



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 290 350**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 31/736 (2006.01)

A61K 36/886 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02792110 .5**

86 Fecha de presentación : **23.12.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1461361**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2004**

54 Título: **Polisacárido cargado negativamente que se puede derivar de *Aloe vera*.**

30 Prioridad: **27.12.2001 EP 01205253**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

73 Titular/es: **2QR Research B.V.**
Informaticalaan 12
2628 ZD Delft, NL

72 Inventor/es: **Van Dijk, Willem;**
Goedbloed, Annelize, Frieda y
Koumans, Floris, Jan, Robbert

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 290 350 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

Polisacárido cargado negativamente que se puede derivar de *Aloe vera*.

5 La presente invención se refiere a una composición de interés que comprende polisacáridos que se pueden derivar de *Aloe vera* y a un método para preparar dicha composición de interés, a un extracto animal o vegetal que comprende dicha composición de interés y a un método para preparar dicho extracto animal o vegetal y a su aplicación como suplemento alimenticio, en higiene personal y en uso farmacéutico.

10 El *Aloe* es un miembro de la familia liliáceas que comprende más de doscientas especies diferentes de *Aloe*. *Aloe barbadensis* Miller o *Aloe Curacao* se reconoce generalmente como el “aloe verdadero”, debido a su amplio uso y su poder cicatrizante más efectivo. El *Aloe vera* contiene dos fuentes de líquido principales, un látex amarillo (exudado) y el gel transparente (mucílago). La gelatina mucilaginoso procedentes de las células parenquimatosas de la planta se denomina gel de *Aloe vera*. El gel de *Aloe vera* es aproximadamente 98,5% de agua en peso. Más del 60% del sólido
15 total está constituido por polisacáridos originados de carbohidratos.

Desde las épocas más tempranas de la historia registrada, el hombre ha utilizado las hojas completas, exudados y geles brutos obtenidos de *Aloe vera*, debido a que es responsable de una serie de actividades biológicas, incluyendo actividades antibacterianas, antivíricas y antiinflamatorias. Fue la medicina tradicional de muchas culturas y se usó,
20 entre otros, para la lepra, quemaduras y enfermedades alérgicas. Otras especies de *Aloe* con poder curativo son, por ejemplo, *Aloe arborescens*, *Aloe vahombe*, *Aloe ferox* y *Aloe saponaria*.

En la literatura se han descrito muchos polisacáridos diferentes, que se han mencionado como responsables de dichas actividades biológicas. Por ejemplo, en la patente de EE.UU. 4.861.761, se describe un método en una etapa
25 para la preparación de un polisacárido puro, terapéuticamente activo, denominado Aloferón, con un peso molecular de aproximadamente 70 kD.

En la patente de EE.UU. 5.118.673, dichas actividades biológicas se atribuyen al Acemanano, un polisacárido extraído del gel de *Aloe vera*, que comprende moléculas de manosa que están acetiladas sobre el oxígeno en un 91%
30 aproximadamente. Además de la manosa, otro componente glicosilo, concretamente galactosa, está presente en una proporción de aproximadamente 20:1. El peso molecular es, en promedio, aproximadamente 1000 kD. Este polímero atóxico se dice que es efectivo también en la supresión de tumores.

Sin embargo, recientemente Nirmal Pugh *et al.* describieron en el Journal of Agricultural Food Chemistry, 49, 1030-1034 (2001), un nuevo polisacárido de elevado peso molecular de *Aloe vera* con actividad inmunoestimulante
35 potente. Se indica que el peso molecular es 4000-5000 kD. Los componentes glicosilo principales son glucosa (37,2%), galactosa (23,9%), manosa (19,5%) y arabinosa (10,3%). Se establece que, aunque este polisacárido comprende sólo 0,015% del peso seco original, su actividad biológica en esta prueba es responsable totalmente de la actividad en el jugo de *Aloe* bruto. Se postula que la actividad inmunoestimulante mucho menor del acemanano se debe a una sustancia muy potente (muy probablemente polisacárido Aloeride), que está presente en cantidades traza, como “contaminante”.
40

Por tanto, hasta el momento no se ha establecido con seguridad qué fracción de *Aloe vera* produce la actividad biológica de dicha planta. Un objeto de la presente invención es aislar una nueva composición de interés, que se puede derivar de *Aloe vera* o un extracto animal o vegetal que sea adecuado como complemento alimenticio o en alimentos
45 dietéticos, en higiene personal o en cosméticos, o en uso farmacéutico, especialmente para evitar la adhesión de microorganismos en los tejidos. Otro objeto de la invención es proporcionar procesos mediante los que se pueda aislar tal composición de interés o extracto.

Se descubrió que una nueva fracción polisacárida cargada negativamente, aislada de *Aloe vera*, y que comprendía
50 principalmente manosa, mostraba una actividad biológica sorprendentemente mayor que la de las fracciones polisacáridas no cargadas o cargadas sólo débilmente., las cuales no se unían a una columna cargada positivamente. Esta actividad biológica mayor se ha descubierto para subfracciones con todos los pesos moleculares aparentes.

La presente invención proporciona tal composición de interés que comprende polisacáridos que se pueden derivar de *Aloe vera*, con las siguientes características: a) los polisacáridos comprenden 70-90% de D-manosa con un
55 intervalo entre 60-100%, 30-10% de D-glucosa con un intervalo entre 40-0% y 0-10% de otros monosacáridos, b) los polisacáridos están cargados negativamente, c) los polisacáridos se unen a una columna cargada positivamente y d) el peso molecular promedio es superior a 50 kD. El segundo intervalo más amplio indicado significa que un polisacárido con un porcentaje en peso de los monosacáridos indicados en los intervalos más amplios pertenece al alcance
60 de la invención, pero se prefieren aquellos con un porcentaje en peso incluido en los intervalos pequeños. Todos los porcentajes relativos a la composición de interés se refieren a porcentajes en peso.

Se observa que, en el artículo de A. Femenia *et al.*, Carbohydrate polymers 39, 109-117 (1999), se han descrito características de polisacáridos de *Aloe vera*; se mencionan polímeros que contienen manosa del filete interior y de
65 gel, que muestran un peso molecular promedio de aproximadamente 30-40 kDa.

Además, se observa que se conocen antimicrobianos de US-A-6.290.964, que no son polisacáridos que contienen manosa, aislados de *Aloe vera*.

ES 2 290 350 T3

Preferiblemente, en dicha composición de interés, los polisacáridos tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 100-300 kD. Sin embargo, como también otras subfracciones con un peso molecular promedio de 50-100 kD o superior a 300 kD muestran una actividad biológica considerable, estas subfracciones forman también un aspecto de la presente invención. Preferiblemente, la proporción de D-manosa y D-glucosa en dichos polisacáridos está comprendida en el intervalo de aproximadamente 5 a 20, preferiblemente 7-10.

La presente invención también proporciona un proceso para preparar dicha composición de interés mediante las siguientes etapas de proceso:

a) subfraccionamiento de un extracto animal o vegetal, por ejemplo un extracto de *Aloe* o *Aloe vera* en dos fracciones, una con peso molecular aparente de $>\pm 5$ kD, denominada subfracción I y una con un peso molecular aparente de $\leq \pm 5$ kD.

b) paso de la subfracción I sobre una columna cargada positivamente como, por ejemplo, una columna de DEAE-Sephadex, una columna de DEAE-Sephadex o una columna de DEAE-celulosa,

c) elución de parte de la subfracción I unida a dicha columna con una solución salina, por ejemplo con una solución de cloruro sódico, produciendo la subfracción I-D₁,

d) desalación y ultrafiltración de I-D₁ por ejemplo a través de una membrana PM10 bajo presión de nitrógeno, para concentrar I-D₁ hasta aproximadamente 0,1 del volumen original del extracto de *Aloe vera*,

e) opcionalmente, preparación de subfracciones de I-D₁ con pesos moleculares aparentes deseados de >300 kD, 100-300 kD y 50-100 kD, particularmente mediante ultrafiltración secuencial sobre una membrana XM-300, XM-100, XM-50 y, finalmente PM-10, o mediante FPLC preparativa sobre una columna de Superose.

Preferiblemente, se realiza una etapa previa a la purificación antes de la etapa "a", sobre una columna de Sephadex G-25.

En el artículo de A. Femenia *et al.*, Carbohydrate Polymers 39, 109-117 (1999), también se han descrito extractos de *Aloe vera*, sin embargo, dichos extractos no se fraccionan posteriormente y no se separan posteriormente con la ayuda de una columna cargada positivamente.

