *E. coli* adherentes, al final del cultivo, los tejidos se recuperaron y lavaron con 2 ml de solución salina en un mezclador orbital a velocidad baja durante 2 minutos. Después del lavado, cada tejido se homogeneizó en 1 ml de solución salina y se prepararon diluciones para cuantificar la recuperación de *E. coli* en medios selectivos de agar sólido.

RECUPERACION DE *E. coli* AL FINAL DEL EXPERIMENTO: la recuperación de sobrenadante y tejido se cuantificó de inmediato después del experimento mediante cultivo en medios sólidos selectivos para Enterobacteriaceae. Se llevaron a cabo al menos 3 diluciones diferentes para cada muestra. El número de colonias se contó manualmente 24 horas más tarde. Los resultados se han normalizado a tamaño estándar de 30 mg.

CUANTIFICACION DE TNF-α: la concentración de TNF-α en los sobrenadantes se midió usando un sistema de ensayo ELISA comercialmente disponible para la citocina humana TNF-α (Kit de análisis, e-Bioscience). La concentración de citocina se expresa como pg (TNF-α) por 30 mg de tejido.

VIABILIDAD DEL COLON: para estimar la viabilidad del tejido, se calculó la liberación de actividad de LDH (lactato deshidrogenasa) en el sobrenadante. Este procedimiento se validó por Finnie (Gut 1995). Se calculó la tasa de actividad de LDH en el sobrenadante frente a una actividad de LDH total en homogeneizados de tejido y se usó para estimar el porcentaje de tejido viable. Las muestras de tejido se homogeneizaron en Tris/HCl (100 mmol/l, pH 7,4) y los sobrenadantes se analizaron para LDH usando el procedimiento espectrofotométrico. Se evaluó la viabilidad del tejido como la liberación de LDH por mg de tejido.

ANALISIS ESTADÍSTICO: los resultados están expresados mediante la media y el EEM, o mediante datos individuales en gráficos.

RESULTADOS

Recuperación de *E. coli* en el tejido al final del experimento:

El resultado en la recuperación de *E. coli* en las muestras de tejido se proporciona en la tabla 1 y figura 1:

Tabla 1

			Control Ec	Fag 50	Fag 500	Fag 5000
E coli x 10 ⁶ Recuperación en tejido	1		8,2	4	2,4	1,6
	2			4,4	0,8	1,6
E coli x 10 ⁶ Estandarizada 30 mg	1		7,45	4,12	2,21	1,4
	2			4,31	0,9	1,55
Promedio			7,45	4,22	1,56	1,47
EEM				0,09	0,65	0,07
% de promedio frente a control			100,0%	56,6%	21,0%	19,8%
% de EEM frente a control				1,3%	8,7%	1,0%

Como se puede observar claramente, se muestra la presencia más alta de E.coli en el tejido del colon en la muestra de control y la presencia de bacterias adheridas al tejido disminuye a medida que la concentración de D-fagomina se incrementa. En otras palabras, se puede inferir que la D-fagomina tiene un efecto antiadherente frente a la E.coli en el epitelio del colon. El efecto antiadherente es más potente mientras que la concentración de la D-fagomina se incrementa.

Liberación de citocinas:

Los resultados de liberación de citocinas se muestran en la tabla 2 y la figura 2:

Tabla 2

		Control B	Control Ec	Fag 50	Fag 500	Fag 5000
TNF-alfa/ml	1	12,9	0,7	106,2	20,7	13,8
	2	25,2	0,4	98,8	18,6	5,7
mg (peso de tejido)	1	31,2	33,0	29,1	32,6	34,3
	2	26,5	33,6	30,6	26,2	31,0
TNF-alfa (1,5 ml) Estandarizada	1	18,6	0,9	164,2	28,6	18,1
30 mg	2	42,8	0,5	145,4	31,9	8,2
Promedio		30,7	0,7	154,8	30,3	13,2
EEM		8,5	0,1	6,7	1,2	3,5

Los resultados demuestran claramente que la presencia de D-fagomina tiene el efecto de estimular la liberación de TNF-alfa bien con respecto al control con E.coli o con respecto al control sin E.coli. Además, se aprecia que la liberación de TNF-alfa es dependiente de la concentración de D-fagomina. Es interesante ver que cuanto más baja sea la concentración de D-fagomina más potente es la liberación de citocinas. La liberación de TNF-alfa en la dosificación de 50 µg/ml es sorprendentemente potente, ya que induce una liberación de TNF-alfa que es 5 veces más alta que la de la dosis de 500 µg/ml y casi 8 veces más alta que la de la dosis de 5000 µg/ml.

