

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 917**

51 Int. Cl.:

A61K 31/718 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A23L 29/219 (2006.01)

A23L 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2017** **PCT/EP2017/080468**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2018** **WO18096131**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2017** **E 17808402 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.03.2021** **EP 3544630**

54 Título: **Composición nutricional con almidón resistente útil en el tratamiento de enfermedades neoplásicas**

30 Prioridad:

28.11.2016 EP 16200981

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2021

73 Titular/es:

**FONDAZIONE DI RELIGIONE E DI CULTO
(100.0%)
Viale Cappuccini snc
71013 San Giovanni Rotondo (FG), IT**

72 Inventor/es:

PAZIENZA, VALERIO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 870 917 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

Composición nutricional con almidón resistente útil en el tratamiento de enfermedades neoplásicas

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende almidón resistente, proteínas y grasa como se define en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas, caracterizada por que se administra combinada con un agente antitumoral o en estrecha proximidad temporal con él mismo.

Siendo la cuarta causa de muerte por cáncer en todo el mundo, el adenocarcinoma de páncreas es un tumor muy letal [1]. La resección quirúrgica es la única opción de tratamiento curativo, pero desafortunadamente solo un pequeño porcentaje de pacientes son elegibles porque el diagnóstico a menudo se produce tarde, cuando la enfermedad se encuentra en un estadio avanzado. Las bajas tasas de supervivencia también se deben a la agresividad del cáncer y la quimiorresistencia, que hacen que las terapias sistémicas existentes sean ineficaces. A pesar de que tanto el mecanismo de resistencia intrínseco como el adquirido disminuyen la eficacia del fármaco, la gemcitabina, sola o combinada con otros fármacos, se ha considerado durante mucho tiempo la opción de primera línea en el tratamiento del cáncer de páncreas (PC). Recientes estudios revolucionarios de los autores de la presente invención descubrieron un vínculo potencial entre los ciclos cortos de ayuno y la mejora de la eficacia de la quimioterapia [2]. Específicamente, la inanición a corto plazo (24 h) lograda con medio que imita el ayuno, aumenta la captación de gemcitabina por las células tumorales, haciéndolas más susceptibles a la muerte celular inducida por fármacos.

De manera constante, en un modelo *in vivo* de xenoinjerto de cáncer de páncreas, la gemcitabina administrada a ratones en ayunas durante 24 h disminuyó significativamente el volumen del tumor en comparación con los ratones de control. Además, se demostró que el medio que imita el ayuno cambia las células a la fase G0/G1 del ciclo celular. De manera constante, los ciclos de ayuno disminuyen los niveles del marcador de proliferación Ki67 *in vivo*, según el hallazgo de que la restricción calórica disminuye el crecimiento de las células pancreáticas murinas y humanas. A la luz de estas observaciones, el ayuno podría reducir el crecimiento del cáncer y aumentar la eficacia de la quimioterapia también en pacientes con PC. Sin embargo, el cambio de este enfoque terapéutico de los animales a los seres humanos tiene que lidiar con algunas dificultades objetivas: las personas enfermas pueden negarse a seguir el régimen de ayuno [3] y el ayuno puede empeorar la pérdida de peso que a menudo ocurre en los pacientes con cáncer. Por lo tanto, se necesitan enfoques alternativos para aprovechar los beneficios de la restricción calórica sin requerir exenciones especiales por parte de los pacientes. En este sentido, los autores de la presente invención se centraron en los carbohidratos nutricionales, reconocidos como elementos fundamentales en el metabolismo de las células cancerosas y como promotores del crecimiento del cáncer.

Los autores de la presente invención formularon una composición nutricional, definieron una dieta diseñada de almidón resistente (ERS) en la que el almidón de maíz fue reemplazado por almidón resistente. Mientras que el almidón común es metabolizado por las enzimas del intestino delgado para liberar glucosa, el almidón resistente no es digerible por lo que llega al intestino grueso donde es fermentado por bacterias residentes para producir metabolitos bioactivos tales como ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato, valerato), otros ácidos orgánicos (lactato, succinato y formiato), gases y alcoholes. Se sabe que la dieta puede moldear la composición de la microbiota intestinal, cuyas alteraciones se perfilan cada vez más como un factor clave en el desarrollo de enfermedades gastrointestinales y trastornos metabólicos, así como de cánceres intestinales y extraintestinales. Varios estudios han revelado un vínculo entre las alteraciones en la composición de la microbiota oral e intestinal y el desarrollo de cáncer de páncreas, que probablemente se deba a la capacidad de ciertas poblaciones bacterianas para mantener la inflamación que promueve el cáncer. Además, hoy en día se acepta que la restricción nutricional tiene efectos beneficiosos para la salud, incluido el aumento de la esperanza de vida y la prevención del cáncer [4]. Estudios recientes del grupo de los autores de la presente invención y de otros grupos revelaron una asociación entre la restricción calórica lograda con el ayuno y una mejor respuesta a la quimioterapia en ciertos tipos de cáncer, entre los que destaca el pancreático, como se demostró en modelos tanto *in vitro* como animales. Esta intervención nutricional también puede resultar útil en la lucha contra los cánceres humanos, pero la dificultad del paciente para aceptar este régimen y el posible empeoramiento de la pérdida de peso relacionada con el cáncer hacen necesaria la adopción de nuevos enfoques.

Por tanto, existe la necesidad de una nueva composición nutricional que sea capaz de imitar la condición de ayuno para reducir el estado de inflamación y retardar el crecimiento tumoral.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Cuantificación de fosfo-ERK1/2 relativa normalizada a la expresión de la proteína ERK1/2 total (A-B-C) por inmunotransferencia (D-E-F) en células PC de control o tratadas con dieta que imita ERS durante 48 h (Tabla 1). Ensayo de viabilidad celular en células de control BxPC-3, MiaPaca-2 y PANC-1 o tratadas durante 48 h con dieta que imita ERS (G-H-I). Los resultados se expresan como medias $\pm$ DE. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$ (*) o $P < 0,01$ (**) o $P < 0,001$ (***).

Figura 1 complementaria (S1). Cuantificación de la detección por inmunotransferencia de fosfo-ERK1/2 relativa normalizada a ERK1/2 total (A), fosfo-mTOR normalizada a mTOR total (B) y fosfo-p70S6K normalizada a la expresión

total de la proteína p70S6K (C) en biopsias de ratones PC de xenoinjerto de control y ratones alimentados con dieta ERS.

Figura 2. Cuantificación y detección de inmunotransferencia de fosfo-mTOR relativa normalizada a la expresión de la proteína mTOR total (A-B-C) en células PC de control o tratadas con dieta que imita ERS durante 48 h. Cuantificación y detección de inmunotransferencia de fosfo-p70S6K relativa normalizada a la expresión de la proteína p70S6K total (D-E-F) en células PC de control o tratadas con dieta que imita ERS durante 48 h. Los resultados se expresan como medias $\pm$ DE. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$ (*) o $P < 0,01$ (**) o $P < 0,001$ (***).

Figura 3. Efecto de la dieta de control (A) y dieta que imita ERS (B) sobre la agregación células a célula BxPC-3 y la densidad tumoral evaluada mediante un ensayo de gota colgante. Se muestran imágenes representativas.

Figura 4. Tinción fluorescente de faloidina (a), DAPI (b) y señales fusionadas (c) que muestran diferentes formaciones de invadopodios en la línea celular pancreática BxPC3, bajo dieta de control (A) y dieta que imita ERS (B). Se muestran imágenes representativas.

Figura 5. Efecto de la dieta ERS sobre el tumor de PC. Se asignaron al azar ratones carentes de sistema inmunitario portadores de tumores BxPC-3-luc a 2 grupos cuando el tamaño del tumor alcanzó un volumen promedio de 100 mm³. Grupo 1 (dieta de control), grupo 2 (dieta ERS). Señalización de bioluminiscencia medida como fotones/s (A). Se recogieron las masas tumorales y se evaluó el volumen tumoral (B). También se evaluó el peso corporal (C).

Tinción H/E, Ki67 y CD31 de biopsias de PC de ratones pertenecientes a los dos grupos diferentes (D). a, c, e - dieta de control, b, d, f - dieta ERS.

Figura 6. Composición de taxones bacterianos en muestras fecales individuales. Panel (A) muestra los 20 taxones bacterianos más abundantes de muestras fecales con una abundancia promedio de al menos 1% (suma promedio de lecturas en escala relativa, %). Antes y después indican el momento en que se toman las muestras con respecto al tratamiento del cáncer. (B) Esquema metabólico y cantidad de ácidos orgánicos en muestras fecales de ratones (mmol/g-heces) antes (B) y después (A) de la inducción del cáncer. Cont. - dieta de control, ERS - dieta de almidón resistente. Los nombres de las bacterias en las líneas de la ruta indican los géneros identificados a partir de las muestras.

Figura 7. Calor total acumulado durante el crecimiento de consorcios fecales en experimentos de microcalorimetría (A). Se midió la emisión total de calor de la muestra fecal de ratón y se normalizó al peso de la muestra. Antes - antes del tratamiento del cáncer, Después - después del tratamiento del cáncer. Las barras de error representan DE. (B) Patrones de evolución de calor durante el crecimiento de consorcios fecales en microcalorímetro sin sustrato añadido. "antes de CTRL" o "después CTRL" indica la muestra fecal de ratones antes o después de la inducción del cáncer, respectivamente. ERS - dieta de almidón resistente.

Figura 8. Gráficos de puntuación de PLS-DA (A y Q) y puntuaciones VIP (B y M) agrupados por sustratos utilizados en microcalorimetría. Gráficos derivados del análisis integrado de datos microcalorimétricos (calor total acumulado (Q), tasa máxima de evolución de calor (Pmax), tasa de crecimiento específico (m)), consumo de sustratos (levanos, aminoácidos) y formación de productos (ácidos orgánicos, gases y etanol) y los géneros bacterianos cultivados en los experimentos de microcalorimetría. El análisis se realizó mediante el programa MetaboAnalyst 3.0. Lev, NO RS indican levano sin sustrato añadido y almidón resistente utilizado en el experimento de microcalorimetría. A y B en los nombres muestran paralelismos.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, se pretende que todos los términos de la técnica, notaciones y otra terminología científica utilizada en este documento tengan los significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta divulgación. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en este documento para mayor claridad y/o para una fácil referencia; por tanto, la inclusión de tales definiciones en el presente documento no debe interpretarse como una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende generalmente en la técnica.

El término "almidón resistente" en este documento se refiere a almidón y productos de degradación del almidón que escapan de la digestión en el intestino delgado de individuos sanos. El Almidón Resistente se ha clasificado en cuatro tipos [16, 17]:

- RS1 - Almidón resistente físicamente inaccesible o no digerible, tal como el que se encuentra en semillas o legumbres y granos integrales sin procesar.
- RS2: El almidón resistente es inaccesible a las enzimas debido a la conformación del almidón, como en el almidón de maíz con alto contenido de amilosa.