La presente invención también proporciona como sustancia adecuada un extracto animal o vegetal, especialmente un extracto de *Aloe*, siendo más especialmente un extracto de *Aloe vera* indicado como extracto NAG-25 (sin afinidad para Sephadex G-25), que comprende la composición de interés, según se definió anteriormente, en una concentración de 5-10, especialmente 8 veces superior, y de compuestos de peso molecular bajo aproximadamente 2 veces más reducidos que los extractos conocidos en la técnica. Generalmente, tal extracto animal o vegetal NAG-25 (entendido como NAG-25 vegetal o NAG-25 animal), será una savia.

Según un aspecto adicional de la invención, se ha proporcionado un proceso para preparar tal extracto vegetal o animal NAG-25 mediante purificación del correspondiente extracto vegetal o animal sin tratar sobre una columna de Sephadex G-25 para eliminar materiales con afinidad para dicha columna. "Correspondiente" significa la misma especie de planta o animal. Tal extracto NAG-25 comprende todos los compuestos de elevado peso molecular sin ninguna afinidad por la matriz polisacárida de la columna cargada positivamente usada, pero también menos compuestos de peso molecular bajo que los esperados. Si es necesario, el extracto resultante se concentra posteriormente por un factor de 5 a 50, mediante la eliminación de agua, produciendo el extracto vegetal o animal NAG-25 según la presente invención, también indicado como 2QRide. Generalmente, si el compuesto de partida es un polvo secado por pulverización, se puede obtener una solución concentrada partiendo de un volumen pequeño de agua, en cuyo caso no son necesarias etapas de concentración posteriores.

Preferiblemente, si se usa una planta para preparar la composición de interés o el extracto NAG-25 según la invención, esta es una planta de *Aloe*, especialmente de *Aloe vera*. Sin embargo, se puede conseguir un extracto que contenga los polisacáridos cargados negativamente, de otras plantas. Se han encontrado polisacáridos biológicamente activos en *Vaccinium macrocarpon* (arándano agrio), *Panax ginseng*, *Plantago*, *Echinacea*, *Garcinia*, *Arnica*, *Angelica*, *Hibiscus*, *Glycyrrhiza*, *Morinda*, etc. Si se usa un animal, son especialmente adecuados los peces y babosas. Sin embargo, además de extractos de plantas y animales, también se deberían considerar para esta solicitud de patente como incluidos en el alcance de la invención extractos de animales inferiores como algas, esponjas y hongos. Por tanto, para esta solicitud de patente, la expresión "vegetal y animal" también comprende organismos inferiores.

Según otro aspecto adicional de la invención, se proporciona un extracto de *Aloe*, especialmente un extracto de *Aloe vera*, que se ha ultrafiltrado, preferiblemente con un método de flujo transversal sobre una membrana, para preparar subfracciones con un peso molecular aparente deseado según se indicó anteriormente, pero con polisacáridos tanto cargados como sin cargar, que se unen y no se unen, respectivamente, a una columna cargada positivamente. Asimismo, este extracto de *Aloe* ultrafiltrado comprende los nuevos polisacáridos cargados negativamente según la invención. Preferiblemente, dichos polisacáridos cargados y sin cargar se separan posteriormente en polisacáridos cargados y sin cargar haciéndolos pasar sobre filtros cargados, de los cuales los polisacáridos cargados se indican con 2QRide.

Los nuevos polisacáridos cargados negativamente, los extractos vegetales o animales NAG-25 y el extracto ultrafiltrado de *Aloe* que comprende una elevado porcentaje de dichos polisacáridos cargados negativamente según la invención aquí descrita, tienen una elevada actividad biológica, y se pueden aplicar como suplemento alimenticio o en alimentos dietéticos, por ejemplo para evitar la adhesión de bacterias, particularmente en la capa mucosa del epitelio gástrico humano. Adicionalmente, dichos polisacáridos cargados negativamente, los extractos vegetales o animales NAG-25 y los extractos ultrafiltrados de *Aloe* que los comprenden, se pueden aplicar para la higiene personal y uso cosmético, para evitar infecciones de microorganismos nocivos y deletéreos, como en higiene dental, p.ej. en pasta de dientes para evitar la gingivitis y caries. Adicionalmente, los polisacáridos cargados y dichos extractos que los comprenden se pueden aplicar probablemente, de forma adecuada, en líquidos, p.ej., para proteger lentes de contacto, en aerosoles y tónicos, y en gotas, cremas y geles para el cuidado de la piel, cabello, ojos y oídos. Finalmente, dichos polisacáridos y dichos extractos que los comprenden están destinados a aplicarse en uso farmacéutico, especialmente como un medicamento o aditivos en una composición farmacéutica, para evitar o curar infecciones con microorganismos infecciosos, como virus, hongos y bacterias, o en la prevención y cicatrización de inflamaciones y, probablemente, en inmunoterapia y cicatrización de heridas. Particularmente, una infección con cuatro de dichas bacterias, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*, se puede combatir mediante estos polisacáridos.

A lo largo de esta solicitud de patente, todos los porcentajes relativos a una composición de interés se refieren a porcentajes en peso. Además, "correspondiente" designa como materia prima la misma especie de vegetal o animal que el extracto resultante. Adicionalmente, a menos que se indique otra cosa, "extracto" designa un extracto en agua.

La infección de estómago por *Helicobacter pylori* es una de las infecciones bacterianas más comunes del mundo. Una minoría de individuos infectados desarrolla una enfermedad gastroduodenal asociada con dicha bacteria. Ejemplos de la misma son el desarrollo de úlcera péptica, gastritis crónica y atrófica, linfomas del tejido linfoide asociado a la mucosa y cáncer gástrico. La adhesión de *Helicobacter pylori* a la mucosa está limitada a la superficie apical de las células de la mucosa epitelial, y a células que recubren las criptas gástricas, particularmente en la zona del fondo del estómago. Se han encontrado diferentes adhesinas que intervienen en esta unión, mediante reconocimiento de proteínas o glicoconjugados específicos, p.ej., mucinas, presentes en la superficie de las células eucariotas (D. Ilver *et al.*, Science 279, 373-377 (1998)). Por tanto, al menos parte de la adhesión de *Helicobacter pylori* parece ser dependiente de glicoconjugados. Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito en ningún sitio la efectividad de un extracto NAG-25 vegetal o animal, por ejemplo un extracto de *Aloe* o un extracto de ultrafiltración de *Aloe* que contenga los polisacáridos cargados negativamente según la invención para combatir una infección por *Helicobacter pylori*.

En una prueba ELISA establecida parecía que, en efecto, los extractos de *Aloe vera* podrían inhibir la adhesión de preparaciones de adhesinas de *Helicobacter pylori* a mucinas salivares. Por tanto, se decidió investigar qué componentes en el extracto eran responsables de la inhibición. Se obtuvieron subfracciones activas de geles de *Aloe vera*, mediante una combinación de precipitación, cribado molecular y cromatografía de intercambio aniónico, y se caracterizaron respecto al peso molecular y la composición de azúcares, y parecían ser nuevas.

La presente invención se ilustra mediante las siguientes figuras con las leyendas:

Figura 1: Elución de la fracción unida de 200 ml AV-15 fracción I (la fracción >5 kD de AV-15 NAG) procedente de la columna de DEAE-Sepharose con un gradiente de NaCl desde NaCl 0-2 M. El eje Y representa la concentración de NaCl (M), así como la absorbancia a 215 nm: el eje X representa el volumen de elución. Cero ml representa el punto de partida del gradiente de NaCl 0,3,0 M, que se aplicó después de la recogida de la fracción AV-D₀ no unida a DEAE, seguido de lavado de la columna con dos volúmenes de columna de agua Milli-Q.

Figura 2: Inhibición de adherencia de mucina a capa S de *Helicobacter pylori* mediante extractos de *Aloe vera* obtenidos de varias fuentes, siendo:

50 muc, testigo positivo que contiene sólo mucina.

AV, incubación simultánea de mucina con un intervalo de dilución de 2-16 veces de extracto de *Aloe vera*

55 AV-3 y AV-4, productos de gel de *Aloe* 1:1; AV-B, AV-D, AV-E y AV-F son fuentes de *Aloe vera* disponibles en el comercio concentradas 40, 10, 5 y 2,5 veces, respectivamente

A_{490nm} valores de absorbancia por pocillo por duplicado, para mucina por cuadruplicado.

60 Figura 3: Inhibición de la subfracción de 100-300 kD de la fracción cargada I-D₁ de un extracto de *Aloe vera* con:

muc, testigo positivo que contiene sólo mucina

65 AV-2, un producto de gel de *Aloe* 1:1 en diferentes concentraciones

A_{490nm} valores de absorbancia por pocillo por duplicado, para mucina por cuadruplicado.

Figura 4: Inhibición de adherencia de *Helicobacter pylori* marcado con FITC a láminas del antro humano mediante subfracciones de extracto de Aloe vera AV-5, siendo:

a. vista normal

b. láminas consecutivas incubadas con *Helicobacter pylori* marcado con FITC y fracción I total

c. láminas consecutivas incubadas con *Helicobacter pylori* marcado con FITC y fracción I-D₀, idénticas con testigos sin subfracciones de *Aloe vera*.

