

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 387**

51 Int. Cl.:

**A23L 5/00** (2006.01)

**A61K 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2014 PCT/NO2014/050061**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14175748**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2014 E 14726214 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2991507**

54 Título: **Uso de una composición que comprende aceite de pescado y zumo para el tratamiento y/o tratamiento posterior del cáncer**

30 Prioridad:

**22.04.2013 NO 20130552**

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

**08.04.2020**

73 Titular/es:

**SMARTFISH AS (100.0%)  
Gaustadallèen 21  
0349 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**MATHISEN, JANNE SANDE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 753 387 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

5      Uso de una composición que comprende aceite de pescado y zumo para el tratamiento y/o tratamiento posterior del cáncer

### Campo de la invención

10     La presente invención proporciona una composición que comprende aceite de pescado y zumo en una emulsión de aceite en agua para su uso en el tratamiento y tratamiento posterior del cáncer

### Antecedentes de la invención

15     Los posibles beneficios del aceite de pescado surgieron de la observación de que las enfermedades cardiovasculares y las tasas de incidencia de cáncer son generalmente bajas en esquimales de Alaska y Groenlandia. Estas poblaciones tienen una dieta alta en pescado y baja en carbohidratos, lo que contrasta con las dietas en Europa y América del Norte.

20     El aceite de pescado es la fuente dietética más rica de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, de sus siglas en inglés) omega-3 de cadena larga. Los ácidos grasos son los componentes básicos de las grasas dietéticas, y se almacenan sustancialmente en forma de triglicéridos. Sin embargo, el cuerpo no puede producir estos ácidos grasos y debe obtenerlos de fuentes alimenticias o de suplementos. Tres ácidos grasos componen la familia omega-3: ácido alfa-linoleico (ALA, de sus siglas en inglés), ácido eicosapentaenoico (EPA, de sus siglas en inglés) y ácido docosahexanoico (DHA, de sus siglas en inglés). ALA se encuentra en, por ejemplo, nueces, algunos tipos de judías y aceite de oliva. EPA y DHA se encuentran en el pescado, incluidos el aceite de pescado y los suplementos.

25     Los ácidos grasos omega-3 son esenciales para la vida en cualquier etapa, incluso antes del nacimiento. Son componentes básicos esenciales de la membrana de cada célula del cuerpo y su presencia es una necesidad para mantener una membrana celular adecuada. También contribuyen en la regulación de la mayoría de las funciones biológicas. Existe evidencia epidemiológica sustancial de que el consumo de pescado o de PUFA poliinsaturados n-3 de cadena larga, especialmente EPA y DHA, protegen contra las enfermedades cardiovasculares en las poblaciones occidentales. Los PUFA n-3 de cadena larga reducen las concentraciones de triacilglicerol en plasma en ayunas y reducen la respuesta lipémica posprandial. El aceite de pescado también proporciona efectos antiinflamatorios y antiagregantes que juegan un papel crucial en el tratamiento de la aterosclerosis y la trombosis.

30     Aunque se han presentado resultados convincentes donde se ha empleado omega-3 en el tratamiento de diferentes afecciones, se dispone de datos muy limitados sobre omega-3 o aceite de pescado en el tratamiento del cáncer. Hasta ahora parece que los resultados son ambiguos.

35     Sin embargo, la American Cancer Society declara que se han presentado algunos resultados prometedores con respecto al aceite de pescado y el cáncer y que estos hallazgos merecen más estudios.

40     En un estudio, un modelo de cáncer inducido por carcinógenos mostró que una alta ingesta de aceite de pescado redujo significativamente la incidencia de cáncer en estudios con animales en comparación con animales alimentados con dietas bajas en grasas o dietas altas en maíz (Welsch, CW. Cancer Res., 52:2040s- 2048s, 1992).

45     En un artículo de revisión de Gleissman H., et al., (Experimental Cell Research 316 (2010) 1365-1373), se presenta que los quimioterapéuticos convencionales se consideran "espadas de doble filo" ya que matan las células cancerosas pero también atacan a las células sanas causando morbilidad severa y algunas veces también mortalidad. Se discute además si el omega-3 en este contexto funciona como una "espada y escudo", al ser citotóxico para las células cancerosas, y al mismo tiempo protege a las células sanas de estos efectos nocivos.

50     El documento NO 324262 desvela una composición que comprende aceite de pescado y zumo poco oxidados en una emulsión de aceite en agua. El documento WO-A-2007/064222 desvela composiciones que comprenden aceite de pescado y zumo. El documento WO-A-2004/075647 desvela emulsiones comestibles. El documento WO-A-2009/120091 desvela una fórmula de bebida que comprende aceite de omega-3 marino fresco y antioxidantes.

55     De la investigación que condujo a la presente invención, se descubrió sorprendentemente que la composición que comprende aceite de pescado y zumo poco oxidado en una emulsión de aceite en agua podría usarse en la terapia contra el cáncer. Los resultados que se detallan a continuación mostraron una disminución en la proliferación de células cancerosas y un aumento en la apoptosis de células cancerosas, así como un retraso en el desarrollo del tumor después del tratamiento con una composición de la invención que comprende aceite de pescado y zumo.

### Sumario de la invención

60     La presente invención abarca una composición que comprende una combinación de aceite de pescado y zumo en una emulsión de aceite en agua, para el uso en el tratamiento y/o tratamiento posterior del cáncer, en donde dicho

aceite de pescado se selecciona de aceite de pescado que tiene un valor tottox inferior a 20 y un contenido de omega-3 superior al 10 % en peso basado en el peso total del aceite de pescado y en donde se utiliza un emulsionante adecuado para estabilizar la emulsión, de acuerdo con la presente reivindicación 1 independiente.

- 5 Las realizaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones dependientes y en la descripción detallada de la presente invención.

### Descripción de las figuras

- 10 **Figura 1.** Ilustra el efecto de una composición de la invención (Nutrifriend 1100) sobre la proliferación celular de líneas celulares de cáncer Caco-2, HT-29 y HCT116. Las células se incubaron durante 24 horas con concentraciones crecientes de la composición (Nutrifriend 1100) antes de que se midiera la proliferación celular en relación con las células de control (incubadas con medio celular). Los valores son medias con la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron con ANOVA unidireccional junto con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, utilizando el programa estadístico MINITAB 16. La significación comparada con los valores de control se estableció en  $p \leq 0,05$  (\*).

- 20 **Figura 2.** Ilustra el efecto de una composición de la invención (Nutrifriend 1100) sobre la inducción de apoptosis en la línea celular de cáncer Caco-2. Las células se incubaron durante 4 horas con concentraciones crecientes de la composición (Nutrifriend 1100) antes de que se midiera la apoptosis en relación con las células de control (incubadas con medio celular). Los valores son medias con la desviación estándar de dos experimentos independientes. Los datos se analizaron con ANOVA unidireccional junto con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, utilizando el programa estadístico MINITAB 16. La significación comparada con los valores de control se estableció en  $p \leq 0,05$  (\*).

- 25 **Figura 3.** Ilustra el efecto de una composición de la invención (Nutrifriend 1100) y dos muestras de aceite de pescado, es decir, aceite de pescado bueno y aceite de pescado oxidado, sobre la proliferación celular de las líneas celulares de cáncer Caco-2, HT-29 y HCT116. Las células se incubaron durante 24 horas con concentraciones crecientes de muestras antes de que se midiera la proliferación celular en relación con las células de control (incubadas con medio celular). Los valores son medias con la desviación estándar de tres experimentos independientes.

