

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 921 854**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/765 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2019 PCT/IB2019/051891**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2019 WO19175725**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2019 E 19714248 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2022 EP 3765033**

(54) Título: **Polihidroxialcanoatos para uso en la prevención del cáncer colorrectal**

(30) Prioridad:

12.03.2018 IT 201800003441

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

01.09.2022

(73) Titular/es:

**BIO-ON S.P.A. (100.0%)
Via Dante Alighieri 7/B
40016 San Giorgio Di Piano (BO), IT**

(72) Inventor/es:

**COMES FRANCHINI, MAURO;
SAETTONE, PAOLO;
FERNANDEZ, JAVIER;
VILLAR, CLAUDIO JESÚS y
LOMBÓ, FELIPE**

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 921 854 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

Polihidroxialcanoatos para uso en la prevención del cáncer colorrectal

- 5 La presente invención se relaciona con polihidroxialcanoatos (PHA) para uso en la prevención del cáncer colorrectal (CRC).

10 El cáncer colorrectal (CRC), también conocido como cáncer de intestino o cáncer de colon, es un tipo de cáncer que se desarrolla en el colon o recto, que son partes del intestino grueso. En la población europea, el CRC tiene una incidencia de 31.3 casos nuevos por cada 100,000 habitantes, y este cáncer generó en la UE 345,346 casos nuevos y 152,046 muertes en 2012. Estos datos convierten al CRC en el tipo de cáncer más frecuente en la población europea, así como en los países occidentales. Además, el CRC aumenta cada año en los países occidentales debido a factores de riesgo ambientales (tabaco, alcohol, cloro en el agua) y hábitos dietéticos (grasas saturadas, nitrosaminas de alimentos salados, benzopirenos de alimentos demasiado cocinados, bajo consumo de frutas y fibra vegetal), que afectan el estado saludable de la mucosa del colon.

15 La mucosa del colon está estructurada como un epitelio monocapa (colonocitos) con millones de criptas. Estas criptas son invaginaciones que permiten a este tejido aumentar la superficie funcional de la mucosa para la absorción de nutrientes. Además, estas criptas contienen, en su fondo, las células madre encargadas de la renovación de toda la mucosa del colon, que son células con capacidad de multiplicación constante. Estas células madre en el fondo de cada cripta de la mucosa del colon pueden sufrir mutaciones de ADN en los genes (como apc, k-ras, dcc y p53), dando lugar a su transformación en células cancerosas con crecimiento descontrolado, que proliferarán hacia un foco de cripta aberrante, luego hacia un microadenoma, hacia un pólipos (adenoma grande), y finalmente hacia un carcinoma de colon metastásico.

20 25 El proceso tumorigénico descrito (a partir de las células transformadas de focos de criptas aberrantes iniciales en la mucosa del colon) puede verse alterado, o incluso detenido, por la presencia de algunos compuestos nutracéuticos en la luz del colon como por ejemplo las fibras prebióticas. Estas fibras prebióticas, como la inulina, son polímeros de polisacáridos vegetales formados por largas cadenas de D-fructosa, que no son digeridas por las enzimas de la boca, estómago, páncreas o del intestino humano. Esto contrasta con otros polímeros vegetales de D-glucosa más abundantes, como el almidón, que se digiere completamente hacia la glucosa libre y se absorbe en el intestino delgado.

30 35 Con respecto a la prevención del CRC, estas fibras prebióticas son muy importantes, ya que una vez consumidas, no son digeridas ni absorbidas en el tracto digestivo humano, llegando intactas al colon, donde estimulan selectivamente el crecimiento o actividad de algunas bacterias benéficas inherentes del colon como *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Roseburia*, *Faecalibacterium* y otros géneros (Gibson et Roberfroid, 1995; Roberfroid, 2007; Pompei et al., 2008; Bosscher et al., 2009).

40 45 La fermentación de fibras prebióticas en el microbiota del colon genera un tipo de compuestos denominados ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como lactato, acetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato, hexanoato, etc. (Rumessen et al., 1990). De estos SCFA, el más importante en la homeostasis del colon es el butirato, ya que los colonocitos normales lo metabolizan para generar energía.

50 Los polímeros de polihidroxialcanoato (PHA), y particularmente polihidroxibutirato (PHB), son reservas de energía bacterianas. Estos polímeros carecen de toxicidad en humanos y se utilizan para cirugía y otras aplicaciones médicas. Por ejemplo, las nanopartículas hechas con PHB también se han utilizado con fines de diagnóstico en el cáncer de colon (Kwon et al., 2014) y para la administración de proteínas antitumorales conjugadas a células de cáncer de útero HeLa en experimentos *in vitro* (Pandian et al., 2015).