Las siguientes abreviaturas, usadas a lo largo de esta solicitud de patente, tienen el significado:

DEAE = dietil-aminoetil

FITC = 5-isotiocianato de fluoresceína

HPAEC-PAD = cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado, con detección amperométrica pulsada

BCA = ácido bicinconínico

ELISA = prueba de inmunoabsorción enzimática

A_{490nm} = absorbancia a 490 nm

NMR = resonancia magnética nuclear.

Se puede aislar una fracción que se une a DEAE de la fracción I > 5 kD de AV-15 NAG-25 mediante cromatografía en DEAE-Sephrose, DEAE-celulosa y DEAE-Sephacel, bajo elución con NaCl 0,5 o 1 M. Esto se ejemplifica mediante el gradiente de NaCl en la Figura 1, para la elución de la fracción que se une a DEAE de 200 ml, AV-15 fracción I. La adhesión inespecífica a la matriz de polisacárido es improbable, ya que se usa como materia prima para el subfraccionamiento la fracción NAG-25 y no el gel de *Aloe*. Por tanto, la elución dependiente de NaCl confirma que la unión a DEAE se produce mediante una carga negativa sobre las moléculas. Las proteínas o péptido estaban por debajo de los niveles detectables. El análisis de azúcares reveló que el ácido galacturónico está presente en pequeñas cantidades, pero este azúcar parecía estar presente también en la fracción que no se unía, D₀ (resultados no mostrados). Es decir, la naturaleza molecular de la carga negativa no se conoce aún.

Todos los extractos de *Aloe vera* disponibles inhibían la interacción con las mucinas de un modo dependiente de la dosis, cuando se incubaban conjuntamente con una concentración determinada de mucina, véase Figura 2. Las variaciones en la actividad inhibidora reflejan diferencias en composiciones de extractos, en dependencia de la fuente o las condiciones de cultivo de la planta de *Aloe vera*, pero apenas cambian la actividad biológica proporcional de las diversas subfracciones. Aparentemente, un componente o componentes de *Aloe vera* compiten con mucina para la unión a la preparación de adhesina de *Helicobacter pylori*.

La mayoría de la actividad inhibidora de los extractos de *Aloe vera* parece residir en una subfracción, I, con un peso molecular de al menos 5 kD, según su comportamiento en cromatografía sobre Sephadex G-25. Estudios posteriores se enfocaron en esta fracción cargada, debido a su elevada actividad. El análisis de carbohidratos y la cromatografía de permeación analítica sobre una columna HR-200 Superdex, revelaron que los polisacáridos eran los componentes principales. La composición de azúcares depende del extracto de *Aloe vera*, pero cualquier extracto consiste en homo- y heteropolímeros de manosa y glucosa.

El grueso de la actividad inhibidora se podía mantener y eluir específicamente con NaCl desde columnas de intercambio aniónico. Se aplicó cromatografía sobre DEAE-Sephrose para aislar esta fracción polisacárida cargada negativamente, aparentemente, indicada como fracción I-D₁. Se empleó ultrafiltración secuencial para obtener subfracciones con pesos moleculares aparentes >300 kD, 100-300 kD, 50-100 kD y 10-50 kD. Estas subfracciones se prepararon también para los componentes que no se unían a DEAE-Sephrose, indicados como fracción I-D₀. Todas las subfracciones parecen contener 90%, o particularmente 95% o más homo- o heteropolímeros de manosa y glucosa, de los cuales las polimanasas forman los componentes principales, según se resume en la Tabla 1, más adelante. El resto comprende galactosa y diversos azúcares sin identificar (no mostrados en la tabla).

Según se muestra en la Tabla 1, las actividades inhibidoras de las fracciones del extracto de *Aloe vera* que se unen a DEAE, son considerablemente mayores que las de las subfracciones que no se unen. La subfracción de 100-300 kD de I-D₁ expresa la actividad inhibidora mayor (82%), aunque en la prueba por pocillo, es decir 12,5 µl, sólo está presente una pequeña cantidad de polisacárido de *Aloe vera*, nl. 0,325 µg de manosa y 0,045 µg de glucosa. Esto representa aproximadamente 9,3 nM de polisacárido en los 200 µl de volumen final, asumiendo un peso molecular medio de 200 kD. La inhibición es dependiente de la dosis y 50% de la inhibición se alcanza a una concentración 10 veces inferior a aproximadamente 0,03 µg de manosa por pocillo, o aproximadamente 0,9 nM de polisacárido, véase Figura 3. La cantidad muy pequeña de composición de interés recuperada en la fracción >300 kD que se une a DEAE, es también muy activa por pmol de polimansa, cuando se han tenido en cuenta los elevados pesos moleculares. Las otras dos

ES 2 290 350 T3

fracciones que se unen a DEAE muestran una actividad específica mucho más baja, pero aún más alta que en las subfracciones correspondientes de la I-D₀ que no se une a DEAE. Notablemente, no era detectable ninguna actividad inhibidora para los polisacáridos presentes en la fracción I-D₀ con pesos moleculares >300 kD.

TABLA 1

Actividad inhibidora de las subfracciones I-D₀ e I-D₁ sobre la adherencia de H. pylori

Subfracción	Inhibición de la unión de mucina (%)		Composición de azúcares (µg/ml)					
	I-D ₀	I-D ₁	I-D ₀			I-D ₁		
			Man	Glc	Proporción	Man	Glc	Proporción
10-50 kD	27	64	696	266	2,6	132	22	6,0
50-100 kD	17	43	77	7	11	21	4	5
100-300 kD	37	82	20	1,6	12,5	26	3,6	7,2
>300 kD	sin datos	52	9,4	9	1	4,6	1,7	2,7

Se preparan subfracciones de extracto AV-2 de *Aloe vera* (véase Materiales), mediante ultrafiltración secuencial, partiendo de 25 ml de dicho extracto AV-2. El volumen de cada subfracción se ajusta a 12,5 ml. Los datos se basan en valores por duplicado, obtenidos para cantidades iguales (12,5 µl) de cada fracción, y se expresan en relación con la absorbancia medida en los pocillos testigo que contienen sólo mucina. La actividad inhibidora de 12,5 µl del extracto original AV-2 con 813 µg de glucosa/ml y 325 µg de manosa/ml, es decir 286 nM de polisacárido, era 76%.

La inhibición de la unión de *Helicobacter pylori* a la mucosa gástrica se demostró incubando láminas transversales secuenciales de la mucosa del antro humano con *Helicobacter pylori* marcado con FITC, en ausencia y presencia de subfracciones de *Aloe vera*. Como en el estudio de Boren *et al.* Science, 262, 1892-1895 (1993), se observaba unión selectiva de células de *Helicobacter pylori* marcadas con FITC sólo sobre los recubrimientos mucosos del antro, véanse figuras 4A y 4C. La incubación conjunta del *Helicobacter pylori* marcado con FITC con la fracción en peso total I, es decir las fracciones I-D₀ e I-D₁ de un extracto de *Aloe vera*, inhibían fuertemente la adherencia de las bacterias a la mucosa (véase figura 4b), lo cual contrasta fuertemente con la ausencia de inhibición cuando se incubaba conjuntamente con la subfracción I-D₀ sola. Esta es otra indicación convincente de que la actividad inhibidora reside en la fracción cargada negativamente.

Se ha descubierto un patrón de inhibición comparable para *Helicobacter pylori* marcado con Syto-13, en el que Syto-13 es un tinte fluorescente verde, aplicando dos concentraciones diferentes de subfracciones de *Aloe vera* según la invención, sobre placas multipocillos marcadas con MUC5. En un artículo de Van den Brink *et al.*, Gut 46, 601-607 (2000), "*H. pylori* colocalizes with MUC-5AC in the human stomach", se ha descrito que *H. pylori* en el estómago se une a una mucina específica presente en la parte del antro pilórico. Por tanto, el efecto de las subfracciones de *Aloe vera* sobre la mucina salivar similar en un sistema de análisis *in vitro*, se puede usar como modelo para la unión específica de mucina de *H. pylori* al epitelio del estómago.