En resumen, este ensayo demuestra que la D-fagomina induce la activación de la respuesta inmunitaria innata en una forma dependiente de la dosis y que dicha inducción es más potente a concentraciones más bajas de 50 µg/ml o menos.

Control de la viabilidad:

Los resultados de viabilidad del tejido del colon se representan en la tabla 3:

Tabla 3

	Viabilidad LDH	pH
Blanco	93,25%	7,71
Ec	94,16%	7,62
Ec Fago 50	88,20%	7,65
Ec Fago 500	91,47%	7,59
Ec Fago 5000	83,88%	7,65

Los resultados indican que el cocultivo con E.coli o fagomina no afecta a la viabilidad del tejido.

Ejemplo 2: composiciones que comprenden D-fagomina

- 5 Se prepararon las siguientes composiciones con D-fagomina:
- Bebida para beber complementada con D-fagomina (50 mg) y rutina (500 mg).
 - 10 • Comprimido complementado con D-fagomina (50 mg) y rutina (500 mg).
 - Galletas hechas de harina de *Fagopyrum esculentum* que de forma natural comprende D-fagomina, rutina y una preparación de prebióticos que contiene fibras vegetales, FOS (fructooligosacáridos) y XOS (xilooligosacáridos).
 - 15 • Cerveza sin alcohol hecha a partir de *Fagopyrum esculentum* con un contenido de 8 ppm de D-fagomina y 50 ppm de rutina.
 - Fórmula para lactantes, basada en leche de vacas alimentadas con alforfón que muestra un contenido de D-fagomina de 10 ppm.
 - 20 • Goma de mascar libre de azúcar con D-fagomina (50 mg) para estimular la respuesta inmunitaria innata en la mucosa oral y prevenir la caries y periodontitis.
 - Caramelo con D-fagomina (20 mg) como coadyuvante en procesos de infección bacteriana en la garganta o intestinos.
 - 25 • Granulado recubierto, preparación de microencapsulación con D-fagomina (50 mg) y rutina (500 mg) como aditivo para la preparación de alimentos funcionales o formulaciones farmacéuticas, para mejorar la biodisponibilidad en el colon.
 - 30 • Pulverizadores nasales con D-fagomina (10 mg) como coadyuvante para vacunas nasales en procesos de inmunización frente a *Streptococcus pneumoniae*, virus de la gripe, etc.
 - Formulación en polvo oral de 50-100 mg de D-fagomina como coadyuvante en procesos de infecciones entéricas, junto con probióticos (lactobacilos, bifidobacterias).
 - 35

REIVINDICACIONES

1. El compuesto D-fagomina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una sal veterinaria del mismo o una sal comestible del mismo, para su uso en la prevención de la aparición de enfermedades autoinmunes por la estimulación del sistema inmunitario innato a nivel mucosal.
2. El compuesto D-fagomina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sistema inmunitario innato es a nivel de la mucosa oral, la mucosa esofágica, la mucosa gástrica, mucosa entérica, la mucosa colónica, la mucosa nasal, la mucosa bronquial, la mucosa uretral o la mucosa uterina.
3. El compuesto D-fagomina para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la respuesta inmunitaria innata es a nivel de la mucosa colónica.
4. El compuesto D-fagomina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad autoinmune se selecciona entre diabetes, psoriasis, síndrome metabólico, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, polimialgia o artritis reumatoide.
5. Una composición que comprende D-fagomina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una sal veterinaria de la misma o una sal comestible de la misma, para su uso en la prevención de la aparición de enfermedades autoinmunes por la estimulación del sistema inmunitario innato a nivel mucosal.
6. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la enfermedad autoinmune se selecciona entre diabetes, psoriasis, síndrome metabólico, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, polimialgia o artritis reumatoide.
7. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición es una composición sólida o acuosa.
8. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición acuosa comprende D-fagomina en una concentración igual o menor a 5000 µg/ml.
9. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la composición acuosa comprende D-fagomina en una concentración igual o menor a 50 µg/ml.
10. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en la que la D-fagomina está en forma de un extracto enriquecido a partir de una fuente natural o un producto de química fina.
11. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la fuente natural de D-fagomina es las semillas de *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum*, hojas de *Morus bombycis* o *Morus alba*, raíces de *Lycium chinense*, raíces y hojas de *Xanthocercis zambesiaca*, frutos de *Angylocalyx pinaertii*, hojas de *Baphia nitida*, semillas de *Castanospermum austral* y raíces de *Lonchocarpus latifolius*.
12. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en la que la composición es una composición farmacéutica, veterinaria o alimentaria.
13. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, que comprende adicionalmente rutina.

