

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 968 428**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/353 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/28 (2006.01)
A61K 36/45 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2017 PCT/IB2017/057580**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2018 WO18100551**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2017 E 17822783 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023 EP 3548006**

(54) Título: **Composición para su uso en el tratamiento de alteraciones intestinales**

(30) Prioridad:

01.12.2016 IT 201600122310

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2024

(73) Titular/es:

ALFASIGMA S.P.A. (100.0%)
Via Ragazzi del '99, 5
40133 Bologna, IT

(72) Inventor/es:

BIFFI, ANDREA;
ROSSI, RUGGERO;
FOIRE, WALTER y
SALAMINA, SILVIA

(74) Agente/Representante:

MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela

ES 2 968 428 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 para su uso en el tratamiento de alteraciones intestinales

5 Descripción

La presente invención, como se define en las reivindicaciones, se refiere a una composición que comprende una mezcla que comprende o, como alternativa, consiste en un extracto (a) de un fruto de al menos una planta del género *Vaccinium* y al menos un ingrediente (b) aceptable para uso farmacéutico o alimentario, y el uso del mismo en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad diverticular, o de una patología derivada de la misma o correlacionada con la misma.

El intestino representa el órgano diana de numerosas patologías inflamatorias, que pueden ser la causa de trastornos graves y, a menudo, son difíciles de tratar por los médicos.

15 Entre ellos, un papel de primordial importancia lo ocupan:

- la enfermedad inflamatoria intestinal (EII).
- la reservoritis.
- la enfermedad diverticular y la diverticulitis.

20 Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) se caracterizan por la presencia de una inflamación crónica de la mucosa del intestino, que tiene un curso intermitente y puede provocar complicaciones graves. Incluyen la enfermedad de Crohn (EC), la rectocolitis ulcerosa (RCU) y la denominada “colitis indeterminada” (CI).

25 Los síntomas difieren para las dos patologías más importantes del grupo, concretamente, la enfermedad de Crohn (EC) y la rectocolitis ulcerosa (RCU).

30 En el caso de la EC, los síntomas iniciales más frecuentes son la diarrea y el dolor abdominal, localizados sobre todo en la fosa ilíaca derecha (correspondiente a la última asa ileal, lugar más frecuente de la enfermedad).

35 La RCU, por el contrario, casi siempre se manifiesta con diarrea sanguinolenta (que contiene sangre roja brillante y mucosa mezcladas con las heces), asociada a “tenesmo” (sensación de evacuación incompleta) y, a veces, anemia.

Ambas enfermedades pueden tener períodos de latencia que se alternan con brotes de inflamación. Cuando la inflamación intestinal vuelve a agudizarse, también aparecen síntomas constitucionales, tales como fiebre, pérdida de peso, astenia y pérdida de apetito. Con el tiempo, la EC puede complicarse con la formación de estenosis (estrechamiento del lumen de la porción afectada del intestino, que, en última instancia, puede provocar una obstrucción intestinal), fistulas (comunicaciones entre el intestino y la piel, o entre órganos abdominales) o abscesos.

40 La denominada “colitis indeterminada”, CI, por el contrario, es una enfermedad de adquisición relativamente reciente, en la que la flogosis se limita al colon, con características histológicas, clínicas, radiológicas y endoscópicas tales que impiden una clasificación, ya que no pueden atribuirse ni a la EC ni a la RCU; en un 13-20 % de los casos representan formas iniciales de una de las dos.

45 La denominada “colitis indeterminada”, CI, se caracteriza generalmente por: la presencia de lesiones segmentarias, ulceración extensa, posible afectación del colon derecho, aunque el colon distal (colon izquierdo) está más gravemente comprometido, y la presencia de inflamación que se extiende sobre más del 50 % de la superficie mucosa, con la posible dilatación del colon asociada con megacolon tóxico.

50 En una gran mayoría de los casos (95 %), los síntomas se caracterizan inicialmente por deposiciones diarreicas al principio; hay presencia de diarrea con sangre en el 72 % de los casos y dolor abdominal en el 74 %. Un porcentaje menor de pacientes presenta pérdida de peso (44 %) y fiebre (26 %).

55 La reservoritis es una inflamación no específica del reservorio o bolsa ileal, y es la complicación a largo plazo más frecuente de la intervención quirúrgica conocida como anastomosis con bolsa ileoanal.

60 La etiología aún es desconocida y muy probablemente multifactorial. Se han propuesto varias hipótesis patogénicas, incluida la estasis fecal y el crecimiento excesivo de bacterias, la recurrencia de la RCU y la isquemia de la mucosa de la bolsa.

65 La reservoritis se caracteriza clínicamente por síntomas variables, que incluyen un aumento en el número de evacuaciones y la fluidez de las heces, sangrado rectal, dolores abdominales similares a calambres, urgencia y tenesmo y, a veces, incontinencia y fiebre.

- La diverticulosis colónica es la alteración anatómica más frecuente del colon, a menudo, detectada durante la colonoscopia. Se refiere a la presencia de modificaciones estructurales de la pared del colon, y parece caracterizarse por la presencia de bolsas denominadas “divertículos”; es distinta de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y la reservoritis.
- Los divertículos son pequeñas bolsas protuberantes que pueden formarse en el revestimiento del colon, en puntos de relativa debilidad de la capa muscular de la pared.
- La afección en la que se detectan los divertículos, incluso si no hay síntomas relacionados con su presencia, toma el nombre de “diverticulosis”. En términos prácticos, la diverticulosis es una afección médica caracterizada por la presencia de protuberancias de la mucosa y submucosa, definidas como divertículos, precisamente, a lo largo de la pared de los órganos huecos del sistema digestivo. Generalmente, se forman en zonas de relativa debilidad de la capa muscular (“*Locus minoris resistentiae*”) del colon (sobre todo el colon sigmoide y el recto, debido a las presiones más altas). La diverticulosis se manifiesta sin síntomas; si se vuelve sintomática, tal como, por ejemplo, en el caso de la diverticulitis, se habla de patología o enfermedad diverticular.
- La diverticulosis es más común en los países occidentales, con una prevalencia del 5 % en la población de entre 30 y 39 años, y del 60 % en la parte de la población mayor de 80 años.
- Los divertículos son más comunes en la parte inferior del intestino grueso (o colon), llamado colon sigmoide.
- Se cree que el desarrollo de divertículos colónicos es el resultado de un aumento en la presión intraluminal del colon. Para ser claros, el desarrollo de divertículos es un fenómeno que difiere completamente de los fenómenos inflamatorios y/o autoinmunitarios, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) crónica, por ejemplo, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa y, según nuestro conocimiento actual, dichas patologías no tienen ninguna relación con la diverticulosis y los trastornos asociados con la misma.
- La presencia de divertículos es una alteración anatómica permanente en la estructura de las paredes del colon, que puede permanecer asintomática, o conducir al desarrollo de síntomas. Se estima que aproximadamente el 20 % de los pacientes desarrollan síntomas, en presencia de los cuales la afección se define como “enfermedad diverticular” (ED).
- La enfermedad diverticular sin complicaciones, normalmente no se asocia con síntomas específicos. La enfermedad diverticular es una causa común de sangrado significativo del colon.
- Un subtipo de la ED es la EDSSC (enfermedad diverticular sintomática sin complicaciones), en la que los síntomas abdominales persistentes atribuidos a divertículos, están presentes en ausencia de colitis o diverticulitis macroscópicamente manifiesta.
- Otros síntomas suelen estar relacionados con complicaciones de la enfermedad diverticular, tales como la “diverticulitis”, que es una inflamación aguda macroscópica de los divertículos. La diverticulitis puede ser simple o complicada, dependiendo de si en la tomografía computarizada (TC) se observan o no características de complicaciones, tales como abscesos, peritonitis, obstrucción, fistulas o hemorragias.
- La diverticulitis puede provocar dolor abdominal, escalofríos, fiebre y cambios en los hábitos intestinales. Los síntomas más intensos se asocian a complicaciones graves, tales como perforación (una rotura libre en el abdomen), abscesos (acumulación de pus) o la formación de fistulas (un conducto anómalo que se crea entre el colon y otro órgano o con la piel, tras una perforación del divertículo).
- Los mecanismos patológicos subyacentes que causan la formación de divertículos colónicos (diverticulosis) aún no están claros. Sin desechar quedarse limitados a esta teoría, tales formaciones son probablemente el resultado de interacciones complejas entre la dieta, la microbiota intestinal, factores genéticos, la motilidad del colon y la inflamación microscópica.
- Aunque no se ha demostrado, la teoría predominante actualmente es que una dieta con bajo aporte de fibra se encuentra entre las causas de la enfermedad diverticular. La enfermedad se detectó en los primeros años del siglo XX en Estados Unidos, en una época en la que se introdujeron determinados alimentos en la dieta estadounidense, reduciendo considerablemente la ingesta de fibra de la población estadounidense.
- La enfermedad diverticular es común en los países industrializados y, en particular, en los Estados Unidos, Inglaterra y Australia, donde prevalecen las dietas con un bajo consumo de fibra. Por el contrario, la enfermedad es rara en Asia y África, donde la mayoría de la gente tiene una ingesta dietética elevada de fibra.
- La fibra se encuentra en frutas, verduras y cereales sin refinrar (enteros), que el cuerpo no puede digerir por completo. Algunas fibras, llamadas fibras solubles, se disuelven fácilmente en agua, creando un material gelatinoso blando en

el intestino, mientras que la fibra insoluble pasa a través del intestino casi intacta. Ambos tipos de fibra ayudan a prevenir el estreñimiento, con heces blandas y de fácil expulsión.

5 El estreñimiento se manifiesta con la necesidad de realizar un esfuerzo considerable para defecar; el esfuerzo puede provocar un aumento de la presión en el colon, y esto, a su vez, puede provocar que el revestimiento del colon se hinche a través de los puntos débiles de la pared del colon, lo que puede provocar la formación de bolsas, es decir, divertículos.

10 La falta de ejercicio físico puede aumentar el riesgo de formación de divertículos, aunque su aspecto aún no se ha considerado determinante.

15 Actualmente, como terapia médica para la enfermedad diverticular y/o la diverticulitis, se prescriben el reposo intestinal, una dieta específica con bajo contenido en fibra y antibióticos de amplio espectro, frecuentemente asociados a un fármaco antiespástico. El uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y corticosteroides no es común, porque estos medicamentos pueden facilitar una perforación en las proximidades del divertículo. En los casos más complicados, tales como, por ejemplo, peritonitis, abscesos y fistulas, puede ser necesaria una resección urgente, con o sin anastomosis.

20 En la actualidad, no existe ningún tratamiento disponible capaz de prevenir la formación de divertículos o de inducir una reducción de los mismos, o de prevenir eficazmente la diverticulitis en individuos con enfermedad diverticular o diverticulosis.

25 Para responder a los límites mencionados anteriormente de la técnica anterior, la presente invención como se define en las reivindicaciones, proporciona una nueva composición para la administración oral, que comprende un extracto procedente de plantas del género *Vaccinium*, para su uso en la prevención o tratamiento de la diverticulosis en el colon, o en la porción del colon sigmoide y del recto, y de patologías o enfermedades relacionadas con la presencia de divertículos, tales como la enfermedad diverticular, la EDSSC (enfermedad diverticular sintomática sin complicaciones) y la diverticulitis en el colon, o en la porción del colon sigmoide y el recto.

30 La presente invención se refiere a una composición para la administración oral tal como se define en las reivindicaciones, y que se denomina "(CR)", que comprende o, como alternativa, consiste en:

- (i) un núcleo que comprende o, como alternativa, que consiste en un extracto (a) de al menos una planta del género *Vaccinium* y al menos un ingrediente o excipiente (b) aceptable para uso farmacéutico o alimentario;
- (ii) una capa gastrorresistente externa al núcleo (i), y que recubre completamente dicho núcleo (i), y que comprende al menos un ingrediente o excipiente (c) aceptable para uso farmacéutico o alimentario, en donde dicha capa gastrorresistente (ii) es capaz de permitir la liberación del extracto (a) en la mucosa del intestino; preferiblemente, es capaz de permitir la liberación del extracto (a) en el colon.

40 La presente invención se refiere, además, a una composición para la administración oral (CR), que comprende o, como alternativa, consiste en:

- (i) un núcleo que comprende o, como alternativa, que consiste en un extracto (a) de al menos una planta del género *Vaccinium* y al menos un ingrediente o excipiente (b) aceptable para uso farmacéutico o alimentario;
- (ii) una capa gastrorresistente externa al núcleo (i), y que recubre completamente dicho núcleo (i), y que comprende al menos un ingrediente o excipiente (c) aceptable para uso farmacéutico o alimentario, en donde dicha capa gastrorresistente (ii) es capaz de permitir la liberación del extracto (a) en el colon.

50 La presente invención se refiere además a una composición para administración oral (CR) que comprende o, como alternativa, consiste en:

- (i) un núcleo que comprende o, como alternativa, que consiste en un extracto (a) de al menos una planta del género *Vaccinium* y al menos un ingrediente o excipiente (b) aceptable para uso farmacéutico o alimentario;
- (ii) una capa gastrorresistente externa al núcleo (i), que recubre completamente dicho núcleo (i), y que comprende al menos un ingrediente o excipiente (c) aceptable para uso farmacéutico o alimentario, en donde dicha capa gastrorresistente (ii) es capaz de permitir la liberación del extracto (a) en el colon; en donde dicha composición es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de diverticulosis en el colon, o en la porción del colon sigmoide y recto, y de patologías o enfermedades relacionadas con la presencia de divertículos, tales como la enfermedad diverticular, la EDSSC (sintomática enfermedad diverticular sin complicaciones) y la diverticulitis en el colon, o en la porción del colon sigmoide y el recto.

La composición (CR) de la presente invención está gastroprotégida y se encuentra en forma sólida de polvo, gránulos, copos, comprimidos, píldoras o cápsulas; se trata preferiblemente de un comprimido monolítico gastroprotégido. En este caso, el núcleo (i) se representa y coincide con el comprimido monolítico.

5 Se describe, además, pero no se reivindica, una composición (C) que comprende o, como alternativa, consiste en:

- un extracto (a) de un fruto de al menos una planta del género *Vaccinium*, y
- al menos un ingrediente y/o excipiente (b) aceptable para uso farmacéutico o alimentario,

10 siendo dicha composición para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la diverticulosis en el colon, o en la porción del colon sigmoide y recto, y de patologías o enfermedades relacionadas con la presencia de divertículos, tales como la enfermedad diverticular, la EDSSC (sintomática enfermedad diverticular sin complicaciones) y la diverticulitis en el colon, o en la porción del colon sigmoide y el recto; preferiblemente, en donde dicha composición comprenda la administración oral de (C).