- RS3: El almidón resistente que se forma cuando se cocinan y enfrían alimentos que contienen almidón, tales como la pasta. Ocurre debido a la retrogradación, que se refiere a los procesos colectivos en los que el almidón disuelto se vuelve menos soluble después de ser calentado y disuelto en agua y luego enfriado.
- RS4: Almidones que se han modificado químicamente para resistir la digestión.

5 El término "grasa" también conocido como triglicérido, en este documento se refiere a ésteres de tres cadenas de ácidos grasos y al alcohol glicerol.

El término "excipiente fisiológicamente aceptable" en este documento se refiere a una sustancia desprovista de cualquier efecto farmacológico propio y que no produce reacciones adversas cuando se administra a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Los excipientes fisiológicamente aceptables son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Handbook of Pharmaceutical Excipients, sexta edición (2009).

10 El término "sales y/o derivados farmacéuticamente aceptables" en este documento se refiere a aquellas sales o derivados que tienen la eficacia biológica y las propiedades del compuesto salificado o derivado y que no producen reacciones adversas cuando se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser sales inorgánicas u orgánicas; los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a: carbonato, clorhidrato, bromhidrato, sulfato, hidrógenosulfato, citrato, maleato, fumarato, trifluoroacetato, 2-naftalensulfonato y paratoluensulfonato. Se puede encontrar más información sobre las sales farmacéuticamente aceptables en Handbook of pharmaceutical salts, P. Stahl, C. Wermuth, Wiley-VCH, 127-133, 2008. Los derivados farmacéuticamente aceptables incluyen ésteres, éteres y N-óxidos.

20 El término "uso simultáneo, separado o secuencial" en este documento se refiere a la administración simultánea del primer y segundo compuestos, o la administración de tal manera que los dos compuestos actúan en el organismo del paciente simultáneamente o la administración de un compuesto después del otro compuesto de manera que proporcionan un efecto terapéutico. En algunas realizaciones, los compuestos se toman con una comida. En otras realizaciones, los compuestos se toman después de una comida, por ejemplo, 30 minutos o 60 minutos después de la comida. En algunas realizaciones, se administra un compuesto a un paciente durante un período de tiempo, seguido de la administración del otro compuesto.

25 Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben entenderse como términos "abiertos" (es decir, que significa "que incluye, pero sin limitarse a"), y también deben considerarse un apoyo para términos tales como "consiste esencialmente en", "que consiste esencialmente en", "consiste en" o "que consiste en".

Descripción de la invención

30 Se ha descubierto sorprendentemente que una composición nutricional que comprende al menos almidón resistente, proteínas y grasas es útil para reducir el crecimiento tumoral y el estado de inflamación.

En particular, los resultados del estudio presentados en los ejemplos han demostrado que las intervenciones nutricionales pueden ser beneficiosas para reducir el crecimiento tumoral y, por tanto, pueden usarse en la práctica clínica para sinergizar las terapias convencionales.

35 En el estudio actual los autores de la presente invención también demostraron que una dieta diseñada (Dieta ERS) en donde el almidón de maíz ha sido reemplazado por almidón resistente podría ser una alternativa válida al ayuno para contrarrestar el cáncer de páncreas.

40 En general, en el estudio actual se encontró que la dieta ERS influye en la composición y el metabolismo de la microbiota intestinal (inhibiendo las bacterias proinflamatorias) y esto fue paralelo al retraso del crecimiento tumoral en el modelo de ratón de xenoinjerto PC. Por lo tanto, los resultados del estudio demuestran que se podrían adoptar intervenciones nutricionales que reemplacen el almidón de maíz por almidón resistente en apoyo de las terapias convencionales en el tratamiento clínico del cáncer de páncreas.

45 Por lo tanto, una realización de la presente invención es una composición que comprende almidón resistente, proteínas y grasa como se define en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas, caracterizada por que se administra combinada con o en estrecha proximidad temporal a un agente antitumoral.

Según la presente invención, el almidón resistente incluye almidón resistente de tipo RS1, almidón resistente de tipo RS2, almidón resistente de tipo RS3 y almidón resistente de tipo RS4, preferiblemente un almidón resistente de tipo RS2.

50 Según la presente divulgación, las proteínas comprendidas en la composición se seleccionan entre caseína, L-cistina, proteínas de soja, proteínas de suero o una mezcla de las mismas. Según la invención, las proteínas comprendidas en la composición son una mezcla de caseína y L-cistina.

Según la presente divulgación, las grasas comprendidas en la composición se seleccionan entre aceite de soja, manteca de cerdo, aceite de coco, aceite de oliva y mantequilla o una mezcla de los mismos. Según la invención, las grasas comprendidas en la composición son una mezcla de aceite de soja y manteca de cerdo.

5 En una realización preferida, el almidón resistente está presente en la composición antes mencionada a una razón en peso comprendida entre 40% y 60%, más preferiblemente entre 45% y 55%, con respecto al peso total de la composición.

En una realización preferida, las proteínas están presentes en la composición antes mencionada a una razón en peso comprendida entre el 15% y el 25%, con respecto al peso total del compuesto.

10 En una realización preferida, las grasas están presentes en la composición antes mencionada a una razón en peso comprendida entre 3% y 5%, con respecto al peso total de la composición.

En una realización preferida, la composición de la presente invención comprende opcionalmente al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

La composición de la presente invención comprende componentes adicionales, seleccionados entre carbohidratos, minerales, sales y vitaminas, como se define en las reivindicaciones.

15 Preferiblemente, los carbohidratos de la presente divulgación se seleccionan entre maltodextrina, celulosa, lactosa, sacarosa y pectinas. Según la invención, los carbohidratos comprendidos en la composición son una mezcla de maltodextrina y celulosa.

20 Según la divulgación, las sales de la composición antes mencionada se seleccionan entre fosfato dicálcico, carbonato dicálcico, citrato potásico, cloruro sódico, óxido de magnesio, sulfato de magnesio, molibdato de amonio, sulfato de cromo y potasio, carbonato de cobre, citrato férrico, carbonato de manganeso, yodato de potasio, fluoruro de sodio, selenito de sodio y/o carbonato de zinc. Según la invención, las sales comprendidas en la composición son una mezcla de fosfato dicálcico, carbonato dicálcico y citrato potásico.

25 Preferiblemente, las vitaminas de la composición antes mencionada se seleccionan entre Vitamina A, Vitamina D3, Vitamina E, Vitamina B12, Vitamina B6, Vitamina B1, Vitamina B2, menadiona, biotina, ácido fólico, niacina, ácido pantoténico, bitartrato de colina y/o una mezcla de los mismos.

La composición para uso según la presente invención comprende:

- caseína a una razón en peso comprendida entre el 12% y el 26%;
- L-cistina a una razón en peso comprendida entre 0,2 y 0,5%;
- maltodextrina a una razón en peso comprendida entre el 9% y el 20%;
- 30 • celulosa a una razón en peso comprendida entre 3% y 6,5%;
- aceite de soja a una razón en peso comprendida entre 1,5% y 3%;
- manteca de cerdo a una razón en peso comprendida entre 1% y 3%;
- Almidón Resistente a una razón en peso comprendida entre 35% y 70%;
- minerales a una razón en peso comprendida entre 0,5% y 1,5%;
- 35 • fosfato dicálcico a una razón en peso comprendida entre 0,7 y 2%;
- carbonato dicálcico a una razón en peso comprendida entre 0,1% y 1%;
- citrato de potasio a una razón en peso comprendida entre 0,9% y 2,2%;
- vitaminas a una razón en peso comprendida entre 0,5% y 1,5%;
- bitartrato de colina a una razón en peso comprendida entre 0,1 y 0,25%;

40 con respecto al peso total de la composición.

Un aspecto adicional de la presente divulgación es el uso de dichas composiciones en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, seleccionadas entre cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama y cáncer de ovario.

Según la invención, dicha enfermedad neoplásica es cáncer de páncreas y dicha composición se administra combinada con un agente antitumoral o en estrecha proximidad temporal con el mismo.

Según realizaciones preferidas, la composición para su uso en la presente invención se administra por vía oral o parenteral.

- 5 Preferiblemente, cuando la administración de las composiciones de la invención se realiza por vía oral, la forma farmacéutica puede ser un comprimido, cápsula, gránulos, polvo, solución o suspensión y, más preferiblemente, dicha forma oral puede ser un comprimido, cápsula, gránulos o una solución.

- 10 Preferiblemente, cuando la administración de las composiciones de la invención se realiza por vía parenteral, la forma farmacéutica puede ser una solución tampón acuosa o una cápsula de suspensión oleosa, y más preferiblemente, dicha forma parenteral puede ser una solución oleosa.

La composición para uso según la presente invención se administra combinada con o en estrecha proximidad temporal a al menos otro principio activo, que es un agente antitumoral, preferiblemente un análogo de nucleósido.

Preferiblemente, dichos análogos de nucleósidos se seleccionan entre gemcitabina, 5-fluorouracilo, azacitidina, mercaptopurina, capecitabina, citarabina, doxifluridina y tioguanina.

- 15 En una realización preferida, la composición de la presente invención es una formulación de polvo seco.

Preferiblemente, dicha formulación de polvo seco se reconstituye en agua.

Según una realización preferida, la composición de la presente invención, opcionalmente junto con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable, se administra diariamente a lo largo de toda la duración del programa de quimioterapia, por vía oral al menos 72 horas antes de cada ciclo de quimioterapia.

- 20 Según un aspecto preferido, la administración diaria prevé de una a cuatro dosis al día, incluso más preferiblemente tres dosis diarias para un máximo de 700 g/día.

Según otro aspecto preferido de la invención, la administración diaria se continúa durante un período de al menos 15 días, preferiblemente de al menos 30 días y aún más preferiblemente de al menos 90 días.

- 25 Según un aspecto preferido adicional, tal administración se continúa durante un período de al menos 35 días, preferiblemente durante al menos 65 días.

Preferiblemente, dicha formulación se administra 3 veces al día, durante la duración del programa de quimioterapia durante al menos 2-15 semanas, preferiblemente 12 semanas. Si los pacientes tienen dificultades para adherirse a este régimen, se recomienda un ciclo de 72 horas con este alimento antes de la administración de la quimioterapia.

- 30 Un aspecto de la presente divulgación es el uso de dicha formulación en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, seleccionadas entre cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama y cáncer de ovario.

Según la invención, dicha enfermedad neoplásica es cáncer de páncreas.

- 35 Una realización adicional es un producto alimenticio que comprende la composición de la presente invención para su uso según la invención. Preferiblemente, dicho producto alimenticio es un producto alimenticio líquido, liofilizado, en gel o sólido.

Un aspecto adicional de la presente divulgación es el uso de dicho producto alimenticio en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, seleccionadas entre cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama y cáncer de ovario, preferiblemente cáncer de páncreas.

- 40 Una realización adicional es un kit que comprende un primer recipiente (a) que contiene la composición de la presente invención para su uso según la invención y un segundo recipiente (b) que contiene agua.

