

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102010901842967A1

Publication Date

20111126

Applicant

OVER S.R.L.

Title

COMPOSIZIONI PER IL TRATTAMENTO DELLA INFEZIONE DA
HELICOBACTER PYLORI.

COMPOSIZIONI PER IL TRATTAMENTO DELL'INFEZIONE DA *HELICOBACTER PYLORI*

La presente invenzione riguarda composizioni per il trattamento dell'infezione da *Helicobacter pylori*. Più in particolare, l'invenzione concerne l'utilizzazione come agenti antinfettivi di composizioni antibiotiche contenenti, come principi attivi, delle associazioni di un agente emulsificante e tensioattivo non-ionico noto, il polisorbato, con uno di due specifici antibiotici tra quelli già in uso per il trattamento di eradicazione dell'*H. pylori*.

Come è noto, l'*Helicobacter pylori* è un microorganismo gram-negativo spiraliforme microaerofilo che può vivere nello stomaco e nel duodeno, adattandosi all'ambiente inospitale della mucosa gastrica in un modo tutto particolare, tanto che spesso non dà sintomi rilevabili. In effetti, si calcola che più dell'80% degli individui infettati dall'*H. pylori* siano asintomatici. Tale microorganismo infetta circa la metà della popolazione mondiale a livello del tratto gastroduodenale, e la via di trasmissione dell'infezione non è ancora stata chiarita, anche se sembra che tipicamente l'infezione abbia luogo nel corso dell'infanzia.

Lo stomaco è protetto dal suo stesso succo gastrico, composto da acido cloridrico concentrato e ricco di enzimi digestivi, da uno spesso strato di muco che ricopre la mucosa gastrica, all'interno del quale l'*Helicobacter* riesce a penetrare e a vivere, resistendo all'eventuale acido che può raggiungerlo grazie ad un enzima che tale batterio produce, l'ureasi. L'ureasi converte l'urea, contenuta abbondantemente nello stomaco, in bicarbonato e ammonio, e nelle vicinanze della colonia batterica si crea un ambiente basico che è in grado di neutralizzare l'acido cloridrico delle secrezioni gastriche, proteggendo l'*H. pylori*.

Un altro meccanismo di protezione di cui l'*Helicobacter pylori* dispone consiste nel fatto che le difese immunitarie naturali dell'organismo

non possono raggiungerlo nel muco gastrico. Il sistema immunitario risponde all'infezione da *H. pylori* inviando leucociti, linfociti T killer ed altri fattori di difesa, ma questi non riescono a raggiungere l'infezione perché non penetrano facilmente attraverso lo strato mucoso, però restano nel sito accumulandosi e lasciandovi il loro contenuto distruttivo (costituito da radicali superossido) quando muoiono. Nutrienti in più vengono inviati sul sito per assistere i globuli bianchi, e ciò non fa che fornire maggiore alimentazione anche all'*Helicobacter*. Come risultato, nel giro di pochi giorni si sviluppa una gastrite che può talvolta progredire fino all'ulcera peptica. Alla luce di quanto precede, si ritiene che non sia l'*H. pylori* in sé stesso a causare il danno della mucosa gastrica ma l'infiammazione, e quindi la risposta immunitaria al microorganismo.

Dalla letteratura scientifica risulta che l'infezione da *Helicobacter pylori* è la principale causa della gastrite cronica e il fattore più rilevante per lo sviluppo dell'ulcera peptica (Warren JR, Marshall BJ. *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet* **1983**; 1:1273–5). Colonizzando lo stomaco, *H. pylori* induce uno stato infiammatorio persistente (gastrite cronica) che può perdurare per anni senza evolvere con sintomi clinici, ma nel 10-20% dei casi arriva a determinare lo sviluppo di ulcere gastriche o duodenali.

Anche il cancro gastrico (adenocarcinoma e linfoma gastrico non-Hodgkin) è spesso associato a *H. pylori* (Moss SF. *The carcinogenic effect of H. pylori on the gastric epithelial cell. J Physiol Pharmacol* **1999**; 50:847–56). In una estesa revisione dei casi di carcinoma gastrico si è dimostrato che la presenza di *H. pylori* determina un aumento di circa 6 volte del rischio di cancro gastrico. Si pensa che la gastrite cronica conduca a metaplasia intestinale che a sua volta può degenerare in tumore maligno. Il linfoma maligno a basso grado o MALToma, a sua volta, sembra derivare dalla degenerazione maligna di tessuto linfoide associato alla mucosa. In questo caso studi biotipici retrospettivi hanno dimostrato che il

90% di questi MALTomi sono associati a alla presenza di *H. pylori*.