15 También es posible que la composición (C) en forma sólida, por ejemplo, de polvo, gránulos, perlas o microperlas, o copos, esté contenida dentro de una cubierta, por ejemplo, una cápsula o una cápsula blanda, de material gastrorresistente capaz de descomponerse a un pH superior a 6, preferiblemente un pH comprendido de 6,5 a 8, por ejemplo, un pH de 7,5. En este caso, la composición (C) contenida en dicha cápsula o cápsula blanda, todavía tiene un uso válido en la prevención y/o el tratamiento de diverticulosis en el colon, o en la porción del colon sigmoide y recto, y de patologías o enfermedades relacionadas con la presencia de divertículos, tales como la enfermedad diverticular, la EDSSC (sintomática enfermedad diverticular sin complicaciones) y la diverticulitis en el colon, o en la porción del colon sigmoide y el recto; preferiblemente, en donde dicha composición comprenda la administración oral de (C).

20 A continuación, se ilustrarán realizaciones preferidas, sin intención de limitar su alcance y contenido de manera alguna.

25 A menos que se especifique lo contrario, el contenido de un ingrediente en una composición se refiere al porcentaje en peso de ese ingrediente con respecto al peso total de la composición.

30 A menos que se especifique lo contrario, la indicación de que una composición “comprende” uno o más componentes, significa que pueden estar presentes otros componentes, además del uno o varios específicamente nombrados, y la indicación de que una composición “consiste” en componentes dados, significa que se descarta la presencia de otros componentes.

35 La composición (C) puede consistir en (a) y (b), o puede comprender otros ingredientes o excipientes además de (a) y (b).

40 A modo de ejemplo no limitante, dichos ingredientes adicionales que pueden estar presentes en las composiciones (CR) y (C) de la presente invención, pueden ser otros principios activos, tales como:

- Fibras (por ejemplo, inulina, psyllium)
- Enzimas (por ejemplo, galactosidasa y similares)
- Antiinflamatorios (por ejemplo, mesalazina y derivados, beclometasona y principios activos similares)
- Antibióticos (por ejemplo, rifaxima y principios activos similares)
- Sustancias con acción absorbente a nivel intestinal y/o acción carminativa y/o antiespumante oral, para reducir la formación de gases intestinales (por ejemplo, menta, simeticona y derivados, carbón activado)
- Antioxidantes
- Sustancias con acción inmunomoduladora
- Ácidos grasos de cadena corta (SCFA, tal como butirato y derivados)
- Ácidos grasos poliinsaturados omega-3
- Probióticos o, como alternativa: microorganismos en forma de lisado o extracto (paraprobióticos), bioproductos metabólicos generados por microorganismos (postbióticos) y/o cualquier otro producto derivado de los mismos.

65

Los ejemplos no limitantes de dichos microorganismos que pueden estar presentes en las composiciones (CR) y (C) de la presente invención son: bacterias probióticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*, y levaduras, preferiblemente pertenecientes al género *Saccharomyces*, tomadas individualmente o en varias combinaciones.

5 En una realización preferida, el núcleo (i) presente en dicha composición (CR) o (C) comprende, además, manitol y/o al menos un principio activo con acción antiinflamatoria seleccionado de un fármaco antiinflamatorio esteroideo, un fármaco no esteroideo, y una sustancia o mezcla de sustancias de origen natural.

10 La presente invención también hará referencia a las siguientes figuras:

Figura 1: Curva de calibración para la prueba de disolución.

15 Figura 2: Resultados de la prueba de disolución del comprimido gastroprotegido según la invención, en la fase intestinal.

Figuras 3-10: Resultados del estudio sobre la eficacia protectora sobre la mucosa intestinal (CacoGoblet): Colonización con *E. coli*.

20 Figura 11: Ilustración del tracto gastrointestinal.

En el contexto de la presente invención, la expresión “fármaco antiinflamatorio”, se usa en el significado común del término, e indica, como sabe el experto en la técnica, cualquier sustancia capaz de reducir o eliminar un proceso inflamatorio, en particular, pero sin limitación, daño al intestino de un individuo.

25 En la composición (CR), como se definió anteriormente, la capa gastrorresistente (ii) externa al núcleo (i) comprende o, como alternativa, consiste en al menos una sustancia seleccionada de Eudragard biótico E1207, un polímero gastrorresistente, tal como 7:3:1 de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) u otro copolímero metacrílico aniónico, citrato de trietilo E1505, talco, etilcelulosa, copolímero de metacrilato aniónico y mezclas de los mismos, laca, alginato de sodio y mezclas de los mismos, almidón y almidones modificados, ácido oleico, ácido esteárico y triglicéridos de cadena media.

30 Las formas preferidas de la capa gastrorresistente (ii) externa al núcleo (i) comprenden o, como alternativa, consisten en:

- 35 - un polímero gastrorresistente, tal como 7:3:1 de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) u otro copolímero de metacrilato aniónico: de 5 a 50 mg; 10 a 35 mg; 18-25 mg;
- 40 - Citrato de trietilo E1505: de 0,1 a 5 mg; 0,3 a 3 mg; 0,5-2 mg;
- Talco: de 1 a 30 mg; 3 a 20 mg; 5-15 mg; o, como alternativa:
- Etilcelulosa: de 5 a 15 mg; 8 a 12 mg; 9,97 mg;
- 45 - Alginato de sodio: de 5 a 15 mg; 8 a 12 mg; 9,30 mg;
- Hidróxido de amonio: de 0,5 a 4 mg; 1,5 a 3 mg; 2,34 mg;
- Triglicéridos de cadena media: de 0,5 a 5 mg; 1,5 a 3 mg; 2,12 mg;
- 50 - Ácido oleico: de 0,5 a 3 mg; 1 a 2 mg; 1,17 mg;
- Ácido esteárico purificado: de 0,01 a 0,5 mg; 0,05 a 0,3 mg; 0,1 mg; o, como alternativa:
- 55 - etilcelulosa: de 5 a 50 mg; 10 a 30 mg; 15-20 mg;
- dióxido de titanio: de 0,1 a 15 mg; 0,5 a 10 mg; 1-5 mg;
- Alginato de sodio: de 0,1 a 5 mg; 0,3 a 4 mg; 0,5-2 mg;
- 60 - Ácido oleico, ácido esteárico, triglicéridos de cadena media: cada uno de 0,01 a 3 mg; entre 0,05 y 1 mg.

Las formas preferidas de la capa gastrorresistente (ii) externa al núcleo (i) comprenden o, como alternativa, consisten en:

- 65 - Eudragard® biótico E1207 (Evonik): por ejemplo, 20,4 mg;

- Citrato de trietilo E1505: por ejemplo, 1 mg;
- Talco: por ejemplo, 10, 2 mg; o, como alternativa:
- 5 - Etilcelulosa: por ejemplo, 9,97 mg;
- Alginato de sodio: por ejemplo, 9,30 mg;
- 10 - Hidróxido de amonio: por ejemplo, 2,34 mg;
- Triglicéridos de cadena media: por ejemplo, 2,12 mg;
- 15 - Ácido oleico: por ejemplo, 1,17 mg;
- Ácido esteárico purificado: por ejemplo, 0,1 mg.

Dicha capa gastrorresistente (ii) externa al núcleo (i) tiene la característica de descomponerse y disolverse en función del valor del pH y/o del tiempo; ventajosamente, dicha capa (ii) se formula y prepara de manera que sea capaz de descomponerse y disolverse desde un valor de pH de aproximadamente 6,5 a un pH de aproximadamente 8, preferiblemente desde un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5, en un tiempo comprendido entre 30 minutos a 120 minutos, preferiblemente de 45 minutos a 90 minutos; por ejemplo, a una temperatura comprendida de 30 °C a 40 °C, preferiblemente de 34 °C a 37 °C.

25 Después de una extensa investigación y numerosos intentos experimentales, se descubrió que, ventajosamente, el uso de una o más de dichas sustancias para formar una capa gastrorresistente externa permite obtener una composición (CR) para uso oral, por ejemplo, un comprimido, capaz de pasar intacto a través de los tractos oral, esofágico y gástrico, y permitir una descomposición inicial de dicha (ii) capa gastrorresistente externa al núcleo (i), comenzando desde el íleon terminal, a un pH de aproximadamente 6,5-7, con o sin una disolución inicial del núcleo (i) y una liberación del extracto (a), y la posterior descomposición de dicha (ii) capa gastrorresistente externa al núcleo (i) en el colon, a un pH de aproximadamente 7-8, con la disolución del núcleo (i) y la liberación del extracto (a), principalmente en el colon, a un pH de 7,5 (Figura 11).

35 Los ensayos experimentales realizados demuestran que la composición (CR) de la presente invención, por ejemplo, en forma de comprimido monolítico, como en los Ejemplos 1 y 2, permanece intacta dentro de un período de 2 horas, a un pH de 1, mientras que a un pH de 6 permanece intacta dentro de un período de 1 hora. A un pH de 7,2, el recubrimiento gastrorresistente externo al núcleo (i) de la composición (CR), comienza a desgarrarse después de aproximadamente 30 minutos, mientras que dicho recubrimiento se desgarra ampliamente a un pH de 7,2, después de 90 minutos; la película/recubrimiento se abre, y quedan en su interior pequeñas porciones del núcleo (i) o, en 40 algunos casos, polvo procedente de la desintegración completa del núcleo (i).

45 En cuanto a la liberación de dicho extracto (a) presente en dicho núcleo (i), no hay liberación antes del íleon, hasta un pH de 6,5. En el íleon terminal hay una liberación comprendida de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 %, preferiblemente de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 15 %. En el colon, a un pH de aproximadamente 7,5, por ejemplo, un pH de aproximadamente 7,2, hay una liberación comprendida de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 95 %, preferiblemente de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 90 %. La mayor parte de la liberación de dicho extracto (a) se produce en el colon, que representa, precisamente, el sitio donde están presentes los divertículos, y donde se manifiesta la propia patología o enfermedad. De esta manera, el extracto (a) liberado en el colon es capaz de actuar gracias a la presencia también de PAC (proantocianidinas), que son capaces de realizar una actividad antiinflamatoria.

50 La composición (CR) según la invención está en forma de una composición para un complemento dietético o una composición para un dispositivo médico o una composición para un alimento para fines médicos especiales o una composición farmacéutica; todas las composiciones se encuentran en forma farmacéutica para uso oral.

55 En el contexto de la presente invención, la expresión “dispositivo médico” se usa con el significado según el Decreto Legislativo italiano n.º 46, del 24 de febrero de 1997, que corresponde a la definición proporcionada por la Organización Mundial de la Salud, y disponible en la URL http://www.who.int/medical_devices/full_definition/en/, es decir, indica una sustancia u otro producto, usado solo o en combinación, destinado por el fabricante a usarse, solo o en combinación, 60 en seres humanos, con fines de diagnóstico, prevención, seguimiento, tratamiento o alivio de enfermedades, cuyo dispositivo no logra su acción principal prevista por medios farmacológicos, inmunológicos o metabólicos, en o sobre el cuerpo humano, pero que pueden ser ayudados en su función prevista por tales medios.

65 En la composición (CR) como se definió anteriormente, el extracto (a) puede representarse por frutos (más específicamente, bayas), pertenecientes al género *Vaccinium* y, opcionalmente, también *Sambucus*, *Lycium*, *Euterpe* y combinaciones de los mismos. El extracto (a) es preferiblemente un extracto seco.

En la composición (CR) como se definió anteriormente, el extracto (a) es preferiblemente de los frutos de al menos una planta del género *Vaccinium* y del subgénero *Oxycoccus*, tales como *Vaccinium macrocarpon*, *Vaccinium oxycoccus*, o el subgénero *Vaccinium*, tales como *Vaccinium arboreum*, *Vaccinium crassifolium*, *Vaccinium boreale*, *Vaccinium myrtillus* o mezclas de los mismos; preferiblemente, en donde el extracto (a) es de los frutos de *Vaccinium macrocarpon* o de *Vaccinium oxycoccus* o una mezcla de los mismos. Aún más preferiblemente, el extracto (a) comprende o consiste en los frutos de *Vaccinium macrocarpon*. Ventajosamente, el extracto (a) es un extracto seco; en una realización es un extracto seco de arándano rojo, que contiene preferiblemente PAC (proantocianidinas) en una concentración del 5 % al 30 % en peso o volumen, por ejemplo, 10 %, 15 %, 20 % o el 25 %.

El arándano rojo americano (*Vaccinium macrocarpon*) es un pequeño arbusto de hoja perenne perteneciente a la familia de las *Ericaceae*, que crece en zonas de clima boreal, en particular en América del Norte y en algunas regiones del norte de Europa y Asia, y produce frutos rojos similares a las bayas, con una pulpa densa y un sabor típicamente ácido.

En el pasado, entre los indios de América del Norte, el arándano rojo era considerado una fruta sagrada, y se usaba tanto como alimento, como tratamiento para los cálculos renales y diversos problemas del tracto urinario.

Hoy en día, el arándano rojo americano se usa en todo el mundo por sus innumerables propiedades beneficiosas, debidas fundamentalmente al alto contenido en proantocianidinas (PAC), en particular, proantocianidinas de tipo A.

Los extractos de arándano rojo americano se usan sobre todo en la prevención y el tratamiento de trastornos del tracto urinario, pero también como prevención contra la adhesión de *Helicobacter pylori*, una bacteria que a menudo es causa de úlceras estomacales y duodenales, a las paredes del estómago, o la adhesión de bacterias que pueblan la cavidad bucal, y son responsables de la formación de placa, o la adhesión de bacterias potencialmente patógenas, tal como *E. coli* a nivel intestinal.

La patente europea EP 2135616 B1 se refiere al uso de arándanos rojos para el tratamiento de la EII y la colitis ulcerosa, que, como se indicó anteriormente, son patologías totalmente distintas y diferentes de aquellas a las que se refiere la presente invención. Diverticulitis Forum, Anonymous y col., (22-07-2014), "Anyone try this approach to Diverticulosis? Topix", describió el uso de zumo de arándano rojo para el tratamiento de la diverticulitis.

En el contexto de la presente invención, el uso de arándano rojo para el tratamiento de la EII y la colitis ulcerosa, está excluido y, por lo tanto, no se prevé, al igual que no se prevé el uso de arándano rojo para prevenir la adhesión de *Helicobacter pylori* a las paredes del estómago. Además, se excluye el uso de arándano rojo para el tratamiento de infecciones del tracto urinario (ITU), tales como, por ejemplo, cistitis (inflamación de la vejiga urinaria) o cistitis bacteriana o cistitis no bacteriana, tal como, por ejemplo, cistitis de tipo intersticial, y, por lo tanto, no se prevé.