55 60 65 El documento WO 00/04895 (Metabolix Inc.) se relaciona con usos nutricionales y terapéuticos de oligómeros de 3-hidroxialcanoato para aumentar los niveles de cuerpos cetónicos en la sangre de humanos y otros mamíferos, que son adecuados para administración oral o parenteral. Dichos oligómeros proporcionan una fuente de cuerpos cetónicos en forma de oligómeros lineales o cíclicos y/o derivados de 3-hidroxiácidos. Los métodos representativos para preparar los derivados de oligómeros de hidroxiácidos incluyen la degradación directa de los PHA en derivados oligoméricos; polimerización de hidroxialcanoatos o derivados de los mismos; y síntesis por etapas de oligómeros de hidroxialcanoato que comienza o termina con la modificación de una unidad terminal de hidroxialcanoato. Los oligómeros cíclicos tendrían propiedades ventajosas, ya que darían como resultado un nivel sanguíneo de cetonas sostenido y/o controlado durante un período de horas. El aumento de los niveles de cetonas en sangre sería útil para el control de convulsiones, control de enfermedades metabólicas, reducción del catabolismo de proteínas, supresión del apetito, nutrición parenteral, aumento de la eficiencia cardíaca, tratamiento de la diabetes y estados de resistencia a la insulina, y tratamiento de los efectos de trastornos neurodegenerativos y epilepsia. IONUT-CRISTIAN RADU ET AL: "Poly(HydroxyButyrate-co-HydroxyValerate) (PHBV) Nanocarriers for Silymarin Release as Adjuvant Therapy in Colo-rectal Cancer", FRONTIERS IN PHARMACOLOGY, vol. 8, 2 de agosto de 2017, divulga el uso de nanoportadores de polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV) cargados con siliimarina para tratar el cáncer colorrectal.

- El solicitante ha estudiado los efectos de la administración oral de PHA a mamíferos, particularmente a humanos, para encontrar posibles efectos beneficiosos en la prevención o tratamiento de diversas enfermedades, incluido el cáncer. Dentro de dicho programa de investigación, el solicitante ha postulado la existencia de posibles efectos beneficiosos de los PHA en el desarrollo de enfermedades del tracto gastrointestinal y ha encontrado sorprendentemente que la administración oral de un PHA que contiene unidades monoméricas de 3-hidroxibutirato, particularmente de un PHB, tiene un notable efecto en la prevención del CRC. Este es el sorprendente resultado de una metodología de ensayo preclínico no farmacológico, que se ha explorado para la prevención del CRC mediante la administración oral de PHB en un modelo de rata, que se ilustra a continuación.
- 5 Por tanto, de acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un polihidroxialcanoato (PHA) que contiene unidades monoméricas de 3-hidroxibutirato para uso en la prevención del cáncer colorrectal (CRC) por administración oral. Preferiblemente, el PHA es un homopolímero o copolímero de polihidroxibutirato (PHB) que contiene al menos un 20 % en moles de unidades monoméricas de 3-hidroxibutirato, siendo el resto unidades monoméricas de hidroxialcanoato distintas del 3-hidroxibutirato.
- 10 Dentro de la presente descripción y las reivindicaciones adjuntas, el término "prevención" incluye la inhibición de la iniciación o del desarrollo de CRC, para evitar o al menos retrasar sustancialmente la aparición de CRC.
- 15 La administración oral puede ser una administración enteral a un sujeto, por ejemplo, a un sujeto que tiene predisposición a desarrollar CRC o que ya ha mostrado al menos un síntoma clínico que es típico de una etapa temprana de CRC.
- 20 Alternativamente, la administración oral puede ser una administración dietética, que puede estar dirigida a una gran mayoría de la población, que desea obtener un efecto preventivo contra la aparición de CRC.
- 25 Sin vincularse a ningún mecanismo biológico específico que pueda estar en el origen de dicho efecto preventivo sobre el CRC, el solicitante cree que un PHA como tal puede metabolizarse en el tracto gastrointestinal para formar 3-OH-butirato, un ácido graso de cadena corta (SCFA) que eventualmente pueden convertirse en otros SCFA, que son activos como agentes preventivos en CRC, donde inducen la apoptosis (muerte celular) en las células tumorales de colon, mientras que actúan como el nutriente principal en las células de colon normales.
- 30 Un PHA como tal es un PHA obtenido de la fermentación de un sustrato orgánico por un microorganismo productor de PHA, sin modificaciones químicas de la estructura del PHA, como las descritas en el documento WO 00/04895 citado anteriormente para obtener oligómeros de bajo peso molecular. El PHA puede someterse únicamente a una fase de purificación, cuyo objetivo es eliminar los productos secundarios que pueden estar presentes en los PHA y que no son adecuados para la administración oral, como tensioactivos y residuos celulares. Después de la purificación, el PHA suele tener un grado de pureza de al menos el 99.5 %.
- 35 Los PHA adecuados para la presente invención son producidos por microorganismos aislados de ambientes naturales o también por microorganismos genéticamente modificados, que actúan como reservas de carbono y energía y que son acumulados por diversas especies de bacterias bajo condiciones de crecimiento desfavorables y en presencia de una fuente de carbono en exceso. Los PHA pueden ser sintetizados y acumulados por alrededor de 300 especies microbianas diferentes, incluidas dentro de más de 90 tipos de bacterias gram-positivas y gram-negativas, como, por ejemplo, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Rhizobium*. En células, los PHA se almacenan en forma de microgránulos, cuyo tamaño y número por célula varía en las diferentes especies bacterianas.
- 40 En general, los PHA adecuados para la presente invención son homopolímeros formados por unidades monoméricas de 3-hidroxibutirato:
- 45
- 50 -O-CH(CH₃)-CH₂-CO- (I)
- 55 o copolímeros de unidades monoméricas de 3-hidroxibutirato con al menos una unidad monomérica de hidroxialcanoato que tiene la fórmula
- 60 -O-CHR₁-(CH₂)_n-CO- (II)
- 65 en donde:
R₁ se selecciona de: -H y alquilos C₁-C₁₂;
n es cero o un número entero que oscila entre 1 y 6, y es preferiblemente 1 o 2; con la condición de que, cuando R₁ es metilo, n es diferente de 1. Preferiblemente, R₁ es metilo o etilo. Preferiblemente, n es 1 o 2.
En el caso de un copolímero, este contiene preferiblemente al menos 20 % en moles, más preferiblemente al menos 30 % en moles, de unidades monoméricas de 3-hidroxibutirato, siendo el resto unidades monoméricas de

hidroxialcanoato diferentes del 3-hidroxibutirato. En tales copolímeros, la cantidad de unidades monoméricas de 3-hidroxibutirato es generalmente igual o inferior al 99 % en moles, preferiblemente igual o inferior al 90 % en moles.