Materiales y métodos

1. Cultivo celular y condición de imitación de ERS

- 45 Las células BxPC-3 y PANC-1 se cultivaron en medio DMEM de control (CM) 2 g/L de glucosa con un suplemento de suero bovino fetal (FBS) al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen Life Technologies, Milán, Italia) en atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C o en medio DMEM de imitación de ERS (EMM) (0,5 g/L de glucosa y FBS al 1%) (Tabla 1). Las MIAPaCa-2 se mantuvieron en medio RPMI 1640 de control (Invitrogen Life Technologies, Milán, Italia) o en medio RPMI 1640 en condiciones de imitación de ERS como se describe en otra parte [5]. La proliferación celular se midió mediante el ensayo MTT como se describió anteriormente [6].

Tabla 1. Medio que imita ERS

	Medio de Control	Medio que imita ERS
Medio DMEM o RPMI 1640	90%	98,5%
Glucosa	2 g/L	0,4 g/L
Suero fetal bovino (FBS)	10%	1,5%
Penicilina	100 U/ml	100 U/ml
Estreptomicina	100 µg/ml	100 µg/ml

2. Estudio con animales

El estudio in vivo se realizó en una instalación experimental acreditada por la AAALAC (Asociación para la Evaluación y Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio Internacional). Los protocolos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal. Se suspendieron 5×10^6 células cancerosas BxPC-3-luc por ratón en 0,1 ml de mezcla de PBS/matrigel (1:1) y a continuación se inyectaron s.c. (flanco derecho) en ratones carentes de sistema inmunitario hembra Nu/Nu de 5-6 semanas de edad. Cuando el tamaño del tumor alcanzó un volumen medio de 100 mm³, los ratones carentes de sistema inmunitario portadores de tumores BxPC-3-luc se asignaron aleatoriamente a 2 grupos (6 ratones/grupo): grupo 1 (bajo dieta de control) y grupo 2 (bajo dieta ERS). Los animales tenían libre acceso al agua. El gránulo de dieta ERS consiste en sustituir íntegramente el almidón de maíz por almidón resistente.

Se recolectaron muestras fecales recientes antes y después de la inducción del cáncer de ambos grupos de alimentación. Las muestras fecales se recogieron en un Eppendorf regular estéril de 1,5 ml y se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su uso en experimentos de cultivo.

Tabla 2. Componentes presentes en la dieta ERS y en una Dieta de Control

Ingredientes específicos	Dieta de control (g)	Dieta ERS (g)
Caseína	200	200
L-cistina	3	3
Almidón de maíz	550	0
Maltodextrina	150	150
Almidón resistente	0	550
Celulosa BW200	50	50
Aceite de soja	25	25
Manteca de cerdo	20	20
Mezcla de minerales	10	10
Fosfato dicálcico	13	13
Carbonato dicálcico	5,5	5,5
Citrato de potasio	16,5	16,5
Mezcla de vitaminas	10	10
Bitartrato de colina	2	2

Para los fines de la presente invención, se considera que también es eficaz una variación de 30-40% de esta concentración, siempre que permanezca dentro del alcance reivindicado.

3. Inmunotransferencia

La extracción de proteína total de las células adherentes del cáncer de páncreas y de las muestras de xenoinjerto de cáncer de páncreas congeladas instantáneamente se obtuvo utilizando el tampón de muestras casero Laemmli 2x (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, ditiotretol 100 mM, dodecilsulfato de sodio al 2%, azul de bromofenol al 0,1%, glicerol al 10%) con un suplemento de cóctel inhibidor de proteasa 2x (COMPLETO; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y ortovanadato de sodio 1 mM como ya se describió [7]. Se cargó la misma cantidad de extracto de proteína para cada muestra en gel de poliacrilamida-SDS al 10% y se transfirió a una membrana de PVDF (Whatman, Dassel, Alemania) durante 60 min a 60V. Las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido 1:1000 en Tampón de Bloqueo como se informa en [7]. El anticuerpo policlonal primario

de conejo contra fosfo ERK1/2 (4695), el anticuerpo monoclonal de ratón contra β -actina (C4) (sc-47778) fueron de Santa Cruz Biotechnology (D.B.A. Milán, Italia); los anticuerpos contra ERK1/2 (4370), mTOR (n.º 2972), fosfo-mTOR (n.º 2974), p70S6K (n.º 9202), fosfo-p70S6K (n.º 9205) se obtuvieron de Cell Signalling. Antes de la incubación durante una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios apropiados (BioRad, Hercules, CA de cabra anti-ratón y cabra-anti-conejo diluidos 1:3000) las membranas se lavaron tres veces con solución de lavado (1x solución salina tamponada con Tris, Tween 20 al 0,1% Sigma). La detección en película de rayos X (Amersham Biosciences) de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó utilizando quimioluminiscencia mejorada (ECL; Amersham Biosciences) según las instrucciones del fabricante.

4. Ensayo de gota colgante

Se recolectaron las células BxPC-3 cultivadas, se contaron y se resuspendieron a una concentración final de $2,5 \times 10^6$ ya sea en medio de control o de imitación de ERS. Se pipetearon gotas (20 μ l cada una) sobre la superficie interior de la tapa de una placa de Petri colocada de modo que la gota colgara de la tapa con las células suspendidas en su interior. Para evitar la evaporación, se colocaron 8 ml de PBS en el fondo de la placa de Petri. Después de la incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 5 días, las células se fotografiaron usando un microscopio Nikon Eclipse E600.

5. Inmunofluorescencia

Las células BxPC-3, cultivadas sobre cubreobjetos, se fijaron durante 10 min en paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente (RT). A continuación, las células se lavaron tres veces en PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 5 minutos, se lavaron dos veces de nuevo en PBS y se incubaron con Alexa-Fluor 555/Faloidina diluida 1:50 en PBS, albúmina de suero bovino al 1% (BSA), durante 30 minutos a RT. Después de enjuagar tres veces en PBS, se montaron cubreobjetos sobre portaobjetos de microscopio con medio de montaje que contenía DAPI. Para la microscopía de fluorescencia, se observaron los portaobjetos montados para inmunofluorescencia utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600.

6. Inmunohistoquímica

Las secciones de cáncer de páncreas de ratones incluidas en parafina asignadas a los dos grupos diferentes se inmunotñeron mediante el uso de un kit de detección disponible comercialmente (EnVision™ FLEX+, Dako, Glostrup, Dinamarca) siguiendo el protocolo del fabricante ya descrito [8]. Los anticuerpos primarios para Ki67 (n.º de cat. M7240) y CD31 (n.º de cat. IR61061) eran de Dako. Se utilizó la sustitución del anticuerpo primario por suero normal solo para comprobar la especificidad de todas las reacciones. Se analizaron controles positivos y negativos de forma concomitante. La inmunorreactividad de Ki67 fue evaluada ciegamente por un patólogo experto que evaluó un sistema de puntuación semicuantitativo en diez campos de alta potencia (10HPF, X 400) según una escala semicuantitativa de negativo a 3+ (-: 0%; +: 1-33%; ++: 34-66%; +++: 67-100%).

7. Microcalorimetría isotérmica

Para la preparación de los inóculos, se descongelaron muestras fecales de 0,02-0,4 g y se mezclaron con 5 PBS desaireado estéril que contenía (concentración final, mM): NaCl - 160, KCl - 3, Na₂HPO₄ - 8, NaH₂PO₄ - 1, pH 7,2, con un suplemento de Cys-HCl recién preparado y esterilizado por filtración (0,5 g/L en medio final) y solución de tioglicolato de sodio sometido a autoclave (0,5 g/L en medio final) como agentes reductores y 4 ml de solución de sustrato o agua (como control sin carbohidratos adicionales). La solución de sustrato contenía 5 g/L de levano preparado como se muestra en [9] o almidón resistente (maltodextrina de Tapioca, C1, Cargill; Alemania GmbH). Todos los medios de crecimiento se redujeron previamente en un recipiente anaeróbico (Anaero-Gen™, GasPack System, Oxoid Inc., Reino Unido) antes de la inoculación de los cultivos fecales.

Las ampollas calorimétricas de 3,3 ml se llenaron con 2 ml del medio inoculado, se cerraron herméticamente y se incubaron a 37°C en un microcalorímetro isotérmico TAM III de 24 canales (TA Instruments, Delaware, EE. UU.) Como describen Kabanova *et al.* [10]. Se registró el flujo de calor (P, μ W) y se calculó el calor total acumulado (Q, J) que es proporcional a la cantidad de biomasa mediante la integración del flujo de calor. Todas las muestras fecales se analizaron al menos por duplicado.

8. Determinación de metabolitos

Las muestras del comienzo y el final de los experimentos de crecimiento se analizaron en busca de metabolitos y secuencias microbianas del ADNr 16S. Las muestras se centrifugaron (21000 g, 10 min), se añadió una solución de ácido sulfosalicílico al 10% al sobrenadante (1:0,25 vol/vol) y tanto el sedimento como el sobrenadante se almacenaron a -20°C hasta el análisis. Antes de los análisis cromatográficos, las muestras de sobrenadante se centrifugaron (21000 g, 15 min, 4°C) y se filtraron a través de filtros de jeringa de PTFE de 0,20 μ m (filtros Millex SLLGH13NK, Millipore). Las muestras iniciales (0 h) se ultrafiltraron adicionalmente usando Dispositivos de Filtro Centrífugo AmiconR Ultra-10K, corte de 10 kDa (Millipore).

Las concentraciones de ácidos orgánicos (succinato, lactato, formiato, acetato, propionato, isobutirato, butirato, isovalerato, valerato), glicerol y etanol se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC,

sistema Alliance 2795, Waters, Milford, MA), usando una columna BioRad HPX-87H (Hercules, CA) con elución isocrática de H_2SO_4 0,005 M a una velocidad de flujo de 0,5-0,6 ml/min a 35°C. Para la cuantificación de las sustancias se utilizaron detectores de índice de refracción (IR) (modelo 2414; Waters) y UV (210 nm; modelo 2487; Waters). El límite de detección para la HPLC fue 0,1 mM.

5 9. Análisis del microbioma

El ADN se extrajo del sedimento celular utilizando kits de extracción de ADN MoBioPowerFecal (MoBio, Carlsbad, Canadá) según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron cebadores universales S-D-Bact-0341-b-S-17 Directo y S-D-Bact-0785-a-A-21 Inverso [publicado por Klindworth A, Priesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M y Glockner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(1):e1], para la amplificación por PCR de las regiones hipervariables V3-V4 de genes de ARNr 16S. La región amplificada fue de aproximadamente 450 pb y se obtuvieron de promedio 12000 lecturas por muestra. La mezcla de amplicones fue pirosecuenciada usando la plataforma IlluminaMiSeq 2x250 v2.

Los datos de la secuencia se analizaron utilizando BION-meta, un programa de código abierto, según las instrucciones del autor. Primero, las secuencias se limpiaron en ambos extremos usando un punto de corte para una calidad mínima de 95%, seguido de la eliminación de lecturas más cortas de 350 pb. En segundo lugar, las secuencias se agruparon basándose en una similitud de semilla mínima de 99,5% (lecturas consenso). Por último, las lecturas consenso se alinearon taxonómicamente con la base de datos de ARNr 16S de referencia SILVA (v123) utilizando un mínimo de coincidencia de 90%.