- 30 **Figura 4.** Ilustra los resultados de un estudio en donde ratones desnudos con xenoinjertos de neuroblastoma de SK-N-BE(2) se trataron con una composición de la invención (zumo Smartfish, Nutrifriend 2000) 15 mg/ml (los ratones recibieron aproximadamente 45 - 60 mg de EPA-DHA/día/ratones) (3 ratones, 6 tumores) o agua potable (7 ratones, 14 tumores) *ad libitum*. Los gráficos muestran el tiempo en días desde la inyección subcutánea de  $10 \times 10^6$  células, hasta que el tumor excede un volumen de 0,10 ml (A, D), 0,20 ml (B, E) o 0,30 ml (C, F). En A-C: diagramas de Kaplan-Meier y en D-E: tiempo medio con intervalo; en D: CTRL 14 (11-26) días y SF 19,5 (9-26) días, en E: CTRL 18 (12-26) días y SF 23,5 (11-26) días y F: CTRL 19,5 (15-26) días y SF 24,5 (13-26) días.

- 40 **Figura 5.** Ilustra los resultados de una prueba entre 13 pacientes con cáncer en donde se probó el sabor de una composición de la invención (Nutrifriend 1100). El sabor se puntuó de 1 a 10 (en donde 10 fueron la puntuación más alta y el mejor sabor). 7 pacientes dieron a la composición una puntuación de 9-10, 3 pacientes puntuaron la composición de 6-8 y 3 pacientes puntuaron la composición de 4-5.

- 45 **Figura 6.** Ilustra la inducción de caspasa-3 (rojo) en cultivos conjuntos de células cancerosas L3.6 con células NK (IL-2) o NK (IL-2/CD16). Se usó una composición de la invención llamada Smartfish Nutrifriend 2000 (Omega 3 identificado (DHA y EPA) en la figura. Sin Smartfish ((B) y (C)), las células MP2 (células verdes grandes) con células NK (células verdes pequeñas o núcleos azules con citoplasma residual) tienen principalmente citoplasma verde, excepto los parches naranjas que indican supervivencia. Con Smartfish, ((E) y (F)), las células cancerosas y las células NK tienen citoplasma principalmente amarillo que indica apoptosis de caspasa-3; solo unas pocas células cancerosas sobreviven en (E).

### Descripción detallada de la invención

- 55 Mediante la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que una composición que comprende aceite de pescado y zumo en una emulsión de aceite en agua podría usarse en la terapia contra el cáncer.

- 60 Sorprendentemente, se ha encontrado que el uso de una composición de acuerdo con la presente invención era un fuerte inductor de apoptosis de células cancerosas que revelaba un gran potencial en el tratamiento del cáncer.

- Además, sorprendentemente se ha encontrado que el uso de la composición de acuerdo con la presente invención contribuyó a un efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer, revelando también un gran potencial en el tratamiento del cáncer.

- 65 Un estudio adicional en un modelo animal reveló sorprendentemente un retraso en el desarrollo de tumores en

ratones que recibieron la composición de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición que comprenda aceite de pescado y zumo para su uso en el tratamiento y/o tratamiento posterior del cáncer.

5 Se describen diferentes aspectos de las composiciones que comprenden aceite de pescado y zumo en la patente noruega NO 324262, aunque se pueden emplear modificaciones adicionales de la composición en la presente invención.

10 Se ha demostrado que las composiciones de la presente invención tienen una alta estabilidad como emulsión marina y permiten una baja oxidación y mantienen los nutrientes vulnerables intactos y potentes, lo que a su vez da como resultado una mayor absorción y alta biodisponibilidad.

15 El aceite de pescado en una composición a menudo contribuye a un sabor no deseado y después del sabor del pescado. La composición para su uso en la presente invención tiene la ventaja de ser sabrosa, que es un requisito previo importante cuando se trata a pacientes con cáncer que experimentan cambios en el gusto y pérdida de apetito. La prueba ilustrada en la Figura 5 subraya el hecho de que los pacientes con cáncer hospitalizados percibieron que la composición era de buen gusto. En dicha prueba, 13 pacientes con cáncer probaron la composición con respecto al buen gusto. El sabor se puntuó de 1 a 10 (en donde 10 fueron la puntuación más alta y el mejor sabor). 7 pacientes dieron a la composición una puntuación de 9-10, 3 pacientes puntuaron la composición de 6-8 y 3 pacientes puntuaron la composición de 4-5.

20 Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que la composición desvelada en el documento NO 324262 puede usarse para el tratamiento y el tratamiento posterior del cáncer.

25 Un aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende una combinación de aceite de pescado y zumo en una emulsión de aceite en agua, para el uso en el tratamiento y/o tratamiento posterior del cáncer, en donde dicho aceite de pescado se selecciona del aceite de pescado que tiene un valor totox inferior a 20 y un contenido de omega-3 superior al 10 % en peso basado en el peso total del aceite de pescado y en donde se utiliza un emulsionante adecuado para estabilizar la emulsión.

30 El aceite de pescado puede seleccionarse de cualquier preparación de aceite de pescado de calidad apropiada, es decir, el nivel de oxidación debe ser bajo. Para tener una calidad adecuada, el nivel de oxidación dado como el valor totox (2 veces el valor de peróxido (PV, de sus siglas en inglés) añadido con el valor de anisidina (AV, de sus siglas en inglés)) debe ser inferior a 20, preferentemente inferior a 10. Dichos aceites de pescado de calidad apropiada son generalmente aceites transparentes con un olor y sabor a pescado muy suaves.

35 El contenido de ácidos grasos omega-3 difiere ampliamente en diferentes preparaciones de aceite de pescado. Se prefiere que el contenido de omega-3 sea alto. De acuerdo con las realizaciones preferidas, el contenido de ácidos grasos omega-3 en el aceite de pescado usado en la composición de la invención debe ser de al menos un 10 %, preferentemente de al menos un 16 %, o más preferentemente de más de un 30 % en peso basado en el peso del aceite de pescado.

40 Una realización preferida de la presente invención proporciona una composición en donde el contenido del aceite de pescado es aproximadamente 0,5 % -15 % en peso basado en el peso total de la composición, más preferentemente en el intervalo de 2 % - 7 %, lo más preferentemente aproximadamente un 2 %-5 %.

45 En realizaciones adicionales de la presente invención, el contenido del zumo es aproximadamente un 30 - 95 % en peso basado en el peso total de la composición. El uso puede seleccionarse entre frutas y/o bayas que tienen un alto nivel adecuado de antioxidantes. Se prefiere además que la fruta posea un nivel mínimo de iones metálicos que funcionen como agente oxidante.

50 Los zumos preferidos se pueden seleccionar del siguiente grupo: granada, albaricoque, pomelo, naranja, arándano rojo, rosa mosqueta, piña, arándano negro, morera, frambuesa amarilla, acerola, frambuesa, sandía, melocotón, uvas, cereza, yambul, manzana, mango, pera, aronia, fruta de la pasión y kiwi. Además, el zumo se puede seleccionar de remolacha, zanahoria, arándano rojo (arándano), guayaba, moras o verduras como la col rizada, espinaca, apio, perejil o pepino. Cualquier zumo adecuado para estabilizar la oxidación del aceite de pescado puede, sin embargo, utilizarse. El zumo puede prepararse mediante la adición de agua a los concentrados de zumo y al puré de zumo obteniendo un zumo normal listo para usar. El zumo también puede ser un zumo fresco prensado.

55 Para estabilizar la emulsión de aceite en agua que comprende aceite de pescado y zumo, se usan emulsionantes adecuados. Los emulsionantes adecuados se pueden seleccionar del siguiente grupo: sólidos lácteos, proteína de suero, proteína de avena y proteína de guisante. El emulsionante puede ser por ejemplo, Grindsted o Lacprodan, pero se puede emplear cualquier emulsionante adecuado. Además, la presente invención puede comprender un agente espesante que preferentemente puede ser pectina, preferentemente de avena, más preferentemente de fruta, por ejemplo, cítricos.

Además, la composición de acuerdo con la invención puede comprender yogur en polvo, leche de cáñamo en polvo, leche de almendras en polvo o leche de avena en polvo. Mediante la adición de dichos aditivos, la composición se espesa dando una consistencia atractiva. La cantidad añadida puede estar en el intervalo del 5 - 10 % en peso basado en el peso total de la composición.

