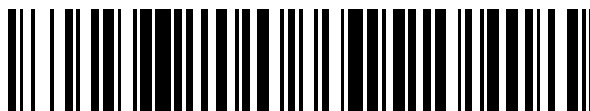


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 340**

51 Int. Cl.:

A61K 36/06 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2010 E 10194022 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2332556**

54 Título: **Levaduras para el tratamiento de úlceras gástricas o intestinales inducidas por agentes gastrotóxicos**

30 Prioridad:

08.12.2009 FR 0958734

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

15.01.2016

73 Titular/es:

**BIOCODEX (100.0%)
7, avenue Gallieni
94250 Gentilly, FR**

72 Inventor/es:

**GIRARD, PHILIPPE;
LE GUERN, MARIE-EMMANUELLE;
VERLEYE, MARC y
HUBLLOT, BERNARD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 556 340 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

Levaduras para el tratamiento de úlceras gástricas o intestinales inducidas por agentes gastrotóxicos

Ámbito de la invención

5 La presente invención se refiere a un medicamento para la prevención o el tratamiento de las úlceras gástricas o intestinales.

Antecedentes técnicos

10 Las úlceras gástricas o intestinales se manifiestan esencialmente por una pérdida de sustancia de un revestimiento epitelial mucoso sin tendencia a la cicatrización espontánea y por una lesión de la pared gástrica o intestinal, en particular, del duodeno. Se considera generalmente que la úlcera gástrica o intestinal, en particular, duodenal, resulta de un desequilibrio entre factores de agresión, tales como las secreciones gástricas ácida y péptica, y factores de defensa, tal como la síntesis de las prostaglandinas, el moco y el epitelio de superficie.

15 Además del *Helicobacter pylori*, la principal fuente de úlceras gastrointestinales es medicamentosa. Así, la aspirina y los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), tal como el ibuprofeno, inhiben, en particular, las ciclooxigenasas, que implican una disminución de la síntesis de las prostaglandinas y la secreción de moco gastrointestinal protector. En consecuencia, la mucosa gastrointestinal se encuentra expuesta a los ataques ácidos de las secreciones gástricas.

20 Se desarrollaron algunos AINE's que presentan una mayor selectividad frente a la ciclooxigenasa de tipo 2 (COX-2), principalmente inflamatoria, con relación COX-1, que forma la clase medicamentosa de los COXIB. No obstante, los estudios clínicos realizados hasta ahora indican que los COXIB presentan también un mayor riesgo creciente de aparición de úlceras gastrointestinales (Yeomans (2002) Journal of Gastroenterology and Hepatology **17**: 488-494), lo que podría ser un reflejo del papel de la COX-2 en la reparación de las lesiones mucosas (Halter et al (2001) Gut **49**: 443-453).

Así, el problema de las úlceras gastrointestinales vinculadas a los AINE's se plantea de manera especialmente aguda para los individuos tratados a largo plazo por estos compuestos, por ejemplo en el marco de la toma en caso de dolores y de inflamaciones articulares.

25 Actualmente, los principales tratamientos utilizados para las úlceras gastrointestinales vinculadas a los AINE's recurren a dos tipos de compuestos (Yeomans (2002); Journal Gastroenterology of Hepatology **17**: 488-494), Florent et al (1990) Acta Endoscopica **20**: 427-439):

- i. inhibidores de secreciones gástricas: inhibidores de la bomba de protón, tal como el omeprazol, o antagonistas de los receptores H2 a la histamina, tales como la cimetidina y la ranitidina;
- 30 ii. estimulantes de la secreción de moco, como las prostaglandinas, y, en particular, el misoprostol (Graham et al (1988) Lancet **2**: 1277-1280).

No obstante, ninguno de estos tratamientos es plenamente satisfactorio.