I vari ceppi di *Helicobacter pylori* non sono dotati dello stesso potere patogenetico: quelli che posseggono un'inserzione nel proprio cromosoma definita "isola di patogenicità *cag*" (*cag* PAI), un insieme di geni coinvolti nella virulenza del microrganismo, esibiscono un più elevato potenziale infiammatorio. Circa il 50-70% dei ceppi di *H. pylori* trovati nei paesi occidentali contengono l'isola di patogenicità *cag*, e i pazienti infettati con batteri che contengono la *cag* PAI hanno una risposta infiammatoria gastrica più forte e un maggiore rischio di sviluppare ulcere peptiche o cancro gastrico rispetto ai pazienti infettati con ceppi che non contengono tale inserzione nel genoma. I ceppi *cag* positivi sono in grado di iniettare nelle cellule gastriche colonizzate un'oncoproteina (codificata da uno dei geni *cag*) detta CagA, che aumenta il rischio di sviluppare lesioni neoplastiche (Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**; 93:14648–53).

Una volta che l'infezione da *Helicobacter pylori* è stata diagnosticata in pazienti con ulcera peptica, la procedura normale consiste nell'eradicare farmacologicamente il microrganismo e quindi permettere all'ulcera di rimarginarsi. Attualmente, il trattamento standard di prima scelta, noto come "terapia tripla", consiste nella somministrazione di:

- a) un inibitore della pompa protonica gastrica;
- b) due antibiotici, scelti tra amoxicillina, claritromicina, metronidazolo o tetraciclina.

Come è noto, la pompa protonica è il meccanismo metabolico tipico delle cellule parietali dello stomaco che permette loro di secernere acido cloridrico nel succo gastrico, e gli inibitori della pompa protonica un sono un gruppo di molecole la cui azione principale è quella di ridurre per una lunga durata (dalle 18 alle 24 ore) l'acidità dei succhi gastrici. Essi a-

giscono attraverso l'inibizione dell'enzima gastrico H⁺/K⁺-ATPasi (la pompa a protoni), catalizzatore dello scambio degli ioni H⁺ e K⁺.

Tali principi attivi, tra cui i più diffusi sono l'omeprazolo, il lansoprazolo e l'esomeprazolo, portano a una notevole riduzione dell'acidità gastrica; e sono usati pertanto nel trattamento della dispepsia, del reflusso gastro-esofageo e dell'ulcera peptica, dove hanno praticamente soppiantato i farmaci precedentemente in uso per indicazioni analoghe, antagonisti dei recettori H₂ dell'istamina o antistaminici H₂, come la ranitidina e la cimetidina.

Nel trattamento di eradicazione dell'*H. pylori* gli inibitori di pompa protonica vengono utilizzati per alleviare i sintomi dell'ulcera peptica e per facilitare l'azione degli antibiotici, mentre la vera e propria attività di eradicazione è svolta da questi ultimi, che vengono somministrati con le precauzioni e le limitazioni tipiche di ogni trattamento antibiotico.

Nel corso degli anni, i protocolli terapeutici sono andati via via perfezionandosi, consentendo di passare, nei casi standard, da terapie della durata di due settimane a terapie di 7 o 10 giorni, riducendo il numero di unità di dosaggio da somministrare quotidianamente e limitando la tossicità e gli effetti collaterali degli stessi. Protocolli alternativi sono stati sviluppati in caso di allergie a determinati farmaci, schemi di trattamento di seconda linea sono stati individuati in caso di fallimento del primo ciclo di terapia e nel complesso l'efficacia di eradicazione è migliorata, garantendo percentuali di successo di almeno l'80%. I casi di effetti indesiderati vengono contenuti entro un limite del 10-15% dei pazienti, e normalmente tali effetti non sono così gravi da causare l'abbandono della terapia.