20 10. análisis estadístico

El índice de diversidad de Shannon (H') se calculó según la fórmula:

$$H' = - \sum_i^R p_i \cdot$$

$\ln(p_i)$ donde R representaba la riqueza (número total de especies identificadas en la muestra) y p_i representaba la abundancia relativa de i° especies de la muestra. Para el análisis multivariado, los datos de todos los experimentos (abundancia de taxones bacterianos, características de crecimiento de calorimetría y producciones/consumos de metabolitos) se fusionaron en una tabla de matriz. El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de los datos se realizó utilizando el soporte lógico MetaboAnalyst 3.0 basado en la web [12]. Para los experimentos *in vitro* y con ratones los resultados se expresan como media $\pm$ DE. Las comparaciones se realizaron utilizando la prueba t de Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$ (*) o $P < 0,01$ (**) o $P < 0,001$ (***).

30 Resultados

Detección de la vía ERK1/2 y mTOR en células de cáncer de páncreas en condiciones de cultivo que imitan ERS

Como primer paso, los autores de la presente invención plantearon la hipótesis de que el cultivo que imita ERS podría ser responsable de inhibir la proliferación de las células. Con este objetivo, los autores de la presente invención evaluaron la activación de las vías ERK1/2 y mTOR que son bien conocidas por ser sensibles a los nutrientes y estar involucradas en las vías de proliferación [13-15]. Como se muestra en la Figura 1, el medio que imita ERS inhibe significativamente la fosforilación de ERK1/2 en las líneas celulares Bx-PC3 y PANC-1 (A-C; D-F), mientras que se observó un aumento del nivel de fosforilación de ERK1/2 en las células MiaPaca-2 (B). Este último, sin embargo, muestra un nivel reducido de la forma total de ERK1/2 (E) mediante análisis de inmunotransferencia. Además, las tres líneas celulares mostraron una viabilidad celular reducida según se evaluó mediante el ensayo MTT (Fig. 1G-H-I). Además, cuando se investigó la vía de mTOR, se observó un nivel reducido de fosforilación de mTOR en las tres líneas celulares (Fig. 2A-B-C) con la consiguiente reducción de la fosforilación de su sustrato p70S6K (Fig. 2D-E-F).

Efecto de las condiciones de cultivo que imitan ERS sobre la agregación célula-célula.

En vivo, los tumores sólidos crecen en una conformación espacial tridimensional (3D) que da como resultado una exposición diferente de las células a los vasos sanguíneos, nutrientes y compuestos quimioterapéuticos. Para imitar mejor la arquitectura *in vivo* de los órganos, los autores de la presente invención desarrollaron a continuación un cultivo de células en 3D para evaluar el efecto de la dieta que imita ERS sobre la agregación célula-célula.

Como se muestra en la Figura 3, en los modelos 3D, el medio que imita ERS (B) inhibe la agregación de las células BxPC-3 en comparación con el medio de control (A). Esto sugiere que, dado que las células están más dispersas, la quimioterapia podría llegar a ellas mejor, resultando más eficaz.

Efecto de las condiciones de cultivo que imitan ERS sobre la formación de invadopodios.

La migración e invasión celular juegan un papel clave en la propagación de las células cancerosas durante la metástasis. Las células cancerosas invasoras reorganizan su citoesqueleto y producen protuberancias de membrana, llamadas invadopodios. Con el fin de evaluar si las condiciones de cultivo podrían afectar la invasividad de las células

cancerosas, en las células BxPC-3 cultivadas en medio de control o en medio que imita ERS, se tiñó la actina citoesquelética con Faloidina fluorescente y se tomaron fotografías al microscopio de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 4, las células cultivadas en medio de control (A) mostraron protuberancias de membrana mientras que las células cultivadas en condiciones que imitaban ERS (B) no. Esto sugiere que el medio que imitaba ERS disminuiría el potencial invasivo de las células de cáncer de páncreas.

Efecto de la dieta ERS sobre el crecimiento tumoral en ratones con xenoinjerto de cáncer de páncreas

Los autores de la presente invención evaluaron a continuación los efectos del tratamiento con dieta ERS en un modelo de ratón con xenoinjerto de cáncer de páncreas. Como se muestra en la Figura 5 (A y B), los ratones sometidos a dieta ERS mostraron una progresión retardada leve pero significativa del tumor de cáncer de páncreas ($p = 0,04$) en comparación con los ratones de control. No se observaron diferencias significativas en el peso corporal total entre los dos grupos de ratones (Figura 5C).

Los autores de la presente invención evaluaron a continuación la expresión de marcadores de proliferación y muerte celular/apoptosis en biopsias de cáncer de páncreas de ratones. La positividad de Ki67 fue mayor en los ratones alimentados con dieta de control mostrando 60% de los ratones los niveles positivos más altos (Figura 5D panel c) mientras que en el grupo de dieta ERS 40% de los ratones fueron positivos para la tinción de Ki67 y 60% restante de los ratones fueron levemente positivos (panel d). Además, al teñir para neoangiogénesis, utilizando un anticuerpo anti-CD31, todos los ratones del grupo de control mostraron un total más alto de niveles de CD31 (figura 5D panel e) en comparación con los ratones tratados con ERS (panel f). Además, ERK1/2 y mTOR (con su sustrato directo p70S6K) se determinaron mediante transferencia Western en un subconjunto de ratones tratados con dieta de control o dieta ERS. Como se muestra en la Figura 1 complementaria, ambas vías tendieron a estar reguladas por disminución sin alcanzar una significación estadística.

Caracterización de microbiota y metabolitos de muestras fecales.

En total, se encontraron 65 taxones bacterianos que superaban 0,5% de abundancia relativa en heces de ratones alimentados con dieta de control y/o ERS. La composición inicial de los consorcios fecales estuvo dominada por phylum *Firmicutes* (más de 50%). Los principales taxones representados en las muestras pertenecían a *Lactobacillus*, *Lachnospiraceae*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Aeromonas* y *Escherichia* (Figura 6A). La mayoría de las bacterias detectadas estaba presente en todas las muestras fecales. Sin embargo, la diversidad de la microbiota fue mayor en los ratones alimentados con dieta ERS que en el grupo de control (índices de Shannon $3,56 \pm 0,06$ y $3,34 \pm 0,2$, respectivamente). Después de la inducción de cáncer, la diversidad de la microbiota se redujo, especialmente en el caso de la dieta de control en comparación con la dieta ERS (índices de Shannon $3,0 \pm 0,01$ y $3,05 \pm 0,18$, respectivamente). *Bacteroides acidifaciens* y *Escherichia sp.* fueron las especies dominantes (5-20 y 6-8%, respectivamente) en ratones con xenoinjerto de cáncer alimentados con dieta de control, mientras que las especies de *Blautia* y *Aeromonas* fueron dominantes (más de 15%) en ratones con xenoinjerto de cáncer alimentados con dieta ERS. La única especie encontrada solo en muestras fecales de ratones alimentados con dieta ERS y antes, pero no después de la inducción del cáncer fue *Bacteroides thetaiotaomicron* (abundancia relativa de 1%). Este último también fue detectable en cantidades menores (0,1%) en ratones con xenoinjerto alimentados con dieta de control. Los perfiles de metabolitos difirieron entre las muestras fecales dependiendo del alimento (dieta de control frente a ERS). El principal producto de fermentación antes de la inducción del cáncer fue el acetato (53 y 56% de todos los ácidos producidos en la dieta de control o ERS, respectivamente) seguido de propionato, succinato y lactato, mientras que el butirato se detectó solo en cantidades insignificantes (Figura 6B). Después de la inducción del cáncer, se observó una reducción significativa en la producción de acetato en ambas dietas (2,5 y 9 veces en la dieta de control y ERS, respectivamente), que fue reemplazada por la producción de propionato, especialmente en la dieta de control. Es notable que no se produjera lactato con la dieta de control, mientras que la producción de succinato fue insignificante con la dieta ERS. La producción total de ácido antes de la inducción del cáncer fue similar en ambas dietas, sin embargo, después de la inducción se redujo casi dos veces con la dieta ERS de 105 a 59 mmol/gDW pero no con la dieta de control.

La Tabla 3 muestra la producción de ácidos orgánicos durante el crecimiento de la microbiota fecal en microcalorímetro sin sustrato añadido (mmol/gDW).

Tabla 3

Muestra	Acetato	Butirato	Formiato	Lactato	Propionato	Succinato
Dieta de control antes	906±160	100±23	335±248	199±179	185±50	143±52
Dieta de control después	559±3	-	260±39	51±30	133±27	74±3
Dieta ERS antes	922±110	33±46	353±246	160±26	88±124	131±22
Dieta ERS después	533±211	-	338±27	220±56	73±5	65±58

Experimentos de crecimiento con microbiota fecal

Para dilucidar el potencial de la dieta ERS y un polifruetano levano para modular la composición y el patrón de fermentación de la microbiota fecal, se llevaron a cabo experimentos de crecimiento *in vitro*. Los experimentos de crecimiento utilizando inóculos fecales de ratones después y antes de la inducción del cáncer, se realizaron en un medio definido que contenía levano, almidón resistente o ningún sustrato adicional (control). La generación de calor (crecimiento de biomasa) de los cultivos de control se produjo a expensas de los sustratos residuales (carbohidratos complejos y proteínas) en la materia fecal, accesibles a los microorganismos. Se pueden discriminar dos fases en las curvas de crecimiento con muestras tomadas antes de la inducción del cáncer (Figura 7B), pero el crecimiento de bacterias a partir de muestras de ratones en los que se había inducido cáncer alimentados con medio ERS fue rápido dentro de la fase única, lo que indica tasas metabólicas rápidas de bacterias en estas muestras. Hubo aproximadamente 30% de diferencia en el calor acumulado entre las muestras recolectadas antes y después de la inducción del cáncer (110-120 frente a 74-75 J/g, respectivamente, Figura 7A) independientemente de las dietas de los ratones. El cambio de calor acumulado, entre muestras de antes y después de la inducción del cáncer, podría indicar la modificación de la diversidad de la comunidad microbiana (véase más arriba). Mediante el análisis PLS-DA que combina todos los datos (metabolitos, datos de calor y datos de secuenciación), la tasa máxima de evolución de calor que indica una actividad metabólica rápida fue el parámetro más importante que discrimina el crecimiento de consorcios en experimentos de microcalorimetría (Figuras 8). Además, otros dos parámetros importantes que tienen puntuaciones altas de VIP fueron la abundancia relativa de *C. cocleatum*, que fue alta en RS y la producción de formiato, que fue alta en levano.

Resultados. Las células de cáncer de páncreas cultivadas en medio que imita la dieta ERS mostraron niveles reducidos de fosfo-ERK1/2 y niveles de fosfo-mTOR en comparación con las cultivadas en medio convencional. De manera constante, los ratones con cáncer de páncreas de xenoinjerto sometidos a dieta ERS mostraron un retraso significativo en el crecimiento del tumor. En experimentos de crecimiento *in vitro*, los cultivos microbianos fecales de ratones alimentados con dieta ERS mostraron un mayor crecimiento en sustratos residuales, mayor producción de formiato y lactato y menor cantidad de propionato en comparación con la microbiota fecal de ratones alimentados con dieta de control.

