

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 284**

51 Int. Cl.:

A61K 31/593 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 3/02 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A23L 33/155 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/44 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2020 PCT/IB2020/057316**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2021 WO21028772**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2020 E 20761900 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024 EP 4009983**

54 Título: **Colecalciferol para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca**

30 Prioridad:

09.08.2019 IT 201900014550

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.11.2024

73 Titular/es:

**ABIOPEN PHARMA SPA (100.0%)
Via Meucci 36
56121 Ospedaletto (PISA), IT**

72 Inventor/es:

TRASCIATTI, SILVIA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 988 284 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

Colecalciferol para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con el uso de colesteciferol como un agente activo en el tratamiento de la enfermedad celíaca.

Estado de la técnica

La enfermedad celíaca es la enteropatía autoinmune crónica más frecuente en las poblaciones occidentales. Esta patología se desencadena por la ingestión de gluten en sujetos genéticamente predisuestos.

10 El gluten, un complejo proteico de alto peso molecular presente en el endospermo de los granos de los cereales, incluidos trigo, cebada y centeno, se almacena en las semillas para garantizar un suministro estable de nutrientes que favorezca la germinación y desarrollo de las plantas jóvenes. Los cereales a base de gluten, que representan los cultivos más importantes del mundo, se utilizan normalmente para la elaboración de productos alimenticios como pasta, pan y diversos productos de panadería y pastelería. De hecho, las propiedades viscoelásticas y estabilizadoras del gluten han favorecido su uso como aditivo en las operaciones de cocción en hornos industriales; 15 además, el gluten proporciona a los alimentos una mayor palatabilidad, debido a la creación de enlaces disulfuro que, en combinación con el oxígeno y el nitrógeno atmosféricos, alteran las propiedades de la masa.

El gluten es un compuesto de dos clases de proteínas, gluteninas y prolaminas.

La prolamina es la fracción proteica responsable del efecto tóxico para los celíacos.

20 La prolamina del trigo se denomina gliadina y constituye aproximadamente el 50 % del contenido de gluten. Proteínas similares, con el mismo efecto sobre la enfermedad celíaca, se encuentran también en la cebada (hordeína), centeno (secalina), emmer, espelta, kamut, triticale y avena (avenina).

La gliadina resistente a la pepsina-tripsina (PT-G) es el fragmento no digerido de la gliadina que contribuye a la patogénesis de la enfermedad celíaca al alterar las uniones intercelulares estrechas (TJ) y provocar la disminución de la función de barrera intestinal.

25 Incluso cantidades muy pequeñas de gluten pueden causar problemas. Si no se modifican los hábitos alimentarios, las vellosidades intestinales retroceden y la mucosa dañada del intestino delgado ya no es capaz de metabolizar suficientemente los nutrientes, lo que provoca desnutrición.

De hecho, la intolerancia al gluten genera graves daños en la mucosa intestinal, como la atrofia de las vellosidades intestinales.

30 La enfermedad celíaca se manifiesta de formas muy diferentes. A menudo se producen trastornos gastrointestinales, como diarrea, hinchazón abdominal, dolor abdominal, náuseas y vómitos, pero no siempre.

Otros síntomas generales también pueden ser indicadores de una posible enfermedad celíaca. Por ejemplo, pérdida de peso y energía, pérdida de apetito, deficiencia de hierro con anemia, osteoporosis, deseos de embarazo insatisfechos o abortos espontáneos, deficiencia de vitaminas y/o minerales.

35 En los niños, la enfermedad celíaca se desarrolla en los primeros años de vida, a menudo ya después del destete, cuando pasan de la leche materna a alimentos que contienen gluten. Si no se descubre a tiempo, los niños pueden sufrir trastornos del crecimiento y desarrollo. Los niños celíacos suelen tener una constitución delgada, lloran con facilidad y son muy sensibles.

40 Desgraciadamente, todavía no existen terapias farmacológicas capaces de tratar la enfermedad celíaca ni ningún medicamento en el mercado con esta indicación de uso.

45 En la literatura existen algunos estudios preliminares tanto *in vivo* como *in vitro* que describen los posibles efectos positivos sobre la barrera de la mucosa intestinal hacia PT-G por parte del calcitriol, que parece tener una acción protectora contra las TJ (Dong et al. Dig. Dis. Sci. (2018), 63: 92-104). Pero el mismo estudio concluye que se necesitan más investigaciones y estudios clínicos para determinar la utilidad efectiva del calcitriol en el tratamiento de la enfermedad celíaca. La Patente de Estados Unidos US 8 128 971 B1 divulga una composición para el tratamiento de la enfermedad celíaca que comprende L-carnosina, baya de Aronia, vitamina D3, ácido fólico, ARN, ADN, *Pulsitilla* y *Lycopodium Clavatu*, que se postula para estimular el recrecimiento de las vellosidades que entonces serían capaces de absorber más eficientemente los nutrientes. Sin embargo, dicha patente no aporta ninguna evidencia experimental de que la vitamina D3 (colecalciferol) sea un agente activo eficaz para tratar la 50 enfermedad celíaca.