Si tratta comunque di inconvenienti, sia locali che sistemici, che rendono la terapia poco tollerabile, tra cui i più comuni sono, a parte i casi di vera e propria intolleranza al principio attivo, vertigini o senso di sbandamento, cattivo sapore in bocca, nausea e problemi digestivi o intestinali.

Inoltre, e in maniera più critica, un numero sempre crescente di pa-

zienti risulta infetto da batteri resistenti: in gran parte del mondo sono già stati evidenziati molti ceppi resistenti alla claritromicina e anche ceppi resistenti al metronidazolo. Per i pazienti affetti da ceppi di *H. pylori* resistenti è stato proposto l'uso di antibiotici alternativi, da utilizzare eventualmente in caso di fallimento del primo ciclo di trattamento. Ad esempio, per il trattamento di ceppi resistenti alla claritromicina è stato suggerito l'uso della levofloxacina in una terapia tripla di seconda linea (Perna F, Zullo A, Ricci C, Hassan C, Morini S, Vaira D. *Levofloxacin-based triple therapy for Helicobacter pylori re-treatment: role of bacterial resistance. Dig Liver Dis*, **2007**, 39(11):1001–5).

È evidente, in base a quanto precede, che le terapie farmacologiche per l'eradicazione dell'*Helicobacter pylori* richiedono continue revisioni e aggiornamenti, non solo per migliorare l'efficacia o la tollerabilità dei farmaci, ma anche in conseguenza dell'evolversi di ceppi resistenti agli antibiotici in determinate popolazioni, a seconda anche dell'uso che si fa dei vari antibiotici nei diversi territori.

Poiché studi recenti hanno dimostrato che l'aggiunta di sostanze dotate di attività di scavenging verso i radicali liberi, come la vitamina C, ai farmaci usati per trattare l'infezione da *H. pylori* migliora i tassi di eradicazione, l'interesse di microbiologi e clinici si è concentrato verso composti naturali biologicamente attivi, in particolare estratti di piante noti per essere dotati di attività antiossidante e/o antibatterica, da associare alle terapie farmacologiche o da utilizzare per l'integrazione alimentare (Correa P, Malcom G, Schmidt B, Fontham E, Ruiz B, Bravo JC, et al. *Antioxidant micronutrients and gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther* **1998**; 1: 73–8). Numerosi studi hanno dimostrato l'effetto antibatterico di un'ampia varietà di frutti e loro derivati, come bacche, aglio, cipolle, kiwi, agrumi e vino, così come anche di estratti di piante e spezie, in particolare oli essenziali, cannella, timo, propoli, liquirizia, paprica, tè e riso (ad esempio, Nostro A, Cellini L, Di Bartolomeo S, Di Campli E, Grande R, Cannatelli MA, et al. *Anti-*

bacterial effect of plant extracts against Helicobacter pylori. Phytother Res **2005**; 19:198–202; e Ohno T, Kita M, Yamaoka Y, Imamura S, Yamamoto T, Mitsufuji S, et al. *Antimicrobial activity of essential oils against Helicobacter pylori. Helicobacter* **2003**; 8:207–15).

In tale ambito, alcuni dei presenti autori hanno recentemente studiato e identificato i composti fenolici presenti nelle foglie di rovo (*Rubus ulmifolius*) e nella comune farina di frumento, e ne hanno determinato l'attività antiossidante e il potere antibatterico verso ceppi di *H. pylori* (Martini S, D'Addario C, Colacevich A, Focardi S, Borghini F, Santucci A, Figura N, Rossi C. *Antimicrobial activity against Helicobacter pylori strains and antioxidant properties of blackberry leaf (Rubus ulmifolius) and isolated components. Int. J Antimicrob Agents.* **2009**; 34:50-9).

Tra i componenti fenolici più abbondantemente presenti in tali estratti è l'acido ferulico, un componente della lignina che costituisce le pareti cellulari vegetali, e che si trova in abbondanza nel riso, nel frumento e in altri cereali, come pure nel caffè e in diversi semi e frutti. Le sue proprietà antiossidanti hanno condotto a proporre l'uso in una grande varietà di applicazioni terapeutiche per la prevenzione e la cura di patologie che vanno dal cancro alle patologie neurodegenerative, al diabete, alle disfunzioni cardiovascolari, e anche nel campo dell'ulcera peptica e del trattamento dell'infezione da *H. pylori*, attraverso i numerosi estratti vegetali che lo contengono.