ES 2 290 350 T3

Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

TABLA 2

Actividad inhibidora de la subfracción I-D₁ de un extracto AV sobre la adherencia de H. Pylori

Expt. 1 MUC-5 (intervalo de dilución)	Fluorescencia (unidades arbitrarias)		Inhibición (%)
	<i>H. pylori</i>	<i>H. pylori + 0,010 ml de fracción I-D₁ de AV-17</i>	
1	4572	2304	50
3	4195	1956	53
9	1904	353	81
27	650	89	86
81	346	129	73

TABLA 3

Actividad inhibidora de la subfracción I-D₁ de un extracto AV sobre la adherencia de H. Pylori

Expt. 2 MUC-5 (intervalo de dilución)	Fluorescencia (unidades arbitrarias)		Inhibición (%)
	<i>H. pylori</i>	<i>H. pylori + 0,025 ml de fracción I-D₁ de AV-17</i>	
1	3308	-38	100
2	3627	59	97
4	2666	32	98
8	1679	58	96
16	1388	65	95
32	968	107	89

De la misma forma, se analizó el efecto de la adherencia de una subfracción de *Aloe vera* según la invención sobre dos cepas de *P. aeruginosa* marcadas con Syto-13 sobre placas multipocillo marcadas con MUC5. La cantidad de bacterias unida a las placas dependía de la cantidad de MUC-5 recubierta. Los resultados se proporcionan en la tabla 4 y tabla 5, respectivamente.

TABLA 4

Actividad inhibidora de la subfracción I-D₁ de un extracto AV sobre la adherencia de *P. aeruginosa*

Enfermedad	MUC-5 (1:50)		MUC-5 (1:100)	
	Unid. arbitrarias	% Inhib.	Unid. arbitrarias	% Inhib.
PA025	19630	0	9800	0
PA025 + AV-16-D ₁	4438	77	1103	89

TABLA 5

Actividad inhibidora de la subfracción I-D₁ de un extracto AV sobre la adherencia de *P. aeruginosa*

Enfermedad	MUC-5 (1:50)		MUC-5 (1:100)	
	Unid. arbitrarias	% Inhib.	Unid. arbitrarias	% Inhib.
PA014	24450	0	6050	0
PA0145 + AV-16-D ₁	9857	60	1103	82

De la misma forma, se analizó el efecto de la adherencia de una subfracción de *Aloe vera* según la invención sobre una cepa de *Streptococcus mutans* marcada con Syto-13 y sobre una cepa de *Streptococcus sanguis* marcada con Syto-13, sobre saliva enriquecida en aglutinina, depositada sobre las placas. La cantidad de bacterias unida a las placas, dependía de la cantidad de MUC-5 depositada. Los resultados se proporcionan en la tabla 6 y la tabla 7, respectivamente.

TABLA 6

Actividad inhibidora de la subfracción I-D₁ de un extracto AV sobre la adherencia de *Streptococcus mutans*

Enfermedad	Conc. de aglutinina		Agglutinina diluida 2x	
	Unid. arbitrarias	% Inhib.	Unid. arbitrarias	% Inhib.
<i>S. mutans</i>	3995	0	1903	0
<i>S. mutans</i> + AV-16-D ₁	947	76	869	55

TABLA 7

Actividad inhibidora de la subfracción I-D₁ de un extracto AV sobre la adherencia de *Streptococcus sanguis*

Enfermedad	Conc. de aglutinina		Aglutinina diluida 2x	
	Unid. arbitrarias	% Inhib.	Unid. arbitrarias	% Inhib.
<i>S. sanguis</i>	24022	0	14216	0
<i>S. sanguis</i> + AV-16-D ₁	9921	59	8240	43

El experto en la técnica apreciará que los polisacáridos antiadhesivos según la invención son antiinfectivos frente a todos los microorganismos que invaden la superficie del tejido hospedador, que están ejemplificados por las bacterias *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces mutans* y *sanguis*, según se mencionó anteriormente. Excepto por la invasión bacteriana, es un fenotipo común a células cancerosas, leucocitos, parásitos, bacterias y virus implicados en la adhesión intercelular, adhesión entre célula y matriz, proteólisis y movilidad. Estas actividades se regulan mediante la comunicación cruzada entre invasores y hospedador. La adhesión de microorganismos a la superficie del tejido del hospedador es, frecuentemente, la primera etapa en la patogénesis. Cada vez más, la población de pacientes se hace más susceptible a la morbilidad y mortalidad asociada con patógenos resistentes a fármacos. La inhibición de la adhesión es, por tanto, una propiedad importante de los nuevos antiinfectivos.

Los polisacáridos según la invención reducen la carga de la biopelícula. Esto se debe a una reducción en la adhesión de bacterias Gram negativas, y probablemente también Gram positivas, a las células. Además, dichos polisacáridos interfieren también con los procesos adhesivos de virus, hongos, flagelados y otros parásitos, y pueden ser parte de una terapia para tratar o evitar afecciones y enfermedades de todo el cuerpo de seres humanos, animales y, posiblemente, plantas. Dichos polisacáridos, que consisten en monosacáridos simples, no se espera que sean tóxicos en aplicaciones orales, tópicas, inyectables, ni sistémicas.

En relación con la aplicación de polisacáridos cargados negativamente, o extractos NAG-25, vegetales o animales que comprenden dichos polisacáridos según la presente invención en forma oral, todas las formas de dosificación adecuadas aplicables, como fluidos inyectables o comprimidos, que comprendan opcionalmente excipientes adecuados, como un producto de celulosa, por ejemplo celulosa o sílice microcristalina o microfina, desintegrantes como por ejemplo almidones modificados, carboxi-metil-celulosa sódica o poli(vinil-pirrolidona) reticulada, opcionalmente lubricantes y, opcionalmente, edulcorantes, como saborizantes y aromas, forman un aspecto de la presente invención. Asimismo, otras formas de dosificación oral como cápsulas o jarabes, opcionalmente junto con excipientes adecuados que comprenden los polisacáridos de la presente invención, forman uno de sus aspectos. Sin embargo, dichas formas de dosificación oral se pueden aplicar también como un medicamento en la prevención o cicatrización de una infección con microorganismos infecciosos, o en la prevención y cicatrización de inflamaciones. Adicionalmente, también las formas de dosificación tópica, como cremas o geles, forman un aspecto de la presente invención, especialmente en el campo de la higiene personal o para uso cosmético.

Ejemplos de afecciones, infecciones y enfermedades que se pueden prevenir y tratar mediante los polisacáridos antiadhesivos de la presente invención son además de aquellas causadas por microorganismos que invaden el tracto gastrointestinal, como el estómago, por ejemplo por *Helicobacter pylori*, aquellas de:

la piel, producidas por

- *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermitis*, que son patógenos comunes, p.ej. en hospitales.

- virus, como el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, virus del *Herpes simplex*.

- hongos, como *Candida* sp., *Blastomyces dermatidis*; la adhesión a la piel también incluye la adhesión a células endoteliales microvasculares.

ES 2 290 350 T3

ojos, producidas por

- *Staphylococcus epidermitis*, que juega un papel importante en la patogénesis de algunas formas de endoftalmitis producida tras la cirugía de cataratas.

- *Moraxella bovis*, como fuente de la queratoconjuntivitis bovina infecciosa.

oídos, nariz y garganta, producidas por

- *Staphylococcus aureus*, que se adhiere a la piel y tejidos mucosos

- Bacterias implicadas en la otitis media y las infecciones nasofaríngeas, como *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis*.

la cavidad oral, en la que la biopelícula de la placa dental juega un papel fundamental en la progresión de las enfermedades dentales y los polisacáridos tienen una gran importancia en la ecología de la biopelícula dental, producidas por

- bacterias implicadas en la caries, como *Streptococcus sobrinus*, como cepa acariogénica, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

- bacterias periodontopatogénicas, como *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella intermedia*

- todas las Spirochetes orales, que se clasifican en el género *Treponema*, como *denticola*, *pectinovorum*, *socranskii* y *vincentii*,

- *Mycoplasma salivarium*

- microorganismos implicados en la poliposis nasal.