5 En relación con los estudios clínicos, recientemente se ha puesto en marcha en Estados Unidos un estudio clínico de fase II para verificar la posibilidad de utilizar la latiglutenasa, una mezcla de dos proteasas de gluten recombinantes específicas, capaz de degradar el gluten como tratamiento de la enfermedad celíaca en fragmentos más pequeños fisiológicamente irrelevantes. El fármaco, de tipo biológico, se administraría en forma oral y se asociaría a una dieta sin gluten.

La dieta sin gluten, llevada a cabo rigurosamente y durante toda la vida, es, de hecho, y por desgracia, hasta la fecha, todavía la única terapia que garantiza al celíaco un perfecto estado de salud.

Por lo tanto, se siente fuertemente la necesidad de desarrollar fármacos que sean capaces de tratar la enfermedad celíaca, o al menos de contrarrestar los efectos nocivos causados por la misma.

10 El objeto de la presente invención es, por tanto, encontrar un remedio eficaz para el tratamiento de la enfermedad celíaca, que además sea bien tolerado por el organismo.

Resumen de la invención

Este objeto se ha logrado mediante el colecalciferol como un agente activo para uso en el tratamiento terapéutico de la enfermedad celíaca.

15 En otro aspecto, el colecalciferol como un agente activo para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz para la reducción de la atrofia de las vellosidades intestinales.

En otro aspecto, el colecalciferol como agente activo para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz para la protección y regeneración del epitelio intestinal.

20 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica o un complemento alimenticio que comprende colecalciferol como agente activo, y al menos un excipiente adecuado, para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un alimento para celíacos que comprende colecalciferol como un agente activo para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca, y al menos un ingrediente alimentario adecuado.

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones. Cualquier materia que quede fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona únicamente a título informativo. Los métodos de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia, a los que se hace referencia en esta descripción, no forman parte de la presente invención como tal, sino que se describen aquí en relación con compuestos y composiciones farmacéuticas o alimentarias para uso en dichos métodos de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia, de acuerdo con la presente invención.

La invención se refiere al colecalciferol como agente activo para su uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca.

35 El colecalciferol, o vitamina D₃, es el compuesto natural de la vitamina D, de origen animal/humano. Es una prohormona, precursora de las dos formas hidroxiladas [25(OH)D y 1.25(OH)₂D] de la vitamina D y, por lo tanto, necesita someterse a dos procesos naturales de hidroxilación para transformarse en su forma metabólicamente activa.

40 Para los fines de la presente invención, se entiende que el término "colecalciferol" incluye todos los isómeros ópticos, isómeros geométricos y estereoisómeros, así como sus mezclas, tales como mezclas de enantiómeros, mezclas racémicas y mezclas de diastereoisómeros, así como todas sus formas polimórficas, tanto amorfas como cristalinas y cocrystalinas, así como las formas anhidras, hidratadas y solvatadas, sales farmacéuticamente aceptables y mezclas de las mismas.

Como también se desprenderá de los ejemplos siguientes, el colecalciferol ha demostrado ser un agente activo que puede utilizarse en el tratamiento de la enfermedad celíaca.

45 En particular, el colecalciferol ha mostrado una marcada actividad en la reducción de la atrofia de las vellosidades intestinales. Por lo tanto, el colecalciferol puede utilizarse eficazmente como un agente activo para reducir la atrofia de las vellosidades intestinales. Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de colecalciferol como un agente activo para reducir la atrofia de las vellosidades intestinales. De hecho, los ejemplos que se presentan a continuación han demostrado que las vellosidades de los animales tratados con colecalciferol eran más largas que las de los controles celíacos no tratados. Dado que la disminución de la longitud de las vellosidades es un signo de atrofia de las vellosidades y de enteropatía celíaca, puede decirse que los resultados del análisis histomorfológico fueron decididamente positivos, siendo las vellosidades de los animales tratados con colecalciferol más largas que las de los controles celíacos no tratados; 50 además, se demostró que el aumento de la longitud de las vellosidades era proporcional a la dosis de colecalciferol administrada.