El inventor descubrió que el extracto de frutos del género *Vaccinium*, en particular, el arándano rojo americano, es útil en la prevención y/o el tratamiento, preferiblemente mediante administración oral, de la diverticulosis en el colon, o en la porción del colon sigmoide y el recto, y/o de patologías o enfermedades derivadas o vinculadas a la presencia de divertículos, tales como la enfermedad diverticular, la enfermedad diverticular sintomática sin complicaciones (EDSSC) y la diverticulitis en el colon, o en la porción del colon sigmoide y el recto.

En la composición (CR) según la presente invención, el extracto (a) contiene preferiblemente al menos el 10 %, más preferiblemente al menos el 15 % o el 20 % o el 30 %, y/o no más del 95 % o el 60 % o el 40 % en peso de proantocianidinas del peso total de dicho extracto (a), más preferiblemente, pero sin limitación, de proantocianidinas de tipo A. Las proantocianidinas (PAC) son oligómeros y polímeros de flavan-3-oles, que pertenecen a la familia de los flavonoides, y pueden cuantificarse, por ejemplo, con el método "BL-DMAC" de Prior, R.L. y col., J. Sci Food Agric, 2010, 90(9), 1473-8, o métodos equivalentes. Dicho extracto (a) es preferiblemente un extracto seco; aún más preferiblemente, es un extracto seco de arándano rojo.

La composición (CR) según la invención, comprende, preferiblemente, al menos:

- dicho extracto (a) de 150 a 600 mg, preferiblemente de 200 a 300 mg, más preferiblemente de 240 a 260 mg, de extracto de *Vaccinium macrocarpon*, que contenga al menos el 10 %, más preferiblemente al menos el 15 %, de proantocianidinas (PAC) en peso del peso total de (a);
- al menos un ingrediente o excipiente (b) aceptable para uso farmacéutico o alimentario, opcionalmente, seleccionado de celulosa, manitol, estearato de magnesio, sales de magnesio de ácidos grasos saturados y/o insaturados, dióxido de silicio, carboximetilcelulosa, carboxietilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica reticulada y mezclas de los mismos. Dicho extracto (a) es preferiblemente un extracto seco; aún más preferiblemente, es un extracto seco de arándano rojo. Los ingredientes o excipientes (b) aceptables para uso farmacéutico o alimentario se seleccionan preferiblemente de celulosa, manitol, dióxido de silicio, carboximetilcelulosa sódica reticulada y sales de magnesio de ácidos grasos saturados y/o insaturados.

La composición (CR) como se definió anteriormente, es particularmente útil en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad diverticular y patologías relacionadas con la misma.

5 Se describe, además, pero no según la invención, una composición (C) que comprende o, como alternativa, consiste en:

- un extracto (a) de un fruto de al menos una planta del género *Vaccinium*, y
- al menos un ingrediente (b) aceptable para uso farmacéutico o alimentario,

10 siendo dicha composición para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedad diverticular o de una patología derivada de diverticulosis, preferiblemente en donde dicho uso comprenda la administración oral de (C). La administración puede realizarse por cualquier vía. Preferiblemente, la composición se toma por vía oral, más preferiblemente en forma de píldoras, cápsulas, comprimidos, polvo granulado, cápsulas de cubierta dura, gránulos 15 que se disuelven por vía oral, bolsitas, pastillas para chupar o viales bebibles.

Como alternativa, la composición de la invención se formula como líquido, por ejemplo, como jarabe o bebida, o bien se añade a los alimentos, por ejemplo, a un yogur, queso o zumo de frutas.

20 Como alternativa, la composición de la invención se formula en una forma capaz de ejercer una acción tópica, por ejemplo, mediante enema.

Dicha composición (C) se usa preferiblemente para el tratamiento o prevención de al menos una entre la enfermedad 25 diverticular, la enfermedad diverticular sintomática sin complicaciones (EDSSC) y la diverticulitis. Dicha composición (C) es preferiblemente para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la diverticulitis.

En una realización preferida, la composición (C) para el uso descrito anteriormente está en forma de una preparación farmacéutica oral, o un complemento dietético o un dispositivo médico, que comprende un recubrimiento 30 gastrorresistente, y capaz de permitir la liberación del extracto (a) en el colon.

35 En una divulgación adicional, en la composición (C) para su uso como se especificó anteriormente, el extracto (a) procede de los frutos de al menos una planta del género *Vaccinium* y el subgénero *Oxycoccus*, tal como *Vaccinium macrocarpon*, *Vaccinium oxycoccus*, o el subgénero *Vaccinium*, tal como *Vaccinium arboreum*, *Vaccinium crassifolium*, *Vaccinium boreale*, *Vaccinium myrtillus* (arándano) o mezclas de los mismos.

40 En una divulgación adicional, más preferiblemente, en la composición (C) para su uso según la presente invención, el extracto (a) procede de los frutos de *Vaccinium macrocarpon* (arándano rojo americano) o *Vaccinium oxycoccus* o una mezcla de los mismos. Aún más preferiblemente, el extracto (a) comprende o consiste en los frutos de *Vaccinium macrocarpon*. El extracto (a) es preferiblemente un extracto seco.

45 En una divulgación adicional en la composición (C) según la presente invención, el extracto (a) contiene preferiblemente al menos el 10 %, más preferiblemente al menos el 15 % o el 20 % o el 30 %, y no más del 95 % o el 60 % o el 40 % en peso de proantocianidinas del peso total de (a), preferiblemente, pero sin limitación, proantocianidinas de tipo A. Ventajosamente, el extracto (a) es un extracto seco; en una realización es un extracto seco de arándano rojo, que contiene preferiblemente PAC (proantocianidinas) en una concentración del 5 % al 30 % en peso o volumen, por ejemplo, 10 %, 15 %, 20 % o el 25 %.

50 Las proantocianidinas (PAC) son oligómeros y polímeros de flavan-3-oles, que pertenecen a la familia de los flavonoides, y pueden cuantificarse, por ejemplo, con el método "BL-DMAC" de Prior, R.L. y col., J. Sci Food Agric, 2010, 90(9), 1473-8, o métodos equivalentes.

55 En el contexto de la presente invención, los ingredientes aceptables para uso farmacéutico o alimentario comprenden todas las sustancias auxiliares conocidas por el experto para la preparación de formas para administración oral, tales como, a modo ilustrativo no limitante, diluyentes, absorbentes, edulcorantes, saporíferos, colorantes, lubricantes, antiadhesivos, deslizantes, aglutinantes, agentes desintegrantes, tensioactivos, antimicrobianos, antioxidantes, estabilizadores, espesantes, gelificantes, y sustancias capaces de modificar la liberación del principio activo en el tiempo, para permitir la liberación de las mismas sólo en determinadas condiciones fisiológicas, por ejemplo, en un determinado intervalo de pH.

60 En una divulgación adicional, la composición (C) para su uso como se describió anteriormente, preferiblemente, comprende al menos:

- (a) de 150 a 600 mg, preferiblemente de 200 a 300, más preferiblemente de 240 a 260 mg, de extracto de *Vaccinium macrocarpon*, que contenga al menos el 10 %, más preferiblemente al menos el 15 %, de proantocianidinas en peso del peso total de (a);

- (b) al menos un ingrediente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, seleccionado de celulosa, manitol, estearato de magnesio, dióxido de silicio, carboximetilcelulosa y mezclas de los mismos. Más preferiblemente, dicha composición (C) comprende, además, un recubrimiento gastroprotector, es decir, uno que sea capaz de proteger la mezcla, que comprenda al menos (a) y (b) de la acción de los jugos gástricos.

5 Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones prácticas de la invención, sin intención de limitar el alcance y extensión de la misma.

A continuación, se exponen formas preferidas de composiciones (CR) de la presente invención:

10 (i) Un núcleo que comprende:

15 Extracto de arándano que contenga PACS en una concentración (peso/peso) del 10 %, 15 % o 30 %: de 100 a 500 mg; 150 a 400 mg; 240-300 mg

20 Celulosa: de 100 a 400 mg; 200 a 350 mg; 300-310 mg

25 Manitol: de 1 a 50 mg; 5 a 30 mg; 10-18 mg

30 Dióxido de silicio: de 1 a 50 mg; 3 a 30 mg; 5-8 mg

Carboximetilcelulosa sódica reticulada: de 1 a 30 mg; 3 a 20 mg; 5-12 mg

35 Sales de magnesio de ácidos grasos: de 1 a 30 mg; 3 a 20 mg; 5-10 mg

(ii) un primer tipo de recubrimiento (película) del núcleo (i), que comprende los siguientes agentes:

40 - un polímero gastrorresistente, tal como 7:3:1 de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) u otro copolímero de metacrilato aniónico: de 5 a 50 mg; 10 a 35 mg; 18-25 mg

45 - Citrato de trietilo E1505: de 0,1 a 5 mg; 0,3 a 3 mg; 0,5-2 mg

- Talco: de 1 a 30 mg; 3 a 20 mg; 5-15 mg; o, como alternativa,

50 (ii) un segundo tipo de recubrimiento (película) del núcleo (i), que comprende los siguientes agentes:

- Etilcelulosa: de 5 a 15 mg; 8 a 12 mg; 9,97 mg

55 - Alginato de sodio: de 5 a 15 mg; 8 a 12 mg; 9,30 mg

- Hidróxido de amonio: de 0,5 a 4 mg; 1,5 a 3 mg; 2,34 mg

60 - Triglicéridos de cadena media: de 0,5 a 5 mg; 1,5 a 3 mg; 2,12 mg

65 - Ácido oleico: de 0,5 a 3 mg; 1 a 2 mg; 1,17 mg

- Ácido esteárico purificado: de 0,01 a 0,5 mg; 0,05 a 0,3 mg; 0,1 mg.

A continuación, se exponen formas preferidas de composiciones (CR) de la presente invención:

50 (i) Un núcleo que comprende:

55 Extracto de arándano que contenga PACS en una concentración (peso/peso) del 10 %, 15 % o 30 %: de 100 a 500 mg; 150 a 400 mg; 240-300 mg

60 Celulosa microcristalina: de 100 a 400 mg; 200 a 350 mg; 320-335 mg

65 Estearato de magnesio: de 1 a 30 mg; 2 a 20 mg; 5-10 mg

Dióxido de silicio: de 1 a 50 mg; 3 a 30 mg; 5-8 mg

(ii) un primer tipo de recubrimiento (película) del núcleo (i), que comprende los siguientes agentes:

- etilcelulosa: de 5 a 50 mg; 10 a 30 mg; 15-20 mg;

65 - dióxido de titanio: de 0,1 a 15 mg; 0,5 a 10 mg; 1-5 mg

- Alginato de sodio: de 0,1 a 5 mg; 0,3 a 4 mg; 0,5-2 mg
- Ácido oleico, ácido esteárico, triglicéridos de cadena media: cada uno de 0,01 a 3 mg; entre 0,05 y 1 mg; o, alternativamente,

5 (ii) un segundo tipo de recubrimiento (película) del núcleo (i), que comprende los siguientes agentes:

- Etilcelulosa: de 5 a 15 mg; 8 a 12 mg; 9,97 mg
- Alginato de sodio: de 5 a 15 mg; 8 a 12 mg; 9,30 mg
- Hidróxido de amonio: de 0,5 a 4 mg; 1,5 a 3 mg; 2,34 mg
- Triglicéridos de cadena media: de 0,5 a 5 mg; 1,5 a 3 mg; 2,12 mg
- Ácido oleico: de 0,5 a 3 mg; 1 a 2 mg; 1,17 mg
- Ácido esteárico purificado: de 0,01 a 0,5 mg; 0,05 a 0,3 mg; 0,1 mg

10 20 Como ejemplo no limitante, la composición (CR) según la presente invención puede comprender:

Ejemplo 1

25 (i) Un núcleo que comprende:

Extracto de arándano rojo que contenga PACS al 15 % (peso/peso): 240 mg

30 Celulosa: 304,4 mg

Manitol: 15 mg

Dióxido de silicio: 5,8 mg

35 Carboximetilcelulosa sódica reticulada: 9 mg

Sales de magnesio de ácidos grasos: 5,8 mg.

40 Núcleo total 580 mg. Intervalo de peso: 575 mg-585 mg

45 (ii) un recubrimiento (película) del núcleo (i), que comprende:

- Eudragard® biótico E1207 (Evonik): 20,4 mg

50 - Citrato de trietilo E 1505: 1 mg

- Talco: 10. 2 mg.

55 Revestimiento/película total 31,6 mg. Intervalo de peso: 26,1 mg-37,7 mg.

50 Comprimido recubierto/cubierto con película total 612 mg. Intervalo de peso: 607 mg-617 mg.

Ejemplo 2

55 (i) Un núcleo que comprende:

Extracto de arándano rojo que contenga PACS al 15 % (peso/peso): 240 mg

60 Celulosa: 270 mg

Manitol: 29 mg

Dióxido de silicio: 5,8 mg

65 Carboximetilcelulosa sódica reticulada: 29 mg

Sales de magnesio de ácidos grasos: 5,8 mg.

Núcleo total 580 mg. Intervalo de peso: 575 mg-585 mg

5 (ii) un recubrimiento (película) del núcleo (i), que comprende:

- Etilcelulosa: 9,97 mg
- Alginato de sodio: 9,30 mg
- 10 - Hidróxido de amonio: 2,34 mg
- Triglicéridos de cadena media: 2,12 mg
- 15 - Ácido oleico: 1,17 mg
- Ácido esteárico purificado: 0,1 mg.

20 Revestimiento/película total 25 mg. Intervalo de peso: 20 mg-30 mg.

20 Comprimido recubierto/cubierto con película total 605 mg. Intervalo de peso: 595 mg-615 mg.

Prueba de disolución

25 Materiales:

Se probaron los comprimidos gastrorrecubiertos según la invención, según el ejemplo.

30 Reactivos:

- Dimetilaminocinamaldehído (DMAC, código de colon sigmoide D-4506).
- Procianidina A2 (PCAA2, Sigma, código 28660).
- 35 - Enzimas y reactivos para GID (Sigma).

Métodos:

- Ensayo de PCA según el método espectrofotométrico propuesto por Prior y col. (*Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders*. J. Sci. Food Agric. (2010), 9, 1473-1478. DOI 10.1002/jsfa.3966).
- GID *in vitro* según el método propuesto por Minekus y col. (“*A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus*” Food Funct. (2014), 6, 1113-1124. DOI 10.1039/C3FO60702J).

45 Resultados

Los comprimidos se sometieron a GID *in vitro* (por triplicado), tomando muestras después de 120 min de la fase gástrica, y después de 30, 60, 90 y 120 min de la fase intestinal. Las diversas muestras se analizaron para determinar el contenido de PCAA2 en mg de equivalentes, utilizando el método DMAC, y se cuantificaron según la curva de calibración que se muestra en la Figura 1 (obtenida con el mismo método aplicado al estándar PCAA2 a 640 nm).