Conclusión. Un efecto positivo de la dieta ERS sobre la composición y el metabolismo de la microbiota fecal de los ratones mostrado *in vitro* está asociado con la disminución de la progresión tumoral en el modelo de ratón de xenoinjerto de PC *in vivo*. Estos resultados demuestran que las intervenciones nutricionales diseñadas podrían ser de apoyo como un enfoque sinérgico para mejorar la eficacia de los tratamientos contra el cáncer existentes en pacientes con cáncer de páncreas.

Ejemplos de composiciones

Composición (referencia)

- caseína	140 g;
- L-cistina	1 g;
- maltodextrina	100 g;
- celulosa	30 g;
- aceite de soja	15 g;
- manteca de cerdo	5 g;
- almidón resistente	380 g;
- mezcla de minerales	2 g;
- fosfato dicálcico	3,5 g;
- carbonato dicálcico	1,5 g;
- citrato de potasio	4 g;
- mezcla de vitaminas	2 g;
- bitartrato de colina	0,5 g.

Composición 2 (referencia)

- caseína	260 g;
- L-cistina	4 g;
- maltodextrina	200 g;
- celulosa	70 g;

ES 2 870 917 T3

- aceite de soja	35 g;
- manteca de cerdo	30 g;
- almidón Resistente	710 g;
- mezcla de minerales	15 g;
- fosfato dicálcico	17 g;
- carbonato dicálcico	8 g;
- citrato de potasio	20 g;
- mezcla de vitaminas	15 g;
- bitartrato de colina	4 g.

Composición 3

- caseína	200 g;
- L-cistina	3 g;
- maltodextrina	150 g;
- celulosa	50 g;
- aceite de soja	25 g;
- manteca de cerdo	20 g;
- almidón resistente	500 g;
- mezcla de minerales	10 g;
- fosfato dicálcico	13 g;
- carbonato dicálcico	5,5 g;
- citrato de potasio	16,5 g;
- mezcla de vitaminas	10 g;
- bitartrato de colina	2 g.

Composición 4 (referencia)

- caseína	190 g;
- L-cistina	4 g;
- maltodextrina	200 g;
- celulosa	60 g;
- aceite de soja	35 g;
- manteca de cerdo	15 g;
- almidón resistente	485 g;
- mezcla de minerales	14 g;
- fosfato dicálcico	18 g;
- carbonato dicálcico	5 g;
- citrato de potasio	14 g;
- mezcla de vitaminas	12,5 g;
- bitartrato de colina	2,5 g.

Composición 5 (referencia)

- caseína	215 g;
- L-cistina	2,5 g;
- maltodextrina	110 g;
- celulosa	70 g;
- aceite de soja	30 g;
- manteca de cerdo	22 g;

- almidón resistente	565 g;
- mezcla de minerales	8 g;
- fosfato dicálcico	8 g;
- carbonato dicálcico	7 g;
- citrato de potasio	10,5 g;
- mezcla de vitaminas	7 g;
- bitartrato de colina	2 g.

Composición 6

- caseína	175 g;
- L-cistina	4 g;
- maltodextrina	130 g;
- celulosa	35 g;
- aceite de soja	25 g;
- manteca de cerdo	25 g;
- almidón resistente	600 g;
- mezcla de minerales	10 g;
- fosfato dicálcico	15 g;
- carbonato dicálcico	6,5 g;
- citrato de potasio	20 g;
- mezcla de vitaminas	8 g;
- bitartrato de colina	1,5 g

Composición 7

- caseína	260 g;
- L-cistina	2 g;
- maltodextrina	185 g;
- celulosa	45 g;
- aceite de soja	20 g;
- manteca de cerdo	15 g;
- almidón resistente	465 g;
- mezcla de minerales	12 g;
- fosfato dicálcico	11 g;
- carbonato dicálcico	6 g;
- citrato de potasio	18 g;
- mezcla de vitaminas	13,5 g;
- bitartrato de colina	2,5 g

Composición 8

- caseína	230 g;
- L-cistina	2 g;
- maltodextrina	175 g;
- celulosa	55 g;
- aceite de soja	20 g;
- manteca de cerdo	14 g;
- almidón resistente	500 g;
- mezcla de minerales	8 g;
- fosfato dicálcico	14 g;

- carbonato dicálcico	7 g;
- citrato de potasio	16 g;
- mezcla de vitaminas	12 g;
- Bitartrato de colina	2 g.

Referencias

1. Siegel R, Naishadham D y Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012; 62(1):10-29.
- 5 2. D'Aronzo M, Vinciguerra M, Mazza T, Panebianco C, Saracino C, Pereira SP, Graziano P y Pazienza V. Fasting cycles potentiate the efficacy of gemcitabine treatment in in vitro and in vivo pancreatic cancer models. *Oncotarget.* 2015; 6(21):18545-18557.
3. Mathews EH y Liebenberg L. Short-term starvation for cancer control in humans. *ExpGerontol.* 2013; 48(11):1293.
4. Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, Perkins SN y Barrett JC. Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annu Rev Med.* 2003; 54:131-152.
- 10 5. Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G y Longo VD. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(24):8215-8220.
- 15 6. Pazienza V, la Torre A, Baorda F, Alfarano M, Chetta M, Muscarella LA, Battista C, Copetti M, Kotzot D, Kapelari K, Al-Abdulrazzaq D, Perlman K, Sochett E, Cole DE, Pellegrini F, Canaff L, et al. Identification and functional characterization of three NoLS (nucleolar localisation signals) mutations of the CDC73 gene. *PLoS One.* 2013; 8(12):e82292.
7. Benegiamo G, Vinciguerra M, Mazzocchi G, Piepoli A, Andriulli A y Pazienza V. DNA methyltransferases 1 and 3b expression in Huh-7 cells expressing HCV core protein of different genotypes. *Dig Dis Sci.* 2012; 57(6):1598-1603.
- 20 8. Rappa F, Greco A, Podrini C, Cappello F, Foti M, Bourgoin L, Peyrou M, Marino A, Scibetta N, Williams R, Mazzocchi G, Federici M, Pazienza V y Vinciguerra M. Immunopositivity for histone macroH2A1 isoforms marks steatosis-associated hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2013; 8(1):e54458.
- 25 9. Adamberg S, Tomson K, Vija H, Puurand M, Kabanova N, Visnapuu T, Jogi E, Alamae T y Adamberg K. Degradation of Fructans and Production of Propionic Acid by *Bacteroides thetaiotaomicron* are Enhanced by the Shortage of Amino Acids. *Front Nutr.* 2014; 1:21.
10. Kabanova N, Kazarjan A, Stulova I y Vilu R. Microcalorimetric study of growth of *Lactococcus lactis* IL1403 at different glucose concentrations in broth. *Thermochimica Acta.* 2009; (496):87-92.
- 30 11. Klindworth A, Priesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M y Glockner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (1):e1.
12. Xia J, Sinelnikov IV, Han B y Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(W1):W251-257.
13. Apontes P, Leontieva OV, Demidenko ZN, Li F y Blagosklonny MV. Exploring long-term protection of normal human fibroblasts and epithelial cells from chemotherapy in cell culture. *Oncotarget.* 2011; 2(3):222-233.
- 35 14. Liu Y, Duysen E, Yaktine AL, Au A, Wang W y Birt DF. Nutritional energy restriction inhibits ERK but not JNK or p38 activity in the epidermis of SENCAR mice. *Carcinogenesis.* 2001; 22(4):607-612.
15. Longo VD y Fontana L. Intermittent supplementation with rapamycin as a nutritional restriction mimetic. *Aging (Albany NY).* 2011; 3(11):1039-1040.
16. Nugent AP. (2005); "Health properties of resistant starch". *Br Nutr Foundation Nutr Bull* 30:27-5;
- 40 17. Sajilata, M. G.; Singhal, Rekha S.; Kulkarni, Pushpa R. (Enero 2006). "Resistant Starch - A Review". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 5 (1): 1-17.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 - caseína en una razón en peso comprendida entre el 12% y el 26%;
 - L-cistina en una razón en peso comprendida entre el 0,2 y el 0,5%;
 - 5
 - maltodextrina en una razón en peso comprendida entre el 9% y el 20%;
 - celulosa en una razón en peso comprendida entre el 3% y el 6,5%;
 - aceite de soja en una razón en peso comprendida entre el 1,5% y el 3%;
 - manteca de cerdo en una razón en peso comprendida entre el 1 y el 3%;
 - almidón resistente en una razón en peso comprendida entre el 35 y el 70%;
 - 10
 - minerales en una razón en peso comprendida entre el 0,5% y el 1,5%;
 - fosfato dicálcico en una razón en peso comprendida entre el 0,7 y el 2%;
 - carbonato dicálcico en una razón en peso comprendida entre el 0,1% y el 1%;
 - citrato de potasio en una razón en peso comprendida entre el 0,9 y el 2,2%;
 - vitaminas en una razón en peso comprendida entre el 0,5% y el 1,5%;
 - 15
 - bitartrato de colina en una razón en peso comprendida entre el 0,1 y el 0,25%;
- con respecto al peso total de la composición,
- para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas, caracterizada por que se administra combinada con o en estrecha proximidad temporal a un agente antitumoral.
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, caracterizada por que es una formulación de polvo seco.
 - 20 3. Composición para su uso según la reivindicación 1, caracterizada por que se administra por vía oral o vía parenteral.
 4. Composición para su uso según la reivindicación 1, caracterizada por que dicho agente antitumoral es un análogo de nucleósido.
 - 25 5. Producto alimenticio que comprende la composición según las reivindicaciones 1 a 4 para su uso según la reivindicación 1, caracterizado por que es un producto alimenticio líquido, en gel o sólido.
 6. Kit que comprende un primer recipiente (a) que contiene la composición según las reivindicaciones 1 o 4 para su uso según la reivindicación 1 y un segundo recipiente (b) que contiene agua.