35 *Saccharomyces boulardii* (Ultra-Levure®) es una cepa particular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este probiótico se indica principalmente como complemento a la rehidratación para el tratamiento de las diarreas. Su utilidad se estableció, en particular, en niños (Villarruel et al (2007) Acta Paediatr **96**: 538-541; Szajewska et al (2007) Alimento Pharmacol Ther **25**: 257-264) y para las diarreas vinculadas a la toma de antibióticos (Surawicz et al (1989) Gastroenterology **96**: 981-988; Kotowska et al (2005) Alimento Pharmacol Ther **21**: 583-590) o a las infecciones a *Clostridium difficile* (Surawicz et al (2000) Clin Infect Dis **31**: 1012-1017).

Resumen de la invención

40 La presente invención se deriva de la puesta en evidencia inesperada, por los inventores, que *Saccharomyces boulardii* permite disminuir el número y la superficie de úlceras gástricas vinculadas al ibuprofeno en ratas.

Así, la presente invención se refiere a células de levadura para su utilización en la prevención o el tratamiento de las úlceras gástricas o intestinales inducidas por un principio activo de medicamento que tiene una actividad gastrotóxica y susceptible de provocar úlceras gástricas o intestinales como efecto secundario.

45 La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que incluye como sustancias activas:

- células de levadura de la especie *Saccharomyces boulardii*, eventualmente liofilizadas, y
- al menos un principio activo de medicamento que tiene una actividad gastrotóxica y susceptible de provocar úlceras gástricas o intestinales como efecto secundario,

eventualmente en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere también, a un estuche que incluye:

- en un primer compartimento células de levadura;
- en un segundo compartimento al menos un principio activo de medicamento que tiene una actividad gastrotóxica y susceptible de provocar úlceras gástricas o intestinales como efecto secundario.

5 En un modo de realización particular, el estuche tal como se define más arriba se utiliza como medicamento o producto con objetivo terapéutico.

Por otra parte, en un modo de realización particular de las células de levadura, la utilización, del método, de la composición farmacéutica o de objetivo terapéuticos, o del estuche, tales como se definen más arriba, ningún compuesto adicional destinado al tratamiento de las úlceras gástricas o intestinales, tal como el omeprazol por ejemplo, se asocia a las células de levadura según la invención.

10

Descripción de las figuras

La figura 1 representa el efecto de *Saccharomyces boulardii* (Sb, vía oral) sobre el número de úlceras (eje de las ordenadas) inducidas por una administración repetida de ibuprofeno (Ibu, vía oral) durante 6 días consecutivos. Sb se da durante 6 días, 1 hora antes del ibuprofeno y se toma nota del número de úlceras el sexto día.

15 La figura 2 representa el efecto de *Saccharomyces boulardii* (Sb, vía oral) sobre la superficie de ulceración (eje de las ordenadas, mm²) inducida por una administración repetida de ibuprofeno (Ibu, vía oral) durante 6 días consecutivos. Sb se da durante 6 días, 1 hora antes del ibuprofeno y se mide la superficie de ulceración el sexto día.

Descripción detallada de la invención

20 Las úlceras gástricas o intestinales según la invención, también denominadas úlceras gastrointestinales, son preferentemente úlceras gástricas o duodenales, también denominadas úlceras gastroduodenales, y más preferentemente úlceras gástricas. Más preferentemente aún, las úlceras gástricas o intestinales según la invención son inducidas por un principio activo que tiene una actividad gastrotóxica.

Tal como se entiende aquí, la expresión “inducidos por un principio activo” es sinónimo de la expresión “consecutivos a la toma de un principio activo”.

25 Como se entiende aquí, la expresión “principio activo que tiene una actividad gastrotóxica” agrupa el conjunto de los principios activos de medicamentos susceptibles de provocar úlceras gástricas o intestinales según la invención, en particular, como efecto secundario. A este respecto, *Helicobacter pylori* no es por supuesto un principio activo que tiene una actividad gastrotóxica en el sentido de la invención.