Tra le altre varie sostanze che sono state proposte come principi attivi o come coadiuvanti nel trattamento farmacologico di eradicazione dell'*Helicobacter pylori* in ragione delle loro proprietà antibatteriche, la domanda di brevetto internazionale pubbl. No. **WO 96/05822** (a nome New England Medical Center Hospital) descrive l'uso di alcune molecole normalmente utilizzate come tensioattivi ed emulsionanti non-ionici adatti al campo alimentare, cosmetico e farmaceutico, tra cui in modo specifico i polisorbati. Tali composti sono una classe di sostanze derivate dal sorbi-

tano ((3S)-2-(1,2-diidrossietil)tetraidrofuran-3,4-diolo, un composto ciclico poliossidrilico ottenuto dalla disidratazione del sorbitolo) polietossilato o PEG-ilato, cioè con i quattro gruppi ossidrilici eterificati con catene di polietilenglicol, a sua volta esterificato con una catena di acido grasso (monolaurato, monopalmitato, monostearato o monooleato).

I polisorbati, noti con il nome commerciale Tween, vengono spesso utilizzati per le loro capacità solubilizzanti come emulsionanti e additivi antischiuma nelle fermentazioni, e partendo da sperimentazioni su colture di *Helicobacter pylori* gli autori della domanda di brevetto citata hanno rilevato che tali composti si comportano come potenti inibitori della crescita batterica. Per tale motivo il documento citato propone la somministrazione di composizioni a base di polisorbato per il trattamento delle infezioni da *H. pylori* nell'ambito di un trattamento sequenziale di eradicazione, in cui, però, è tassativamente prescritto che non vi sia sovrapposizione temporale tra il trattamento antibiotico e quello con polisorbato.

Infatti, era stato trovato che gli agenti tensioattivi/emulsionanti proposti hanno attività battericida a certe concentrazioni, ma solo batteriostatica a concentrazioni inferiori, inibendo la crescita di *H. pylori* senza eradicarlo del tutto, e poiché molti antibiotici utilizzati in clinica sono efficaci soltanto su microrganismi in fase di crescita attiva, la presenza contemporanea del tensioattivo/emulsionante proposto e dell'antibiotico sarebbe stata controproducente. La terapia proposta dal documento citato consiste, pertanto, nel somministrare gli antibiotici noti per il trattamento dell'*Helicobacter* in assenza del tensioattivo/emulsionante proposto e, successivamente, somministrare tale agente da solo.

Anche la domanda di brevetto internazionale pubbl. No. **WO 97/36600** (a nome AMBI Inc.), di poco successiva, propone l'uso di composizioni contenenti polisorbati nel trattamento dei disordini gastrointestinali causati da *H. pylori*. Gli autori riportano di aver trovato che i polisorbati, in particolare, non solo inibiscono la crescita dell' *H. pylori*, ma rapida-

mente uccidono tali ceppi batterici, e pertanto possono essere usati da soli nell'eradicazione del microrganismo. Il documento citato descrive l'uso di poliossietilensorbitano (e in particolare polisorbato 20, che è l'estere monolaurato del polisorbato) da solo o in combinazione con altri agenti antiulcera noti, tra cui antagonisti dei recettori istaminici H₂, sali di bismuto, antiacidi e inibitori della pompa protonica, e in modo specifico in associazione con agenti mucolitici, ma non in associazione con antibiotici sistemici. Al contrario, la somministrazione con antibiotici che vengono assorbiti nella circolazione sistemica, o passano attraverso l'intestino, è espressamente sconsigliata.