En una realización, la composición comprende además vitamina D. Como ejemplo, la cantidad de vitamina D es de 1 µg a 2000 µg por dosis unitaria de 200 ml, preferentemente de 5 µg a 50 µg por dosis unitaria de 200 ml, lo más preferentemente 10 µg a 20 µg por dosis unitaria de 200 ml.

Además, a la composición de acuerdo con la invención se le pueden añadir proteínas que pueden ser favorables para pacientes que padecen cáncer y/o efectos adversos asociados al cáncer tales como caquexia.

En una realización preferida adicional de la presente invención, la composición puede comprender edulcorantes, agentes aromatizantes, antioxidantes y conservantes. El conservante y edulcorante preferidos pueden ser sorbato de potasio y xilitol, respectivamente.

En una realización, la composición no contiene ingredientes lácteos.

En una realización, a la composición no se le añade ningún antioxidante adicional no presente de forma natural.

Se ha demostrado que la composición de la invención es útil en el tratamiento y tratamiento posterior del cáncer. En un estudio, se utilizaron células de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, de sus siglas en inglés) para investigar el posible efecto apoptótico de una composición de la invención mediante el estudio de la actividad de la caspasa-3. La enzima caspasa-3 se activa en las células apoptóticas, por lo tanto, el aumento de la actividad de la caspasa-3 es una indicación directa del aumento de la actividad apoptótica.

La actividad de la caspasa-3 se estudió tanto en un ensayo enzimático como en un ensayo de inmunofluorescencia.

Los resultados del ensayo enzimático indican que la composición de la presente invención indujo la expresión de caspasa-3 a un nivel de  $9,6 \pm 1,10$  µM en células PDAC cultivadas conjuntamente con células NK. En comparación, los niveles de caspasa-3 fueron  $5,5 \pm 0,48$ ,  $6,3 \pm 0,31$  y  $6,1 \pm 0,48$  en cultivos conjuntos de PDAC similares sin ninguna estimulación, con estimulación resolvinD1 y con estimulación DHA, respectivamente. (Tabla 1)

Los resultados se confirmaron en un estudio de inmunofluorescencia que muestra un efecto significativo de la composición de la invención. Como se muestra en la Figura 6, la estimulación de un cultivo conjunto de células cancerosas L3.6 y células NK estimuladas con una composición de la invención mostró una mayor actividad apoptótica (Figura 6).

El interferón γ (IFNγ) es una citocina importante del sistema inmunitario producido entre otros por células NK, y se sabe que tiene efectos inmunoestimuladores e inmunomoduladores. En un estudio limitado, se investigaron los niveles de IFNγ en células PDAC cultivadas conjuntamente con células NK. Los resultados mostraron que IFNγ no fue producido solo por células NK sino por células NK en cultivo conjunto con células PDAC a un nivel de 158 pg/ml. La producción de IFNγ disminuyó mediante el tratamiento de una composición de la invención a 119 pg/ml. (Tabla 2)

Por lo tanto, los tipos preferidos de cáncer que pueden tratarse con la composición de la invención son el cáncer de páncreas, en particular, el adenocarcinoma ductal pancreático.

En otro estudio de líneas celulares realizado por el inventor, se usaron tres líneas celulares de cáncer de colon epitelial humano para investigar el posible efecto antiproliferativo de la composición en comparación con los aceites marinos, mediante la medición del efecto sobre la proliferación celular y la inducción de apoptosis.

Los resultados indican que la composición de la presente invención tiene un efecto antiproliferativo en las tres líneas celulares (Figura 1), y que esta inhibición de la proliferación celular se debe a una inducción de apoptosis (Figura 2). El mayor efecto se observó en la línea celular HCT116, donde una concentración de 0,7 mg/ml (con respecto al contenido de aceite) dio una disminución significativa (aproximadamente un 50 %) en la proliferación celular en comparación con las células de control. Las muestras de control de aceite de pescado no mostraron inhibición de la proliferación celular (Figura 3).

Por lo tanto, los tipos de cánceres que se tratan con la composición de la invención son cánceres colorrectales como el cáncer de colon y el cáncer de recto.

En el estudio de ratones desnudos, los ratones desnudos con xenoinjertos de neuroblastoma de SK-N-BE (2) se trataron con la composición (zumo Smartfish, Nutrifriend 2000) 15 mg/ml (los ratones recibieron aproximadamente 45 - 60 mg de EPA-DHA/día/ratones) (3 ratones, 6 tumores) o agua potable (7 ratones, 14 tumores) *ad libitum*. Los resultados muestran un claro retraso en el desarrollo del tumor en los ratones que reciben la composición en

comparación con el grupo de control que recibe agua (Figura 4).

Por lo tanto, los tipos de cánceres que se tratan con la composición de la invención son cánceres neurológicos como el neuroblastoma.

5 Otros tipos de cánceres que se tratan con la composición de la invención son cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón y cáncer de piel.

10 Incluso otros ejemplos de tipos de cáncer que pueden tratarse con la composición de la invención son cáncer suprarrenal, cáncer de ano, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, tumores cerebrales/del SNC, cáncer de mama, leucemia, linfoma, cáncer de melanoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, rhabdomyosarcoma, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, neuroblastoma, tumor de Wilms, linfoma no de Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, retinoblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon/recto, cáncer de esófago, cáncer ocular, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón, cáncer de laringe e hipofaringe, cáncer de hígado, 15 cáncer de pulmón, carcinóide pulmonar, linfoma, cáncer de mesotelioma maligno, cáncer de mieloma múltiple, cáncer nasal, cáncer de cavidad y seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, cáncer de la cavidad oral y orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, tumores pituitarios, cáncer de próstata, retinoblastoma, glándulas salivales, sarcoma, cáncer de piel, melanoma de cáncer de piel, cáncer de piel de células de Merkel, cáncer del intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides del timo, 20 sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer vulgar y macroglobulinemia de Waldenstrom.

La expresión "tratamiento del cáncer" también abarca la mejora de los efectos adversos asociados con el desarrollo del cáncer o la terapia contra el cáncer en curso, como caquexia, deficiencia de vitamina D, fatiga, estimulación del sistema inmunitario, etc. También puede incluir el tratamiento de trastornos cognitivos resultantes de la terapia 25 contra el cáncer y la reducción de la recaída.

El tratamiento posterior del cáncer de acuerdo con la presente invención puede ser el tratamiento de cualquier efecto adverso asociado con la enfermedad del cáncer *per se* o el tratamiento del cáncer.

30 El tratamiento posterior del cáncer de acuerdo con la presente invención es el tratamiento de la caquexia, deficiencia de vitamina D, fatiga o estimulación del sistema inmunitario. También puede incluir el tratamiento de trastornos cognitivos resultantes de la terapia contra el cáncer y la reducción de la recaída.

35 El apoyo nutricional durante el tratamiento y el tratamiento posterior del cáncer se usa ampliamente en la atención del cáncer. La composición de la presente invención tiene el propósito de ser un soporte nutricional de este tipo, y también además de ser una nutrición que modifica la enfermedad y, de ese modo, asegura dos dimensiones importantes en un régimen de tratamiento del cáncer, todo en una sola composición.

40 Dicho tratamiento dietético con la composición de la invención podría introducirse en protocolos clásicos de terapia contra el cáncer humano como una nueva terapia adyuvante contra el cáncer no tóxica y fácilmente aplicable sin ningún riesgo adicional para el paciente.

45 En una realización preferida adicional de la presente invención, la composición puede administrarse a una dosificación en un intervalo de aproximadamente 600 mg/día a aproximadamente 5000 mg/día de EPA y DHA, preferentemente aproximadamente 3000 mg/día, más preferentemente aproximadamente 2000 mg/día y lo más preferentemente aproximadamente 1100 mg/día. Para lograr un efecto terapéutico, la dosis puede ser menor o incluso mayor. La composición puede administrarse como una bebida en un intervalo de volumen de 50 - 300 ml, preferentemente 100 ml, más preferentemente 200 ml. La persona que necesita la composición de la invención puede beber una o varias dosis unitarias de la bebida por día. El peso corporal, etc., serán parámetros que se 50 utilizarán en el cálculo de la dosis; por lo tanto, la dosificación puede variar de un individuo a otro.