30 El experto en la técnica sabe perfectamente identificar los medicamentos, y sus principios activos asociados, que presentan efectos secundarios gastrotóxicos. En particular un principio activo que tiene una actividad gastrotóxica según la invención presenta una actividad de inhibición de ciclooxigenasa, en particular, de ciclooxigenasa de tipo 1 (COX-1) y/o de tipo 2 (COX-2).

35 Así pues, el principio activo que tiene una actividad gastrotóxica según la invención es preferentemente un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) o aspirina. Como ejemplo de AINE según la invención se puede, en particular, citar el ibuprofeno. En el sentido de la invención, el término “aspirina” agrupa el ácido acetilsalicílico y el conjunto de sus sales farmacéuticamente aceptables, tal como sus sales de lisina, y, en particular, el acetilsalicilato de DL-lisina.

Preferentemente, el principio activo que tiene una actividad gastrotóxica según la invención se administra en forma de una cápsula dura, de un comprimido o de un sobre.

40 Como se entiende aquí, la expresión “células de levadura” agrupa células de levadura viables o muertas, enteras o en forma de restos. Preferentemente, al menos una parte de las células de levadura según la invención son viables.

La viabilidad de una célula de levadura se define como la capacidad de una célula de levadura para multiplicarse. El número de células viables en una muestra se puede estimar determinando el número de Unidades Formando Colonia (UFC) incluidas en la muestra.

45 A título de ejemplo, el número de UFC de células de levadura de una muestra líquida que incluye levaduras se puede determinar extendiendo un volumen determinado de la muestra sobre un medio sólido, por ejemplo gelosado, que permite el crecimiento de las levaduras y que incuba el medio sólido durante una duración, por ejemplo de 48 h, y a una temperatura, por ejemplo de 30°C, permitiendo el crecimiento de colonias de levaduras. El número de colonias relacionado con el volumen extendido sobre el medio sólido permite determinar el número de UFC incluido en la muestra. Se describe un protocolo detallado de la determinación de UFC conforme a la invención, en particular, en Toothaker & Elmer (1984) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 26: 552-556 en el párrafo “Assay for *S. boulardii*”. Por otra parte, cuando la muestra de levadura se presenta en forma de un sólido, por ejemplo de un polvo liofilizado, se prefiere determinar el número de UFC comprendido en la muestra después de haber retomado una

50

masa determinada de la muestra en una solución acuosa, en particular, de agua destilada o una solución a 0,9% de NaCl a pH 7.

Una "levadura" según la invención es un hongo preferentemente unicelular. Así, las células de levadura según la invención son preferentemente de la clase *Saccharomyces*, más preferentemente de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y más preferentemente aún de la especie *Saccharomyces boulardii*. *Saccharomyces boulardii* es muy conocido por el experto en la técnica y se describe, en particular, en Hennequin et al (2001) a J. Guiño. Microbiol. **39**: 551-559.

De manera especialmente preferida, las células de *Saccharomyces boulardii* según la invención se obtienen a partir de medicamentos de marca UltraLevure® o a partir de los depósitos efectuados en el American Type Culture Collection (ATCC, EE.UU.) bajo la referencia 74012 o a la Colección Nacional de Cultivo y de Microorganismos (CNCM, Francia) bajo la referencia I-745.

Preferentemente, también se liofilizan las células de levadura según la invención.

De manera ventajosa, la viabilidad y la vitalidad de células de levadura obtenidas a partir de liofilizados son superiores a lo que se puede obtener a partir de otro modo de conservación de las células de levadura.

Tal como se entiende aquí, la "liofilización" es un método de conservación en el cual las células de levadura se congelan luego se someten a una sublimación del agua congelada que contienen para dar un liofilizado en forma de un polvo de levadura seca que contiene preferentemente menos de 2% de agua y más preferentemente menos de 1% de agua. Preferentemente, las células de levadura liofilizadas se obtienen a partir de concentrados de células de levadura. Cualquier tipo de método de liofilización de células de levadura conocido por el experto en la técnica se puede utilizar. No obstante, las células de levadura se liofilizan preferentemente según la invención con la ayuda del siguiente método de liofilización:

- cultivar las células de levadura en un medio nutritivo líquido hasta que las células alcancen una fase estacionaria;
- concentrar las células de levadura cultivadas y congelar el concentrado;
- liofilizar el concentrado.