55 El perfil de disolución de los comprimidos según la presente invención, se muestra en la Figura 2.

55 Se obtuvieron resultados sustancialmente equivalentes para los comprimidos gastrorrecubiertos de los Ejemplos 1 y 2.

Durante la fase gástrica de la GID *in vitro*, no hubo liberación de PCA verificada analíticamente.

60 La cinética de liberación de PCA (expresada como de equivalentes de PCAA2 mg/comprimido, media de tres repeticiones) durante la fase intestinal *in vitro*, se muestra en la Figura 2. La liberación de PCA fue observable analíticamente durante la fase intestinal, después de 60 minutos.

65 El contenido de PCAA2 no digerido del comprimido en mg de equivalentes se determinó después de la rotura mecánica del propio comprimido y de la extracción de PCA con fluidos gastrointestinales y enzimas (blanco GID), o con el

disolvente de extracción (acetona/agua/ácido acético, 75:24,5:0,5 v/v/v) propuesto por Prior y col. (2010). Los resultados obtenidos fueron, respectivamente, iguales a 19,39 y 19,81 mg de equivalentes de PCAA2/comprimido.

Evaluación de eficacia

- 5 Con el fin de evaluar la eficacia de la presente invención, en particular en lo que respecta a la eficacia de protección de la mucosa intestinal, se realizaron varias pruebas *in vitro* para determinar:
- 10 • **Actividad de competencia contra la adhesión de cepas de *Escherichia coli***, mediante el bloqueo de los mecanismos de adhesión, basada en análisis de las proteínas específicas.
- **Actividad antiinflamatoria** a través de la reducción de la activación de monocitos en macrófagos, basada en el estudio de la permeabilidad intestinal, evaluada como se describe a continuación:
- 15 ○ Medición de TEER (resistencia eléctrica transepitelial)
La resistencia eléctrica transepitelial (TEER, por sus siglas en inglés) es una medición directa de la funcionalidad de la barrera de los tejidos epiteliales: refleja la resistencia tisular global debida tanto al espesor como a la estructura, y representa una indicación del nivel de integridad de la monocapa y, por lo tanto, de la formación de uniones estrechas entre las células. La resistencia eléctrica transepitelial (expresada en Ωcm^2) se mide usando un voltímetro (ERS Millicell).
- 20 ○ Ensayo con Amarillo Lucifer: En presencia de la sustancia a evaluar. El Amarillo Lucifer es un marcador fluorescente impermeable a la membrana celular, que permite verificar en porcentaje la integridad de las uniones celulares. Se usa para estudiar la permeabilidad de una sustancia a nivel paracelular en capas monocelulares de células caliciformes Caco-2/Caco. El transporte de LY se evalúa como un paso al compartimento basolateral después de un período definido de incubación. La lectura de la sustancia fluorescente se toma mediante un espectrofluorómetro, con 428 nm de excitación y 525 nm de emisión.
- 25 30 En particular, se evaluará la eficacia de la presente invención en la protección de la mucosa intestinal tras el estrés inducido por *E. coli*, utilizando el modelo experimental Caco2-goblet®, que está formado no sólo por células intestinales, sino también por células secretoras de mucosa, HT29, en cocultivo, que es un sistema mucho más realista.
- Se realizó un estudio sobre la eficacia protectora sobre la mucosa intestinal (CacoGoblet): Colonización con *E.Coli*.
- 35 35 1. Introducción y objetivo del estudio
La relevancia biológica del modelo Caco-2 está bien establecida, ya que es un modelo de referencia *in vitro* utilizado para reproducir las funciones de la mucosa intestinal.
- 40 40 CacoGoblet es un modelo de células secretoras de mucosa, que consiste en soportes sembrados permeables sobre filtros de policarbonato microporosos, con células caliciformes mucíparas humanas y células Caco-2 diferenciadas y polarizadas.
- 45 45 Se aplicó un modelo experimental basado en el modelo CacoGoblet con el fin de evaluar la eficacia del EXTRACTO DE ARÁNDANO ROJO por parte de Sofar S.p.A.
La concentración no citotóxica se probó en una etapa preliminar mediante ensayo MTT, para descartar la posible toxicidad intrínseca del producto.
- 50 50 Se utilizaron dos protocolos:
1) Propiedades antiinflamatorias del extracto de arándano rojo en un sistema de cocultivo (células THP-1 y células epiteliales intestinales)
- 55 55 2) Capacidad de los arándanos rojos para prevenir la adhesión de *E. coli* a la mucosa
2. Diseño experimental
1) Propiedades antiinflamatorias del extracto de arándano rojo en un sistema de cocultivo *in vitro* (células THP-1 y células epiteliales intestinales)
- 60 65 Las células CacoGoblet se trataron previamente con 10 ng/ml de IL-1 beta durante una noche. Una vez eliminada la IL-1 beta, el modelo intestinal se trató con arándano rojo a una concentración no citotóxica durante 24 horas. Paralelamente, se realizó un tratamiento con la molécula de referencia etacortilene (dexametasona fosfato sódico) al 0,15 %, con el fin de estudiar la superación del estado inflamatorio de la mucosa.

A continuación, los productos se retiraron, y las células THP-1 marcadas (marcadas con el rastreador celular diacetato de 5-clorometil-fluoresceína) se añadieron a las células CacoGoblet en el compartimento apical, y se incubaron durante 1 hora a 37 °C.

- 5 Una vez eliminadas las células no adherentes, se evaluó bajo un microscopio la fluorescencia superficial residual de las células THP-1.

La actividad antiinflamatoria de los diversos compuestos a nivel intestinal se evaluó en un ensayo estático utilizando la reducción de la adhesión celular de THP-1 en CacoGoblet como parámetro de criterio de valoración.

- 10 10 2) Capacidad de los arándanos rojos para prevenir la adhesión de *E. coli* a la mucosa

15 Se colonizaron células CacoGoblet tratadas previamente con arándano rojo durante 4 horas con 50 µl de *Escherichia coli* (ATCC 8739) a 37 °C durante 2 horas. Al final de la colonización, el exceso de bacterias se eliminó y se evaluaron los siguientes parámetros:

- Resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y paso paracelular de Amarillo Lucifer
- Inmunofluorescencia de alfa-actinina: La alfa-actinina interactúa con Tir, una proteína de *E. coli*, para formar la placa adhesiva conocida como pedestal, y es un marcador de infección por *E. coli*.
- Análisis ultraestructural de *E. coli* con un microscopio electrónico de barrido (SEM) para evaluar la densidad bacteriana y la adhesión a la superficie de CacoGoblet.

25 25 3. Materiales

30 3.1 Sistema experimental

35 CacoGoblet™ es un kit de secreción de mucosa listo para usar, para la evaluación *in vitro* de la absorción intestinal. El kit consiste en soportes permeables con 24 pocillos sembrados con células caliciformes mucíparas humanas y células Caco-2 diferenciadas y polarizadas en placas HTS Transwell, complementadas con un medio de transporte patentado exclusivo, y estable a temperatura ambiente.

40 40 La línea celular CacoGoblet se suministró el día 20 de diferenciación, y se utilizó durante 5 días consecutivos, modificándose el medio completo y midiendo TEER basándose en un procedimiento interno. La hoja de datos técnicos de CacoGoblet™ se adjunta en el presente documento en el Anexo I.

45 Se utilizó como medio DMEM (lote RNBF5082) que contenía FBS al 10 %, glutamina al 1 % 200 mM y NEAA al 1 %, como se muestra en la Tabla 1.

45 45 Tabla 1

NOMBRE Y LOTE	CACOGOBLET	ESTADO
	N.º 24 CG 032 112816	
FABRICANTE	READYCELL	
% de LY ($\leq 1,4$)	0,51	Aceptado
TEER (OHMIOS x CM ²) (≥ 70)	208,01	
FECHA DE LLEGADA	15/12/2016	Aceptado
DATOS DE CADUCIDAD	23/12/2016	

55 55 3.1.1 Condiciones de cultivo y uso del sistema experimental

60 Al recibir el producto CacoGoblet, sacar las bolsas con cierre hermético que contienen las placas. Abrir las cremalleras y dejar la bolsa en la oscuridad a temperatura ambiente hasta el viernes de la misma semana. El viernes, incubar las placas a 37 °C, con CO₂ al 5 %, humedad saturada, durante 4 horas. Cambiar el medio, y comenzar el experimento el lunes siguiente.

65 65 3.2 Sustancia objeto de examen: identificación y caracterización

65 El patrocinador es responsable de la ficha de datos de seguridad y la caracterización de las sustancias objeto de examen. (Tabla 2)

Tabla 2

5	NOMBRE DEL PRODUCTO	EXTRACTO DE ARÁNDANO ROJO GASTROPROTEGIDO QUE CONTIENE PACS AL 15 %
10	CÓDIGO ÚNICO	ARÁNDANO ROJO
15	LOTE/FABRICANTE	- Sofar S.p.A.
20	PRESENTACIÓN	Comprimidos
25	CONCENTRACIÓN PARA USAR PARA MTT	10-100-1000 µg/ml
30	CONCENTRACIÓN A USAR PARA EL ESTUDIO DE EFICACIA	1000 µg/ml
35	DOSIS	En 300 µl de medio en el compartimento apical
40	ALMACENAMIENTO	A TEMPERATURA AMBIENTE

3.3 Control negativo y positivo

El control NEGATIVO era el medio por sí solo.

CONTROL POSITIVO PARA EL PROTOCOLO 1: INTERLEUCINA 1 BETA (SRP6169; lote 9E126460). (Tabla 3)

Tabla 3

	PROTOCOLO 1	PROTOCOLO 2
35	AGENTE ANTIINFLAMATORIO	CONTROL COLONIZADO
40	NOMBRE ETACORTILEN AL 0,15 % DEXAMETASONA FOSFATO SÓDICO (SIFI, lote 160040)	<i>Escherichia Coli</i> (ATCC 8739) <i>Lote número 38/76</i>
45	CÓDIGO ÚNICO	<i>E. COLI</i>
50	ALMACENAMIENTO	-80 °C
	CONCENTRACIÓN DE USO	0,065 DO 600 nm = 1,2 x 10 ⁷ UFC
	DOSIS	300 µl
	CERTIFICADO DE PRUEBA	En el Anexo I

4. Metodologías

4.1 *E. coli*.

55 Cepa: *E. COLI* ATCC 8739, lote número.

La cepa se inoculó en un caldo nutritivo la semana anterior al experimento. Además, se sembró en placas con medio agar, para verificar su morfología normal. A continuación, vino seguida la incubación a 37 °C durante 16-24 horas.

60 4.1.1 Preparación de suspensiones de *Escherichia coli* y procedimiento de colonización

El día de la colonización, se comprobó la densidad óptica (DO) a 600 nm de la solución de *E. coli*, y se utilizó para la preparación de las suspensiones de colonización, basándose en procedimientos internos (PM 18).

Se realizaron recuentos bacterianos para verificar cada inóculo en medio Agar nutritivo, sembrando las diluciones 10x apropiadas en placas (desde la versión sin diluir, hasta la dilución 10⁻⁷ de la suspensión de cada compartimento). El recuento de bacterias viables aplicado a CacoGoblet corresponde a 1,2 x 10⁷ UFC.

5 4.2 Prueba de resistencia transepitelial (TEER)

4.2.1 Principio

10 La resistencia eléctrica transepitelial (TEER) es una medida directa de la función de barrera cutánea: refleja la resistencia global del tejido, debido tanto a su estructura como a su espesor, y mide la integridad de la barrera en términos de uniones estrechas.

15 El valor de TEER de la monocapa de células Caco-2 diferenciadas indica el grado de integridad de la propia monocapa y, por consiguiente, la formación de uniones estrechas entre los enterocitos. La medición de TEER (en Ω x cm²) se realiza con un voltímetro (Millicell ERS) (intervalo 200-2000 Ω).

4.2.2 Procedimiento

20 Se evaluó TEER en una monocapa de células CacoGoblet bien diferenciadas, después de 21 días de cultivo, realizando una medición por inserción utilizando el electrodo correcto, y posicionando el extremo corto del electrodo dentro del inserto, en posiciones apicales (en 0,3 ml de medio). El extremo largo del electrodo se sumergió en el pocillo, en posición basolateral (en 0,9 ml de medio).

4.3 Prueba con amarillo lucifer

25 4.3.1 Principio

30 El Amarillo Lucifer (LY) es un colorante fluorescente impermeable a la membrana celular. Se utiliza para estudiar la permeabilidad paracelular de una sustancia. Cuando las uniones están intactas, el Amarillo Lucifer tiene una permeabilidad muy baja; si, por el contrario, las uniones están dañadas, el flujo de Amarillo Lucifer es mayor. Por lo tanto, esta prueba permite verificar la integridad de las uniones celulares en presencia de la sustancia a examinar.

4.3.2 Procedimiento

35 Se aplica Amarillo Lucifer (LY) en el compartimento apical a una concentración de 100 μM, después de la exposición a la sustancia a examinar, disuelta en solución salina (0,25 ml). Se añaden 0,70 ml de solución salina en el compartimento basolateral. El transporte de LY se evalúa en términos del paso desde el compartimento apical al compartimento basolateral, después de un período definido de incubación de 1 hora a 37 °C.

40 La lectura se realiza mediante un espectrofluorómetro (TECAN INFINITE M200), con 428 nm de excitación y 525 nm de emisión.

El porcentaje de permeabilidad se calcula mediante la siguiente fórmula:

45 Flujo de LY = (RFU_{BL}/RFU_{AP} inicial) x 100

En una monocapa de CacoGoblet intacta, el flujo de LY debe ser inferior al 1,4 %.

50 4.4 Microscopio electrónico de barrido (SEM)

55 Las muestras a examinar por SEM se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2,5 % en PBS 0,1 M durante 24 horas, se lavaron en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M, a pH 7,4, y se extrajeron en tetróxido de osmio (OsO₄) al 1 % en la misma muestra (2 horas a temperatura ambiente). A continuación, las muestras se deshidrataron en grados ascendentes de etanol a temperatura ambiente y hexametildisilazano durante una noche.

60 Las muestras se colocaron en clavijas con lengüetas de carbono, y se recubrieron con una capa de oro utilizando el revestidor metálico SEM E5100, de Polaron Equipment Limited, a continuación, se transfirieron al microscopio electrónico de barrido de colon sigma Zeiss, para su visualización y fotografiado.

Muestra SEM generada durante el estudio (Tabla 4)

Tabla 4

Criterio de valoración VS 79-16	CÓDIGO DE MUESTRA
5 SEM	NC 6H-6
	E. COLI 2H-6
	PR (4 h) + E. COLI 2H-6

4.5 Inmunofluorescencia: alfa-actinina

10 4.5.1 Principio

El marcaje por inmunofluorescencia es una técnica histológica para detectar estructuras o moléculas específicas en compartimentos celulares de secciones histológicas. La técnica se basa en la especificidad del anticuerpo que se une al antígeno para la detección de la molécula diana, y un sistema de detección mediante un microscopio de fluorescencia, utilizando un método indirecto: un anticuerpo primario capaz de reconocer específicamente la diana, y un anticuerpo secundario unido al fluoróforo, capaz de reconocer el anticuerpo primario.