En una realización preferida de la presente invención, la composición puede ser bebible, en una cápsula o en forma de polvo.

55 En una realización adicional, la composición de la invención puede usarse como una terapia adyuvante contra el cáncer después de la cirugía, o en combinación con otros agentes terapéuticos tales como agentes quimioterapéuticos o agentes antiinflamatorios o fármacos hormonales o fármacos para prolongar la vida.

60 La expresión "en combinación" significa que la composición de la invención y el otro agente terapéutico se administran en tal cantidad y se separan por tiempos de administración tales que producen un efecto terapéutico. La composición de la invención y el otro agente terapéutico pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente para el uso en el tratamiento y/o tratamiento posterior del cáncer. La composición de la invención y el otro agente terapéutico pueden estar en forma de formulaciones separadas o formuladas juntas en una formulación combinada. Includido en "otro agente terapéutico" está la radioterapia.

65 Ejemplos de agentes quimioterapéuticos son: doxorubicina/adriamicina, epirubicina/Ellence taxanos tales como

5 paclitaxel/taxol y docetaxel/taxotere. Agentes de platino tales como cisplatino (Platinol, Platinol-AQ) y carboplatino ((Paraplatino), vinorelbina (Navelbine), capecitabina (Xeloda), doxorubicina liposomal (Doxil), gemcitabina (Gemzar), mitoxantrona, ixabepilona (Ixempra®), paclitaxel unido a albúmina (Abraxane®), eribulina (Halaven®), ciclofosfamida (Cytosan, Ceosar), foxorrubicina (Adriamicina), etopósido (VePesid), fluorouracilo (5-FU), irinotecán (Camptosar), metotrexato (Folex, Mexate, Amethopterin), paclitax topotecán (Hycamtin), Taxol, Oncovin, Vincasar PFS y vinblastina (Velban).

10 Ejemplos de agentes antiinflamatorios son los fármacos antiinflamatorios esteroideos, tales como los esteroides y los glucocorticoides. Otros ejemplos son fármacos antiinflamatorios no esteroideos, tales como ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, celecoxib y otros fármacos coxib.

15 Ejemplos de fármacos hormonales son los agonistas de la LHRH (hormona liberadora de la hormona luteinizante) como la goserelina, la leuprorelina y la triptorelina y el antagonista de la LHRH como degarelix. Otros ejemplos son los antiandrógenos esteroideos, tales como el acetato de ciproterona y los antiandrógenos no esteroideos, tales como la bicalutamida, la nilutamida y la flutamida.

Ejemplos de fármacos para prolongar la vida son los fármacos antidiabéticos como la metformina, estatinas, el ácido acetilsalicílico, tadalafil y DHEA (deshidroepiandrosterona).

20 La cantidad del agente terapéutico adicional, cuando se administra en combinación con la composición de la invención, es sustancialmente la cantidad y el régimen de dosificación habitualmente empleado por el clínico en la terapia. En cualquier caso, el médico puede variar la cantidad del fármaco adicional (o la mezcla de fármacos adicionales) según el cuadro clínico del paciente.

25 A partir de lo anterior, se puede concluir que el uso de la composición de acuerdo con la presente invención muestra efectos claros en la inhibición de la proliferación celular, aumentando la apoptosis y retrasando el desarrollo del tumor, por lo que es adecuado en el tratamiento del cáncer.

La invención se ilustrará ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

30

## Ejemplos

### Ejemplo 1

35 Se utilizaron tres líneas celulares de cáncer de colon epitelial humano. Caco-2 cultivada en DMEM que contiene FCS al 20 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. HT-29 y HCT116 cultivadas en DMEM que contiene FCS al 10 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Se usó DMEM que contenía FCS al 10 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (medio celular) para todas las líneas celulares en todos los experimentos.

40

Muestras:

- 45
1. La composición de la presente invención (Nutrifriend 1100) que contiene zumo de fruta (de manzana, pera, granada, aronia, fruta de la pasión), aceite de pescado (7 mg/ml), proteína aislada de la leche, pectina, aroma de jaca, extracto de romero, vitamina E, vitamina D y lecitina de soja.
  2. Aceite de pescado bueno (no oxidado) de salmón, PV 3 y AV 2 (7 mg/ml en una emulsión FCS y DMSO)
  3. Aceite de pescado oxidado de salmón, PV 15 y AV 13 (7 mg/ml en una emulsión FCS y DMSO)

50 Los aceites de pescado se prepararon como una emulsión en la misma concentración que el aceite de pescado usado en la composición de la invención (Nutrifriend 1100) antes de la adición a las células como sigue: Se mezclaron 7 mg de aceite con 10 µl de DMSO, se agitaron en vórtex y se sonicaron durante 10 segundos a 40 V en hielo. Luego se añadió 1 ml de FCS y la mezcla se agitó en vórtex y se sonicó durante 10 segundos a 40 V en hielo.

### Tratamiento de células y medidas de efectos antiproliferativos

55

La composición de la invención (Nutrifriend 1100) y las dos emulsiones de aceite se diluyeron en medio celular hasta las concentraciones finales (con respecto al contenido de aceite) como se muestra en la Tabla 1.

Conc. de aceite	Volumen de muestra (µl)	Volumen medio (µl)	Volumen total (µl)
0,35 mg/ml	50	950	1000
0,7 mg/ml	100	900	1000
1,4 mg/ml	200	800	1000
2,1 mg/ml	300	700	1000

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con 100 µl de medio 24 horas antes del experimento. Al comienzo del experimento, se eliminó el medio de crecimiento y se reemplazó con medio celular que contenía las muestras indicadas. Luego, se incubaron las células durante 4 horas para mediciones de apoptosis o 24 horas para mediciones de proliferación celular.

La proliferación celular se midió usando el ensayo MTT. Después de 24 horas de incubación con muestras, las células se lavaron una vez con PBS para eliminar restos de muestras, se complementaron con medio celular nuevo (100 µl/pocillo) y luego se trataron con solución convencional de MTT (15 µl/pocillo) a 37 °C durante 2 h. La tasa de proliferación celular se determinó mediante la capacidad de las células metabólicas activas para escindir la sal de sodio de tetrazolio en cristales de formazán púrpura. El medio que contiene MTT se eliminó y el precipitado púrpura celular se disolvió en HCl 0,04 M en 2-propanol (100 µl/pocillo). La absorbancia se midió a 562 nm mediante un lector de placas Nano SPECTROstar (BMG Labtech GmbH, Alemania). Cada muestra se midió en tres repeticiones en cada experimento, y los experimentos se repitieron tres veces.

Además, la línea celular Caco-2 se analizó para determinar la apoptosis utilizando el ensayo Caspase-Glo® 3/7 (Promega, Madison, WI). Este ensayo es un ensayo homogéneo y luminiscente que mide las actividades de caspasa-3 y -7 que ocurren durante la apoptosis. Se usa un tiempo de incubación más corto a medida que aumentan las actividades de caspasa-3 y -7 en la fase inicial de apoptosis. Después de 4 horas de incubación con muestras, las células se lavaron una vez con PBS para eliminar restos de muestras, se complementaron con medio celular nuevo (100 µl/pocillo) y luego se trataron con sustrato caspasa 3/7 luminógeno (100 µl/pocillo) a temperatura ambiente durante 1 hora. El sustrato de caspasa 3/7 se escinde mediante la caspasa-3/7 celular, y se libera un sustrato para la luciferasa (aminoluciferina) que da como resultado la reacción de luciferasa y la producción de luz. La luminiscencia se detectó utilizando un luminómetro de microplacas Glomax96 (Promega, Madison, WI).