Preferentemente las células de levadura según la invención se administran en forma de cápsulas o sobres.

Preferentemente también, las células de levadura según la invención se administran en una dosis de $0,5 \cdot 10^8$ a $100 \cdot 10^{10}$ UFC/kg/j o a una dosis de 0,00125 g/kg/j 25 g/kg/j.

Como el experto en la técnica comprenderá la cantidad de células de levadura que se deben administrar por unidad de peso (kg) se refiere al peso del individuo al que se destinan las células de levadura. Por otra parte, cuando la cantidad de células de levadura que se deben administrar se expresa en unidad de peso (g), las células de levadura están preferentemente en forma de un liofilizado.

Preferentemente, la composición farmacéutica tal como se define más arriba y el estuche tal como se define más arriba, se utilizan para la prevención o el tratamiento de las úlceras gástricas o intestinales inducidas por el principio activo que contienen.

Por otra parte, como esto aparece claramente al experto en la técnica, cuando el estuche según la invención se utiliza como medicamento, las células de levadura según la invención y el principio activo que tiene una actividad gastrotóxica según la invención se pueden administrar juntos, o bien se pueden administrar de manera separada, es decir, según vías de administración distintas y/o regímenes de administración distintos.

Como ejemplo de estuche según la invención, se pueden citar una caja de medicamento o una placa de medicamento que comprende, por una parte, al menos una composición que comprende células de levadura según la invención, por ejemplo una cápsula dura o un sobre, y, por otra parte, al menos una composición distinta que comprende un principio activo que tiene una actividad gastrotóxica según la invención, por ejemplo una cápsula dura, un comprimido o una sobre.

Ejemplo

Los inventores determinaron el efecto antiulceroso de *Saccharomyces boulardii* en el modelo de la úlcera gástrica inducida por el ibuprofeno en ratas según el protocolo de Abraham et al (2005) Dig Dis Sci **50**: 1632-1640.

1. Material y métodos

1.1. Animales

Ratas machos tipo Wistar de enero de peso comprendido entre 200 y 220 gramos se utilizan después de su

aclimatación de al menos 7 días en el animalario ($t^{\circ} = 22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; higrometría: $50 \pm 20\%$; alimentación SAFE "A04"; ciclo nocturnal: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad).

1.2. Protocolo

5 A J1, la rata recibe el producto estudiado o el disolvente por vía oral. Luego, 1 hora después, la rata recibe el ibuprofeno a 100 mg/kg por vía oral, o el disolvente para el grupo testigo. Las ratas reciben estos tratamientos durante 6 días consecutivos.

Los animales se mantuvieron en ayunas de alimentación durante 14-16 horas antes de la última administración de ibuprofeno, pero no de bebida. Se colocan individualmente en una jaula metálica cuyo suelo es de alambra para evitar la coprofagia.

10 A J6 se sacrifica a la rata. El estómago se extrae entonces, luego se abre según la gran curva, se aclara con NaCl a 0,9%, y se coloca en 10 ml de formalina a 2% para fijar los tejidos.

La evaluación macroscópica de las lesiones gástricas se efectúa del siguiente modo:

- el estómago se extiende sobre un soporte de corcho con alfileres;
- se cuenta el número de úlceras en cada estómago;
- 15 - se mide la superficie ulcerada (mm^2) de las lesiones hemorrágicas con una rejilla de cuadrados ($\times 10$) y un estereomicroscopio (Leica Wild M8) por las medidas de la longitud (mm) y la anchura (mm) de cada ulceración.

1.3. Productos

20 *Saccharomyces boulardii* bajo forma liofilizada (UltraLevure®, Biocodex, Francia, lote 3490) e ibuprofeno (sal de sodio, Ref. 11892 Sigma) se solubilizan en agua destilada.