5 Las unidades repetitivas que tienen la fórmula (II) particularmente preferidas son las que se derivan de: 4-hidroxibutirato, 3-hidroxivalerato, 3-hidroxihexanoato, 3-hidroxioctanoato, 3-hidroxiundec-10-enoato, 4-hidroxivalerato.

En el caso de los copolímeros de PHA, se seleccionan preferiblemente entre: poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) (PHBH), poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato), poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato-co-4-hidroxivalerato) (PHBVV), o mezclas de los mismos.

10 Los PHA adecuados para la presente invención tienen preferiblemente un peso molecular promedio en peso (M_w) que oscila entre 5,000 y 1,500,000 Da, más preferiblemente entre 100,000 y 1,000,000 Da. El peso molecular promedio en peso puede determinarse de acuerdo con técnicas conocidas, en particular mediante análisis GPC (cromatografía de permeación en gel).

15 En cuanto a la producción de PHA, ésta se obtiene preferiblemente por fermentación microbiana de un sustrato orgánico (por ejemplo, carbohidratos u otros sustratos fermentables, como el glicerol) mediante una cepa de microorganismos capaces de producir PHA, y la posterior recuperación de los PHA de la masa celular. Para más detalles, se debe hacer referencia, por ejemplo, a las solicitudes de patente WO 99/23146, WO 2011/045625 y WO 2015/015315. Los sustratos adecuados para la producción de PHA mediante fermentación se pueden obtener en particular a partir del procesamiento de vegetales, por ejemplo, jugos, melazas, pulpa del procesamiento de remolacha azucarera, caña de azúcar. Estos sustratos generalmente contienen, además de sacarosa y otros carbohidratos, factores orgánicos de crecimiento, nitrógeno, fósforo y/u otros minerales útiles como nutrientes para el crecimiento celular. Una alternativa consiste en glicerol, una fuente de carbono orgánico de bajo coste, ya que es un subproducto de la producción de biodiesel (ver por ejemplo patente de EE. UU. 8 956 835 B2).

Dado que los PHA adecuados para la presente invención no son solubles en agua, se pueden administrar en forma de suspensiones acuosas, en donde el PHA está en forma de partículas suspendidas, preferiblemente con un tamaño promedio que oscila entre 0.1 μm y 1,000 μm , más preferiblemente de 1 μm a 500 μm . Estas dimensiones pueden determinarse de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica, como los sistemas de detección del tamaño de partículas en suspensión con detectores láser, conocidas como técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS) (ver la norma ISO 13320-2009). Como alternativa, se pueden utilizar imágenes de microscopio electrónico (SEM), que se analizan digitalmente de acuerdo con técnicas bien conocidas.

35 Alternativamente, el PHA se puede administrar como un componente funcional en diferentes productos farmacéuticos, donde se pueden suspender las partículas de PHA. Algunos ejemplos son bolsitas de gel, cápsulas, bolsitas de polvo y píldoras.

40 Cuando se administra como suplemento dietético, el PHA puede agregarse a otros productos comestibles, como bebidas funcionales, jaleas de frutas, polvo para resuspensión en cualquier matriz alimentaria líquida, barras de cereales, fórmula en polvo para el desayuno, galletas, gominolas, goma de mascar, chocolate, leche fermentada, helado, patatas fritas, pan o pasta.

45 En cuanto a la dosificación del PHA para conseguir un efecto sustancial en la prevención del CRC, por supuesto depende de las condiciones del sujeto y de la presencia de factores externos que puedan aumentar el riesgo de desarrollo del CRC. Habitualmente, la dosificación diaria puede ser generalmente igual o superior a 0.3 g/kg de peso corporal, preferiblemente igual o superior a 0.5 g/kg de peso corporal. En cuanto a un límite superior en la dosificación, se recomienda una dosificación diaria igual o inferior a 5.0 g/kg de peso corporal, preferiblemente igual o inferior a 2.5 g/kg de peso corporal.

50 Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines puramente ilustrativos de la presente invención y no deben considerarse como limitativos del alcance de protección definido por las reivindicaciones adjuntas.

55 1. Animales y diseño experimental.

60 30 ratas macho de la cepa *Rattus norvegicus* F344 se usaron para los siguientes experimentos para mostrar el efecto del compuesto cancerígeno azoximetano, más dos dosis orales del sulfato de sodio de dextrano proinflamatorio. El azoximetano es un compuesto cancerígeno que induce la formación de tumores en el colon. El sulfato de sodio de dextrano es un compuesto proinflamatorio que potencia la generación de tumores en el colon de estos animales tratados.

65 Las ratas (5 semanas de edad) fueron divididas en 3 cohortes de 10 individuos cada una, alimentadas ad libitum.

La cohorte 1 fue alimentada con pienso vegetal para ratas. Este pienso contenía proteína al 16.7 %, grasa al 5.8 % y carbohidratos al 53.6 % (incluyendo celulosa al 20 %). Este pienso tiene un valor calórico de 3.33 kcal/g.