Los resultados indican que la composición de la presente invención, tiene un efecto antiproliferativo en las tres líneas celulares (Figura 1), y que esta inhibición de la proliferación celular se debe a una inducción de apoptosis (Figura 2). El mayor efecto se observó en la línea celular HCT116, donde una concentración de 0,7 mg/ml (con respecto al contenido de aceite) dio una disminución significativa (aproximadamente un 50 %) en la proliferación celular en comparación con las células de control. De manera interesante y evidente a partir de la Figura 3, las dos muestras de control de aceite de pescado no inhibieron la proliferación celular.

### **Ejemplo 2**

#### **35 Ratones con tumores de xenoinjerto SK-N-BE(2) tratados con la composición (zumo Smartfish)**

Los ratones desnudos con xenoinjertos de neuroblasoma se trataron con la composición de la presente invención (zumo Smartfish, Nutrifriend 2000) con una dosificación de 15 mg/ml (los ratones recibieron aproximadamente 45 - 60 mg de EPA-DHA/día/ratones) (3 ratones, 6 tumores) o agua potable (7 ratones, 14 tumores) *ad libitum*. Como se puede observar en la Figura 4, los ratones que recibieron la composición mostraron retraso en el desarrollo del tumor en comparación con el grupo de control.

### **Ejemplo 3**

#### **45 Aumento de peso en un paciente con cáncer de mama cuando se usa la composición de la presente invención**

Un paciente con cáncer de mama (con recaída) tenía un peso corporal de 47 kg y un valor muy bajo de vitamina D. Al paciente se le presentó la composición de la presente invención (Nutrifriend 1100) y comenzó a tomar dos dosis por día (cada dosis (200 ml) comprende 1100 mg de EPA/DHA). Después de dos semanas experimentó aumento de peso y aumento del apetito. El paciente continuó aumentando de peso y había alcanzado 54 kilos después de unas pocas semanas. Además, sentía que su fuerza y vitalidad habían vuelto.

### **Ejemplo 4**

#### **55 Medición de la apoptosis mediante caspasa-3 en cultivo conjunto de células de cáncer pancreático y células NK**

Los pacientes con cáncer de páncreas tienen un pronóstico desfavorable atribuido al alto potencial de diseminación metastásica, protección por medio ambiente celular mesenquimatoso e inflamatorio denso y supresión inmunitaria con la desactivación de las células asesinas naturales (NK, de sus siglas en inglés) por las células tumorales. La curcumina ha sido probada en un ensayo clínico previo con resultados modestos. En el siguiente estudio, se ha probado una composición de la invención con o sin adición de curcumina con respecto a su potencial de estimular la muerte de células de cáncer de páncreas por las células NK.

65

**Métodos:**

**Cultivo celular:** Las células Mia Paca2 (MP2) y L3.6 de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) se obtuvieron de T. Donahue, UCLA Surgery y se propagaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DME) con suero de ternera fetal al 10 %. Se colocaron en placas 10.000 células en cada pocillo de placas de 24 pocillos y se cultivaron a 37 °C y 24 h a casi confluencia antes de la prueba.

**Células NK:** Estas se aislaron de la sangre humana mediante el kit de aislamiento de células NK (Stem cell technologies, Vancouver, Canadá). Las células NK se activaron mediante tratamiento con IL-2 o IL2/CD16 como se describe en Tseng, H. C. et al. "Increased lysis of stem cells but not their differentiated cells by natural killer cells; de-differentiation or reprogramming activates NK cells". *PLOS One* 5(7): el 1590, 2010.

**Composición de la invención - Smartfish Nutrifriend 2000.**

La composición de la invención (Nutrifriend 2000) que contiene DHA (1000 mg/200 ml) y EPA (1000 mg/200 ml) se compró por la compañía Smartfish AS, Oslo, para su uso en cultivo celular, diluida 1:2 con suero de ternera fetal, se sonicó durante 30 segundos y luego se diluyó 1:100 en DMEM con suero de ternera fetal al 10 %.

**Ensayo citocida; cultivo conjunto de células MP2 o L3.6 con células NK:** se añadieron células NK a células MP2 o L3.6 en una proporción de 5 células NK por 1 célula MP2. Los cultivos conjuntos se trataron con Smartfish. La adición de DHA (50 nM) o resolvin D1 (RvD1 de la compañía Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, 50 nM) se probaron como controles. Los cultivos conjuntos se cultivaron durante 48 horas, se cosecharon y se ensayaron mediante el ensayo de caspasa-3.

**Ensayos de caspasa-3:**

**El ensayo de caspasa-3 enzimático** se realizó mediante el ensayo de CaspACE-3 G-7351 (Promega Corporation, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Ensayo microscópico inmunofluorescente de caspasa-3:** Las células MP2 se cultivaron hasta confluencia parcial en portaobjetos de cámara de 8 pocillos (Corning) en DME con suero de ternera fetal al 10 % y se trataron 24 horas como se indicó. Luego se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se permeabilizaron con 0,25 Triton, se tiñeron utilizando la técnica indirecta con anticaspasa-3 de conejo (activo) (Genetex) a diluciones 1:200 seguido de anticuerpo de burro anticonejo 568 ALEXA-flúor (In Vitrogen) a diluciones 1:200 y FITC-faloidina (Sigma) a dilución 1:500, y se montaron usando antienturbamiento Prolong Gold con DAPI (In Vitrogen).

**Análisis estadístico:**

Los datos se analizaron mediante la comparación del intervalo de medias (media +/- 2 x error estándar de la media). Cuando se indicó el valor exacto se calculó mediante la prueba exacta de Fisher.

**Resultados:****Ensayo enzimático de caspasa-3**

La Tabla 1 muestra los resultados del tratamiento del cultivo conjunto de células de cáncer de páncreas (células MP2) y células NK con Smartfish. La adición de DHA y RvD1 se muestran como controles.

**Tabla 1**

<b>Células MP2</b>	X		X	X	X	X
<b>NK (IL-2)</b>		X	X	X	X	X
<b>RvDI</b>				X		
<b>DHA</b>					X	
<b>Smartfish</b>						X
<b>Casp-3 (uM)</b>	3,8	2,1	6	6	5,7	11
<b>X<sub>1</sub></b>						
<b>X<sub>2</sub></b>	3,5	2,1	5,4	6,3	6,6	9,1
<b>X<sub>3</sub></b>	4,1	2,4	5,2	6,6	6	9,1
<b>Media</b>	3,8	2,2	5,5	6,3	6,1	9,6
<b>Media ± 2 x D.E./ Sqrt N</b>	3,8 ± 0,31	2,2 ± 0,18	5,5 ± 0,48	6,3 ± 0,31	6,1 ± 0,48	9,6 ± 1,10
<b>Intervalo del 95 %</b>	(3,49-4,11)	(2,02-2,38)	(5,02-5,98)	(5,99-6,61)	(5,62-6,58)	(8,5-10,7)

Tal como se muestra en la Tabla 1, las células MP2 solas y las células NK estimuladas con IL-2 solas, mostraron una expresión de caspasa-3 muy baja (3,8 µM y 2,2 µM, respectivamente), mientras que en el cultivo conjunto de

células MP2 con células NK la expresión de caspasa-3 fue mayor (5,5 +/- 0,48  $\mu$ M), y se incrementó ligeramente mediante la adición de RvD1 (6,3 +/- 0,31  $\mu$ M) o DHA (6,1  $\mu$ M +/- 0,48  $\mu$ M). El tratamiento del cultivo conjunto de cáncer con células NK por Smartfish aumentó significativamente la expresión de apoptosis (9,6 +/- 1,1  $\mu$ M).

- 5 Por lo tanto, se ha demostrado que Smartfish potencia los efectos citocidas de las células NK en las células cancerosas. Smartfish potencia la apoptosis de las células cancerosas pancreáticas por las células NK.