El lote de *Saccharomyces boulardii* utilizado presenta una viabilidad de 4.10^{10} UFC/g y una cantidad de 1 mg/ml de levadura corresponde a una concentración de 4.10^7 UFC/ml. Los valores de unidades que forman colonias (UFC) recogidos se determinan tal como se indica anteriormente siguiendo el protocolo de Toothaker & Elmer (1984) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 26: 552-556. La determinación de la viabilidad se efectuó con la ayuda de la técnica de recuento sobre placa.

La formalina a 10% se diluye 5 veces (frasco 15 ml, Ref. HT 50-1-1, Sigma).

1.4 estadísticas

30 El ensayo estadístico utilizado es un análisis de variación. Cuando el resultado no depende del azar en un valor umbral de 5%, se efectúa un ensayo de comparación de los grupos tratados con respecto al grupo testigo para determinar los grupos tratados que difieren significativamente del grupo testigo en un valor umbral de 5%.

2. Resultados

Los tratamientos por vía oral de *Saccharomyces boulardii* a 0,3-1,0-3,0 g/kg/j y/o de ibuprofeno a 100 mg/kg/j no modifican la evolución del peso corporal de las ratas con respecto al del grupo sin tratamiento.

35 En el grupo testigo y en los que reciben solamente *Saccharomyces boulardii*, no se observó ninguna úlcera en la mucosa gástrica (Figuras 1 y 2).

Por el contrario, el ibuprofeno a 100 mg/kg/j durante 6 días provocó la aparición de $6,60 \pm 1,06$ úlceras (Figura 1) en la mucosa, para una superficie total de $9,40 \pm 1,72 \text{ mm}^2$ (Figura 2).

40 La coadministración de *Saccharomyces boulardii* a 0,3-1,0-3,0 g/kg/j con el ibuprofeno muestra una disminución dosis-dependiente del número de úlcera y de la superficie de ulceración, con respectivamente, $5,33 \pm 0,92$; $4,32 \pm 1,21$; $2,39 \pm 0,64$ úlceras (Figura 1), y $6,94 \pm 1,41$; $5,10 \pm 1,30$; $2,44 \pm 0,65 \text{ mm}^2$ (Figura 2). A una dosis más alta, *Saccharomyces boulardii* implica una disminución significativa de 64% del número de úlcera y de 74% de la superficie ulcerada.

45 En conclusión, la coadministración de *Saccharomyces boulardii* y de ibuprofeno durante 6 días consecutivos pone de manifiesto que la levadura posee propiedades antiulcerosas en el modelo de la úlcera inducida por el ibuprofeno en ratas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Células de levadura para su utilización en la prevención o el tratamiento de las úlceras gástricas o intestinales inducidas por un principio activo de medicamento que tiene una actividad gastrotóxica y susceptible de provocar úlceras gástricas o intestinales como efecto secundario.
- 5 2.- Células de levadura para su utilización según la reivindicación 1, en la prevención o el tratamiento de las úlceras gástricas o duodenales.
- 3.- Células de levadura para su utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la prevención o el tratamiento de las úlceras gástricas.
- 10 4.- Células de levadura para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, presentando el principio activo una actividad de inhibición de ciclooxigenasa de tipo 1 (COX-1) y/o de tipo 2 (COX-2).
- 5.- Células de levadura para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, siendo las úlceras inducidas por un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) o aspirina.
- 6.- Células de levadura para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, siendo las úlceras inducidas por el ibuprofeno.
- 15 7.- Células de levadura para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, siendo las células de levadura del género de *Saccharomyces*.
- 8.- Células de levadura para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, siendo las células de levadura del genero *Saccharomyces boulardii*.
- 20 9.- Células de levadura para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, siendo las células de levadura liofilizadas.
- 10.- Células de levadura para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, siendo las células de levadura administradas en forma de cápsulas duras o de sobres.
- 11.- Células de levadura para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, siendo las células de levadura administradas en una dosis de $0,5 \cdot 10^8$ a $100 \cdot 10^{10}$ UFC/kg/j.
- 25 12.- Composición farmacéutica que incluye como sustancias activas:
 - células de levadura de la especie *Saccharomyces boulardii*, eventualmente liofilizadas, y
 - al menos un principio activo de medicamento que tiene una actividad gastrotóxico y susceptible de provocar úlceras gástricas o intestinales como efecto secundario,eventualmente en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 13.- Composición farmacéutica según la reivindicación 12, en la cual el principio activo es tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
- 14.- Estuche que incluye:
 - en un primer compartimento células de levadura;
 - en un segundo compartimento al menos un principio activo de medicamento que tiene una actividad gastrotóxica y susceptible de provocar úlceras gástricas o intestinales como efecto secundario.
- 35 15.- Estuche según la reivindicación 14, en el cual las células de levadura son tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
- 16.- Estuche según la reivindicación 14 ó 15, en el cual el principio activo es tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
- 40 17.- Estuche según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, para su utilización como medicamento.