- microorganismos implicados en la sinusitis

el tracto urogenital, producidas por

- *Escherichia coli uropathogenic* gram negativa, que se adhiere a los tejidos del tracto urogenital

- *Mycoplasma genitalium*

- *Trichomonas vaginalis*

- especies de *Candida*

- Adhesión de *Neisseria gonorrhoeae* al epitelio oviductal

- *Treponema pallidum*, que está implicada en la perivascularitis, anormalidades de las células endoteliales que son características destacadas de la sífilis y diversas lesiones cutáneas que son las principales características clínicas de la sífilis

- *Escherichia coli*

- especies de *Citrobacter*

el intestino, producidas por

- especies de *Salmonella*, p.ej., *Salmonella typhimurium*

- *Proteus mirabilis*

- especies de *Clostridium*, p.ej., *difficile*, *perfringens*, *bifermentans*

- especies de *Shigella*, p.ej. *flexneri*

- especies de *Mycoplasma*, p.ej. *gallisepticum*

ES 2 290 350 T3

- especies de *Enterococcus*
 - *Bacteroides fragilis*
 - 5 - especies de *Bacillus*
 - *Listeria monocytogenes*
 - virus de la hepatitis A
 - 10 - *Campilobacter jejuni*
 - *Salmonella typhimurium*
 - 15 - *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*
 - *Aeromonas veronii* biovar sobria
 - *Erwinia chrysanthemi*, que es un patógeno vegetal modelo, que tiene el potencial de parasitar hospedadores
 - 20 mamíferos, así como plantas.
- el tracto respiratorio, producidas por
- 25 - *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno facultativo gram-negativo de los bronquios y el pulmón, así como los quistes en pacientes de fibrosis
 - *Klebsiella pneumoniae*
 - 30 - especies de *Bordetella*, *pertussis*, *parapertussis* y *bronquiseptica*
 - bacterias del género *Legionella* que son parásitos intracelulares y patógenos humanos principales.
 - el virus sincitial respiratorio (VRS), que causa potencialmente infección del tracto respiratorio inferior en niños
 - 35 - *Mycoplasma pneumoniae*
 - *Rhinovirus*, que potencia la inducción de cambios proasmáticos
 - 40 - *Cryptococcus neoformans*, que aparece normalmente en los pulmones, y está implicado en interacciones entre levaduras y células epiteliales alveolares
 - especies de *Streptococcus*, como *pyogenes* o *gordonii*
 - 45 - *Escherichia pneumoniae*, un patógeno respiratorio importante
 - el complejo *Burkholderia cepacia*, que consiste en al menos cinco genomovares bacterianos bien documentados, cada uno de los cuales se ha aislado del esputo de diferentes pacientes con fibrosis quística
 - 50 - *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, que es uno de los patógenos respiratorios más importantes de los rumiantes domésticos, y causa graves brotes de neumonía en corderos, terneras y cabras neonatales, destetados y en desarrollo. También es una causa importante de neumonía en animales adultos.
 - virus de la rinotraqueitis, virus de la parainfluenza-3 o virus sincitial respiratorio bovino, que predisponen los
 - 55 animales a infección por *M. haemolytica*
- los órganos, sangre, linfa, vasos sanguíneos y el sistema linfático, producidas por
- 60 - *Staphylococcus aureus* en la endocarditis bacteriana
 - *Streptococcus sanguis* en la endocarditis bacteriana
 - *Staphylococcus epidermidis* en la endocarditis bacteriana
 - 65 - Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, como *S. aureus* y *E. coli* en la infección intravascular

- *Coxsackievirus*

- Rotavirus

5 - *Citomegalovirus murino*

- Adenovirus

- *Neisseria meningitidis*

10

- *Chlamydia pneumoniae*

15

- Bacterias Wolbachia, relacionadas con Rickettsiales Gram-negativas, en personas infectadas por *Onchocerca volvulus*

- La espiroqueta de la enfermedad de Lyme, *Borrelia burgdoferi*

- *Coxiella burnetii*, el productor de la fiebre Q

20

- *Acholeplasma laidlawii*

- La invasión intracelular es un aspecto importante de la enfermedad de Carrion,

25

- La invasión intracelular es un aspecto importante de la enfermedad de Carrion, producida por *Bartonella Bacilliformis*. Tanto la fase hemática como tisular de la enfermedad, implican la unión inicial del organismo a los eritrocitos y células endoteliales

- *Paracoccidioides brasiliensis*, un hongo dimórfico que se sabe que produce la enfermedad sistémica invasiva en seres humanos.

30

Por tanto, según la invención, una composición de interés que comprende polisacáridos cargados negativamente, opcionalmente presentes en un extracto NAG-25 vegetal o animal, o en un extracto ultrafiltrado de *Aloe* según la invención, se puede aplicar de forma efectiva para la prevención y tratamiento de la infección por microorganismos, presumiblemente mediante prevención de la adhesión de dichos microorganismos. Dicha composición o extracto NAG-25 o extracto ultrafiltrado de *Aloe*, se puede aplicar como complemento alimenticio y en alimentos dietéticos, en higiene personal y en uso cosmético y farmacéutico.

40

La presente invención se ejemplificará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no están destinados a considerarse en ningún modo restrictivos del alcance de la invención.

Materiales y Métodos

Materiales

45

Se obtuvieron columnas de poliestireno desechables con volúmenes de lecho máximos de 2 ml, de Pierce, Rockford, Irlanda. Las columnas Sephadex G-25 Fine, DEAE-Sepharose, de desalación de flujo rápido de 5 ml, Superose 200 HJR 10/30 y MonoQ HR 5/5, se adquirieron de Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia. Las unidades de filtración de 10 ml y 50 ml, así como un conjunto de membranas de ultrafiltración se obtuvieron de Amicon Corp., Lexington, EE.UU., y Millipore, Bedford, EE.UU. Las columnas analíticas Carbopac TM MA1 y PA1 (4X250 mm) en combinación con una columna Carbopac TM Aminotrap Guard (10x32 mm) y un sistema HPAEC-PAD, se obtuvieron de Dionex, Sunnydales, CA, EE.UU. Las placas de microvaloración de 96 pocillos de fondo plano y elevada afinidad Fluorotrac 600 se obtuvieron de Greiner, Frickenhausen, Alemania. La mucina salival humana de elevado peso molecular, así como los anticuerpos monoclonales anti-humanos de ratón (MabF2) frente a mucina salival fueron proporcionados amablemente por el Dr. E. Veerman, Department of Oral Biochemistry, ACTA, Amsterdam. La saliva humana enriquecida en aglutinina fue un regalo del Dr. A.J.M. Ligtenbert, Department of Oral Biochemistry, ACTA, Amsterdam. La IgG e IgM anti-ratón de cabra marcadas con peroxidasa de rábano se obtuvieron de American Qualex, San Clemente, CA, EE.UU. El 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC) se obtuvo de Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.

60

El tinte de ácido nucleico verde fluorescente Syto-13 se obtuvo de Molecular Probes (Leiden, Países Bajos) en forma de solución 5 mM en dimetil-sulfóxido. Los azúcares estándar usados para análisis de carbohidratos procedían de fuentes comerciales y eran de tipo analítico.

Extractos de Aloe vera

65

Los extractos de Aloe vera (AV-1 a AV-2, AV-15, AV-16 y AV-A a AV-F) fueron proporcionados por Bioclin B.V. (Delft, Países Bajos) y se originaron de diversas fuentes comerciales. AV-A, AV-3 y AV-4 comprenden extracto de *Aloe vera* y gel en una proporción de 1:1, AV-B y AV-D son concentrados de fuentes comerciales con un factor 40 y 10, respectivamente. El extracto AV-2 contiene 813 y 325 µg de glucosa y manosa, respectivamente. AV-16 se preparó

mediante ultrafiltración de la savia filtrada del producto del filete de gel interior de Aloe vera, según se describió anteriormente, con un método de flujo transversal sobre una membrana de fibra hueca con un límite de 30 kD, seguido por concentración 10 veces. AV-5, AV-6, AV-7 y AV-E se recibieron en forma de polvos liofilizados, AV-F y AV-17, en forma de polvo secado por pulverización.

Todos estos productos eran productos del filete de gel interior de Aloe. Estos filetes de gel se preparaban según se describe en la patente de Canadá N° 1305475. Los procedimientos de liofilización y secado por pulverización son conocidos por los expertos en la técnica; los detalles difieren para las distintas fuentes.

Los extractos y polvos se almacenaron congelados directamente tras la recepción: entre los experimentos, los polvos y extractos que se habían vuelto a solubilizar, se mantenían a 4°C, durante no más de un mes. Los extractos se obtenían de las hojas extraídas de *Aloe barbadensis* Miller. Se añadió directamente una mezcla al 2% de componentes de estabilización, consistente en ácido ascórbico, benzoato sódico, sorbato potásico, tocoferol, alcohol etílico, ácido cítrico y sorbitol, después de la recolección en la plantación. Algunas preparaciones se recibían como polvos liofilizados, que se reconstituían mediante la adición de agua MilliQ hasta el volumen deseado. El Dr R. Zarzycki, Carrington Laboratories Inc (Irving, TX), proporcionó amablemente una preparación bruta de acemanano.