Sulla base di tale tecnica anteriore, la presente invenzione si propone pertanto lo scopo di fornire nuove preparazioni farmaceutiche per il trattamento dell'infezione da *Helicobacter pylori* dotate di migliorata efficacia e tollerabilità, e in grado di trattare con maggior successo i ceppi batterici resistenti, pur non discostandosi eccessivamente dai protocolli terapeutici già consolidati per il trattamento farmacologico di eradicazione dell'*H. pylori*

In base agli studi condotti nell'ambito della presente invenzione è stato trovato che, diversamente da quanto suggerito dalla tecnica anteriore, le associazioni dei tensioattivi/emulsionanti non-ionici noti con il nome comune di polisorbati e con il nome commerciale di Tween con due degli antibiotici correntemente usati per il trattamento di eradicazione dell'*H. pylori*, specificamente il metronidazolo e la claritromicina, presentano un'attività sinergica inaspettata, e risultano in composizioni sorprendentemente efficaci anche nei confronti di ceppi resistenti a tali antibiotici.

Formano pertanto oggetto specifico della presente invenzione composizioni farmaceutiche per il trattamento dell'infezione da *Helicobacter pylori* contenenti, come ingredienti attivi, polisorbato e un antibiotico scelto tra claritromicina, metronidazolo e una miscela degli stessi.

Ai fini della presente descrizione si intendono in generale come "po-

lisorbati” gli esteri di poliossietilene (20) sorbitano e acido laurico, palmitico, stearico o oleico, dove il numero 20 indica il numero complessivo di unità ossietileniche della molecola. In particolare, il polisorbato 80 o Tween 80 è poliossietilene (20) sorbitano monooleato, il polisorbato 20 o Tween 20 è poliossietilene (20) sorbitano monolaurato, il polisorbato 40 o Tween 40 è poliossietilene (20) sorbitano monopalmitato e il polisorbato 60 o Tween 60 è poliossietilene (20) sorbitano monostearato.

Secondo una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, l'antibiotico che viene formulato in associazione con il polisorbato è la claritromicina, mentre secondo un'altra forma di realizzazione ugualmente preferita è il metronidazolo. È stato rilevato dalla sperimentazione connessa alla presente ricerca, infatti, che l'attività del polisorbato quando utilizzato in combinazione con gli specifici antibiotici metronidazolo e claritromicina è di tipo sinergico, e le concentrazioni minime battericide (CMB, o MBC) sia del polisorbato che dell'antibiotico quando usati in combinazione sono diverse volte inferiori (8 volte per la claritromicina nell'associazione polisorbato-claritromicina) alle CMB delle due sostanze saggiate separatamente.

Preferibilmente, secondo l'invenzione, il polisorbato utilizzato è polisorbato 80. Tale prodotto è già diffuso come emulsionante in prodotti alimentari, in particolare nella produzione di gelati, in prodotti medicinali per somministrazione parenterale, come additivo antischiama in colture batteriche, ad esempio per la produzione di vaccini, ed è considerato un prodotto sicuro e ben tollerato nell'uomo.

Sulla base dei risultati di uno studio di tossicità ripetuta di 13 settimane nel ratto con polisorbato 60, è stato stabilito che la minima NOAEL (NO Adverse Effect Level) per la categoria dei polisorbati è di 1000 mg/kg/die. Questa, pertanto, rappresenta la massima dose preclinica priva di effetti collaterali. Stabilita la NOAEL = 1000 mg/kg/die, per fissare la ADI (dose giornaliera accettabile) per l'uomo è stato introdotto un fattore di si-

curezza pari a 100, e di conseguenza l'attuale ADI è fissata appunto a 10 mg/kg/die. Quindi, la dose considerata priva di effetti collaterali da un punto di vista alimentare e anche regolatorio per un polisorbato è di circa 700-750 mg/die per un adulto e 200 mg/die per un bambino, tale limite essendo largamente prudenziale e comunque superabile, anche se di poco, per scopi strettamente farmaceutici.

I polisorbati sono liquidi oleosi a temperatura ambiente; in particolare il polisorbato 80 si presenta come un liquido giallo viscoso, idrosolubile. Una composizione farmaceutica secondo l'invenzione, a base di polisorbato e di un antibiotico scelto tra metronidazolo e claritromicina o loro miscele, può essere formulata di preferenza in un preparato farmaceutico in forma di soluzione, sospensione colloidale, emulsione, sciroppo o granulato. La somministrazione in forma fluida appare vantaggiosa per la sua più immediata capacità di disperdersi sulle pareti dello stomaco.

Secondo alcune forme preferite di realizzazione dell'invenzione, il preparato proposto è formulato in modo tale che ciascuna unità di dosaggio di detta composizione, liquida, semisolida o solida, contiene da 500 a 750 mg di polisorbato e 500 mg di claritromicina o 500 mg di metronidazolo.