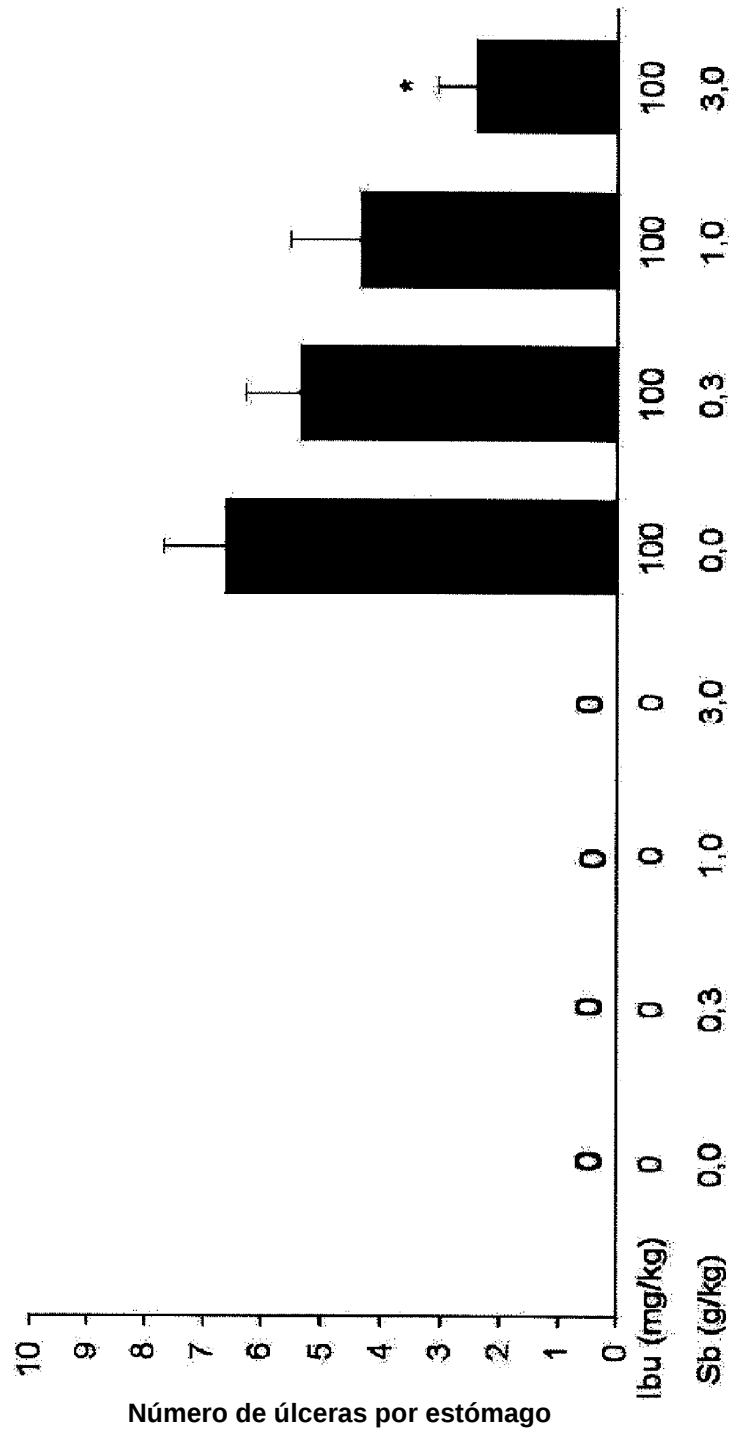


FIG.1