5 La cohorte 2 se alimentó con una versión de este pienso vegetal para ratas, pero que contenía un PHB al 10 %: proteína al 16.7 %, grasa al 5.8 % y carbohidratos al 53.6 % (incluyendo celulosa al 10 %). Este pienso tiene un valor calórico de 3.88 kcal/g.

10 La cohorte 3 se alimentó con una versión de este pienso vegetal para ratas, pero que contiene PHB al 20 %: proteína al 16.7 %, grasa al 5.8 % y carbohidratos al 53.6 % (incluyendo celulosa al 0 %). Este pienso tiene un valor calórico de 4.44 kcal/g.

Las composiciones de los diferentes tipos de pienso en cuanto a macronutrientes y valor calórico (tanto por cada 20 g de pienso como dosis promedio diaria por rata, y como porcentaje) se reportan en la Tabla 1.

15

TABLA 1

		Contenido en 20 g de pienso	kcal en 20 g de pienso	% kcal
Pienso de la cohorte 1 (control)	carbohidratos	10.72	42.62	64
	lípidos	1.16	10.65	16
	proteínas	3.34	13.32	20
	PHB	0	0	0
	calorías totales	-	66.59	-
Pienso de la cohorte 2 (PHB al 10 %)	carbohidratos	10.72	42.62	54.92
	lípidos	1.16	10.65	13.72
	proteínas	3.34	13.32	17.16
	PHB	2	11.12	14.33
	calorías totales	-	77.71	-
Pienso de la cohorte 3 (PHB al 20 %)	carbohidratos	10.72	42.62	47.99
	lípidos	1.16	10.65	11.99
	proteínas	3.34	13.32	15.00
	PHB	4	22.24	25.04
	calorías totales	-	88.83	-

PHB tiene un valor calórico de 5.56 kcal/g. Por lo tanto, la Tabla 1 muestra el contenido de nutrientes y el aporte calórico diario correspondiente a 20 g de pienso, que es el valor promedio de alimento ingerido para una rata adulta.

20 Los animales de la cohorte de pienso control 1 ingirieron 0 g de PHB por rata/día, los animales de la cohorte 2 ingirieron 2 g de PHB por rata/día y los animales de la cohorte 3 ingirieron 4 g de PHB por rata/día. En total, a lo largo de las 17 semanas de intervención nutricional (119 días en total), cada rata ingirió un promedio de 0 g de PHB (cohorte 1), 238 g de PHB (cohorte 2) o 476 g de PHB (cohorte 3).

25 2. Inducción y monitorización de CRC.

Una semana después de la llegada de los animales al animalario, se iniciaron las tres dietas correspondientes. Después de una semana de alimentación con la dieta correspondiente, se indujo CRC en ocho ratas de cada cohorte.

30 Las otras dos ratas se mantuvieron libres de inducción de CRC, como animales de control absoluto. La inducción de CRC se llevó a cabo en esas ocho ratas de cada cohorte utilizando azoximetano (AOM, Sigma-Aldrich) disuelto en solución salina estéril (NaCl al 0.9 %) a una concentración de 2 mg/ml. Esta solución de AOM se inyectó por vía intraperitoneal a una concentración final de 10 mg por kg de peso corporal. El tratamiento con AOM se repitió 7 días después de la primera inyección. Los animales de control absoluto recibieron solución salina estéril en ambas inyecciones.

35

Una semana después del segundo tratamiento con AOM, esas ocho ratas recibieron durante 7 días agua de bebida que contenía sulfato sódico de dextrano al 3 % (DSS, 40.000 g/Mol, VWR). Esta etapa de colitis ulcerosa se repitió a las 11 semanas, utilizando en este caso DSS al 2 % durante otros 7 días.

5 Las ratas fueron sacrificadas por neumotórax en la semana 17, contadas después de la primera administración de AOM. Las ratas se monitorizaron a lo largo de todo el experimento en cuanto al peso corporal y consistencia de las heces/sangrado rectal. Las ratas se pesaron regularmente durante las semanas experimentales.

10 3. Muestras de sangre y tejidos.

10 A las 17 semanas de la primera administración de AOM, las ratas fueron anestesiadas (isoflurano) y sacrificadas (neumotórax) para extracción de sangre (2 ml del corazón, centrifugado a 3.000 rpm durante 15 minutos, y luego se congeló el plasma), colon (abierto longitudinalmente y lavado con PBS antes de mantenerlo en formaldehído al 4 % a 4 ° C) y ciego (congelado a -20 ° C). Los ciegos se pesaron inmediatamente después del sacrificio utilizando una balanza de precisión.

15 Cada colon fijado fue meticulosamente examinado con un calibrador de precisión para contar el número de tumores mayores de 1 mm en su superficie mucosa interna. Además, se calculó el área tumoral total afectada, luego de clasificar la forma de los tumores en pediculados, planos irregulares, planos circulares y esféricos.

20 4. Métodos estadísticos.

20 La normalidad de las diferentes variables se probó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. A la luz de estos resultados, los datos se expresaron como el valor medio ± S.E.M. y se utilizaron métodos paramétricos para los análisis estadísticos. La igualdad de varianzas se probó usando la prueba de Levene y luego las diferencias entre las cohortes se probaron mediante un análisis de varianza ANOVA de 1 vía.