- Además, el colecalciferol también ha mostrado una marcada actividad en la protección y regeneración del epitelio intestinal, por lo que el colecalciferol también puede utilizarse eficazmente como agente activo en la protección y regeneración del epitelio intestinal.
- 5
- En algunas realizaciones, la presente invención se relaciona con colecalciferol como agente activo para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca, en donde dicho tratamiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de colecalciferol para la reducción de la atrofia de las vellosidades intestinales.
- 10
- En otras realizaciones, la presente invención se relaciona con colecalciferol como un agente activo para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca, en donde dicho tratamiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de colecalciferol para la protección y regeneración del epitelio intestinal.
- 15
- En otras realizaciones, la presente invención se relaciona con colecalciferol como un agente activo en el tratamiento de la enfermedad celíaca, en donde dicho tratamiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de colecalciferol para la reducción de la atrofia de las vellosidades intestinales y la protección y regeneración del epitelio intestinal.
- Preferiblemente, el colecalciferol se administrará en una dosis de 0.4 µg/kg/día a 11 µg/kg/día, más preferiblemente de 0.8 µg/kg/día a 11 µg/kg/día, y aún más preferiblemente de 4 µg/kg/día a 11 µg/kg/día.
- 20
- En otras palabras, preferiblemente el colecalciferol debe administrarse en una dosis de 16 IU/kg/día a 430 IU/kg/día, más preferiblemente de 30 IU/kg/día a 430 IU/kg/día, y aún más preferiblemente de 160 IU/kg/día a 430 IU/kg/día.
- Preferiblemente, el colecalciferol se administrará por vía oral, inyectable o subcutánea, más preferiblemente por vía oral. A excepción de determinadas condiciones clínicas (por ejemplo, síndromes de malabsorción), es preferible la vía de administración oral, ya que es superior en términos de eficacia para aumentar la 25OHD sérica en comparación con la formulación intramuscular.
- 25
- En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica o un complemento alimenticio, que comprende colecalciferol como un agente activo, y al menos un excipiente adecuado, para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca.
- 30
- En algunas realizaciones, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica o un complemento alimenticio, que comprende colecalciferol como un agente activo, y al menos un excipiente adecuado, para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca, en donde dicho tratamiento comprende la administración de una composición farmacéutica o un complemento alimenticio que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de colecalciferol para la reducción de la atrofia de las vellosidades intestinales.
- 35
- En otras realizaciones, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica o un complemento alimenticio, que comprende colecalciferol como un agente activo, y al menos un excipiente adecuado, para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca, en donde dicho tratamiento comprende la administración de una composición farmacéutica o un complemento alimenticio que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de colecalciferol para la protección y regeneración del epitelio intestinal.
- 40
- En otras realizaciones, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica o un complemento alimenticio, que comprende colecalciferol como un agente activo, y al menos un excipiente adecuado, para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca, en donde dicho tratamiento comprende la administración de una composición farmacéutica o un complemento alimenticio que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de colecalciferol para la reducción de la atrofia de las vellosidades intestinales y la protección y regeneración del epitelio intestinal.
- 45
- Dicha composición farmacéutica o complemento dietético puede ventajosamente comprender también al menos un probiótico.
- La composición farmacéutica, así como el complemento alimenticio de la invención, pueden administrarse por vía oral, inyectable o subcutánea.
- En una realización preferida, dicha composición farmacéutica o complemento dietético debe administrarse por vía oral.
- 50
- Cuando la composición farmacéutica o complemento dietético va a administrarse por vía oral, se presenta preferentemente en forma de un preparado sólido bucodispersable, gel, cápsula, comprimido, polvo, granulado, solución, suspensión, emulsión o tintura.
- La composición farmacéutica o complemento alimenticio de la invención para administrar por vía oral en forma de preparado sólido bucodispersable, gel, cápsula, comprimido, polvo, granulado, solución, suspensión, emulsión o

tintura, se administra preferentemente en una dosis tal que proporcione de 0.4 µg/kg/día a 11 µg/kg/día de colecalciferol, preferentemente de 0.8 µg/kg/día a 11 µg/kg/día, aún más preferentemente de 4 µg/kg/día a 11 µg/kg/día.

5 En otras palabras, dicha composición farmacéutica o complemento alimenticio de la invención para administrar por vía oral en la forma de un preparado sólido bucodispersable, gel, cápsula, comprimido, polvo, granulado, solución, suspensión, emulsión o tintura, se administra preferentemente en una dosis tal que proporcione de 16 IU/kg/día a 430 IU/kg/día de colecalciferol, preferentemente de 30 IU/kg/día a 430 IU/kg/día, aún más preferentemente de 160 IU/kg/día a 430 IU/kg/día.

10 En realizaciones preferidas, la composición farmacéutica o complemento alimenticio de la invención para administrar por vía oral, en la forma de una solución, suspensión, emulsión, gel o tintura, comprende colecalciferol en una concentración de 10,000 IU/ml a 20,000 IU/ml.

Dicha composición farmacéutica o complemento alimenticio de la invención puede presentarse ventajosamente en la forma de una dosis unitaria.

15 Dicha composición farmacéutica o complemento alimenticio de la invención, también en la forma de una dosis unitaria, comprende además al menos un excipiente adecuado. El término "excipiente" designa un compuesto o una mezcla de compuestos aptos para uso farmacéutico o alimentario, respectivamente. Por ejemplo, un excipiente para uso en una formulación farmacéutica o alimentaria generalmente no debe causar una respuesta adversa en un sujeto, ni debe inhibir significativamente la eficacia del colecalciferol contenido en ella.