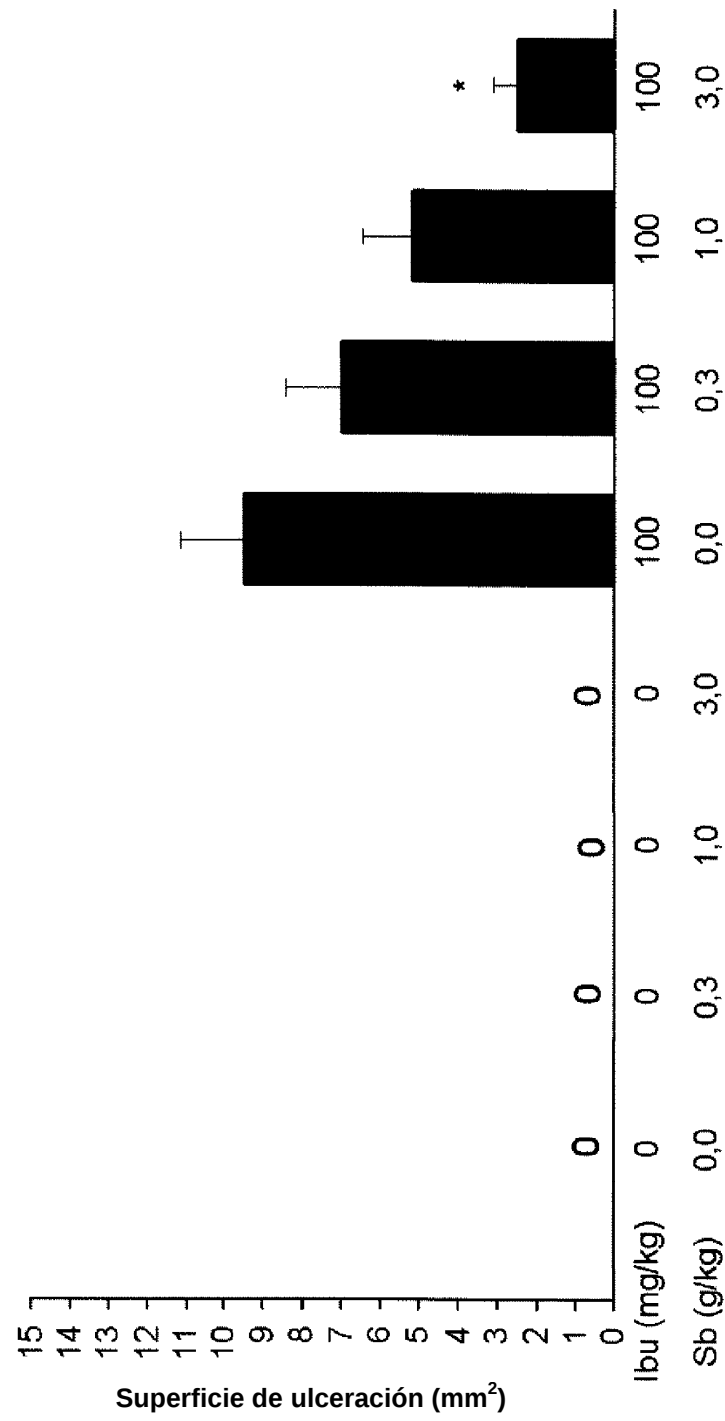


FIG.2