In tal modo, considerando che nella terapia tripla standard per l'eradicazione dell'*Helicobacter* il dosaggio dell'antibiotico è di mg 500 per 2 volte al giorno (ad esclusione dell'amoxicillina, il cui dosaggio usuale è di 1 g due volte al giorno), si può prevedere una formulazione, ad esempio in forma di sciroppo, contenente, in ogni unità di dosaggio pari a 10 ml, una quantità predeterminata compresa tra 500 e 750 mg di polisorbato 80 e una quantità pari a 500 mg di antibiotico (claritromicina o metronidazolo). Tale preparato andrebbe assunto 2 volte al giorno, in quantità pari a 10 ml in volume (1 cucchiaino).

In una terapia analoga alla terapia tripla standard, pertanto, un trattamento realizzato con l'associazione polisorbato-antibiotico dell'inven-

zione può essere effettuato, ad esempio, secondo il seguente schema:

- omeprazolo 20 mg bis in die;
- amoxicillina 1 g bis in die;
- sciroppo polisorbato 80-claritromicina (o sciroppo polisorbato 80-metronidazolo 10 ml bis in die (equivalente ad es. a 500 mg polisorbato+500 mg antibiotico bis in die)).

Secondo alcune forme di realizzazione dell'invenzione ulteriormente preferite, la composizione farmaceutica proposta contiene anche, come ulteriore ingrediente attivo, acido ferulico. Lo scopo dell'aggiunta dell'acido ferulico al polisorbato è quello di sfruttare la sua azione di anti-ossidante ed antibatterica verso *H. pylori*, già descritta in quanto precede. Infatti, come già notato, studi recenti hanno dimostrato che l'aggiunta di sostanze dotate di attività di scavenging verso i radicali liberi, come la vitamina C, ai farmaci usati per trattare l'infezione da *H. pylori* migliora i tassi di eradicazione.

È anche possibile prevedere un'ulteriore utilizzazione dei composti attivi proposti secondo l'invenzione a supporto del trattamento antibiotico per l'eradicazione dell'*H. pylori*. Così, l'acido ferulico e il polisorbato possono essere inclusi in un preparato, ad esempio in sciroppo, privo dell'antibiotico, che contenga ad esempio, oltre a polisorbato e acido ferulico, vitamina E o suoi derivati, e/o probiotici per la tutela della flora batterica intestinale.

Un possibile preparato utilizzabile a questo scopo è uno sciroppo contenente, ad esempio, il 5% di polisorbato 80, l'1% di acido ferulico, lo 0,5% di vitamina E peghilata (più, eventualmente, dei probiotici), da assumere in dosi di 10 ml 2 volte/die come supporto del trattamento di eradicazione dell'infezione da *H. pylori*.

Secondo un suo ulteriore aspetto, la presente invenzione ha ad oggetto l'uso di un'associazione di polisorbato con un antibiotico scelto tra claritromicina, metronidazolo e una miscela degli stessi per la produzione

di un preparato per il trattamento dell'infezione da *Helicobacter pylori*.

Come già notato, in alcune forme preferite di realizzazione dell'invenzione il preparato è un'associazione di polisorbato e claritromicina, mentre in altre di tali forme il preparato è un'associazione di polisorbato e metronidazolo. In ogni caso, il tipo di polisorbato che si preferisce includere nella formulazione è il polisorbato 80, e la formulazione comprende anche, di preferenza, acido ferulico con funzioni di antiossidante e coadiuvante dell'attività antibatterica della formulazione.

È da notare che preparati del tipo di quello proposto secondo l'invenzione per il trattamento di infezione da *Helicobacter pylori* nell'uomo possono anche essere previsti per uso veterinario, per il trattamento di analoghe specie di batteri che colonizzano la cavità orale e l'apparato gastrointestinale di animali. Specie di *H. pylori* che possono essere interessate da trattamenti veterinari includono, ad esempio, *H. canis* e *H. felis*, che rappresentano corrispondenti patogeni per il cane e il gatto.