20 4.5.2 Procedimiento

Después de la fijación en etanol frío durante 30 minutos y en acetona fría durante 3 minutos, la mucosa intestinal se lavó con PBS, y las reacciones no específicas se bloquearon con BSA al 1 % en PBS durante 30 minutos. Cada inserto se incubó durante una noche a 4 °C con anticuerpo alfa actinina (anticuerpo monoclonal de ratón, ab18061, lote GR256204-1) a 1 µg/ml en BSA al 1 % en PBS. Después del lavado, los tejidos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con el anticuerpo secundario (anticuerpo anti ratón de cabra Alexa Fluor 488, Invitrogen A10-680) 1:400 en BSA al 1 % en PBS. Después del lavado, los núcleos se tiñeron con DAPI, y se analizaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM 2500.

4.6 Ensayo de adhesión de monocitos-células epiteliales

30 4.6.1 Principio

Las células CacoGoblet se trataron durante una noche con IL-1beta, la citocina proinflamatoria, antes del ensayo de adhesión, para crear una mucosa inflamada. A continuación, las monocapas tratadas se trataron con los productos durante 24 horas. Las células THP-1 marcadas se añadieron encima del CacoGoblet en cada pocillo. Las células THP-1 se marcaron con el colorante fluorescente diacetato de clorometilfluoresceína (CMFDA; Invitrogen). Después de la incubación, la monocapa se lavó suavemente para eliminar las células THP-1 no adherentes. Las células adherentes marcadas con el colorante fluorescente se observaron bajo un microscopio de fluorescencia.

40 4.6.2 Procedimiento

Una vez tratadas, las células THP-1 marcadas se aplicaron encima del CacoGoblet.

Las células THP-1 se marcaron con el colorante fluorescente diacetato de clorometilfluoresceína (CMFDA Exc. 492, Em 517; Invitrogen).

Después de 1 hora de incubación, la monocapa se lavó suavemente para eliminar las células THP-1 no adherentes. Las células adherentes marcadas con el colorante fluorescente se observaron bajo un microscopio de fluorescencia.

50 5. Resultados

5.1 Viabilidad celular a través de la prueba MTT

Los resultados de la prueba MTT se presentan en la Figura 3. La Figura 3 muestra la viabilidad celular después de 24 horas de tratamiento con arándano rojo a 10-100-1000 µg/ml.

Al control negativo (medio solo) se le asignó una viabilidad del 100 %.

En todas las concentraciones probadas, los productos no redujeron la viabilidad, en comparación con el control negativo.

La concentración no citotóxica seleccionada para el estudio de eficacia, fue de 1000 µg/ml. A esta concentración, la interferencia de la sustancia examinada con la prueba MTT, fue del 32 %.

65 Propiedades antiinflamatorias del extracto de arándano rojo en un sistema de cocultivo *in vitro* (células THP-1 y células epiteliales intestinales)

5.2 Ensayo de adhesión de monocitos-células epiteliales

Una vez tratadas, las células THP-1 marcadas se aplicaron encima del CacoGoblet.

- 5 Después de 1 hora de incubación, la monocapa se lavó suavemente para eliminar las células THP-1 no adherentes. Las células adherentes marcadas con el colorante fluorescente se observaron bajo un microscopio de fluorescencia; los resultados se presentan en la Figura 4.
- 10 La Figura 4 muestra la adhesión de monocitos-células epiteliales en CacoGoblet inflamado no tratado
- ✓ Como era de esperar, tras el tratamiento con IL1beta se observó un aumento en la adhesión de las células THP-1.
- 15 ✓ Como era de esperar, un número muy pequeño de células THP-1 demostraron ser adherentes al epitelio CacoGoblet (control negativo, NT).
- ✓ EL ARÁNDANO ROJO POR SÍ SOLO, sobre mucosas sanas, redujo la adhesión de las células THP-1.
- 20 ✓ Se observó una disminución significativa en la adhesión de las células THP-1 después de la aplicación de etacortileno sobre la mucosa inflamada.
- ✓ Se observó una disminución significativa en la adhesión de las células THP-1 después de la aplicación de ARÁNDANO ROJO sobre la mucosa inflamada, ligeramente menor que después del tratamiento con etacortileno.

25 Capacidad del arándano rojo para prevenir la adhesión de *E. coli* a la mucosa

5.3 Medición de la TEER

- 30 La Figura 5 muestra los resultados de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) expresada en ohmios x cm², al inicio (0 horas), después de 4 horas de tratamiento con los productos, y después de 2 horas de colonización por *E. coli* (6 horas de tratamiento en total).
- 35 Los valores de TEER antes del tratamiento (T = 0 horas) indican la resistencia global de la barrera, correlacionada con la integridad de la estructura de las uniones estrechas.

Se utilizó TEER, un parámetro físico de la integridad de la barrera de la mucosa, para caracterizar la influencia del producto sobre el flujo paracelular de iones a nivel del epitelio de la mucosa.

- 40 La Figura 5 muestra la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) expresada en ohmios x cm², al inicio (0 horas), después de 4 horas de tratamiento con arándano rojo a 1000 µg/ml por sí solo, o después de 2 horas de colonización por *E. coli*. 6 horas fue el tiempo total de cultivo del control negativo.
- 45 Como se indica en la Figura 5, la colonización por *E. coli* provocó una reducción en TEER de 274,67 ohmios x cm² a 218,68 ohmios x cm², después de 2 horas de tratamiento (-21 %).

50 El pretratamiento de 4 horas con arándano rojo provocó un aumento en TEER de 315 ohmios x cm² a 325,82 ohmios x cm², y contrarrestó la adhesión de *E. coli* (3 % de recuperación de TEER).

- 55 Después de 4 horas de tratamiento, el arándano rojo por sí solo indujo un aumento del 43 % en los valores de TEER (de 299,86 ohmios x cm² a 430,54 ohmios x cm²): Estos resultados indican las propiedades válidas de formación de película, y la eficacia positiva del extracto de arándano rojo sobre la barrera epitelial, tanto en presencia como en ausencia de *E. coli*.

5.4 Prueba con Amarillo Lucifer: Permeabilidad paracelular

60 El flujo paracelular de Amarillo Lucifer (LY) se evaluó al final del período de exposición; los resultados de la medición de fluorescencia se muestran en la Figura 6.

- 65 La Figura 6 muestra el % de flujo de LY, en comparación con LY, en el momento cero en el compartimento apical. La Figura 6 muestra el flujo de LY después de 6 horas de tratamiento (4 horas con arándano rojo y 2 horas de colonización por *E. coli*).
El control negativo (NC) tenía una permeabilidad del 0,52 % a LY.

E. coli tenía mayor permeabilidad a LY (0,91 %) que el control negativo (aumento del 74 % en el paso de LY frente al NC).

5 No surgió ninguna diferencia significativa entre el control negativo y el producto probado: el pretratamiento con arándano rojo restauró el epitelio intestinal, y evitó la adhesión por *E. coli*.

El arándano rojo por sí solo tiene eficacia protectora: se observó una reducción del 29 % en el paso de LY, en comparación con el control negativo.

10 5.5 Tinción por inmunofluorescencia de alfa-actinina

La serie de imágenes a continuación, muestra las muestras analizadas bajo un microscopio de fluorescencia. El color verde representa la proteína alfa-actinina ubicada al nivel de la membrana. La alfa actinina interactúa con Tir, una proteína de *E. Coli*, para formar la placa adhesiva conocida como pedestal, y es un marcador de infección por *E. Coli*.

15 La **Figura 7** muestra la inmunofluorescencia de alfa-actinina en muestras colonizadas por *Escherichia Coli*, y tratadas o no tratadas con arándano rojo.

20 El aumento del color fluorescente a nivel de la membrana es evidente después de la colonización por *E. coli*, en comparación con el control negativo.

El arándano indujo una ligera disminución en alfa-actinina cuando se aplicó por sí solo, o como tratamiento previo antes de la colonización por *E. coli* (diferencia no significativa, en comparación con la colonización por *E. Coli*).

25 5.6 Microscopio electrónico de barrido

La Figura 8 muestra imágenes ultraestructurales de microvellosidades de células Caco-2 extraídas de la bibliografía. (BCD Cancer 2008 8:227)

30 En las células Caco-2 no tratadas se puede observar un gran número de microvellosidades. Los márgenes de las células no aparecen. Inserto: Microvellosidades largas presentes, b. Células tratadas con EGF. Son evidentes numerosas vesículas. Inserto: Hay un número reducido de microvellosidades, c-f: células tratadas. Las microvellosidades disminuyen en número, y pierden su posición erguida.

35 Datos históricos de VitroScreen sobre la colonización de células Caco-2 por *E. coli*: La proliferación y la adhesión de *E. coli* a la capa celular son evidentes (flecha de color rojo).

Las Figuras 9A y 9B muestran las muestras analizadas bajo un microscopio electrónico de barrido.

40 La Figura 10A muestra el control negativo: CacoGoblet sin tratar a las 6 horas

Como se esperaba, el control negativo no mostró estrés celular ni contaminación bacteriana. El tejido era trófico, con desmosomas bien estructurados (1000x). Las microvellosidades parecen estar bien organizadas en toda la superficie: Se puede observar un denso borde de microvellosidades en forma de pincel (5000x, cuadro de color rojo).

45 La Figura 10B muestra la colonización del tejido por *E. coli*, 2 horas

Debido a la solución de problemas técnicos, no hay proliferación de *E. coli* en la superficie del CacoGoblet. Sin embargo, la monocapa muestra microvellosidades dañadas en la superficie; son menos numerosas y han perdido su posición normal (10000x, cuadro de color rojo), en comparación con el control negativo, lo que indica que *E. coli* causó daños en el borde en forma de cepillo.

La Figura 10C muestra el pretratamiento con ARÁNDANO ROJO durante 4 horas, antes de la colonización por *E. coli* durante 2 horas.

55 La monocapa parece estar bien estructurada, y muestra microvellosidades en la superficie (5000x). Son visibles pocas células de *E. coli*, y su morfología está alterada (10000x, flecha de color rojo), con claros signos de lisis. Además, se evidencian abundantes restos bacterianos (10000x, estrella de color rojo), lo que indica que el tratamiento con arándano rojo causó daño a *E. coli*.

60 6. Conclusiones

Se aplicaron diversos modelos experimentales basados en el epitelio intestinal CacoGoblet *in vitro*, para evaluar la eficacia del EXTRACTO DE ARÁNDANO ROJO por parte de Sofar S.p.A.

La concentración no citotóxica se probó en una etapa preliminar mediante ensayo MTT, para así descartar la posible toxicidad intrínseca del producto.

La concentración no citotóxica más alta seleccionada para el estudio de eficacia, fue de 1000 µg/ml.

5

Se utilizaron dos protocolos:

- 10 1) Propiedades antiinflamatorias del extracto de arándano rojo en un sistema de cocultivo (células THP-1 y células epiteliales intestinales)
- 10 2) Capacidad del arándano rojo para prevenir la adhesión de *E. coli*

Se evaluaron los siguientes parámetros, para llegar a una conclusión con respecto a:

- 15 - Adhesión monocitos-células epiteliales en CacoGoblet, con inflamación inducida por IL-1 beta (*eficacia antiinflamatoria*)
 - Resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y flujo paracelular de LY (*alteración de la barrera epitelial*)
 - 20 - Análisis ultraestructural de *E. coli* con microscopio electrónico de barrido (SEM) (*contrarrestar la adhesión y proliferación de E. coli*)
 - Localización de alfa-actinina por inmunofluorescencia (*contrarrestar la adhesión de E. coli*)
- 25 En conclusión, los resultados demostraron que:
- 30 1) El ARÁNDANO ROJO, aplicado sobre una mucosa intestinal inflamada, indujo una reducción significativa en la adhesión a las células THP-1, lo que sugiere una importante acción antiinflamatoria.
 - 35 2) El pretratamiento con arándano rojo durante 4 horas contrarrestó ligeramente el daño de la barrera inducido por la adhesión de *E. coli*; el arándano rojo por sí solo, después de 4 horas de tratamiento, indujo un aumento del 43 % en los valores de TEER, lo que sugiere una excelente capacidad de formación de película.
 - 40 3) El arándano rojo por sí solo ejerce una acción protectora sobre la integridad de la barrera: Se observó una reducción del 29 % en el paso de LY, en comparación con el control negativo. No surgió ninguna diferencia significativa con el producto probado, en comparación con el control negativo: El pretratamiento con arándano rojo restauró el epitelio intestinal, y evitó la adhesión de *E. coli*.
 - 45 4) La tinción con α -actinina, relevante como biomarcador de la adhesión de *E. coli*, no fue alterada de manera significativa por el tratamiento con arándano rojo, en las condiciones experimentales adoptadas; sin embargo, se observó una ligera reducción de la fluorescencia.
 - 5) El análisis por microscopía electrónica de barrido reveló una actividad directa del arándano rojo contra la adhesión, viabilidad y morfología de *E. coli*.