### Resultados;

#### 10 Ensayo microscópico inmunofluorescente de caspasa-3

- La configuración experimental fue como se describe en la Figura 6. En resumen, las células NK se estimularon con IL-2 o una combinación de IL-2 y CD16. Las células NK no estimuladas sirvieron como células de control. Los dos grupos de células NK estimuladas se cultivaron conjuntamente con la línea de células de cáncer de páncreas L3.6.  
15 Las células NK de control y los cultivos conjuntos se estimularon adicionalmente con Smartfish.

#### Inmunofluorescencia:

- Los cultivos conjuntos de células cancerosas L3.6 (células cancerosas de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)) con células NK se fijaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía paraformaldehído (PFA) al 4 %, permeabilizada por 0,25 Triton X-100 (Sigma)/PBS, se tiñeron 30 minutos con una dilución predeterminada del anticuerpo primario anticaspasa 3 activo (anticuerpo de conejo anti-IgG humana GTX22302, GeneTex) a diluciones 1:200, 30 minutos con el anticuerpo secundario anticuerpo de burro fluorescente anticonejo (Alexa Fluor 568, Invitrogen) (dilución 1:200), 20 minutos por dilución 1:500 de faloidina fluorescente (488, Sigma), y  
25 se montaron en el medio de montaje acuoso con DAPI (antiturbamiento Prolong Gold; Life Technologies). Las imágenes fueron tomadas mediante microscopio de fluorescencia (Olympus) a 20x y/o 40x.

- Los resultados se exponen en la Figura 6 que muestra la inducción de apoptosis (caspasa-3-positiva = rojo) en cultivos de células de adenocarcinoma pancreático inmortalizado L3.6 (= células verdes grandes) cultivadas conjuntamente durante la noche con NK (IL-2) o células NK (IL-2/CD16) (= pequeñas células verdes o arrugadas) en un ensayo de inmunofluorescencia.  
30

- Las células NK cultivadas solas mostraron una apariencia arrugada, mientras que las células NK cultivadas con Smartfish mostraron un citoplasma verde normal, una protección indicadora de Smartfish (Panel A y D de la figura 6).  
35

- El cultivo conjunto de células NK (estimuladas con IL-2) y células cancerosas L3.6 sin o con estimulación Smartfish mostró lo siguiente: las células cancerosas L3.6 tienen citoplasma principalmente verde que indica que están sobreviviendo, mientras que el cultivo conjunto estimulado con Smartfish mostró que solo unas pocas células cancerosas están sobreviviendo y muestran citoplasma amarillo o naranja que indica su apoptosis (Panel B y F de la Figura 6).  
40

- El cultivo conjunto de células NK (estimuladas con IL2 y CD16) y células L3.6 sin o con Smartfish mostró lo siguiente: las células cancerosas L3.6 tienen citoplasma principalmente verde que indica que están sobreviviendo, mientras que el cultivo conjunto estimulado con Smartfish mostró que las células cancerosas se encuentran en un grupo que muestra apoptosis (amarillo o rojo). (Panel (C) y (E) de la Figura 6)  
45

- Las células NK en los cultivos conjunto (panel (B), (C), (E), (F) de la Figura 6) son apoptóticas, es decir, muestran solo núcleos o citoplasma rojo. Por lo tanto, las células cancerosas y las células NK mueren en la lucha, pero mueren más células cancerosas en presencia de una composición de la invención.  
50

Por lo tanto, se ha demostrado que una composición de la invención potencia los efectos citocidas de las células NK en las células cancerosas, lo que aumenta la apoptosis.

#### 55 Inducción de interferón- $\gamma$

Se estudió el efecto sobre la producción de interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) por las células NK. Las condiciones experimentales fueron las descritas anteriormente. El IFN $\gamma$  se midió usando un ensayo de IFN $\gamma$  disponible comercialmente.

- 60 El ensayo de IFN $\gamma$  mostró que IFN $\gamma$  no se produjo en absoluto por las células NK solo, sino que se produjo por las células NK en cultivo conjunto con células MP2 a un nivel de 158 pg/ml. Smartfish disminuyó la producción de interferón- $\gamma$  a 119 pg/ml. Los resultados se exponen en la Tabla 2 a continuación.

**Tabla 2**

<b>Células MP2</b>	X		X	X
<b>NK (IL-2)</b>		X	X	X
<b>Smartfish</b>				X
<b>IFN<math>\gamma</math> (pg/ml)</b>	0	0	158	119

Por lo tanto, se ha demostrado que la composición de la invención es capaz de reducir la producción de IFN $\gamma$ .

- 5 Habiendo descrito ahora la presente invención con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, será obvio para un experto en la materia que se puede realizar mediante modificación o cambio la invención usando un intervalo equivalente de condiciones y otros parámetros de los mismos, y que dichas modificaciones o cambios pretenden abarcar el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende una combinación de aceite de pescado y zumo en una emulsión de aceite en agua, para el uso en el tratamiento y/o tratamiento posterior del cáncer, en donde dicho aceite de pescado se selecciona de aceite de pescado que tiene un valor tottox inferior a 20 y un contenido de omega-3 superior al 10 % en peso basado en el peso total del aceite de pescado y en donde se utiliza un emulsionante adecuado para estabilizar la emulsión, en donde los tipos de cáncer tratados se seleccionan del grupo que consiste en cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer neurológico, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón y cáncer de piel y dicho tratamiento posterior del cáncer comprende el tratamiento de la caquexia, deficiencia de vitamina D, fatiga o estimulación del sistema inmunitario.
2. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el valor tottox del aceite de pescado está por debajo de 10.
3. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el contenido de aceite de pescado es de un 0,5 a un 15 % en peso basado en el peso total de la composición.
4. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el contenido del zumo es un 30 - 95 % en peso basado en el peso total de la composición.
5. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho zumo se selecciona de frutas y bayas que tienen un alto nivel adecuado de antioxidantes.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el zumo se selecciona del siguiente grupo; granada, albaricoque, pomelo, naranja, arándano rojo, rosa mosqueta, piña, arándano negro, morera, frambuesa amarilla, acerola, frambuesa, sandía, melocotón, uvas, cereza, yambul, manzana, mango, pera, aronia, fruta de la pasión y kiwi.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el zumo se selecciona del siguiente grupo; remolacha roja, zanahoria, arándano rojo (arándano), guayaba, moras o verduras como la col rizada, espinaca, apio, perejil o pepino.
8. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho emulsionante se selecciona del siguiente grupo; sólidos lácteos, proteína de suero, proteína de avena y proteína de guisante.
9. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende además pectina.
10. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende además edulcorantes, agentes aromatizantes, antioxidantes y conservantes.
11. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición se administra a una dosificación en un intervalo de 600 mg/día a 5000 mg/día de EPA y DHA, preferentemente 3000 mg/día, más preferentemente 2000 mg/día y lo más preferentemente 1100 mg/día.
12. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es bebible, o en forma de cápsula o polvo.