20 Los excipientes adecuados son acidulantes, reguladores de la acidez, agentes antiaglomerantes, antioxidantes, agentes de carga, agentes reforzantes, agentes gelificantes, agentes de recubrimiento, almidones modificados, secuestrantes, espesantes, edulcorantes, diluyentes, desagregantes, deslizantes, colorantes, aglomerantes, lubricantes, estabilizantes, adsorbentes, humectantes, saborizantes, sustancias formadoras de película, emulsionantes, agentes humectantes, retardantes de liberación y mezclas de los mismos.

25 Preferentemente, dichos excipientes son aceite de oliva, aceite mineral, parafina líquida, vaselina blanca, polioxietileno, cera emulsionante, alcohol estearílico, alcohol isostearílico, alcohol cetilestearílico, ácido esteárico, estearato de glicerilo, lauril sarcosinato de sodio, glicerina, éter de dietilenglicolmonoetilo, polietilenglicoles, estearatos de polietilenglicol, carbopol, carbómeros, Poloxamer 407, Macrogol 400, bentonita purificada, propionato de miristilo, dimeticona, dióxido de titanio, tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos, agua, sorbato potásico, benzoato sódico, ε-polisina, sucralosa, maltodextrina, ácido cítrico, carbonato sódico, carbonato cálcico, carbonato magnésico, estearato magnésico, almidón natural, almidón parcialmente hidrolizado, almidón modificado, lactosa, fosfato cálcico, carbonato cálcico, sulfato cálcico, polivinilpirrolidona, sílice, sílice coloidal, sílice precipitada, silicatos de magnesio, silicatos de aluminio, laurilsulfato sódico, laurilsulfato magnésico, copolímeros de metacrilato, deshidoacetato sódico, goma xantana, goma guar, goma tara, goma de algarrobo, goma de fenogreco, goma arábica, ácido alginico, alginato sódico, alginato de propilenglicol, croscarmelosa sódica, polivinilpolipirrolidona, behenato de glicerilo, carmín de índigo, celulosa, celulosa modificada, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica, celulosa microcristalina, etilcelulosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polidextrosa, carragenano, metilcelulosa, sacarosa, ésteres de goma de sacarosa, sorbitol, xilitol, dextrosa, fructosa, maltitol, goma tragacanto, pectina, agar, carboxipolimetileno, hidroxipropilmetilcelulosa, tragacanto, manitol, o una mezcla de los mismos.

40 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica o el complemento alimenticio de la invención consiste esencialmente en colecalciferol como un agente activo y al menos un excipiente adecuado. La expresión "consiste esencialmente en" significa que el colecalciferol es el único ingrediente activo en el tratamiento de la enfermedad celíaca que está presente en la composición o complemento, mientras que cualquier componente adicional, como dicho al menos un probiótico, o excipientes no interfieren con su acción. Debe entenderse que todos los aspectos identificados anteriormente como preferidos y ventajosos para el uso de colecalciferol, la composición o el complemento alimenticio, deben considerarse igualmente preferidos y ventajosos también para estas realizaciones.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica o complemento alimenticio de la invención consiste en colecalciferol como un agente activo, al menos un excipiente adecuado y, opcionalmente, al menos un probiótico.

50 En otra realización preferida de la presente invención, dicha composición es un alimento para celíacos que comprende colecalciferol como un agente activo para el uso descrito anteriormente, y al menos un ingrediente alimentario adecuado.

55 Se ha comprobado sorprendentemente que la presencia de colecalciferol permite a los celíacos alimentarse, sin recurrir necesariamente a productos sin gluten. Por lo tanto, ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, el término "alimento para celíacos" significa cualquier producto comestible, con o sin gluten, destinado tanto a la alimentación humana como animal, incluyendo productos de panadería, bebidas alcohólicas, bebidas no alcohólicas, barritas energéticas, dietéticas, condimentos, los llamados "cereales de desayuno", pasta fresca, pasta seca, leche y sus derivados (como yogur y helados), zumos de frutas, dulces, así como pienso animal.

Preferentemente, dicho alimento para celíacos es un producto horneado, como pasta, pan, refrigerio dulce, refrigerio salado, galleta, palitos de pan, galleta salada, postre, tarta salada, y en general cualquier tipo de masa cocida que contenga harina, con o sin gluten, más preferentemente sin gluten. Preferentemente, dicho alimento para celíacos contiene colecalciferol en una cantidad de 200 a 2,000 IU por ración.

5 En realizaciones preferidas, cuando dicho alimento para celíacos es un producto horneado, contiene colecalciferol en una cantidad de 1 a 5 IU/g.

Dichos alimentos para celíacos pueden consumirse con el objetivo de contribuir a la reducción de la atrofia de las vellosidades intestinales y a la protección y regeneración de las mismas.

10 Dicho alimento para celíacos puede ventajosamente comprender también al menos un probiótico, como se ha descrito anteriormente.

Todas las composiciones farmacéuticas o complementos alimenticios o alimentos para celíacos descritos anteriormente pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica.

15 Debe entenderse que también se describen todas las combinaciones posibles de los aspectos preferidos del colecalciferol, de los productos que lo contienen y de los usos respectivos, como se ha indicado anteriormente, y por lo tanto igualmente preferidos.