45

REIVINDICACIONES

1. Una composición para administración oral, que se denomina (“CR”), que comprende o, como alternativa, consiste en:
 - 5 (i) un núcleo que comprende o, como alternativa, que consiste en un extracto (a) de al menos una planta del género *Vaccinium* y al menos un ingrediente (b) aceptable para uso farmacéutico o alimentario;
 - 10 (ii) una capa gastrorresistente externa al núcleo (i), y al que recubre completamente (i), y comprende al menos un ingrediente (c) aceptable para uso farmacéutico o alimentario, en donde dicha capa gastrorresistente (ii) es capaz de permitir la liberación del extracto (a) en el colon; en donde dicha composición es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la diverticulosis colónica, patologías o enfermedades relacionadas con la presencia de divertículos, seleccionadas de la enfermedad diverticular, la EDSSC (enfermedad diverticular sintomática sin complicaciones) y la diverticulitis colónica.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho extracto (a) de al menos una planta del género *Vaccinium*, es preferiblemente un extracto seco presente en una cantidad comprendida de 150 mg a 600 mg, con respecto al peso total de (a).
- 20 3. La composición para su uso según la reivindicación 2, en donde dicho extracto (a) está presente en una cantidad comprendida de 200 mg a 300 mg, con respecto al peso total de (a), y contiene del 80 % al 99 % de proantocianidinas por peso, en relación con el peso total de (a).
- 25 4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho extracto (a) es preferiblemente un extracto seco de arándano rojo, que contiene preferiblemente PAC (proantocianidinas), en una concentración del 5 % al 30 % en peso o volumen, por ejemplo, el 10 %, 15 %, 20 % o 25 %.
- 30 5. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde dicha capa gastrorresistente (ii) externa al núcleo (i) tiene la característica de descomponerse y disolverse en función del valor del pH y/o del tiempo; preferiblemente, dicha capa (ii) es capaz de descomponerse y disolverse desde un valor de pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente un pH de 8.
- 35 6. La composición para su uso según la reivindicación 5, en donde dicha capa gastrorresistente (ii) externa al núcleo (i) es capaz de descomponerse y disolverse desde un valor de pH de aproximadamente 7 a aproximadamente pH 7,5; preferiblemente, en un tiempo comprendido de 30 minutos a 120 minutos; incluso más preferiblemente, de 45 minutos a 90 minutos.
- 40 7. La composición para su uso según las reivindicaciones 1, 5 o 6, en donde dicha capa gastrorresistente (ii) externa al núcleo (i) comprende o, como alternativa, consiste en al menos una sustancia seleccionada de Eudragard biótico E1207, un polímero gastrorresistente, tal como 7:3:1 de polí(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) u otro copolímero metacrílico aniónico, citrato de trietilo E1505, talco, etilcelulosa, copolímero de metacrilato aniónico y mezclas de los mismos, goma laca, alginato de sodio y mezclas de los mismos, almidón y almidones modificados, ácido oleico, ácido esteárico y triglicéridos de cadena media.
- 45 8. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha capa gastrorresistente (ii) externa al núcleo (1), comprende o, como alternativa, consiste en:
 - un polímero gastrorresistente, tal como 7:3:1 de polí(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) u otro copolímero de metacrilato aniónico: de 5 a 50 mg; 10 a 35 mg; 18-25 mg;
 - 55 - Citrato de trietilo E1505: de 0,1 a 5 mg; 0,3 a 3 mg; 0,5-2 mg
 - Talco: de 1 a 30 mg; 3 a 20 mg; 5-15 mg.
- 50 9. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha capa gastrorresistente (ii) externa al núcleo (i), comprende o, como alternativa, consiste en:
 - Etilcelulosa: de 5 a 15 mg; 8 a 12 mg; 9,97 mg;
 - Alginato de sodio: de 5 a 15 mg; 8 a 12 mg; 9,30 mg;
 - 65 - Hidróxido de amonio: de 0,5 a 4 mg; 1,5 a 3 mg; 2,34 mg;

- 5 - Triglicéridos de cadena media: de 0,5 a 5 mg; 1,5 a 3 mg; 2,12 mg;
- 10 - Ácido oleico: de 0,5 a 3 mg; 1 a 2 mg; 1,17 mg;
- 15 - Ácido esteárico purificado: de 0,01 a 0,5 mg; 0,05 a 0,3 mg; 0,1 mg.
- 20 10. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha capa gastrorresistente (ii) externa al núcleo (i), comprende o, como alternativa, consiste en:
- 25 - etilcelulosa: de 5 a 50 mg; 10 a 30 mg; 15-20 mg;
- 30 - dióxido de titanio: de 0,1 a 15 mg; 0,5 a 10 mg; 1-5 mg;
- 35 - Alginato de sodio: de 0,1 a 5 mg; 0,3 a 4 mg; 0,5-2 mg;
- 40 - ácido oleico, ácido esteárico, triglicéridos de cadena media: cada uno de 0,01 a 3 mg; entre 0,05 y 1 mg.
- 45 11. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha capa gastrorresistente (ii) externa al núcleo (i), comprende o, como alternativa, consiste en:
- 50 - Eudragard® biótico E1207 (Evonik): por ejemplo, 20,4 mg;
- 55 - Citrato de trietilo E1505: por ejemplo, 1 mg;
- 60 - Talco: por ejemplo, 10,2 mg.
- 65 12. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha capa gastrorresistente (ii) externa al núcleo (i), comprende o, como alternativa, consiste en:
- 70 - Etilcelulosa: por ejemplo, 9,97 mg;
- 75 - Alginato de sodio: por ejemplo, 9,30 mg;
- 80 - Hidróxido de amonio: por ejemplo, 2,34 mg;
- 85 - Triglicéridos de cadena media: por ejemplo, 2,12 mg;
- 90 - Ácido oleico: por ejemplo, 1,17 mg;
- 95 - Ácido esteárico purificado: por ejemplo, 0,1 mg.