% de recuperación de E.coli 434 en el tejido en relación al control

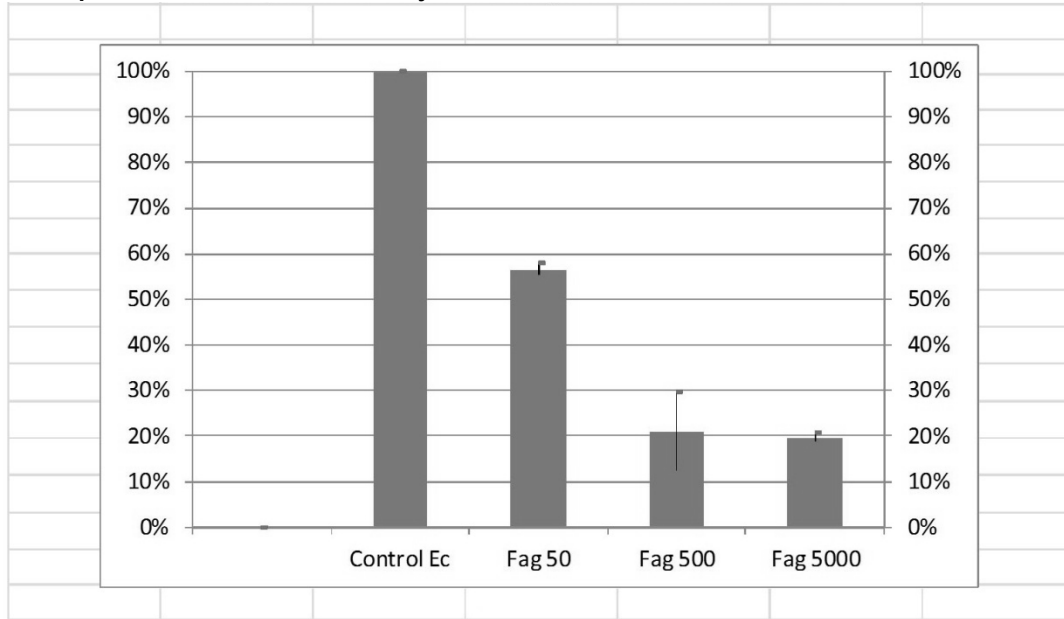


Fig. 1

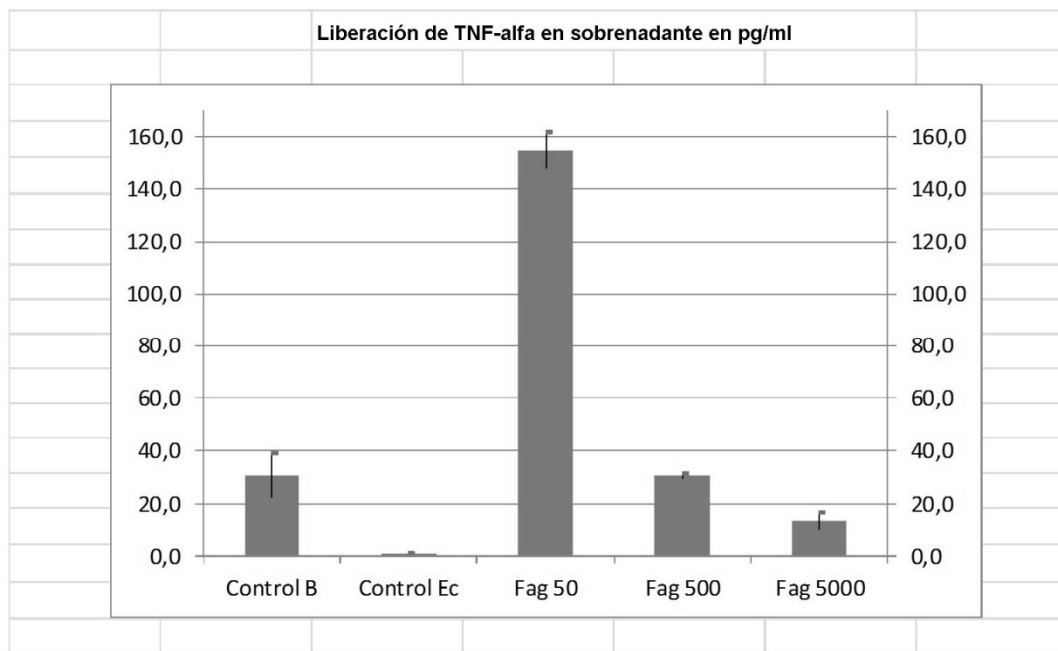


Fig. 2