Subfraccionamiento de extractos de Aloe vera

Se centrifugaron durante 45 min a 15.000 x g a 15°C extractos de 50-150 ml de *Aloe vera* y polvos polvos reconstituidos. El glóbulo se desechó y el sobrenadante se filtró sobre una membrana de 0,2 µm. En el análisis, la solución transparente resultante se filtró opcionalmente sobre un volumen de lecho pequeño (1 ml por 5 ml) de Sephadex G-25, para eliminar componentes de *Aloe vera* que tenían afinidad para este material (Fracción III, también indicada como extracto NAG-25 de Aloe vera, véase más adelante). Las fracciones I (peso molecular aparente >± 5 kD) y II (peso molecular aparente <± 5 kD) se prepararon mediante FPLC (Åcta Explorer 10S, Amersham/Pharmacia, Uppsala, Suecia) sobre dos columnas desaladoras acopladas de 5 ml (Pharmacia) que se eluyeron con agua MilliQ a una velocidad de flujo de 5 ml/min; la absorbancia se registró a diversas longitudes de onda entre 190 y 280 nm. Esto se realizó mediante la inyección repetida de volúmenes de 0,5 ml del extracto resultante, y separación y recogida de las dos fracciones, basándose en los cambios de conductividad, empleando el AKTA Explorer 10S. La fracción II se liofilizó y, posteriormente, se solubilizó en agua MilliQ hasta 0,1 del volumen original del extracto, y se almacenó a -20°C hasta su uso. La fracción I se hizo pasar a través de una columna de DEAE-Sepharose (preparada en agua milliQ; volumen de lecho de 10 ml por 50 ml de extracto original) y se lavó con 2 volúmenes de columna de agua miliQ, para recoger las fracciones no retardada (I-D₀) y ligeramente retardada (I-D_w). Los materiales unidos (I-D₁) se eluyeron con 1 volumen de columna de NaCl 0,5 M en agua milliQ. La fracción I-D₀ se concentró hasta 0,1 del volumen original del extracto de Aloe vera mediante ultrafiltración, bajo presión de nitrógeno, a través de una membrana PM10, usando una unidad de filtración de 10 o 50 ml. La fracción I-D₁ se desaló mediante el procedimiento automatizado descrito anteriormente y, posteriormente, se concentró hasta 0,1 del volumen original del extracto de *Aloe vera* mediante ultrafiltración sobre un filtro PM-10. En algunos experimentos, se prepararon subfracciones con pesos moleculares aparentes de >300, 100-300, 50-100 y 10-50 kD a partir de fracciones I-D₀ e I-D₁ mediante ultrafiltración secuencial, respectivamente, sobre XM-300, XM-100, XM-50 y, finalmente, una membrana PM-10. Alternativamente, se prepararon subfracciones comparables mediante FPLC preparativa sobre Superose 200 HR 10/30. Cada subfracción se lavó 3 veces, añadiendo agua MilliQ hasta 10 veces el volumen final obtenido; el primer lavado se añadió a la fracción posterior antes de la filtración sobre el siguiente filtro. Todas las fracciones se almacenaron el alícuotas a -20°C, hasta su uso posterior.

Extracto NAG-25 de Aloe vera

Se solubilizaron 10 gramos de extracto de *Aloe vera* secado por pulverización, originado de 2 litros de extracto de *Aloe vera*, en 200 ml de agua Milli-Q y se hicieron pasar a través de una columna Sephadex G-25 (5 cm de ancho y 10 cm de alto, preparada en agua Milli-Q; velocidad de flujo 7,5 ml/min), para eliminar materiales que tienen afinidad para la matriz de Sephadex G-25 y reducen el contenido de moléculas de peso molecular bajo. La columna se lava posteriormente con agua Milli-Q y el extracto NAG-25 de *Aloe vera* se recoge en forma de eluato de 60-310 ml.

Bacterias y extractos bacterianos

Se cultivó *H. pylori* (ATCC 43504) en condiciones microaerófilas sobre placas DENT de agar sanguíneo, según se describe por F. Namavar et al., Infection Immunity, 66, 444-446 (1998). Se prepararon extractos de *Helicobacter pylori* que contenían las adhesinas de la membrana externa, la denominada capa S, a partir de cultivos bacterianos confluentes de dos o más placas de agar. Las bacterias se pusieron en suspensión en NaCl 0,15 M, se sometieron a movimiento vorticial durante 1 min, y se centrifugaron durante 30 min a 5000 x g. El sobrenadante que contenía el extracto bacteriano se almacenó a -80°C, tras la determinación de la concentración de proteína mediante el análisis de proteína BCA (Pierce, Rockford, EE.UU.). Se prepararon *H. pylori* marcados con FITC incubando bacterias en 1 ml de tampón carbonato 0,2 M (pH 8,9), que contenía 0,1 mg/ml de FITC, durante 15 min en la oscuridad con albúmina (PBST-BSA), las células se pusieron en suspensión en el mismo tampón a una densidad de 0,13-0,20 unidades A_{600 nm}, y se almacenaron en alícuotas de 0,1 ml, hasta su uso.

Se obtuvieron cultivos bacterianos de las cepas PA025 y PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*, del Department of Medical Microbiology, VU Medical Centre y de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*, obtenidas del Department of Oral Biochemistry, ACTA, Amsterdam. En caso de que las bacterias se usasen en análisis de inhibición de

ES 2 290 350 T3

fluorescencia, las bacterias se ponían en suspensión y se diluían en acetato sódico 100 mM (pH 5), que contenía Tween-20 al 0,5%, hasta una absorbancia final de 0,1 a 700 nm. Las bacterias se marcaban con fluorescencia mediante la adición de Syto-13 (1:500 v/v).

Prueba de inhibición de fluorescencia

Se recubrieron placas Fluotrac 600 con un intervalo de dilución de mucina salival (para *H. pylori* y *Pseudomonas aeruginosa*) o saliva humana enriquecida en aglutinina (para *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*) en tampón de recubrimiento (carbonato sódico 0,1 M (pH 9,6)). Las placas se incubaron durante la noche a 4°C y posteriormente se lavaron 4 veces con PBS-Tween-20 al 0,1% (tampón de lavado). Se añadieron bacterias marcadas con Syto-13 (50 µl) a los pocillos, seguido por 50 µl de una dilución de una muestra I-D₁ de *Aloe vera* o agua (testigo positivo). Los pocillos sin recubrir de mucina sirvieron como testigo negativo. Tras la incubación durante 1 h a 37°C, las placas se lavaron con tampón de lavado. La fluorescencia se midió con Fluorstar Galaxy, las longitudes de onda de excitación y emisión eran respectivamente 485 y 520 nm.

Análisis de monosacáridos

Se realizó análisis de monosacáridos mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) sobre una columna TM MAI de Carbopack, tras la hidrólisis de las fracciones durante 4 h en ácido trifluoroacético 2 M a 100°C. La columna se eluyó con NaOH 0,2 M a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min y se calibró con una mezcla de azúcares estándar.

Ejemplo 1

Inhibición de adherencia de *H. pylori* a mucina salival

Se estudió la inhibición de la unión de la adhesina de *H. pylori* a mucina salival mediante extractos o subfracciones de *Aloe vera*, mediante un ELISA establecido (véase F. Navamar *et al.*, indicado anteriormente), en el cual se incubaron por duplicado placas de microvaloración recubiertas con una preparación de capa-S de *Helicobacteri pylori* (100 µl/pocillo; 10-20 µg de proteína/ml; 16 h a 4°C; tampón de lavado PBS (pH 7,5)-Tween-20 al 0,1% (v/v) (PBST)) con mucina salival humana, en presencia y ausencia de intervalos de dilución de extractos o fracciones de *Aloe vera* durante 2 h a 37°C. El volumen total de las mezclas de incubación fue 100 µl, que estaba compuesto por 50 µl de mucina salival (0,2-0,5 µg/ml) y 50 µl de una dilución de una muestra de *Aloe vera*, ambos en acetato sódico 50 mM-NaCl 150 mM-Tween-20 al 0,5% (pH 5,0). El anticuerpo monoclonal F2, reconocía los grupos sulfo-Lewis^a expresados sobre la mucina salival, y los anticuerpos anti-ratón de cabra marcados con peroxidasa, se usaban para la detección de la cantidad de mucina unida después de lavar con PBST, según se describió anteriormente, por ejemplo por E. Veerman *et al.*, Glycobiology 7, 737(1997).

Las muestras se analizaron por duplicado, en un intervalo de dilución de 2 veces. La actividad inhibidora se expresó como la reducción porcentual de A_{490 nm}, relativa a los pocillos testigo que contenían sólo mucina, tras la corrección para el testigo en blanco. Los resultados se proporcionan en las figuras 2 y 3 y en la tabla 1. Según se describió anteriormente, las actividades inhibidoras de las fracciones que se unen a DEAE son mucho mayores que las de las fracciones que no se unen. De esta fracción que se une a DEAE, la subfracción de 100-300 kD expresa la mayor actividad inhibidora (82%).