Figura 1

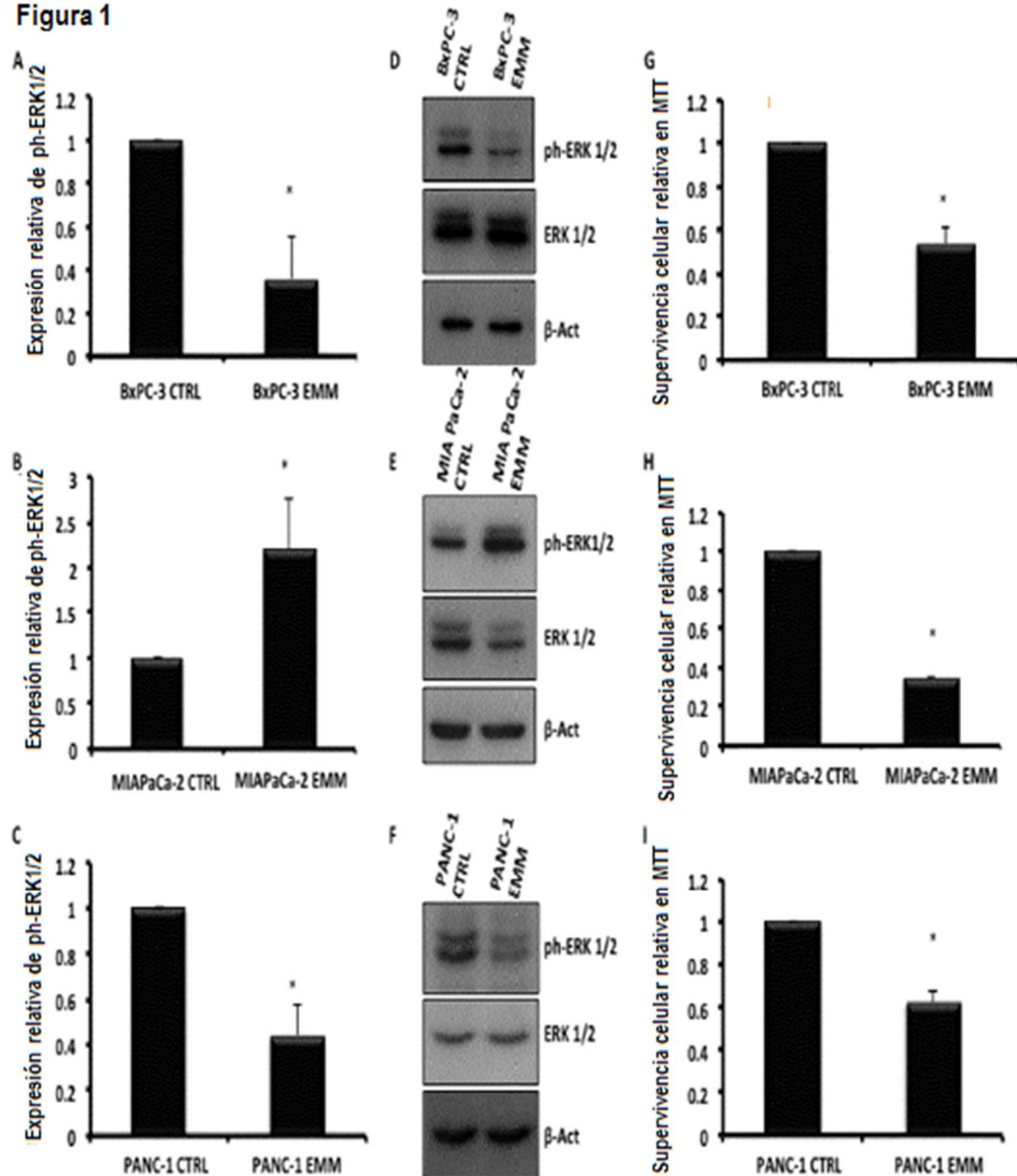


Figura 2

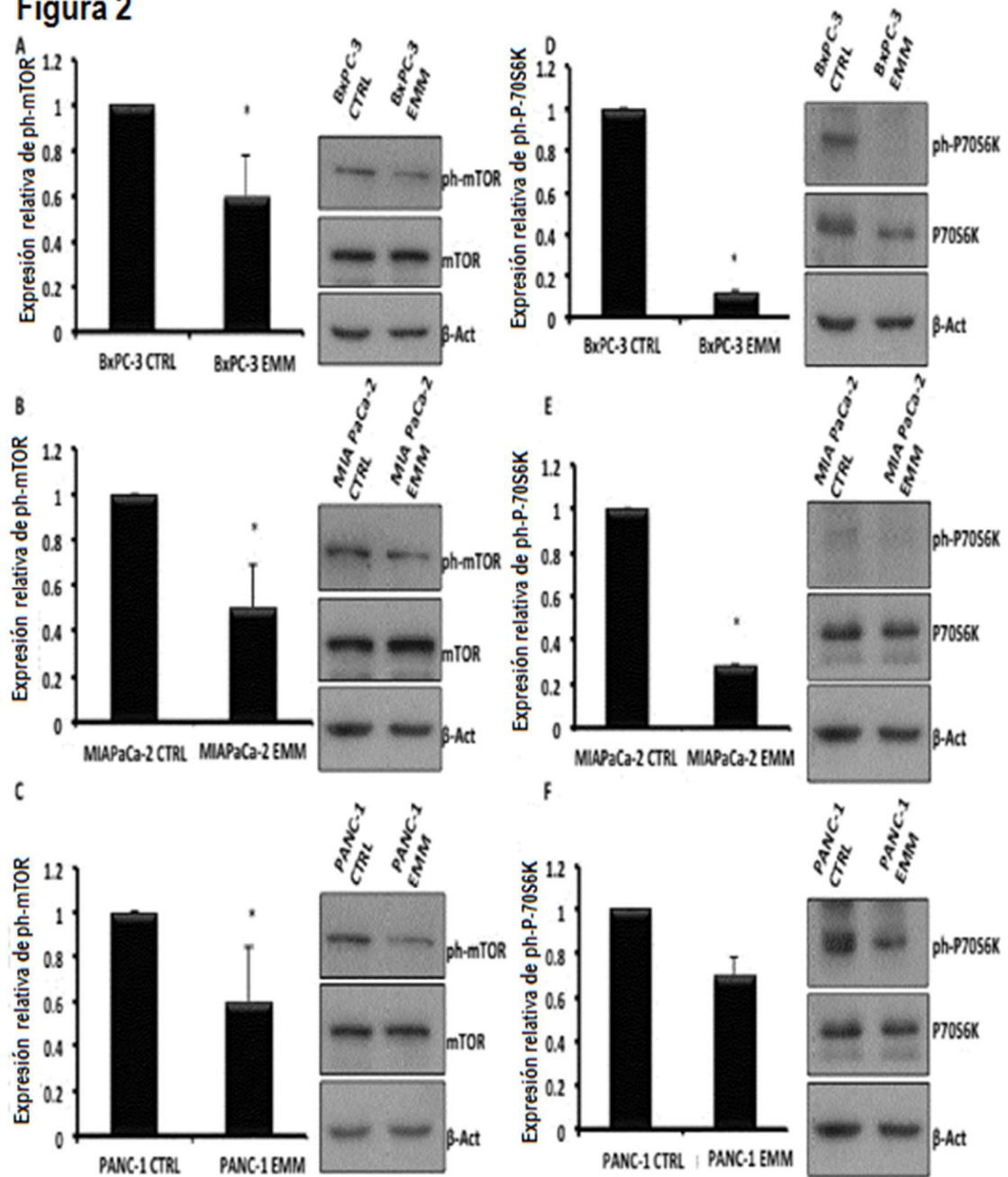


Figura 3

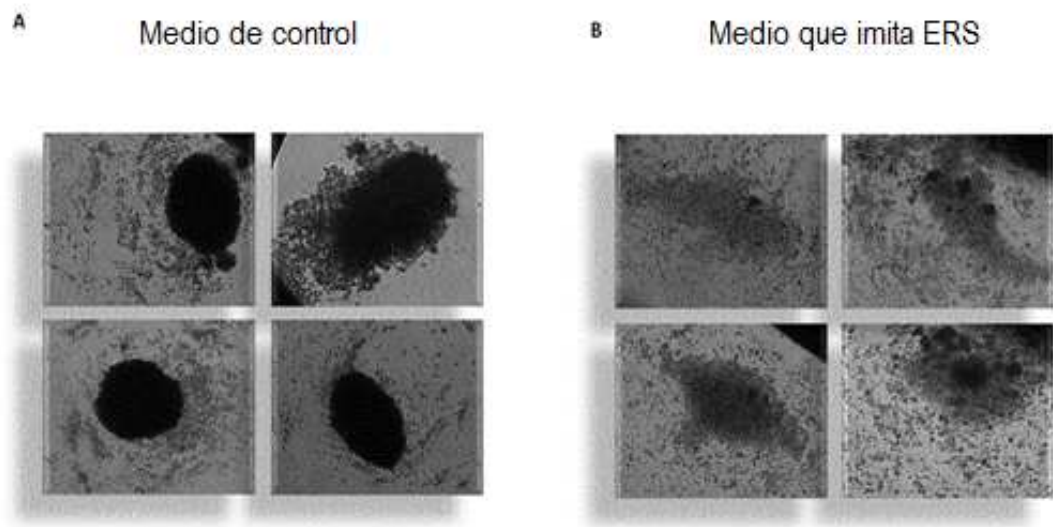


Figura 4

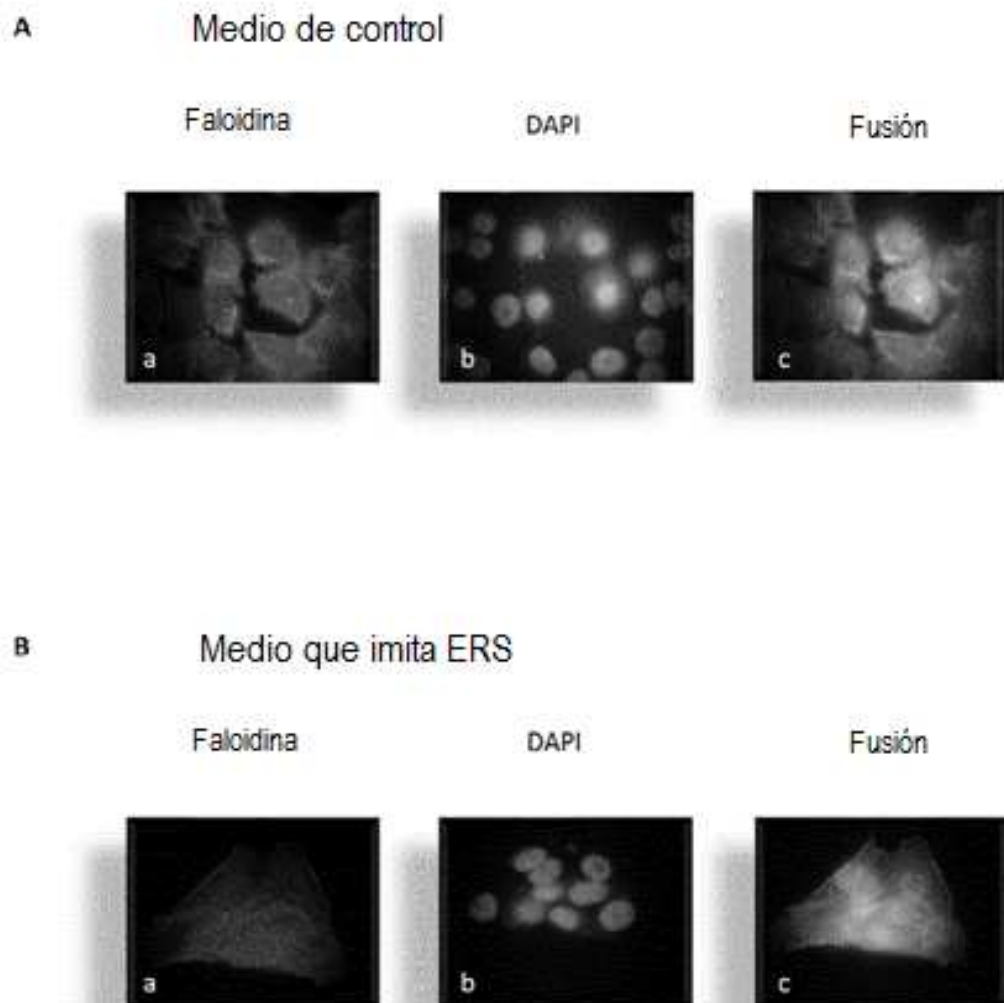