También debe entenderse que todos los aspectos identificados como preferidos y ventajosos para el colecalciferol y sus productos deben considerarse igualmente preferidos y ventajosos también para su preparación y usos.

La eficacia del colecalciferol como un agente activo en el tratamiento de la enfermedad celíaca también quedará clara en los ejemplos que se dan a continuación.

20 Sin querer atarse a ninguna teoría, se cree que el colecalciferol es beneficioso en el contexto del tratamiento de la enfermedad celíaca también porque puede influir en el perfil de la microbiota intestinal a través de la regulación de péptidos antimicrobianos que, a su vez, regulan la comunidad microbiana intestinal, asegurando la homeostasis de cepas bacterianas beneficiosas. Esta acción estaría mediada, a nivel molecular, por el receptor de la vitamina D (VDR).

25 Además, el colecalciferol se almacena normalmente en el tejido adiposo, donde crea depósitos de los que se libera lentamente. Precisamente por esta razón, tiene una vida media sanguínea bastante corta ($T_{1/2}$ estimada en 19-25 horas), mientras que su vida media funcional (varias semanas) es mucho más larga (relacionada con la liberación lenta). La elevada vida media funcional (liberación lenta por el tejido adiposo) hace del colecalciferol un agente activo extremadamente flexible y adaptable en la práctica clínica, permitiendo incluso regímenes de administración intermitentes.

30 A continuación, se presentan ejemplos prácticos de la presente invención con fines ilustrativos y no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Evaluación de la eficacia de la administración oral repetida de colecalciferol en un modelo de enfermedad celíaca *en dos* ratones (ratones NOD)

35 Para el estudio, se eligió el ratón NOD (No Obeso Diabético) como un modelo experimental que, cuando es alimentado con una dieta estándar que contiene gluten, es capaz de desarrollar espontáneamente enteropatía y trastornos autoinmunes, con alteraciones del intestino delgado similares a las observadas en la enfermedad celíaca humana.

40 A continuación, se colocaron 103 ratones NOD hembra de cuatro semanas de edad en dos recintos diferentes (uno para ratones destinados a seguir una dieta estándar y otro para ratones destinados a seguir una dieta sin gluten) y se les permitió aclimatarse durante un período de al menos siete días.

A continuación, fueron asignados aleatoriamente a siete grupos experimentales diferentes. El desarrollo de la enteropatía se consiguió alimentando a ratones NOD con una dieta estándar que contenía gluten y administrándoles gliadina por vía oral con una dosis de 10 µg/kg durante diez días consecutivos.

45 Los siete grupos experimentales se representan en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

No. de grupo	No. de individuos por grupo	Tipo de dieta administrada	Fenotipo	Gliadina	Tipo de tratamiento	Dosificación y vía de administración	Posología y duración de tratamiento
--------------	-----------------------------	----------------------------	----------	----------	---------------------	--------------------------------------	-------------------------------------

1	13	Sin gluten	saludable	no	Vehículo (aceite de oliva)	10 ml/kg por vía oral	Una vez al día por 12 semanas
2	13	estándar	celíaco	5 µg/kg por vía oral por 10 días consecutivos	vehículo (aceite de oliva)	10 ml/kg por vía oral	Una vez al día por 12 semanas
3	15	estándar	celíaco	5 µg/kg por vía oral por 10 días consecutivos	colecalfiferol	5 µg/kg/día por vía oral (200 IU/kg/día)	Una vez al día por 12 semanas
4	15	estándar	celíaco	5 µg/kg por vía oral por 10 días consecutivos	colecalfiferol	10 µg/kg/día por vía oral (400 IU/kg/día)	Una vez al día por 12 semanas
5	16	estándar	celíaco	5 µg/kg por vía oral por 10 días consecutivos	colecalfiferol	20 µg/kg/día por vía oral (800 IU/kg/día)	Una vez al día por 12 semanas
6	16	estándar	celíaco	5 µg/kg por vía oral por 10 días consecutivos	colecalfiferol	50 µg/kg/día por vía oral (2000 IU/kg/día)	Una vez al día por 12 semanas
7	15	estándar	celíaco	5 µg/kg por vía oral por 10 días consecutivos	colecalfiferol	130 µg/kg/día por vía oral (5200IU/kg/día)	Una vez al día por 12 semanas

Al final del periodo de tratamiento, los ratones fueron sacrificados. Se realizó un examen macroscópico y se extrajo el intestino delgado de cada ratón para someterlo a exámenes microscópicos.

5 En particular, se llevaron a cabo exámenes histopatológicos e histomorfométricos en secciones de intestino con un grosor de 5-7 µm colocadas en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina.