Ejemplo 2

Inhibición de adherencia de *H. pylori* a la mucosa gástrica

La adherencia de bacterias marcadas con FITC a secciones del antro pilórico gástrico se detectó según Borèn *et al.*, véase más arriba. Se proporcionaron láminas secuenciales de seis µm de antro pilórico gástrico humano, derivadas de tejido normal y de pacientes con tejido metaplásico ligero y moderadamente inflamado, por el Departamento de Patología. Las láminas secuenciales se desparafinaron en xileno (10 min., aclarado 3 veces), seguido de lavado 3 veces durante 5 min. en etanol, rehidratación en agua milliQ que corría lentamente y lavado 3 veces durante 5 minutos en PBS. Se dibujó un círculo en torno a las láminas con un bolígrafo PA03 de PAP (Diganostics BV, Uithoorn, Países Bajos), seguido de incubación con 0,1 ml de PBST-BSA en condiciones húmedas, durante al menos 1 h a 4°C. Finalmente, el tampón se reemplazó por 0,1 ml de bacterias marcadas con FITC más o menos (testigo positivo) un intervalo de dilución del extracto o subfracción AV-5 en PBST-BSA. Las láminas se incubaron durante 1 h en la oscuridad. Las bacterias sin unir se eliminaron mediante lavado 6 veces con PBST-BSA sobre una mesa rotativa. Finalmente, se aplicó PBS en glicerol (1:1 v/v) a las secciones, antes de sellarlas con un vidrio cubreobjetos para microscopía de fluorescencia, usando un microscopio Nikon Eclipse (Uvikon, Bunnik, Países Bajos), con una cámara digital Nikon DxM 1200 y el programa de control de la cámara ACT-1 de Nikon.

Los resultados se proporcionan en la figura 4. Los testigos sin subfracciones de *Aloe vera* eran idénticos a la placa c (no mostrados). Según se describió anteriormente, el peso total de la fracción I de un extracto de *Aloe vera* inhibía fuertemente la adherencia de bacterias a la mucosa (véase figura 4b), mientras que esta inhibición se reducía a casi cero cuando la fracción no cargada sola se incubaba conjuntamente con las bacterias marcadas con FITC.

Ejemplo 3

Inhibición de adherencia de H. pylori sobre placas multipocillo marcadas con MUC5

En la prueba de inhibición de fluorescencia se incuban bacterias vivas, cuyo DNA se ha marcado con el colorante fluorescente Syto-13, en presencia o ausencia de una preparación I-D₁ de *A. vera* en una placa de 96 pocillos recubierta con las diluciones indicadas de mucina salival MUC-5 o saliva enriquecida en aglutinina. En cada pocillo estaba presente la misma cantidad de bacterias marcadas con Syto-13. Por experimento, todos los pocillos contenían la misma cantidad de preparación de *A. vera* en caso de incubación conjunta con bacterias. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

En las tablas 2 y 3 se muestran experimentos típicos. La cantidad de unión de *Helicobacter pylori* vivas a los pocillo era claramente dependiente de la cantidad de MUC-5 recubierta presente en los pocillos. La incubación conjunta con la preparación I-D₁ inhibía la unión de *Helicobacter pylori* a MUC-5 de forma dependiente de la concentración. La inhibición se incrementaba cuando la cantidad de MUC-5 se reducía (Experimento 1) y también cuando se añadía más I-D₁ (Experimento 2). La cantidad de material en 0,01 ml de I-D₁ presente en los pocillos se derivaba de 0,02 g de polvo de AV-17 (correspondiente a 10-20 ml de gel de *A. vera* original).

Ejemplo 4

Inhibición de adherencia de Pseudomonas aeruginosa marcada con Syto-13 sobre placas multipocillo marcadas con MUC-5

Se analizaron los efectos de una preparación I-D₁ de AV-16 sobre dos cepas de *P. aeruginosa*, *P. aeruginosa* PA025 y *P. aeruginosa* PA14. La cantidad de material en 0,01 ml de fracción I-D₁ de AV-16 se derivaba de 2,5 ml de AV-16. La cantidad de bacterias unida a las placas dependía de la cantidad de MUC-5 recubierta. Los resultados se proporcionaron en la tabla 4 y tabla 5, respectivamente. La incubación conjunta con 0,01 ml de I-D₁ de AV-16 producía una fuerte inhibición de la unión de las bacterias. El estudio piloto sugiere que la inhibición es dependiente de la concentración, ya que la inhibición se incrementaba cuando la cantidad de MUC-5 se reducía.

Ejemplo 5

Inhibición de adherencia de S. mutans y S. sanguis marcados con Syto-13 sobre saliva enriquecida en aglutinina recubierta depositada sobre las placas

Se analizaron los efectos de una preparación I-D₁ de AV-16 sobre dos cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*. La cantidad de bacterias unidas a las placas era dependiente de la cantidad de saliva en aglutinina depositada sobre las placas. La incubación conjunta con 0,01 ml de AV-16-D1 producía una fuerte inhibición de la unión de las bacterias. La cantidad de material en 0,01 ml de AV-16-D1 se derivaba de 2,5 ml de *Aloe vera* 16.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de interés en forma aislada, que comprende polisacáridos que se pueden derivarse de *Aloe vera*, con las siguientes características:
 - a) los polisacáridos comprenden 60-100% de D-manosa, 40-0% de D-glucosa y 0-10% de otros monosacáridos
 - b) los polisacáridos están cargados negativamente
 - c) los polisacáridos se unen a una columna cargada positivamente
 - d) el peso molecular promedio es superior a 50 kD.
2. Una composición de interés en forma aislada según la reivindicación 1, que comprende polisacáridos que se pueden derivar de *Aloe vera*, con las siguientes características:
 - a) los polisacáridos comprenden 70-90% de D-manosa, 30-10% de D-glucosa y 0-10% de otros monosacáridos
 - b) los polisacáridos están cargados negativamente
 - c) los polisacáridos se unen a una columna cargada positivamente.
3. Una composición de interés según la reivindicación 1 o 2, en la que dichos polisacáridos tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 100-300 kD.
4. Una composición de interés según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en las que dichos polisacáridos comprenden D-manosa y D-glucosa en una proporción intervalo de aproximadamente 5 a 20.
5. Proceso para preparar una composición de interés según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** por las siguientes etapas:
 - a) subfraccionamiento de un extracto de *Aloe vera* en dos fracciones, una con un peso molecular aparente de $>\pm 5$ kD, denominada subfracción I y una con un peso molecular aparente de $<\pm 5$ kD
 - b) hacer pasar la subfracción I sobre una columna cargada positivamente
 - c) eluir la parte de la subfracción I unida a dicha columna con una solución salina, produciendo la subfracción I-D_I
 - d) desalación y ultrafiltración de I-D_I
 - e) opcionalmente, preparación de subfracciones de I-D_I con pesos moleculares aparentes deseados de > 300 kD, 100-300 kD y 50-100 kD.
6. Proceso según la reivindicación 5, **caracterizado** por la aplicación de una etapa de purificación previa antes de una etapa de proceso sobre una columna Sephadex G-25, para eliminar materiales con afinidad por dicha columna.
7. Proceso según la reivindicación 5 o 6, **caracterizado** por la aplicación de una columna de DEAE-Sephadex o de DEAE-Sepharose, durante la etapa de proceso b.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, **caracterizado** por la aplicación de ultrafiltración secuencial o FPLC preparativa sobre una columna de Superose.
9. Extracto NAG-25 vegetal o animal, que comprende una composición de interés según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
10. Extracto NAG-25 vegetal según la reivindicación 9, siendo la planta *Aloe*.
11. Extracto NAG-25 vegetal según la reivindicación 10, siendo *el Aloe Aloe vera*.
12. Proceso para preparar un extracto NAG-25 vegetal o animal, según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, **caracterizado** por la aplicación de una etapa de purificación de un extracto correspondiente sin tratar, sobre una columna de Sephadex G-25, para eliminar materiales con afinidad por dicha columna.
13. Extracto ultrafiltrado de *Aloe* que comprende una composición de interés según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

ES 2 290 350 T3

14. Proceso para preparar un extracto ultrafiltrado de *Aloe*, según se definió en la reivindicación 13, **caracterizado** por la aplicación de ultrafiltración sobre el extracto de *Aloe* correspondiente.

15. Uso de una composición de interés, elegida entre una o más de las siguientes:

composición de interés según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4; o un extracto NAG-25 vegetal o animal según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, o un extracto ultrafiltrado de *Aloe*, según se definió en la reivindicación 13, como complemento alimenticio o en alimentos dietéticos.

16. Uso de una composición de interés elegida entre una o más de las siguientes:

composición de interés según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3; o un extracto NAG-25 animal, según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, o un extracto ultrafiltrado de *Aloe*, según se definió en la reivindicación 13, en higiene personal o en cosmética.

17. Uso de una composición de interés elegida entre una o más de las siguientes:

composición de interés según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3; o un extracto NAG-25 animal según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, o un extracto ultrafiltrado de *Aloe*, según se definió en la reivindicación 13, en atención farmacéutica.

18. Uso de una composición de interés, según una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, para una o más de las siguientes aplicaciones: como medio antibacteriano, antivírico y antiinflamatorio.

19. Uso de una composición de interés, según la reivindicación 18, para evitar o cicatrizar una infección con uno cualquiera de los microorganismos: bacterias, virus y hongos.