Figura 5

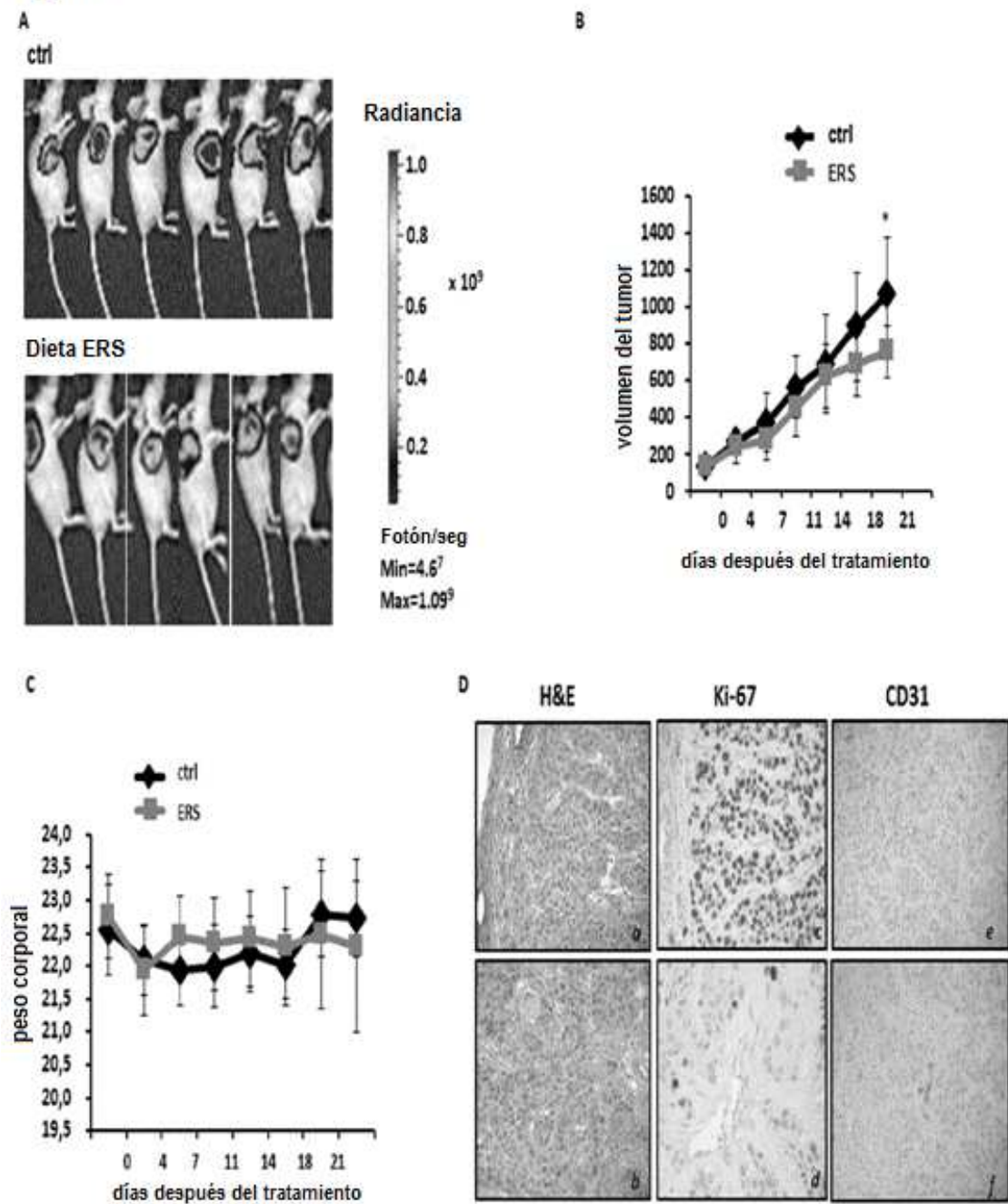


Figura 6A

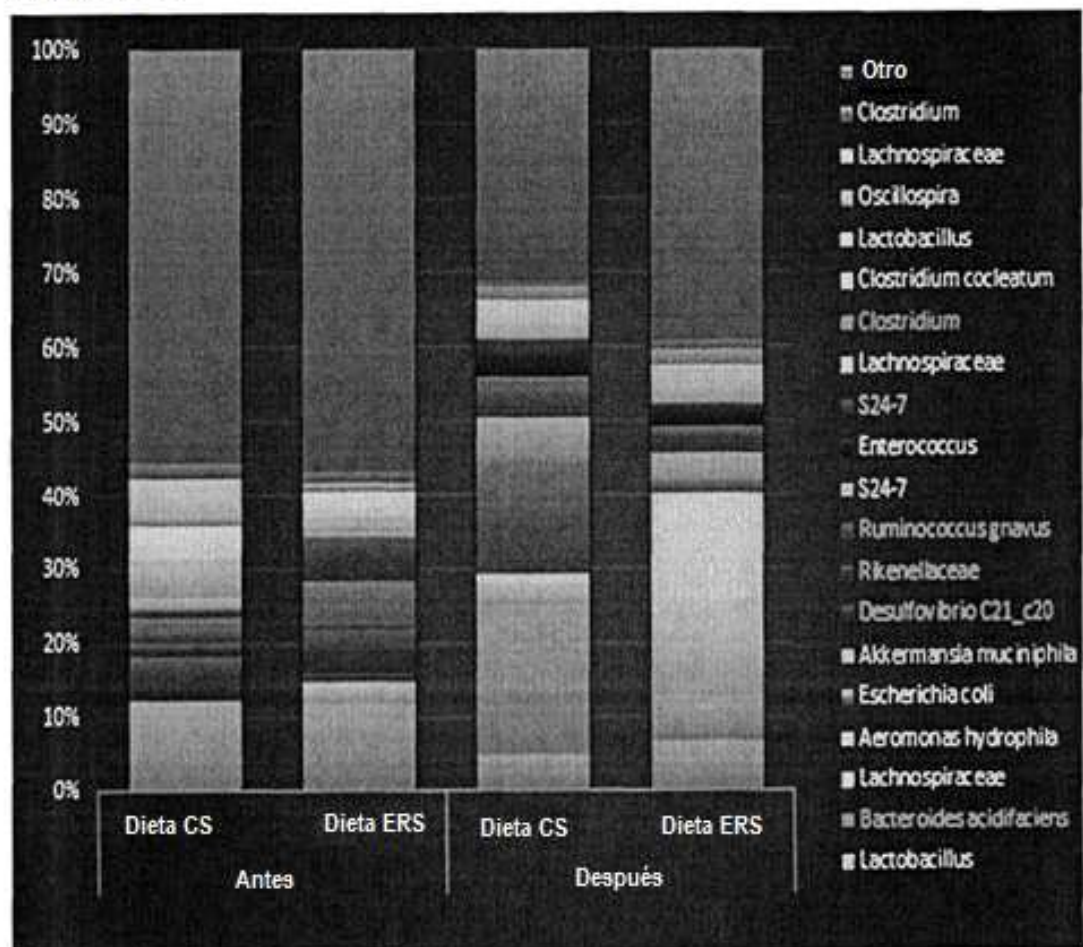


Figura 6B

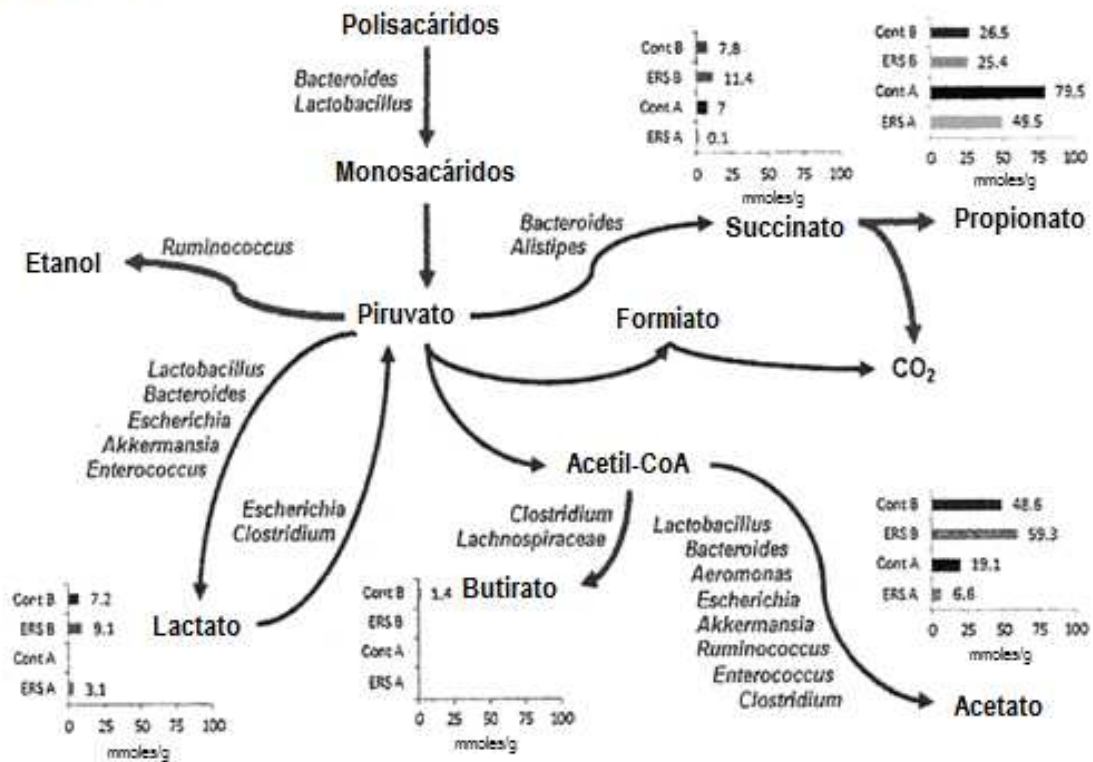


Figura 7