Efecto de Nutrifriend 1100 sobre líneas celulares de cáncer de colon

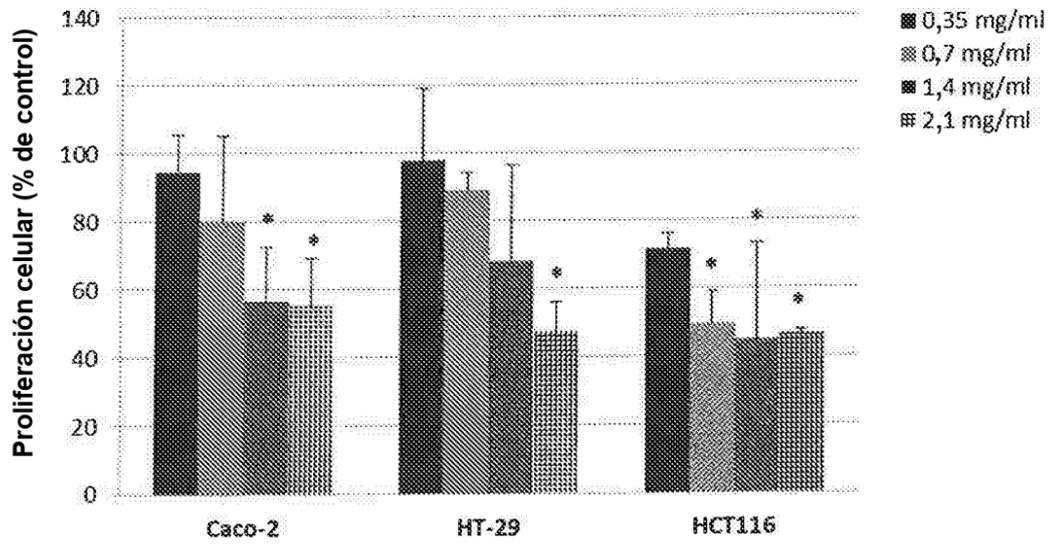


Figura 1

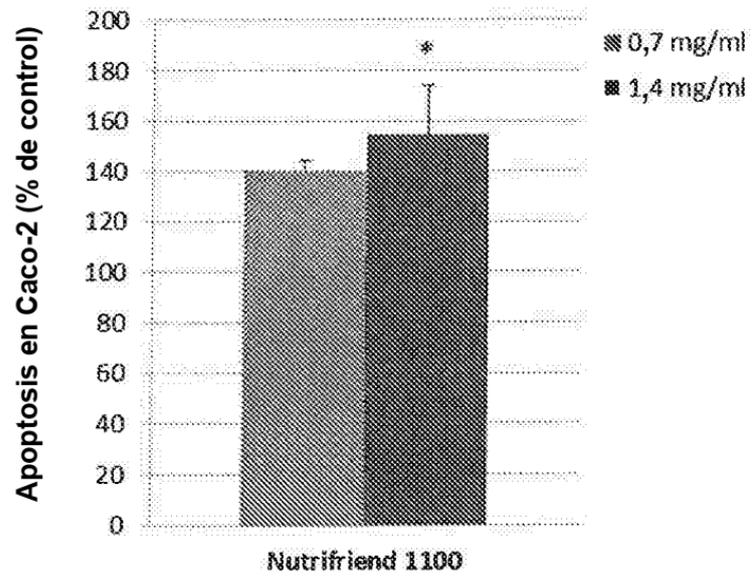


Figura 2

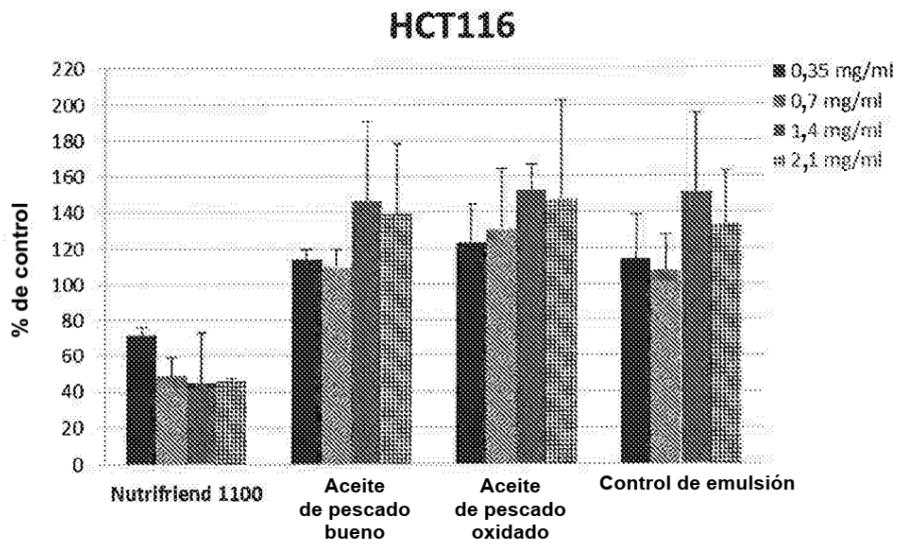
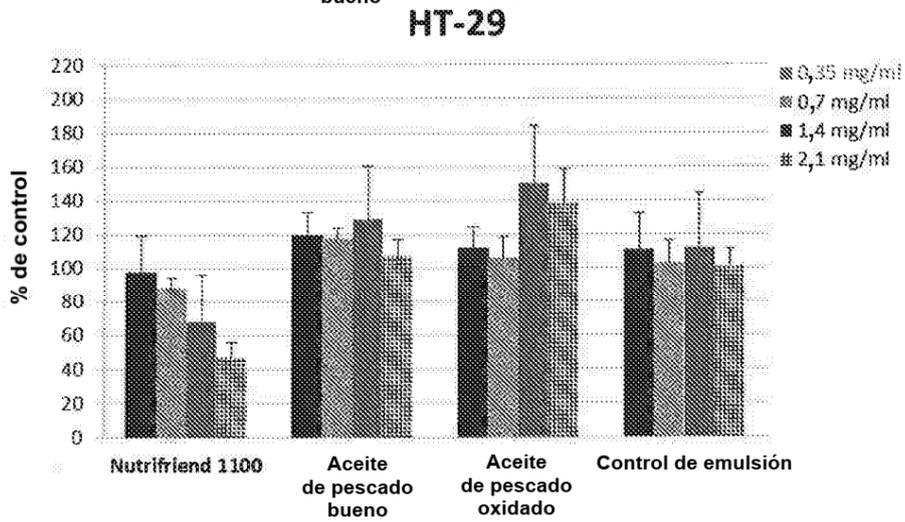
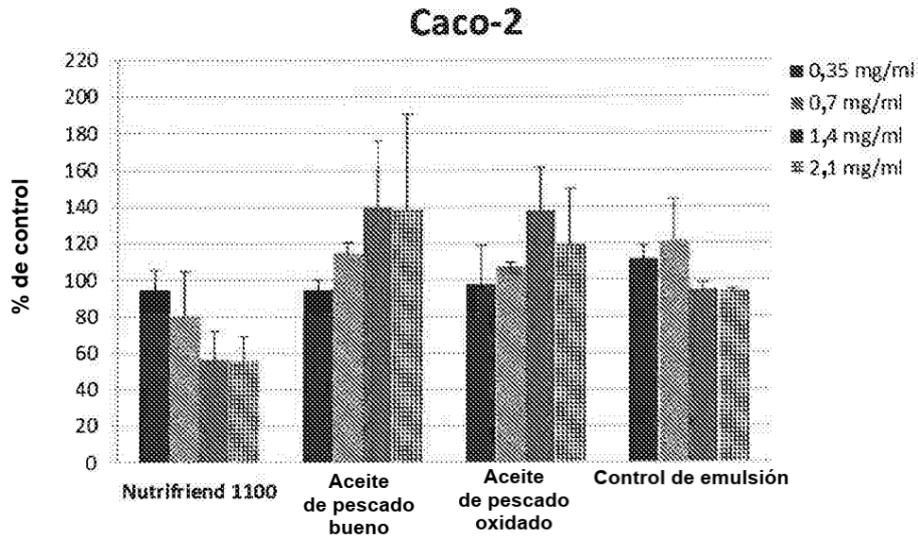