Come è evidente, la composizione farmaceutica proposta secondo l'invenzione può essere impiegata in generale come antibatterico nel trattamento di infezioni da batteri sensibili al metronidazolo o alla claritromicina, ma viene specificamente proposta per l'uso nell'ambito di un trattamento di eradicazione dell'*Helicobacter pylori*. Tale trattamento comprende la somministrazione contemporanea di un altro antibiotico appartenente al gruppo di quelli già consolidati per il trattamento in questione, primo tra tutti l'amoxicillina.

In modo particolarmente preferito, come sarà più evidente nel seguito, il trattamento con il preparato dell'invenzione può essere applicato nei casi in cui l'*Helicobacter* da eradicare appartiene a un ceppo resistente alla claritromicina e/o al metronidazolo.

Le caratteristiche specifiche dell'invenzione, così come i vantaggi della stessa rispetto alle soluzioni della tecnica nota, risulteranno più evidenti con riferimento alla sperimentazione riportata a titolo meramente e-

semplificativo nel seguito.

Valutazione dell'efficacia antibatterica delle proposte nei confronti dell' *H. pylori*

Per verificare le prestazioni delle associazioni di principi attivi proposte secondo invenzione nel trattamento farmacologico di eradicazione dell'*Helicobacter pylori*, si è ipotizzato di partire dai trattamenti farmacologici standard come descritti in precedenza per la terapia tripla, rilevando *in vitro* l'efficacia degli agenti antibiotici utilizzati in tale terapia, da soli e in combinazione con l'agente antimicrobico addizionale proposto.

Per le prove di sensibilità sono stati utilizzati 10 ceppi di *H. pylori*, le cui caratteristiche sono riportate nella **Tabella 1** che segue.

Come notato precedentemente, i ceppi batterici che contengono l'isola di patogenicità *cag* sono notevolmente più virulenti di quelli che non la contengono. I ceppi *cag* positivi e quelli *cag* negativi si differenziano tra di essi a tal punto che per questa specie è stato coniato il concetto di "quasi specie". Questo è principalmente il motivo per il quale quando si effettuano studi sull'efficacia di agenti antibatterici nei confronti dell'*Helicobacter pylori* è necessario esaminare dei rappresentanti dei due gruppi di cloni batterici (ossia ceppi con e senza l'isola di patogenicità *cag*).

(segue tabella)

TABELLA 1

Status CagA e chemioresistenze dei ceppi di *H. pylori* esaminati e patologia dei relativi pazienti

	Ceppi di <i>H. pylori</i>									
	CCUG 17874 (CagA+)	G50 (CagA-)	G21 (CagA-)	4Kb (CagA+)	Di Simpli (CagA+)	10K (CagA+)	328 (CagA+)	328 Km (mutante iso- genico CagA-)	M/C-R1 (CagA+)	M/C-R2 (CagA+)
Status CagA	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
Patologia	ceppo tipo	GCnA	GCnA	CG	GCE	CG	GC		GCnA	GCnA
Antibiotico-resistenze	met	-	-	-	-	-	-	-	met e clar	met e clar

Legenda: GCnA, gastrite cronica non atrofica; CG, carcinoma gastrico; GCE, gastrite cronica attiva;
met, metronidazolo; clar, claritromicina.

Per l'esecuzione dei saggi di attività antibatterica nei confronti dei vari ceppi di *H. pylori*, i materiali in prova sono stati preparati come segue.

Il polisorbato 80 è stato solubilizzato in acqua alla concentrazione del 5%. L'acido ferulico è stato solubilizzato in tampone TRIS alla concentrazione dello 0,4% (peso/volume).

Dopo ulteriore diluizione in brodo *Brucella* contenente il 10% di siero fetale bovino, i campioni sono stati sterilizzati per filtrazione attraverso membrane con pori da 0,22 µm.

I vari antibiotici, amoxicillina, metronidazolo, claritromicina e levofloxacina sono stati utilizzati già dissolti, nella loro formulazione per infusione endovenosa. Al momento del saggio, i campioni venivano diluiti al raddoppio in brodo *Brucella*, in un volume di 100 µL, in piastre "Microtiter".

I vari ceppi venivano coltivati in *Brucella* agar con il 10% di siero fetale bovino in giare in cui veniva creata un'atmosfera di ridotta tensione di ossigeno ottenuta con buste "Campypack", a 37°C per 48 ore.