20. Uso de una composición de interés, según la composición 19, para evitar una infección con una o más de las bacterias seleccionadas del grupo formado por *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*.

21. Uso de una composición de interés, según la reivindicación 17, como medicamento en la prevención o cicatrización de una infección con microorganismos infecciosos, o en la prevención y cicatrización de inflamaciones.

22. Forma de dosificación oral en forma de comprimido, cápsula o jarabe, que comprende una composición de interés, elegida entre una o más de las siguientes:

composición de interés según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4; o un extracto NAG-25 animal según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, o un extracto ultrafiltrado de *Aloe*, según se definió en la reivindicación 13 y, opcionalmente, excipientes.

23. Forma de dosificación tópica en forma de crema o gel, que comprende una composición de interés, elegida entre una o más de las siguientes:

composición de interés según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4; o un extracto NAG-25 animal según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, o un extracto ultrafiltrado de *Aloe*, según se definió en la reivindicación 13 y, opcionalmente, excipientes.

24. Forma de dosificación inyectable en forma de un líquido para inyección, que comprende una composición de interés, elegida entre una o más de las siguientes:

composición de interés según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4; o un extracto NAG-25 animal según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, o un extracto ultrafiltrado de *Aloe*, según se definió en la reivindicación 13 y, opcionalmente, excipientes.

25. Uso de una forma de dosificación, según una cualquiera de las reivindicaciones 22-24, para la fabricación de un medicamento para inhibir, prevenir o revertir la adherencia de un microorganismo a una membrana celular, en un organismo vivo.

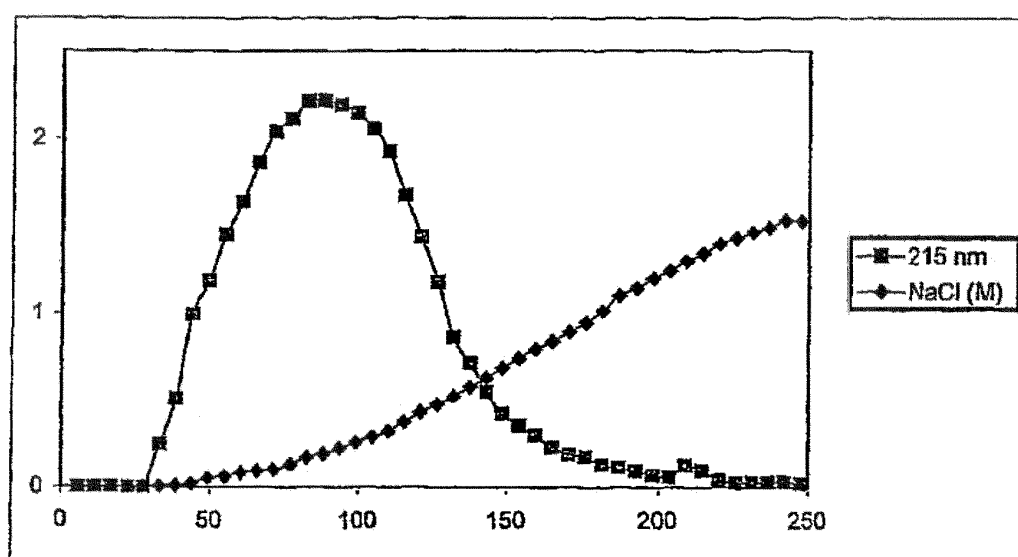


FIG. 1

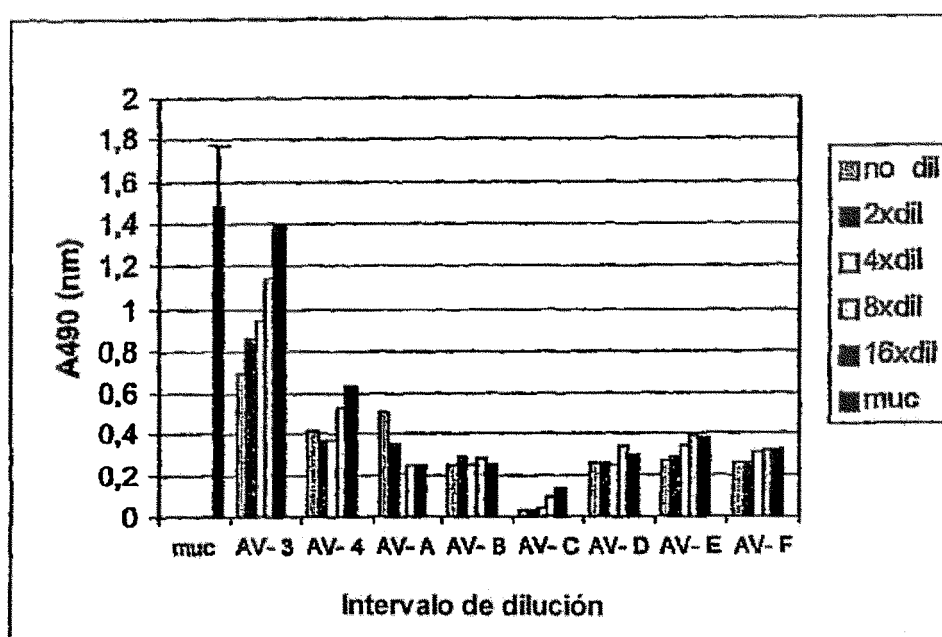


FIG. 2

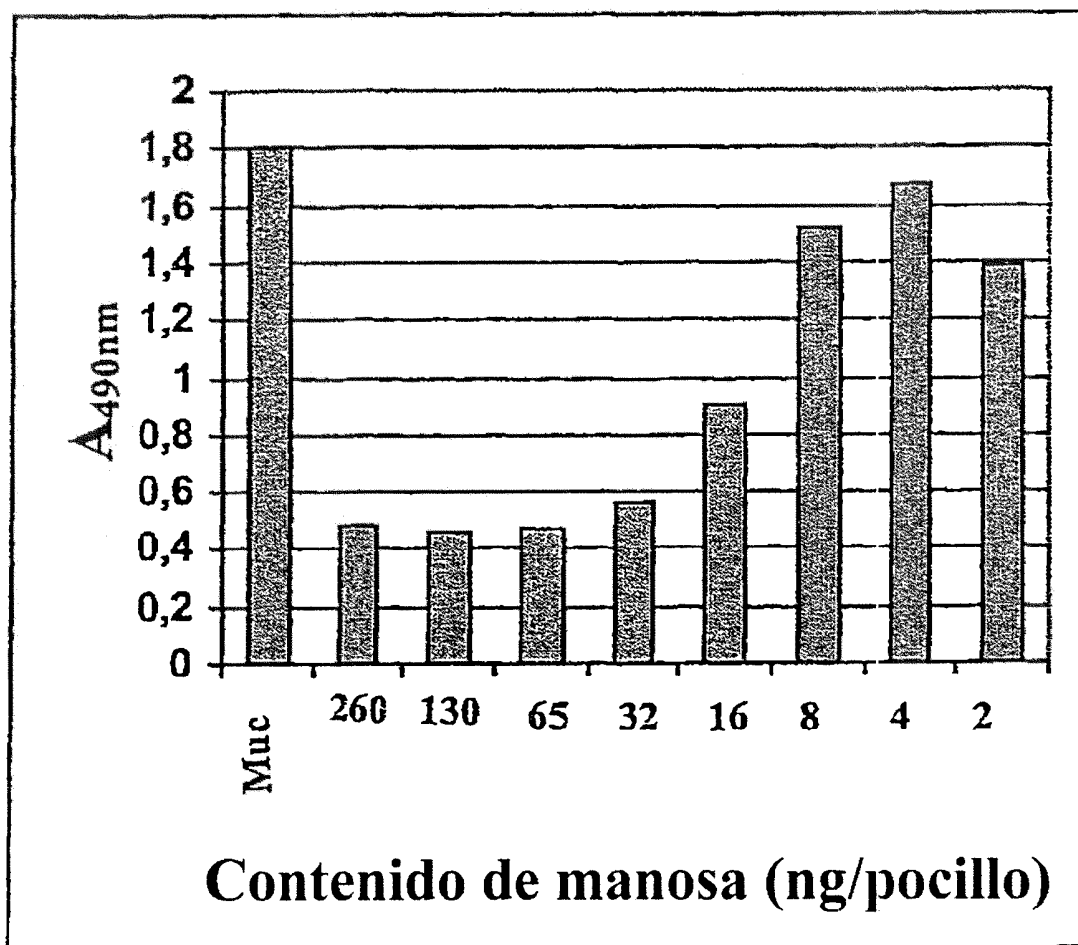


FIG. 3



Adherencia de *H. pylori* a láminas de antro humano (ampliación 200x). a vista normal. b. AV5-I; c. AV5 I-D0

FIG. 4