25 La representación gráfica de todos estos datos se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism, versión 7. En todos los casos, un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente muy significativo (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$; ***: $p < 0.0005$; ****: $p < 0.0001$).

30 5. Resultados.

35 5.1 Evolución de la ganancia de peso corporal.

35 Durante todo el período de tiempo experimental, todas las ratas se pesaron regularmente, con el fin de probar si algunos de los tratamientos de la dieta mostraban toxicidad para las ratas, lo que eventualmente podría observarse como pérdida de peso. En todos los casos, ninguno de los tres tipos de dieta diferentes ha generado cambios de peso de interés (ver Figura 1). Los animales de control absoluto (ratas número 9 y 10) de la cohorte 3 mostraron un peso corporal ligeramente aumentado como promedio, pero estas diferencias no fueron estadísticamente muy significativas ($p = 0.05$).

40 5.2 Evolución de los síntomas digestivos.

40 Cada cohorte de ratas contenía dos ratas de control absoluto (animales 9 y 10 en cada caso). Estos dos animales fueron los que se alimentaron con la dieta correspondiente (control, PHB al 10 % o PHB al 20 %), pero recibiendo solo solución de PBS intraperitoneal (en lugar del compuesto cancerígeno AOM). Además, nunca recibieron el agente proinflamatorio DSS en el agua potable. Por lo tanto, se supone que estos dos animales de cada cohorte carecen de cualquier tipo de síntoma digestivo, y en realidad no han mostrado ningún síntoma digestivo hasta el momento del sacrificio. Esto significa que la ingestión de PHB no es tóxica para los animales a esas dosis (10 % y 20 %), al menos con respecto a los síntomas digestivos. Además, la ganancia de peso fue similar entre los tres tipos de animales de control absoluto (ver más abajo).

45 Con respecto a los animales experimentales, en los que se indujo CRC con tratamientos de AOM y DSS, se observaron algunos síntomas en las tres cohortes de dieta (control, PHB al 10 % y PHB al 20 %). Específicamente, algunas de estas ratas experimentales han mostrado diarrea o hemorragias gastrointestinales durante ambas exposiciones de DSS. Estos síntomas hemorrágicos se clasificaron de la siguiente manera:

50 diarrea leve sin presencia de sangre;

55 diarrea con presencia de gotas de sangre en las heces;

60 diarrea con leve hemorragia en las heces.

65 La Tabla 2 resume la situación de estos efectos secundarios gastrointestinales para las 30 ratas, incluidos los animales 9 y 10 (animales de control absoluto, sin CRC).

TABLA 2

	Pienso de control (cohorte 1)		Pienso con PHB al 10 % (cohorte 2)		Pienso con PHB al 20 % (cohorte 3)	
números de ratas	1 a 8 (a)	9, 10 (b)	1 a 8 (a)	9, 10 (b)	1 a 8 (a)	9, 10 (b)
sin síntomas	2, 8	9, 10	1, 2, 5	9, 10	1, 3, 4, 5, 8	9, 10
diarrea leve	-	-	-	-	2, 6	-
diarrea con gotas de sangre	1, 4, 6, 7	-	3, 6, 8	-	7	-
diarrea con hemorragia	3 (†), 5	-	4, 7	-	-	-
(a) inducción de tumores (b) controles absolutos (†) muerto						

Como se puede observar en la Tabla 2, un animal (rata número 3) murió durante el experimento en el grupo de pienso de control. Esta rata mostraba diarrea con gotas de sangre durante la segunda exposición a DSS. Los tratamientos con DSS inducen un estado proinflamatorio en la mucosa del colon con sangrado, y esto es necesario para inducir la formación de tumores. Además, después de la primera exposición a DSS, otra rata del grupo de pienso de control (rata número 5) mostró sangrado (ver Tabla 2).

El hecho de que no se produjeran muertes en las cohortes 2 y 3 indicó que estas ratas resistieron mejor la inducción de tumores y las exposiciones proinflamatorias a DSS.

En resumen, la gravedad de los efectos secundarios gastrointestinales después de los tratamientos con DSS fue más intensa en la cohorte de pienso de control. Las ratas que mostraban diarrea leve solo existían en la cohorte 3 (2 ratas).

El número de ratas que mostraban diarrea con gotas de sangre fue mayor en la cohorte de pienso de control 1 (4 ratas) que en la cohorte 2 (3 ratas) o cohorte 3 (1 rata) (ver Tabla 2). Finalmente, no hubo ratas que mostraran diarrea con hemorragia en la cohorte 3, pero 2 ratas de este tipo estaban presentes en la cohorte 2 y la cohorte de pienso de control 1 (una de estas dos ratas de la cohorte de pienso de control murió).

5.3 Peso del ciego.

El ciego es la sección del tubo digestivo encargada de la digestión de las fibras prebióticas, debido a la presencia en este órgano de las correspondientes poblaciones bacterianas con esta capacidad.

Por lo tanto, se esperaba que la presencia de un compuesto prebiótico putativo, en este caso PHB, pudiera aumentar las poblaciones microbianas en ciegos, dando lugar a órganos con mayor biomasa microbiana en los casos de las cohortes 2 y 3.

Después de sacrificar a los animales, los ciegos se pesaron inmediatamente. Se observaron diferencias estadísticamente muy significativas para estos valores entre el pienso de control y la cohorte 3 (valor de p inferior a 0.0001) (Figura 2). También hubo un aumento en el peso del ciego en el caso de la cohorte 2 con respecto a la cohorte de pienso de control 1.