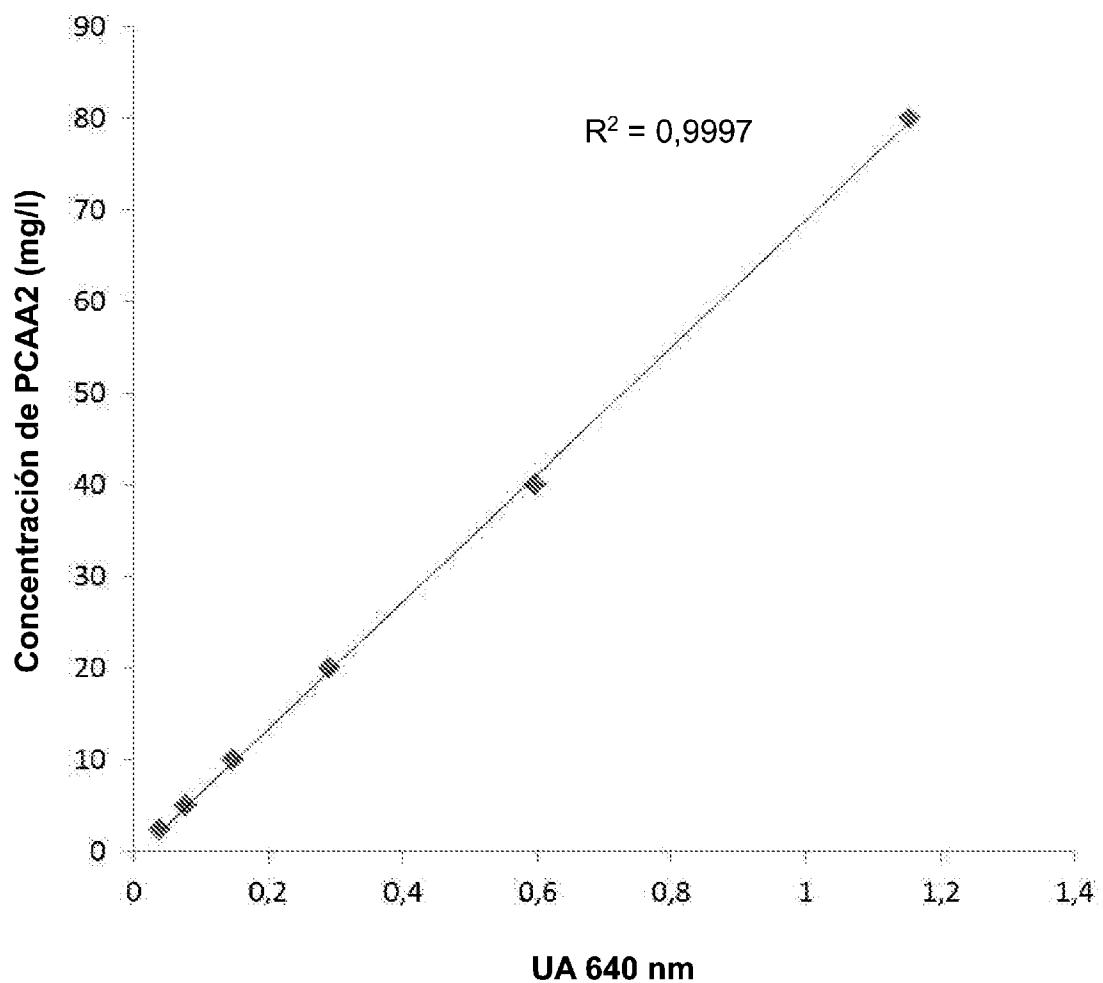


Figura 1

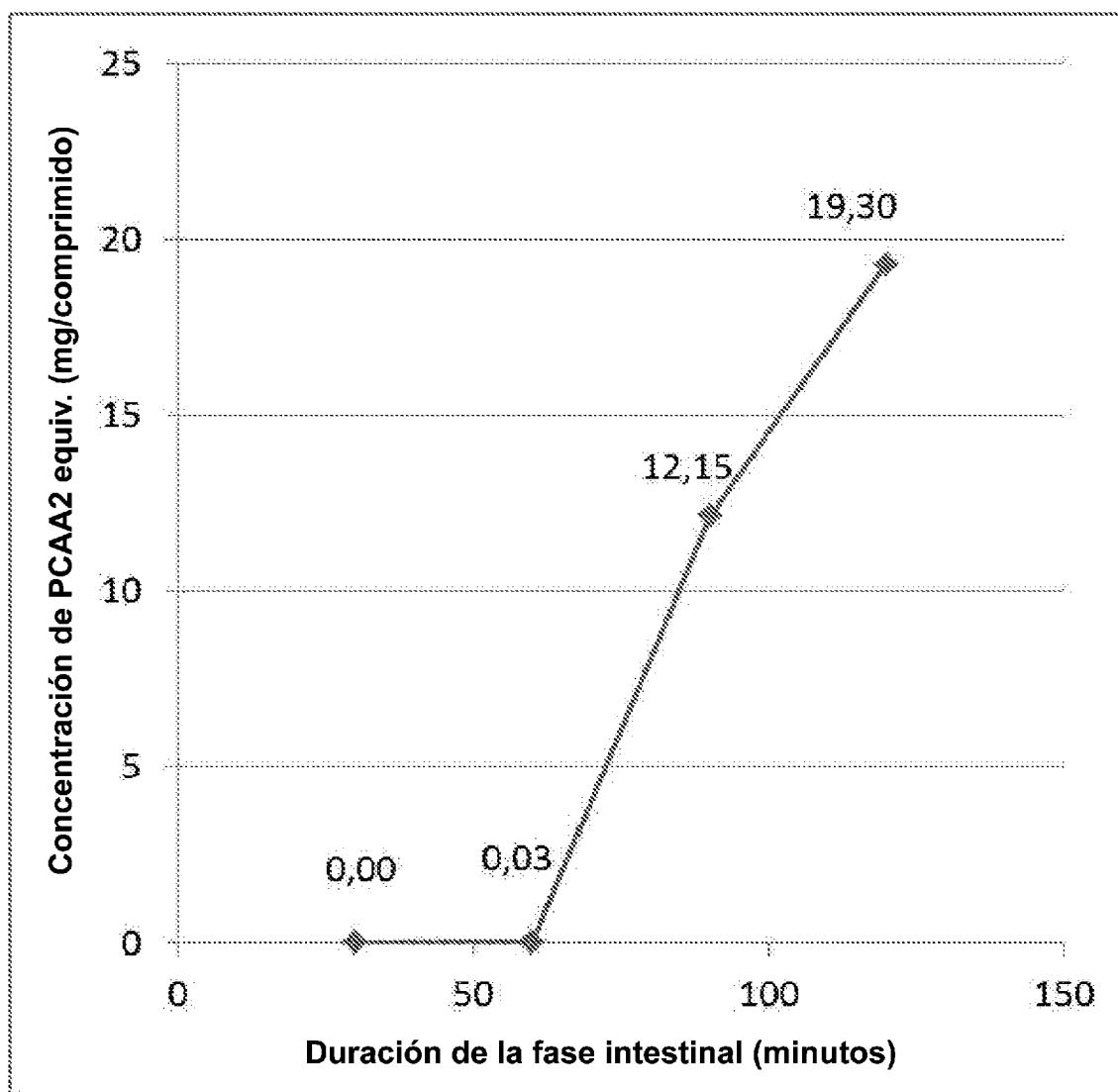


Figura 2

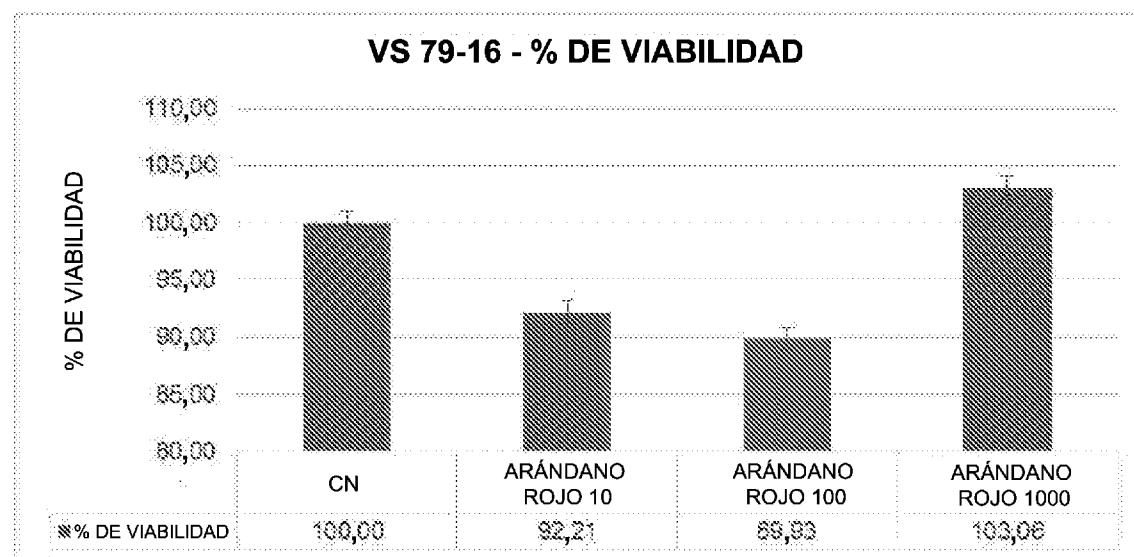


Figura 3

ES 2 968 428 T3

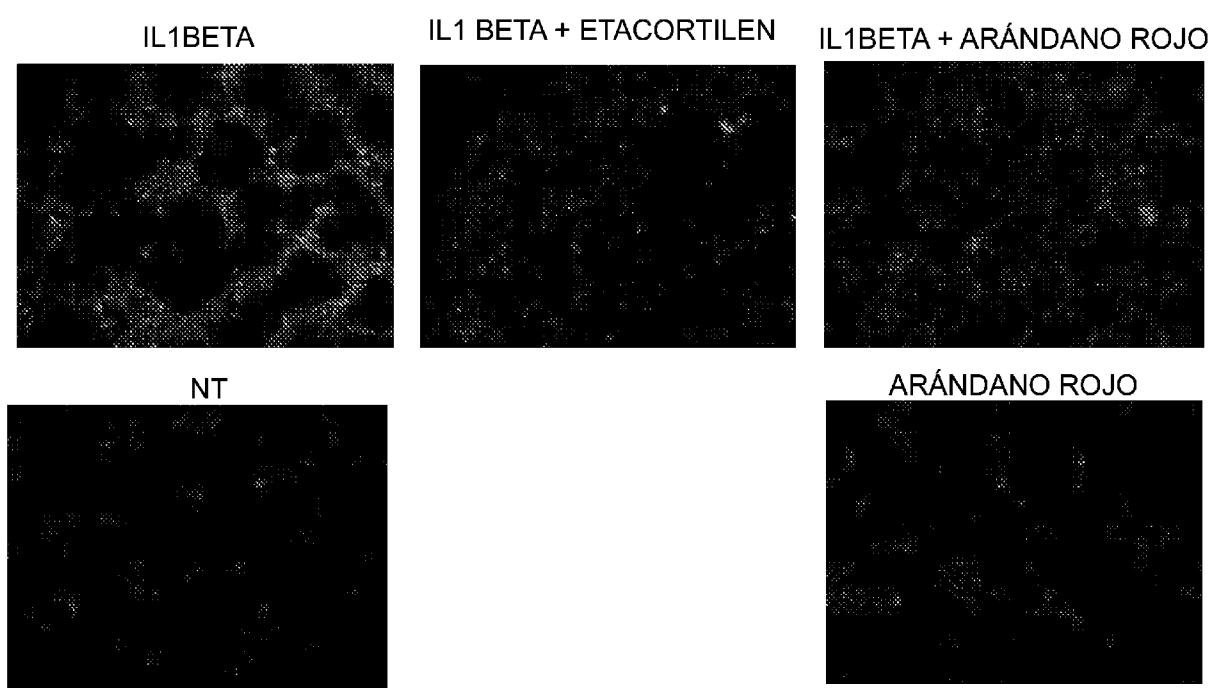


Figura 4

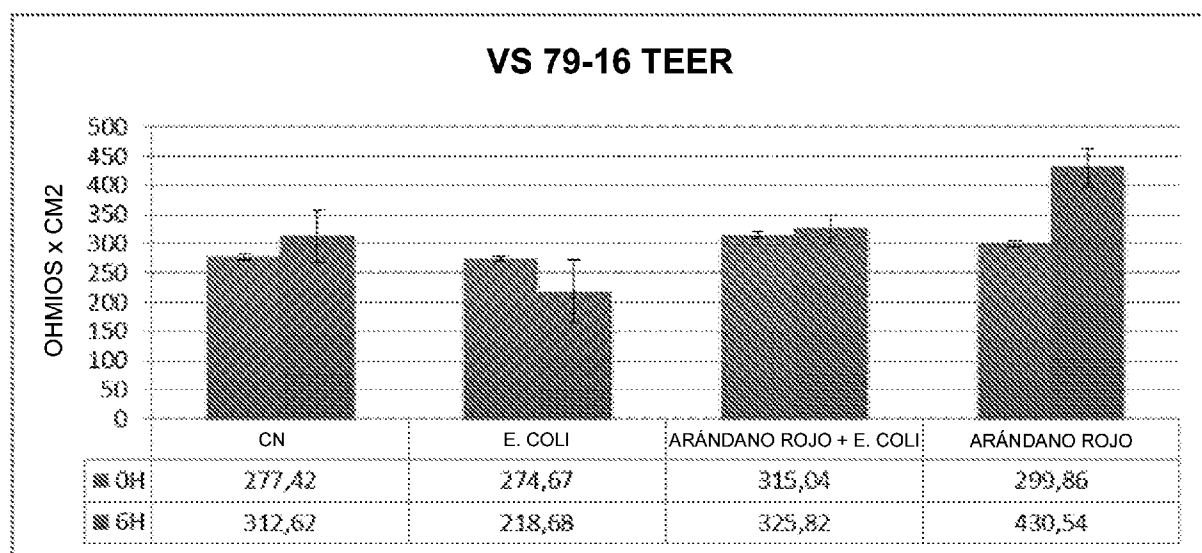


Figura 5

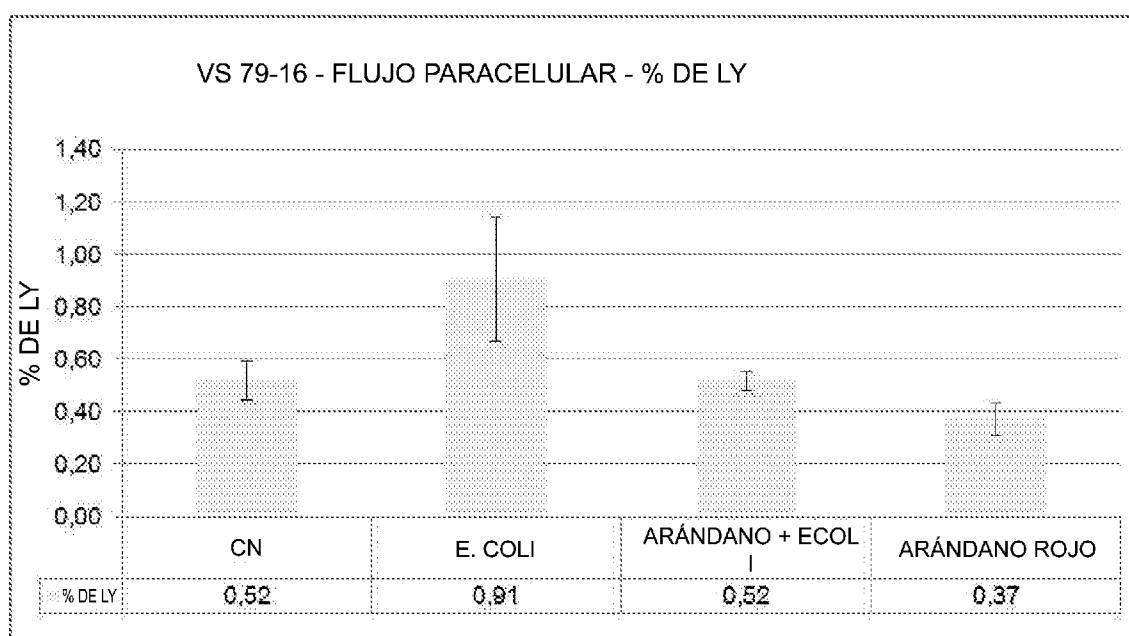


Figura 6

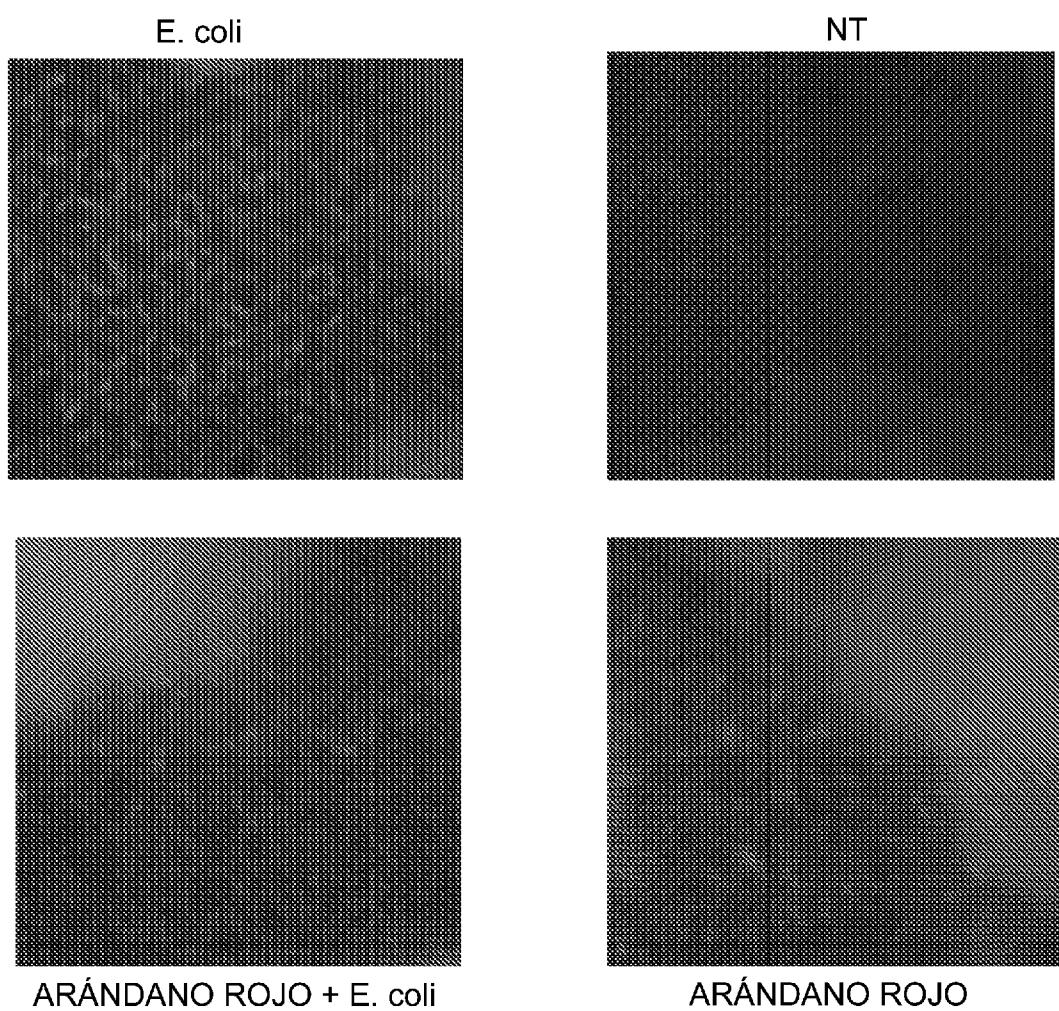


Figura 7

ES 2 968 428 T3

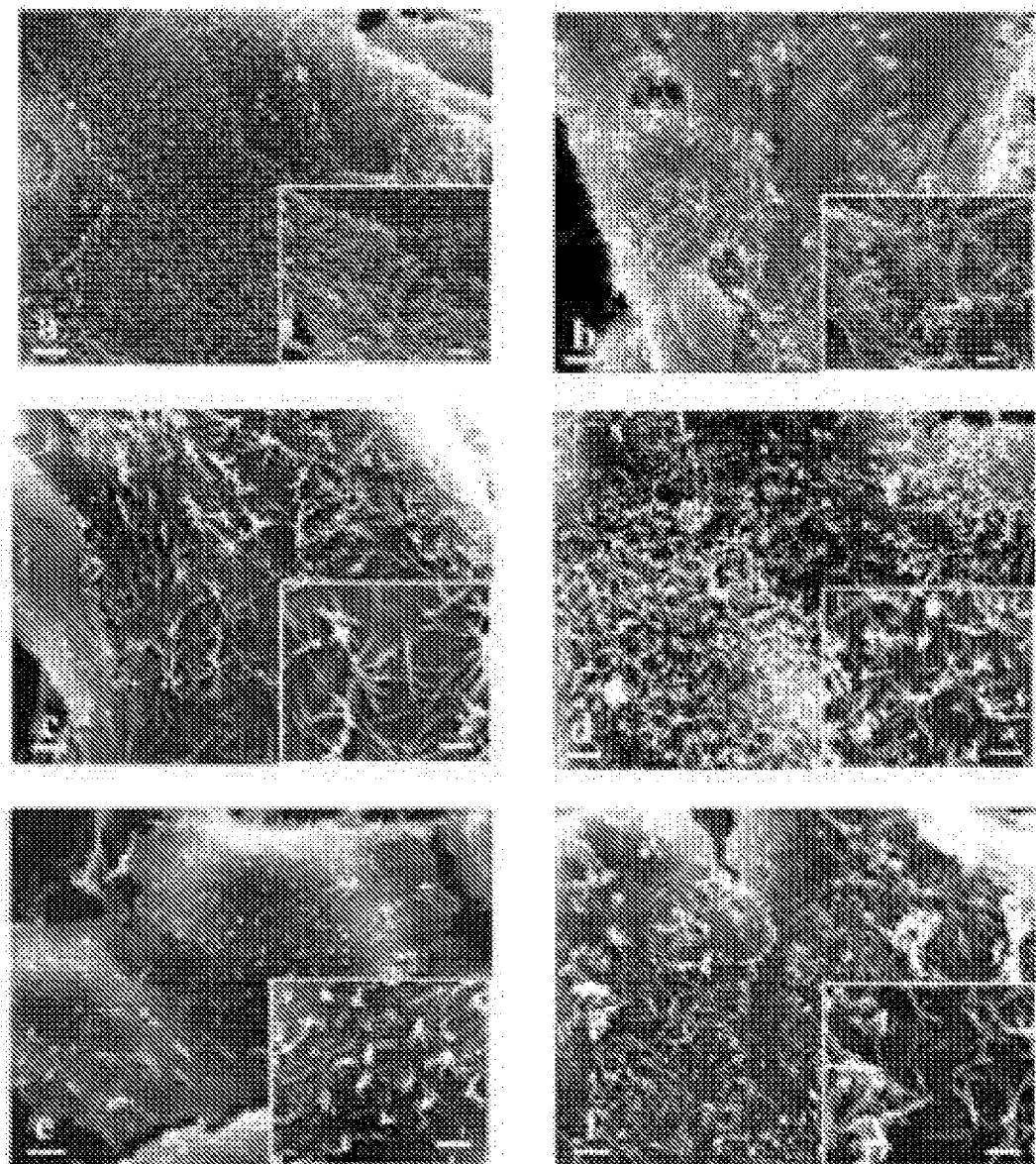
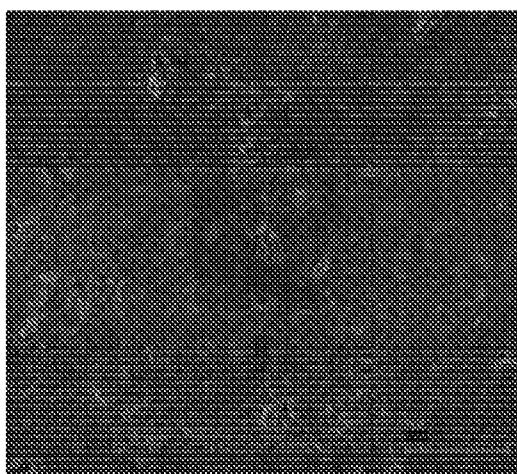