Se utilizó el sistema de puntuación descrito en Marsh et al, Gut 1990 Jan; 31 (1): 111-4, para permitir la comparación entre grupos con diferentes grados de infiltración inflamatoria y tipo de lesiones observadas bajo el microscopio, lo que permite la siguiente clasificación:

- lesión tipo 0: mucosa intestinal normal;

10 - lesión tipo 1 (infiltrativa): morfología y arquitectura normales de las vellosidades, mayor número de linfocitos intraepiteliales;

- lesión tipo 2 (hiperplásica): morfología y arquitectura normales de las vellosidades, mayor número de linfocitos intraepiteliales, hiperplasia de los elementos glandulares;

15 - lesión tipo 3 (infiltrativa): diferentes grados de atrofia de las vellosidades con hipertrofia de las criptas glandulares, enterocitos superficiales de altura reducida, mayor número de linfocitos intraepiteliales.

A continuación, se llevaron a cabo quince mediciones histomorfométricas de la altura de las vellosidades de cada una de las cinco secciones de intestino delgado evaluadas para cada ratón.

20 Los resultados de la evaluación histopatológica microscópica se resumen en la siguiente tabla 2, que contiene los cuatro grados de lesión descritos anteriormente y el número de animales de cada grupo que presentan los distintos tipos de lesiones.

Tabla 2

	Lesión tipo 0	Lesión tipo 1	Lesión tipo 2	Lesión tipo 3
Control (n=13)	7	5	1	0
Patología de control (n=13)	0	1	7	5
Colecalciferol 5µg/kg (n=15)	0	2	13	0
Colecalciferol 10 µg/kg (n=15)	0	9	4	2
Colecalciferol 20 µg/kg (n=16)	0	7	4	5
Colecalciferol 50 µg/kg (n=16)	3	3	9	1
Colecalciferol 130 µg/kg (n=15)	3	3	6	3

La representación histológica más grave para el intestino delgado se observó en el grupo de celíacos no tratados, en donde 5 de 13 animales mostraron lesiones de la mayor extensión.

5 Por otra parte, a todas las dosis probadas de colecalciferol, se observó una mejora global en la representación general de las lesiones en los ratones tratados en comparación con los ratones celíacos no tratados. Esta representación mejoró significativamente cuando el tratamiento se llevó a cabo con las dosis más altas de colecalciferol, es decir, cuando los ratones fueron tratados con administraciones repetidas de 50 y 130 µg/kg de colecalciferol.

10 Los resultados de la evaluación microscópica histomorfométrica de la longitud de las vellosidades se muestran en la siguiente tabla 3.

Tabla 3

	Longitud de vellosidades (x10µm)
Control (n=13)	78.0
Patología de control (n=13)	61.3
Colecalciferol 5µg/kg (n=15)	65.7
Colecalciferol 10 µg/kg (n=15)	71.2
Colecalciferol 20 µg/kg (n=16)	76.1
Colecalciferol 50 µg/kg (n=16)	75.0
Colecalciferol 130 µg/kg (n=15)	78.8

Como es evidente de los datos indicados en la Tabla 3 anterior, las vellosidades de los animales tratados con colecalciferol resultaron ser más largas que las de los controles celíacos no tratados.

15 Dado que la disminución de la longitud de las vellosidades es un signo de atrofia de las vellosidades y de enteropatía celíaca, puede decirse que los resultados del análisis histomorfométrico fueron decididamente positivos, con las vellosidades de los animales tratados con colecalciferol más largas que las de los controles celíacos no tratados, y con una longitud que resultó ser tanto mayor cuanto mayores eran las dosis de colecalciferol administradas, mostrando así una relación dependiente de dosis entre el aumento de la longitud de las vellosidades y la dosis de colecalciferol administrada.

20

Ejemplo 2: Análisis de la expresión de algunas proteínas en la mucosa del intestino delgado de ratones NOD mediante inmunohistoquímica (IHC)