Los resultados se reportan en la Figura 2, un diagrama que muestra el peso del ciego medido en las tres cohortes de animales a lo largo del experimento. Los valores de media y SEM se indican para cada cohorte de animales con líneas horizontales (cohorte de pienso de control 1: 2.414 g ± 0.15; cohorte 2: 3.488 g ± 0.18; cohorte 3: 4.252 g ± 0.14). Estos datos indican que la adición de PHB a la dieta ejerce un efecto en las poblaciones microbianas del ciego, que se potencian como en el caso de una suplementación con una fibra prebiótica convencional.

5.4 Número y área total de tumores colorrectales.

Tras el sacrificio de las ratas, se analizaron las mucosas del colon y se cuantificaron los tumores mayores de 1 mm. La Figura 3 muestra el número promedio de tumores de colon de cada cohorte (ratas 1 a 8 en los tres casos). Los animales de control absoluto (ratas 9 y 10 de cada cohorte) no mostraron tumores, como se esperaba. Los valores son: cohorte de pienso de control 1: 51.14 tumores ± 5.57; cohorte 2: 33.5 tumores ± 4.56; cohorte 3: 26.5 tumores ± 4.58.

En particular, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0058$) entre la cohorte de pienso de control 1 y la cohorte 3, que mostró una reducción drástica del 48.18 % en el número de tumores de colon (consulte

la Figura 3). También se redujo el número de tumores (34.49 % de reducción) en el caso de la cohorte 2 con respecto a la cohorte de pienso de control 1 (ver Figura 3).

Además, dependiendo de la forma de cada tumor, se calculó el área tumoral para cada uno de los tumores existentes en una mucosa de colon dada, y se generó el valor total del área tumoral para cada animal. La Figura 4 muestra el valor promedio, en mm², del área total afectada por el tumor en el colon de cada cohorte. Los valores son: cohorte de pienso de control 1: 960.1 mm² ± 155.1; cohorte 2: 638.2 mm² ± 97.17; 20 % cohorte 3: 402.2 mm² ± 65.67.

La cohorte 3 mostró una reducción del 58.1 % en este parámetro con respecto a la cohorte de pienso de control 1, y la reducción fue estadísticamente muy significativa (0.0047) (ver Figura 4). El área tumoral total también se redujo (reducción del 35.52 %) en el caso de la cohorte 2 con respecto a la cohorte de pienso de control 1.

En conclusión, la adición de PHB al 10 % o PHB al 20 % a la dieta de los animales en este modelo murino experimental para el cáncer de CRC mostró una prevención importante contra el desarrollo de tumores colorrectales. La ausencia de toxicidad en PHB podría permitir su uso como agente preventivo para este tipo de cáncer digestivo en humanos.

Bibliografía

Gibson GR, Roberfroid MB, Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics; J Nutr 1995; 125:1401-1412.

Roberfroid MB, Inulin-type fructans: functional food ingredients; J Nutr 2007; 137:2493S-2502S.

Pompei A, Cordisco L, Raimondi S, Amaretti A, Pagnoni UM, Matteuzzi D, Rossi M, In vitro comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans Anaerobe; 2008 Nov; 14(5):280-6.

Bosscher D, Breyneert A, Pieters L, Hermans N, Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects; J Physiol Pharmacol. 2009 Dec; 60 Suppl 6:5-11.

Rumessen JJ, Bode S, Hamberg O, Gudmand-31. Hoyer E, Fructans of Jerusalem artichokes: intestinal transport, absorption, fermentation, and influence on blood glucose, insulin, and C-peptide responses in healthy subjects; Am J Clin Nutr 1990; 52:675-681.

Kwon HS, Jung SG, Kim HY, Parker SA, Batt CA, Kim YR, A multi-functional polyhydroxybutyrate nanoparticle for theranostic applications; J. Mater. Chem. B, 2014, 2, 3965-3971.

Pandian SR, Deepak V, Nellaiah H, Sundar K, PEG-PHB-glutaminase nanoparticle inhibits cancer cell proliferation in vitro through glutamine deprivation; In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2015; 51(4):372-80.

REIVINDICACIONES

1. Un polihidroxialcanoato (PHA) que contiene unidades monoméricas de 3-hidroxibutirato para uso en la prevención del cáncer colorrectal (CRC) por administración oral.
5
2. El PHA para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el PHA es un homopolímero o un copolímero de polihidroxibutirato (PHB) que contiene al menos un 20 % por mol de unidades monoméricas de 3-hidroxibutirato, siendo el resto unidades monoméricas de hidroxialcanoato diferentes de 3-hidroxibutirato.
- 10 3. El PHA para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el PHA es poli-3-hidroxibutirato (PHB).
4. El PHA para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las unidades monoméricas de hidroxialcanoato distintas del 3-hidroxibutirato se seleccionan entre: 4-hidroxibutirato, 3-hidroxivalerato, 3-hidroxihexanoato, 3-hidroxioctanoato, 3-hidroxiundec-10-enoato, 4-hidroxivalerato.
15
5. El PHA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el PHA tiene un peso molecular promedio en peso (M_w) que oscila entre 5,000 a 1,500,000 Da, preferiblemente entre 100,000 a 1,000,000 Da.
- 20 6. El PHA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la administración oral es una administración enteral a un sujeto que tiene una predisposición a desarrollar CRC o que ya ha mostrado al menos un síntoma clínico que es típico de una etapa temprana de CRC.
- 25 7. El PHA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la administración oral es una administración dietética.
8. El PHA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la administración oral tiene una dosificación diaria igual o superior a 0.3 g/kg de peso corporal, preferiblemente igual o superior a 0.5 g/kg de peso corporal.
30
9. El PHA para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la administración oral tiene una dosificación diaria igual o inferior a 5.0 g/kg de peso corporal, preferiblemente igual o inferior a 2.5 g/kg de peso corporal.