Figura 8

E.coli 2500X



E.coli 7500X



Figura 9A

Figura 9B

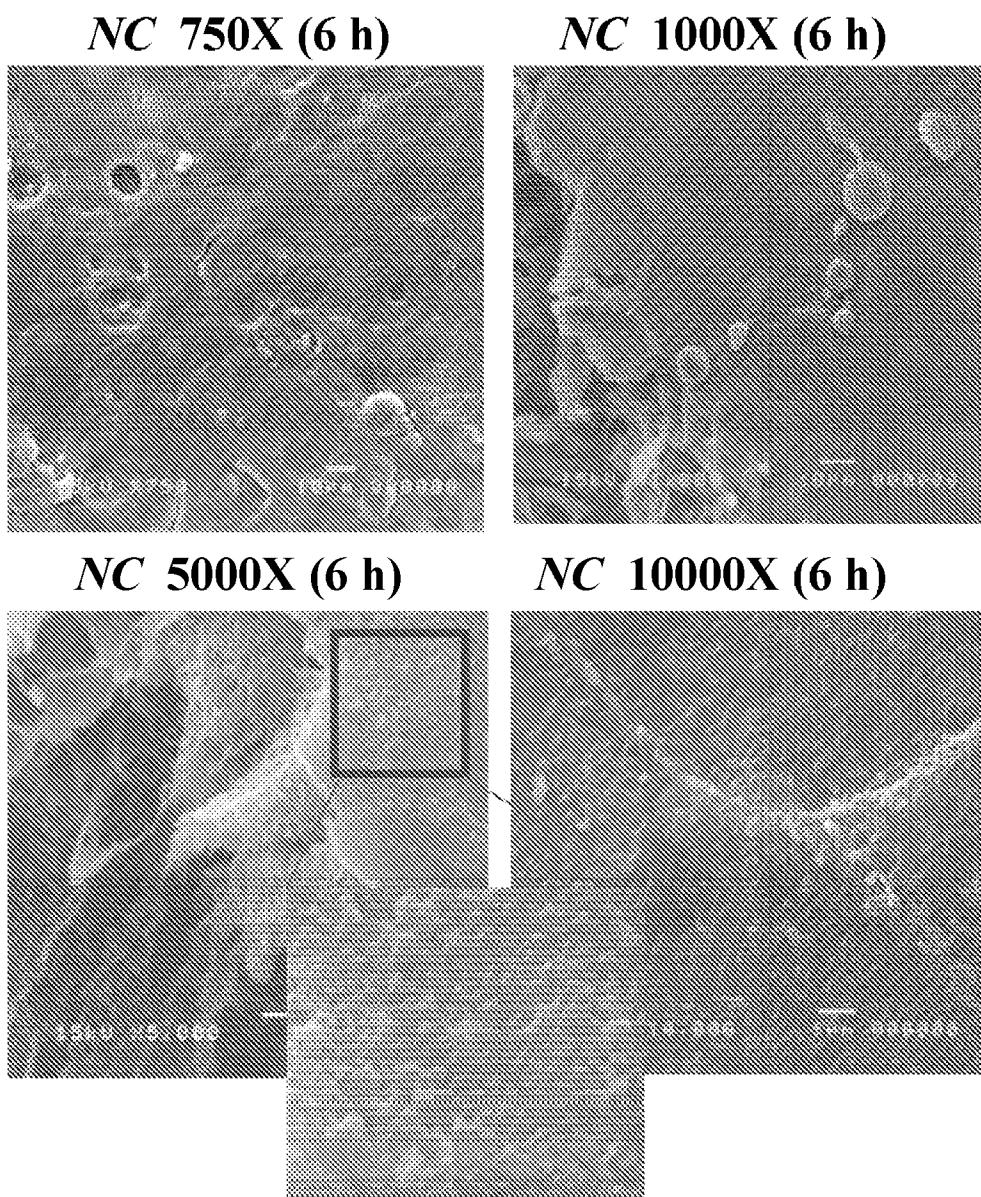


Figura 10A

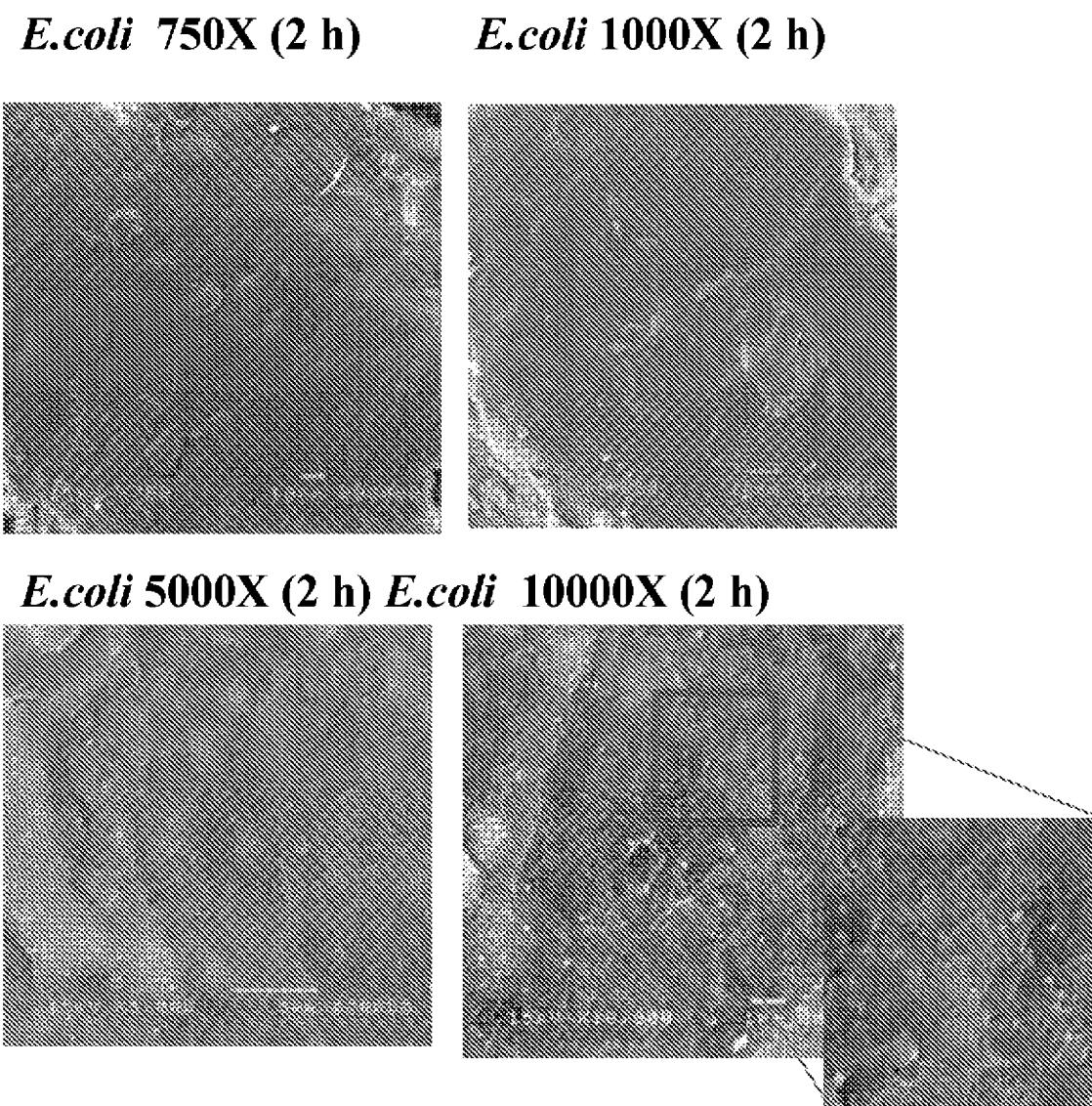


Figura 10B

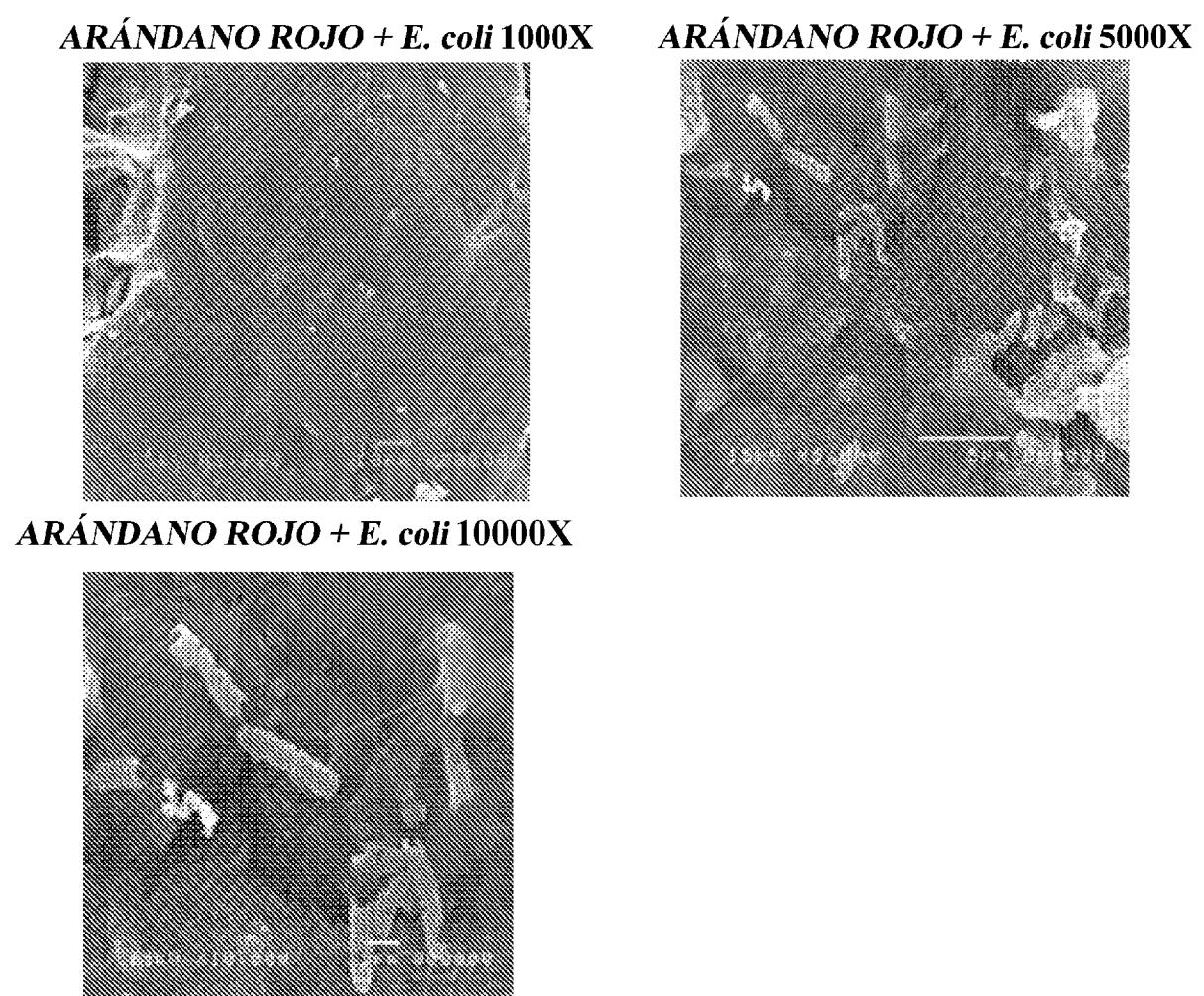


Figura 10C

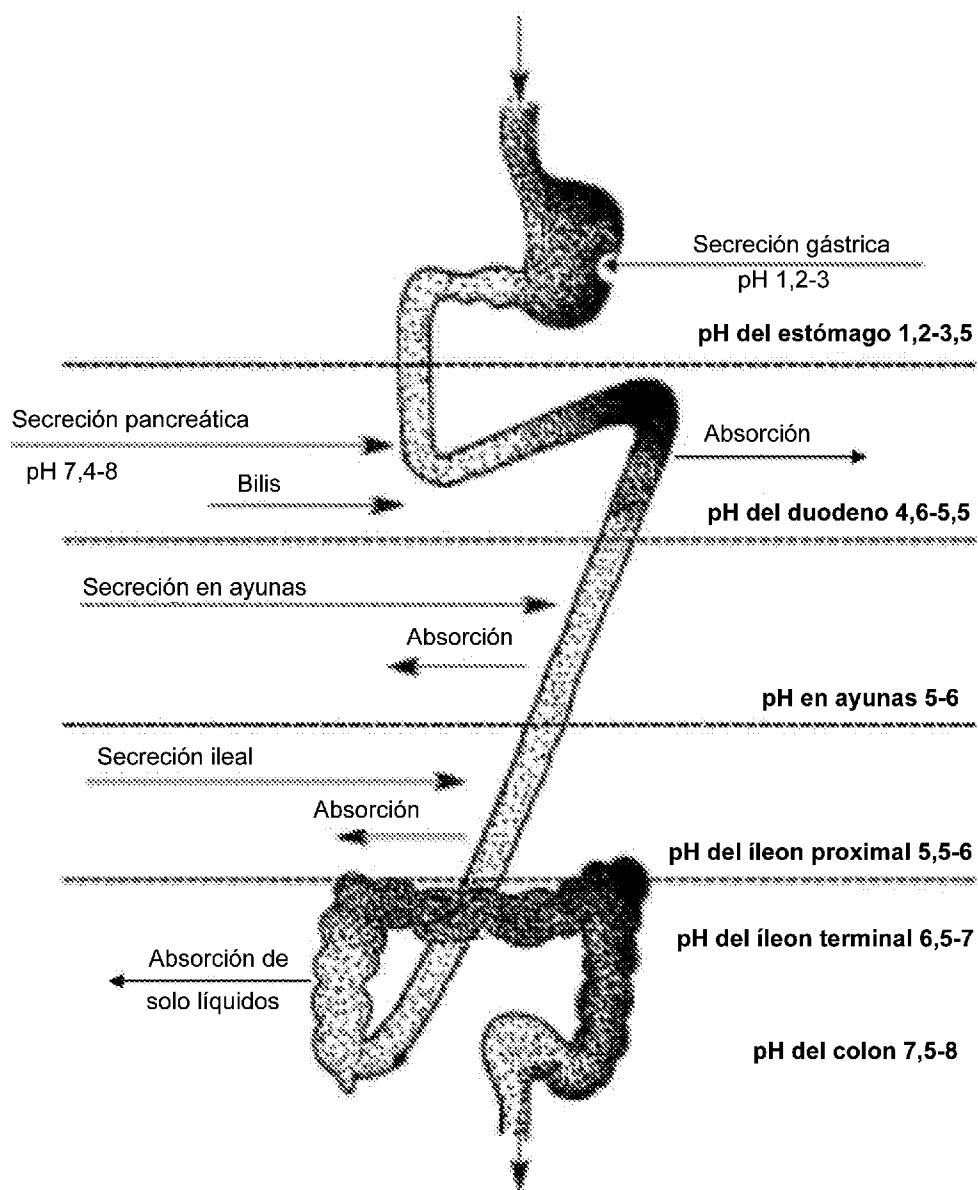


Figura 11