- 5 Se tomaron muestras de intestino delgado de ratones pertenecientes a los grupos experimentales 2 (control de patología) y 7 (colecalfiferol 130 µg/kg) del experimento descrito en el Ejemplo 1 y se procesaron para evaluar por inmunohistoquímica la expresión de tres proteínas: el receptor de la vitamina D (VDR), el marcador de células T (CD3) que indica infiltración linfocitaria y la proteína de Zonula Occludens 1 o Zonulin-1 (ZO-1) que suele liberarse en suero y tejidos tras la destrucción de la barrera epitelial intestinal, en particular de las uniones estrechas intercelulares (TJ).
- 10 Las muestras se lavaron en xileno, se hidrataron y se lavaron en agua con soluciones de etanol y agua a escala. La recuperación del antígeno se llevó a cabo en regulador de citrato de sodio utilizando el protocolo estándar de "olla a presión". Una vez finalizada la recuperación del antígeno, las muestras se colocaron a temperatura ambiente durante 10 'y se lavaron dos veces durante 2' en PBS tween (regulador fosfato salino con tween). Los sitios no específicos se bloquearon con 200 µl de bloque inicial T20.
- 15 A continuación, se dispensaron en cada portaobjetos, o bien 200 µl de solución que contenía el anticuerpo primario de interés, o bien 200 µl del control negativo respectivo. A continuación, los portaobjetos se dejaron incubar durante toda la noche en una cámara húmeda con PBS a 4 ° C.
- Tras la incubación, se llevaron a cabo lavados repetidos en regulador de lavado a temperatura ambiente, tras lo cual se bloqueó la peroxidasa endógena con un regulador de peróxido de hidrógeno al 0.3 %.
- Posteriormente, se volvieron a llevar a cabo lavados repetidos en regulador de lavado a temperatura ambiente y se añadió el anticuerpo secundario, que se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 20 A continuación, se volvieron a llevar a cabo lavados repetidos en regulador de lavado a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió la solución DAB (3',3'-diaminobencidina), que se bloqueó mediante lavado a temperatura ambiente.
- Por último, se llevó a cabo una contratinción con hematoxilina de Meyer y se detuvo la reacción lavando en agua.
- A continuación, los portaobjetos se montaron con dos gotas de medio de montaje acuoso y se dejaron secar.
- La atrofia de la mucosa intestinal se evaluó de acuerdo con la clasificación de Corazza-Villanacci.
- 25 Se evaluó el marcado de anticuerpos en vellosidades, criptas y células caliciformes.
- Resultados
- VDR
- Se detectó una reducción de la atrofia en las vellosidades del grupo de animales tratados con colecalfiferol en comparación con el control tratado con vehículo.
- 30 Las vellosidades estaban más marcadas, por lo tanto con una mayor expresión de VDR, en el grupo tratado con colecalfiferol y el mismo fenómeno se observó en las criptas. En cuanto a las células caliciformes, el grupo tratado con el activo mostró un menor número de células marcadas, aunque con una mayor intensidad de marcaje.
- CD3
- 35 Esta proteína estaba menos expresada en el grupo tratado con colecalfiferol, mientras que las vellosidades y criptas del mismo grupo no estaban marcadas. Esto significa que no había infiltrado de células linfocitarias intraepiteliales, lo que indica una menor respuesta inmunitaria, que subyace a la patogénesis de la enfermedad celíaca.
- Las células caliciformes del grupo tratado con el activo también mostraron una reducción de la señal en comparación con el control y también una reducción de la intensidad del marcado.
- 40 ZO-1
- La atrofia de las vellosidades fue menos marcada en el grupo tratado con colecalfiferol.
- Las vellosidades y criptas estaban más marcadas en el grupo tratado con el vehículo.
- Ejemplo 3: Composición farmacéutica que comprende colecalfiferol para uso oral en forma de una solución
- 45 Para elaborar composiciones farmacéuticas en la forma de una solución para uso oral, se mezcló el colecalfiferol con excipientes adecuados.
- Las composiciones elaboradas contenían una dosificación unitaria de aproximadamente 50,000 IU y 25,000 IU por frasco.

ES 2 988 284 T3

Las cantidades de excipientes contenidas en cada frasco se indican en las siguientes tablas 4a y 4b, respectivamente.

Tabla 4a

Componente	Cantidad unitaria
Colecalciferol	50,000 UI
Aceite de oliva refinado	Equilibrio de volumen a 2.5 ml

5

Tabla 4b

Componente	Cantidad unitaria
Colecalciferol	25,000 UI
Aceite de oliva refinado	Equilibrio de volumen a 2.5 ml

Después de haber introducido el aceite de oliva refinado en un tanque de disolución calentado a $40^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (comprobando que la temperatura nunca superaba los 45°C), se añadió colecalciferol bajo nitrógeno, agitando hasta la disolución completa (al menos 60 minutos). A continuación, la mezcla se enfrió a aproximadamente $27^{\circ}\text{C} (\pm 3^{\circ}\text{C})$ y se filtró bajo nitrógeno a la presión máxima de 0.8 atm en el tanque.

10

Finalmente, la solución filtrada se dosificó automáticamente en el interior de frascos tipo III de color ámbar y se selló en su interior.

Ejemplo 4: Composiciones farmacéuticas que comprenden colecalciferol para uso oral en forma de cápsula de gelatina dura

15 Para elaborar una composición farmacéutica en la forma de una cápsula dura para uso oral, se mezcló colecalciferol con excipientes adecuados.

Las composiciones elaboradas contenían una dosificación unitaria de aproximadamente 50,000 IU y 25,000 IU por cápsula.

20 Las cantidades de excipientes contenidas en cada cápsula se indican en las siguientes tablas 5a y 5b, respectivamente.

Tabla 5a

Componente	Cantidad unitaria (mg)
Colecalciferol	1.250 mg (equivalente a 50,000 UI)
Aceite de oliva refinado	181.150 mg

Tabla 5b

Componente	Cantidad unitaria (mg)
Colecalciferol	0.625 mg (equivalente a 25,000 UI)
Aceite de oliva refinado	181.775 mg

25 Se añadió colecalciferol al aceite de oliva refinado en un tanque de disolución, bajo nitrógeno, dejándolo agitar hasta su completa disolución (durante al menos 60 minutos).