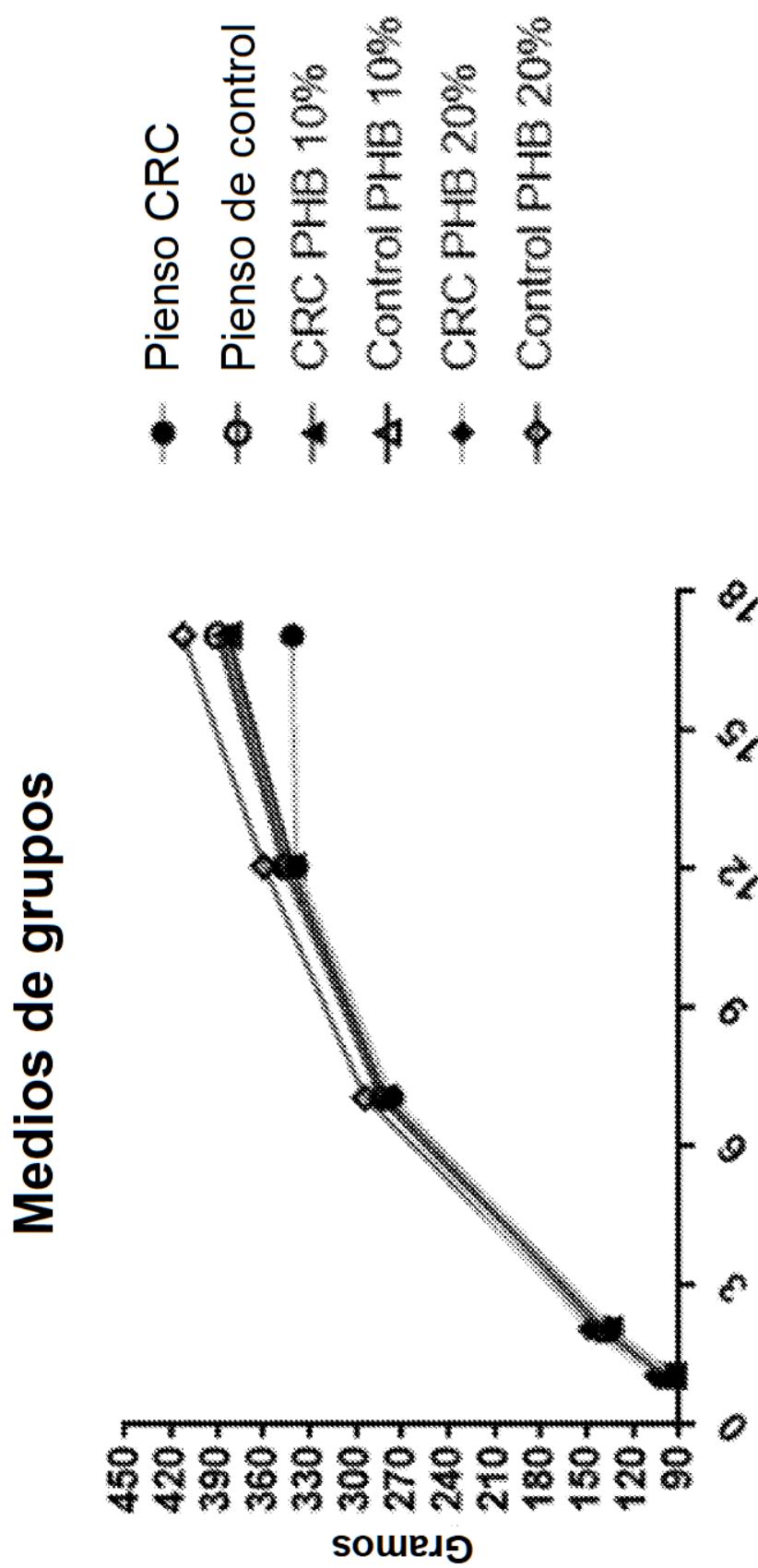


Fig. 1

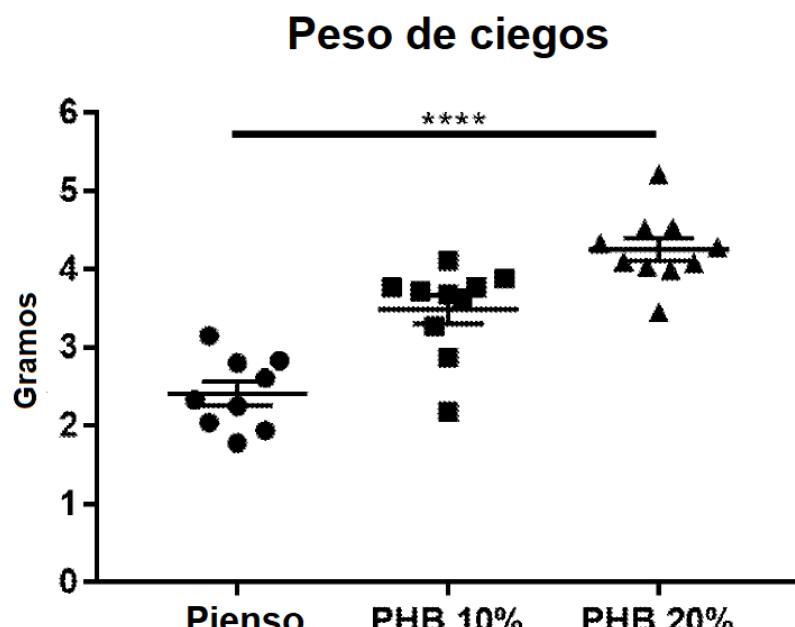


Fig. 2