Figura 3

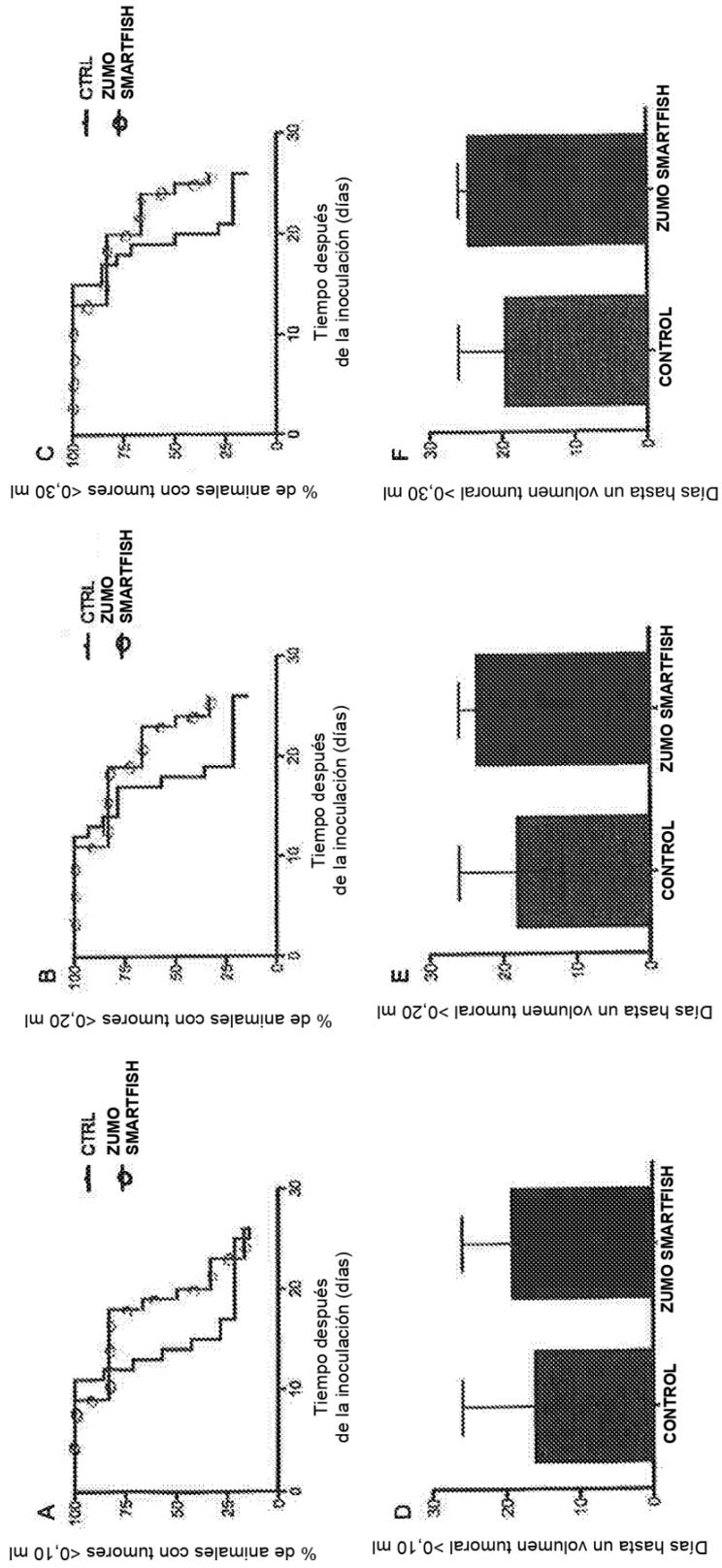


Figura 4

Índice de sabor 1-10

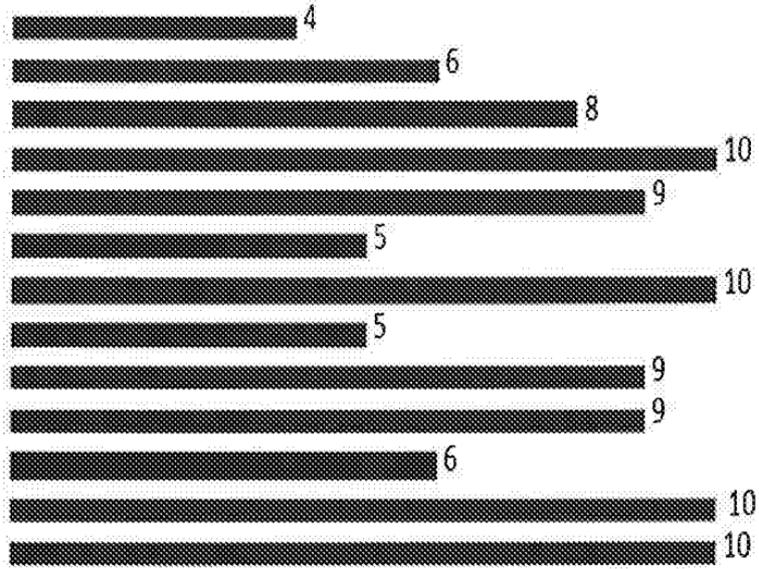


Figura 5

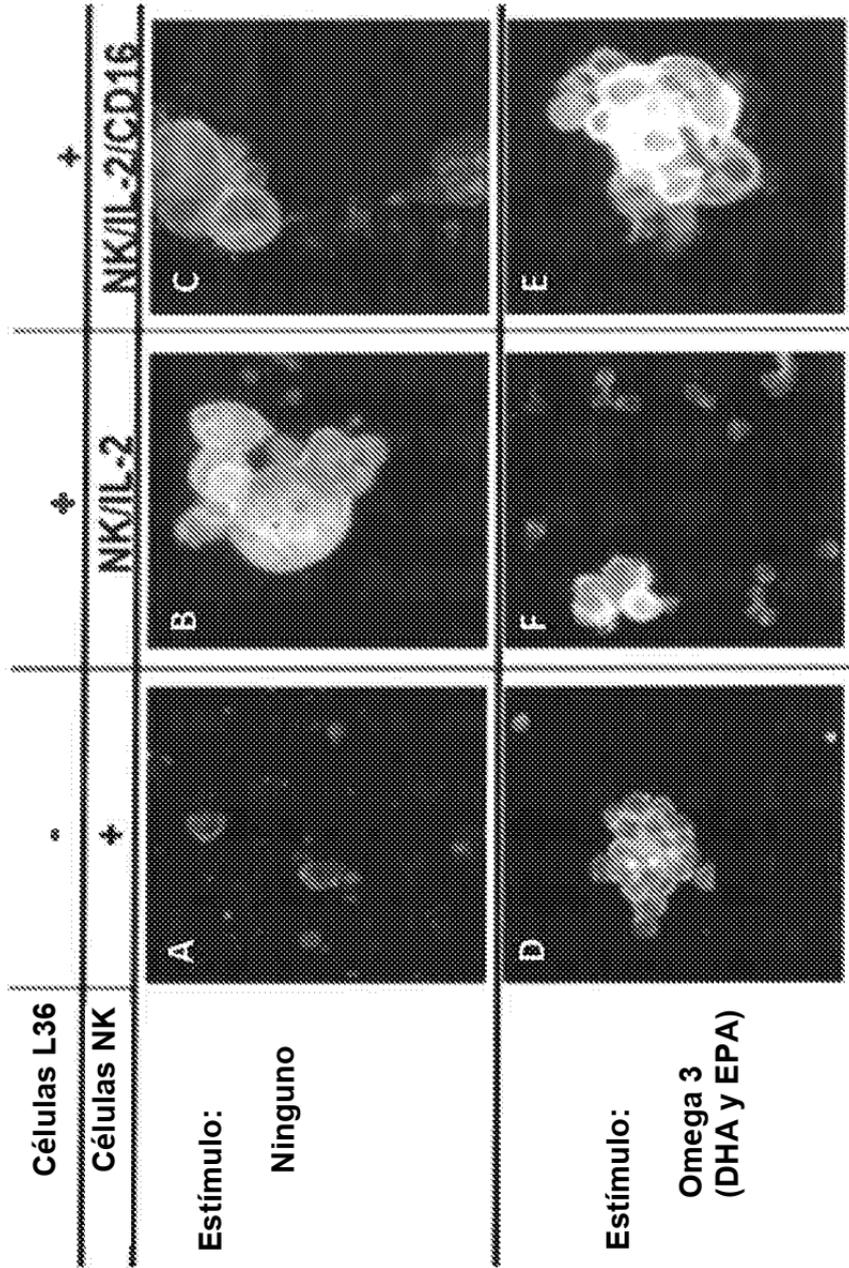


Figura 6