Las cápsulas se llenaron, aún bajo nitrógeno, mediante máquinas automáticas, con 200 µL de la solución de colecalciferol así preparada.

Posteriormente, las cápsulas se sellaron con una banda de gelatina y se envasaron en blísteres de PVC/PVDC/Al mediante una máquina para fabricación de blísteres automática.

5 Ejemplo 5: Preparación de un alimento que contiene colecalciferol

Se preparó una focaccia que contenía colecalciferol e ingredientes adecuados, como se indica en la tabla 6.

Tabla 6

Componente	Cantidad
Harina para pan (con o sin gluten)	400 g
Agua tibia	200 ml
Leche tibia	120 ml
Levadura de cerveza	10 g
Aceite de oliva virgen extra	2 cucharas
Colecalciferol	2,000 UI
Sal	Lo justo
Romero picado	Lo justo

En un recipiente se disolvió la levadura en agua, que luego se añadió a la harina y se mezcló.

10 Posteriormente, se añadió leche a la mezcla de forma gradual y bajo agitación.

A continuación, se añadió a la masa una porción de aceite de oliva (aproximadamente una cucharada sopera) y sal, y se continuó la agitación.

La masa se colocó en un recipiente antiadherente adecuado, se extendió y se dejó fermentar durante aproximadamente 2 horas.

15 A continuación, se espolvoreó la masa con sal gruesa y romero y se coció a aproximadamente 220 ° C durante 25 minutos.

Al final, se roció el dorso de la focaccia con la cucharada restante de aceite de oliva, en la que se habían disuelto 2,000 IU de colecalciferol.

Conclusiones

20 En conclusión, todas las pruebas descritas anteriormente demuestran que el colecalciferol es un agente activo que puede utilizarse en el tratamiento de la enfermedad celíaca.

En particular, el colecalciferol ha mostrado una marcada actividad en la reducción de la atrofia de las vellosidades intestinales, por lo que puede utilizarse eficazmente como agente activo en la reducción de la atrofia de las vellosidades intestinales.

25 Además, el colecalciferol también ha mostrado una marcada actividad en la protección y regeneración del epitelio intestinal, por lo que también puede utilizarse eficazmente como un agente activo en la protección y regeneración del epitelio intestinal.

REIVINDICACIONES

1. Colecalciferol como un agente activo para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca.
2. Colecalciferol para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho tratamiento de la enfermedad celíaca comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de colecalciferol para la reducción de la atrofia de las vellosidades intestinales.
3. Colecalciferol para uso de la reivindicación 1, en donde dicho tratamiento de la enfermedad celíaca comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de colecalciferol para la protección y regeneración del epitelio intestinal.
4. Colecalciferol para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho tratamiento de la enfermedad celíaca comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de colecalciferol para la reducción de la atrofia de las vellosidades intestinales y la protección y regeneración del epitelio intestinal.
5. Colecalciferol para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el colecalciferol debe administrarse en una dosis de 0.4 µg/kg/día a 11 µg/kg/día, preferentemente 0.8 µg/kg/día a 11 µg/kg/día, más preferiblemente 4 µg/kg/día a 11 µg/kg/día, o en una dosis de 16 IU/kg/día a 430 IU/kg/día, preferiblemente 30 IU/kg/día a 430 IU/kg/día, más preferiblemente 160 IU/kg/día a 430 IU/kg/día.
6. Colecalciferol para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el colecalciferol debe administrarse por vía oral, inyectable o subcutánea, preferentemente por vía oral.
7. Composición farmacéutica o complemento alimenticio que comprende colecalciferol como un agente activo para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, y al menos un excipiente adecuado.
8. La composición farmacéutica o complemento alimenticio para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha composición farmacéutica o complemento alimenticio es para administrar por vía oral, y se presenta en la forma de preparado sólido o bucodispersable, gel, cápsula, comprimido, polvo, granulado, solución, suspensión, emulsión o tintura.
9. La composición farmacéutica o complemento alimenticio para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la forma de una solución, suspensión, emulsión en gel o tintura y que comprende colecalciferol en una concentración de 10,000 IU/ml a 20,000 IU/ml.
10. Alimento para celíacos que comprende colecalciferol como un agente activo para uso en el tratamiento de la enfermedad celíaca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, y al menos un ingrediente alimentario adecuado.
11. El alimento para celíacos para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho alimento es un producto comestible destinado tanto al consumo humano como animal, seleccionado entre productos de panadería, bebidas alcohólicas, refrescos, bebidas energéticas, barritas dietéticas, condimentos, los denominados "cereales de desayuno", pasta fresca, pasta seca, leche y sus derivados, zumos de frutas y dulces, y alimentos para animales.
12. El alimento para celíacos para uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde el colecalciferol está presente en una cantidad de 200 a 2,000 IU por porción, o en una cantidad de 1 a 5 IU/g de alimento.
13. La composición farmacéutica o el complemento alimenticio para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, o el alimento para celíacos para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, comprende además al menos un probiótico.