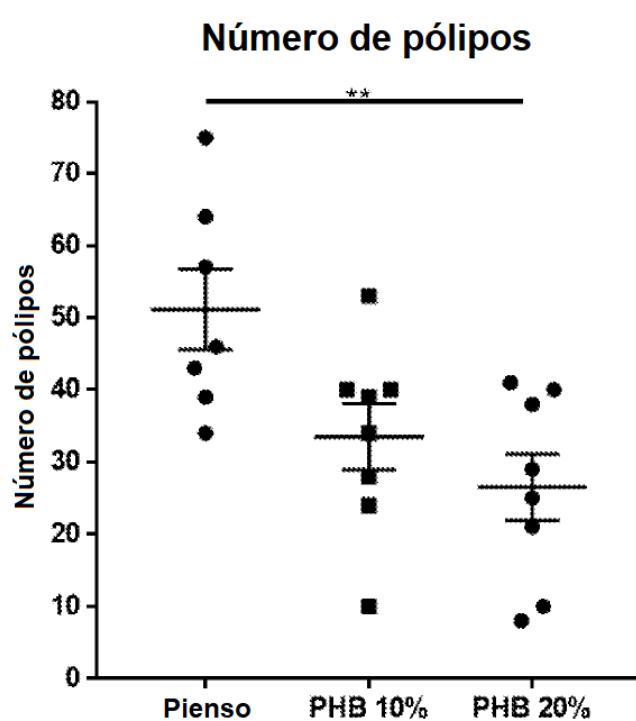


Fig. 3

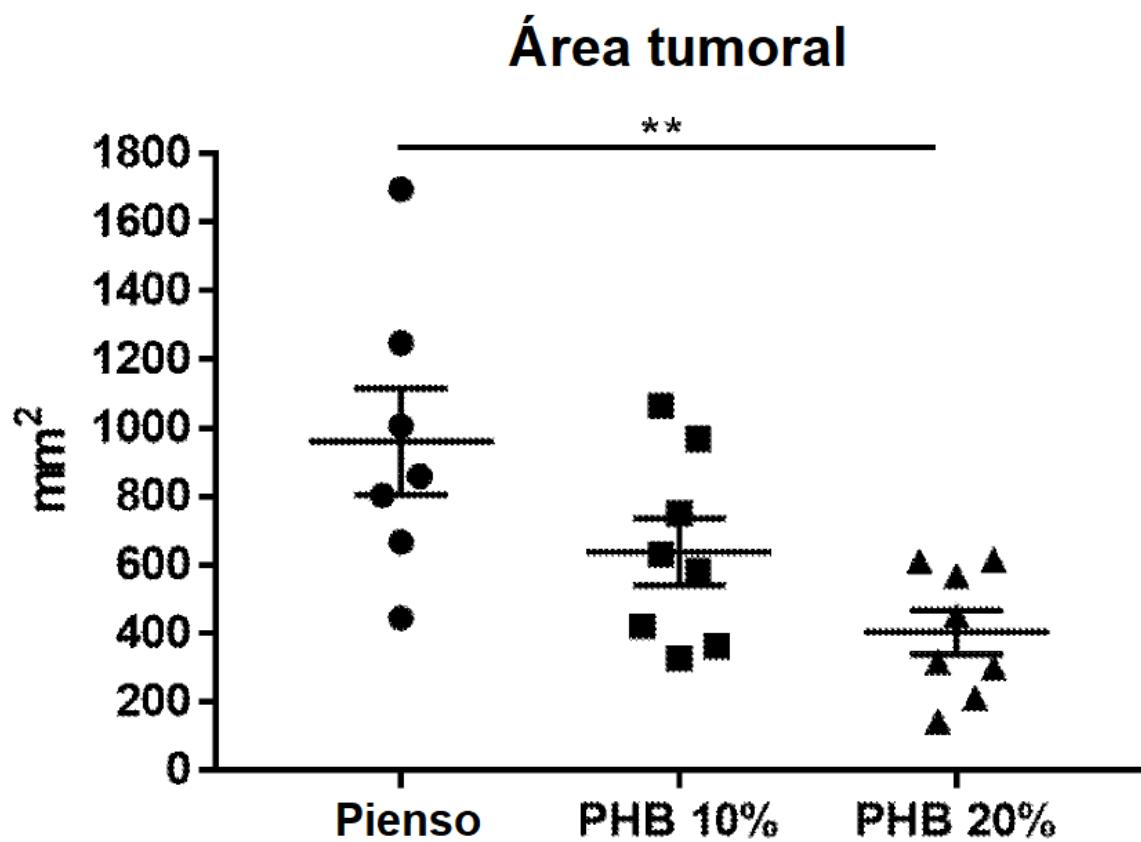


Fig. 4