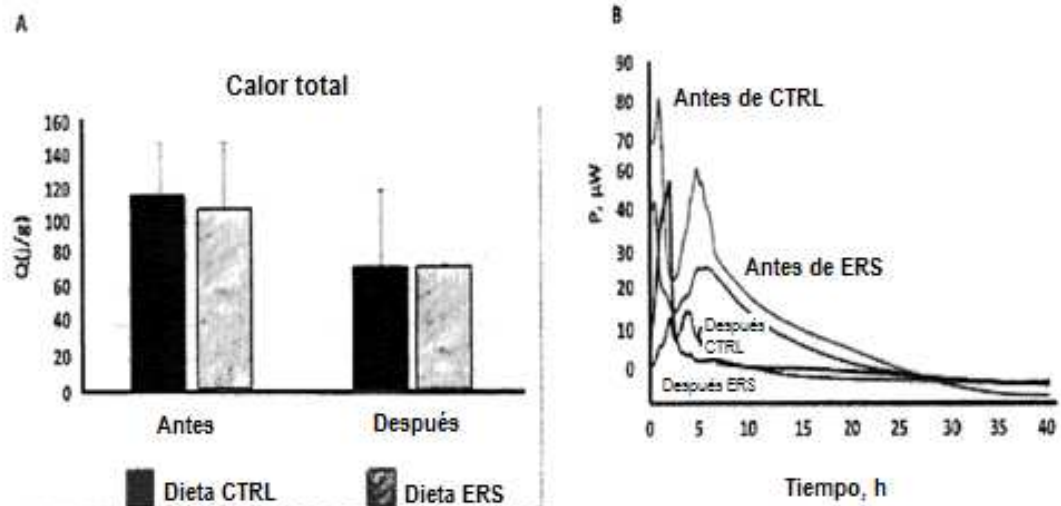


Figura 8A

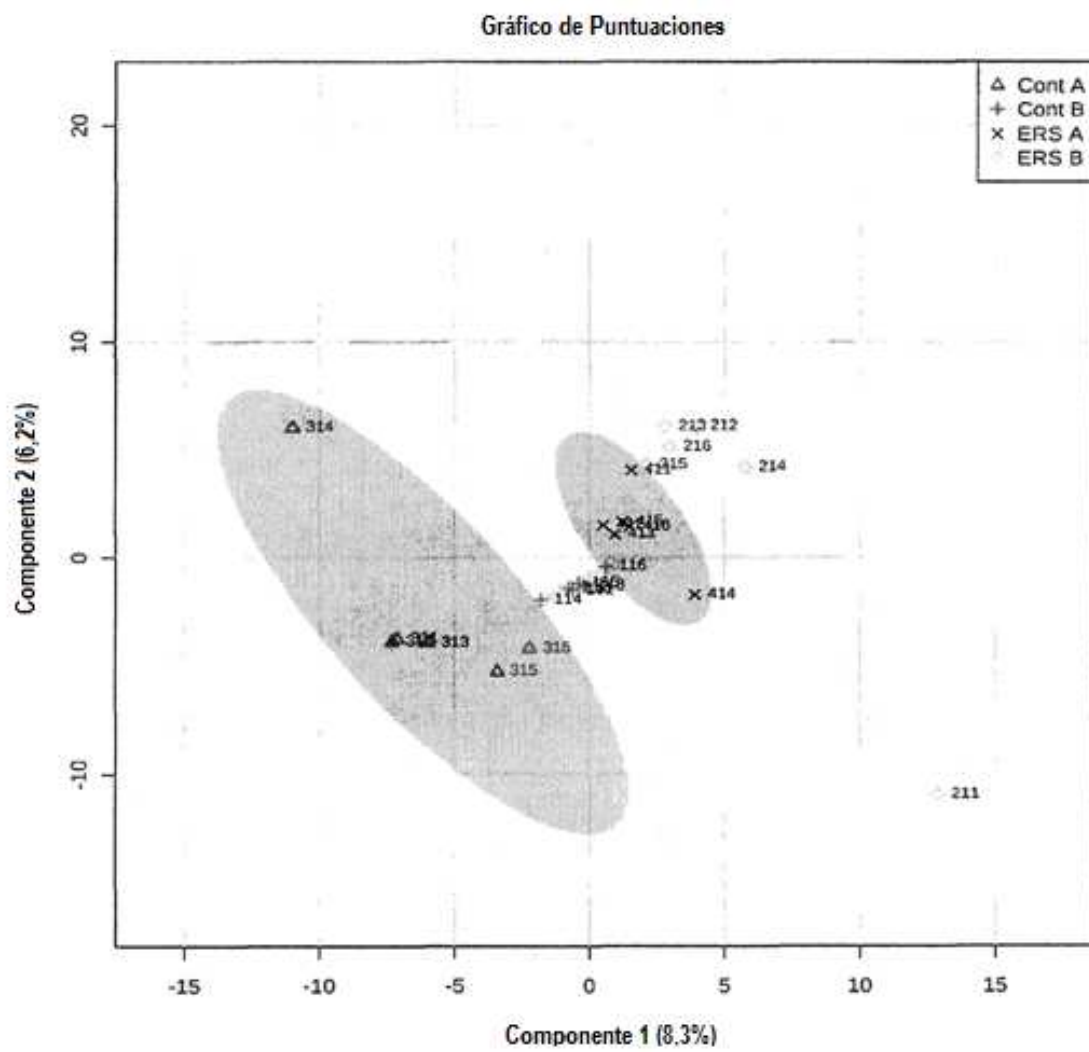


Figura 8B

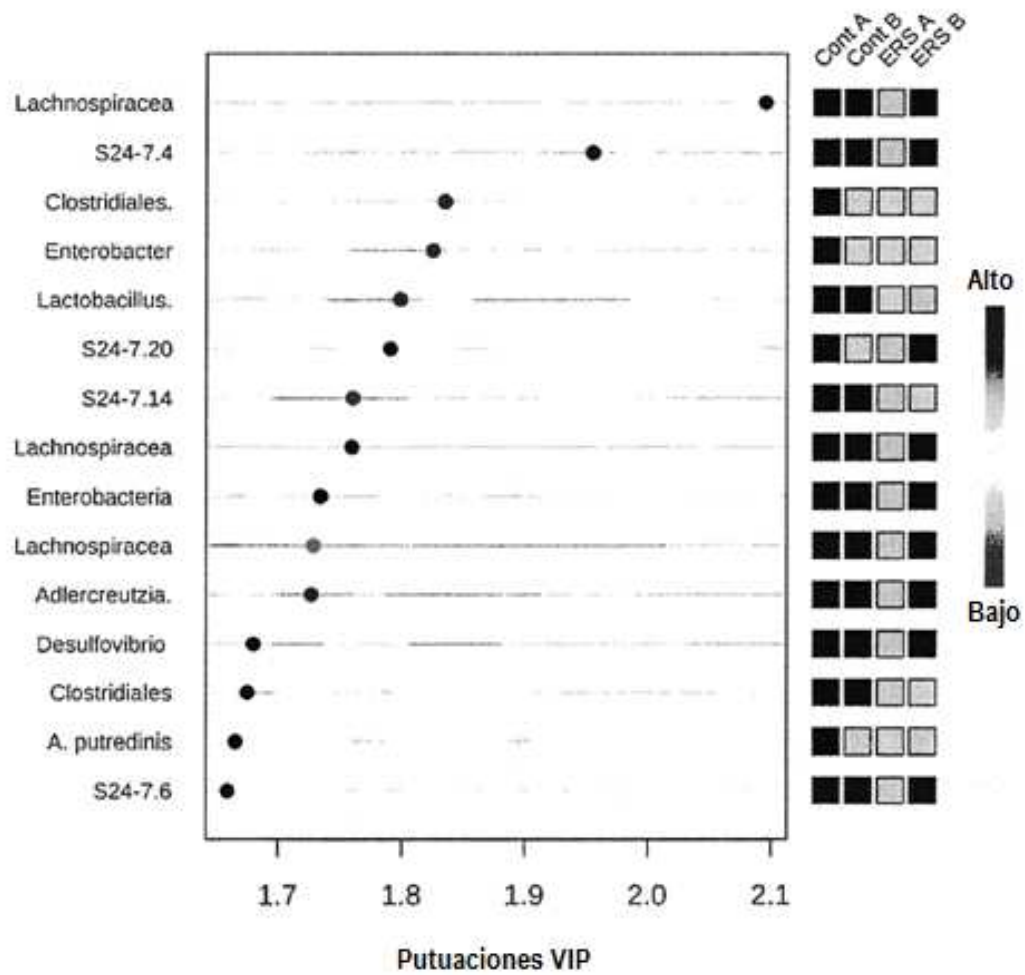


Figura 8M

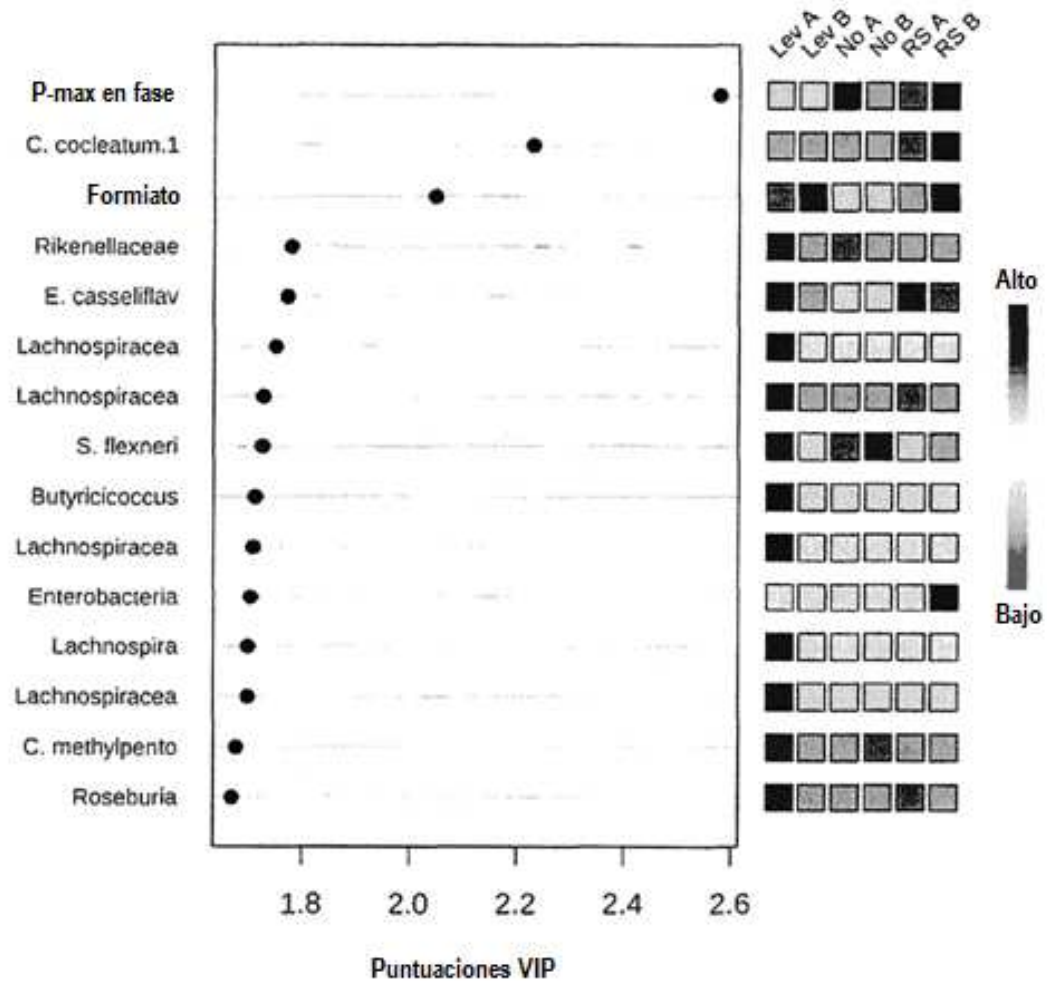


Figura S1