Al momento del saggio, ciascun ceppo veniva sospeso in brodo *Brucella* alla densità ottica corrispondente allo standard di opacità McFarland #4 (circa 10^8 CFU/ml) e ulteriormente diluito 1:20 nello stesso brodo (5×10^5 CFU/ml ca.); 4 µL di ciascuna sospensione batterica erano quindi aggiunti alle varie diluizioni dei campioni; ciascun pozzetto veniva così a contenere circa 2×10^5 CFU/ml.

Dopo incubazione per una notte nella stessa atmosfera di microaerofilia a 37°C, 3 µL di ciascuna diluizione venivano depositati su piastre di agar *Brucella*-siero fetale bovino, che erano immediatamente poste ad incubare a 37°C nella stessa atmosfera per 3-5 giorni.

La più bassa concentrazione in brodo dei campioni in prova la cui subcoltura su agar mostrava la completa assenza di crescita batterica veniva considerata la concentrazione minima battericida (CMB).

I risultati di diverse prove sono raccolti nella seguente **Tabella 2**.

TABELLA 2

Concentrazioni minime battericide (CMB) di polisorbato 80, acido ferulico e di alcuni antibiotici nei confronti di ceppi differenti di *H. pylori*

	Ceppi di <i>H. pylori</i>									
	CCUG 17874	G50	G21	4Kb	Di Simpli	10K	328	328 Km	M/C-R1	M/C-R2
Sostanza	CMB ($\mu\text{g/ml}$)									
polisorbato 80	5,0	4,0	1,6	31	25	6,2	31-62	62	160	62
claritromicina	0,25	0,2	0,2	0,1	0,4		0,2		320	2500
metronidazolo	3,1				10		16		40	320
amoxicillina		0,04				0,08				
levofloxacina		0,16				0,31				
polisorbato / claritromicina	1,25 / 0,016						31 / 0,025		80 / 20	31 / 2,5
polisorbato / metronidazolo							16 / 0,25		80 / 4,0	
polisorbato / amoxicillina		4 / 0,02				6,2 / 0,08				
polisorbato / levofloxacina		4 / 0,08				6,2 / 0,31				
acido ferulico in TRIS	1250	1100	1100	1100	1100	1100	1250	1250	900-1100	800-900
acido ferulico / claritromicina	625 / 0,125									
acido ferulico / metronidazolo	625 / 1,6				250 / 5					

Dai dati riportati nella Tabella che precede si traggono le seguenti osservazioni.

- La CMB della claritromicina nei confronti del ceppo M/C-R2, plurire-sistente, scende da 2500 µg/ml a 2,5 µg/ml quando l'antibiotico viene usato in associazione con il polisorbato.
- L'attività sinergica del polisorbato si manifesta anche con i ceppi sensibili: le CMB degli antibiotici diminuiscono di 8-10 volte quando polisorbato e claritromicina vengono adoperati in associazione (ceppi CCUG 17874 e 328).
- Le CMB di polisorbato, metronidazolo e claritromicina nei confronti del ceppo 328 sono rispettivamente 62 µg/ml, 16 µg/ml e 0,2 µg/ml. Le CMB dell'associazione polisorbato-metronidazolo sono 16 µg/ml e 0,25 µg/ml; quelle dell'associazione polisorbato-claritromicina sono 32 µg/ml e 0,025 µg/ml. Questo ceppo è resistente al solo metronidazolo. Si può vedere come l'attività del metronidazolo associato al polisorbato aumenti di 64 volte e quella della claritromicina associata al polisorbato di 8 volte.
- Le CMB di polisorbato, metronidazolo e claritromicina nei confronti del ceppo resistente M/C-R1 sono rispettivamente 160 µg/ml, 40 µg/ml, e 320 µg/ml. Le CMB dell'associazione polisorbato-metronidazolo sono 80 µg/ml e 4 µg/ml; quelle dell'associazione polisorbato-claritromicina sono 80 µg/ml e 20 µg/ml. I livelli di resistenza al metronidazolo e alla claritromicina si sono ridotti rispettivamente di 10 e di 16 volte.
- Le CMB di polisorbato e claritromicina nei confronti del ceppo resistente M/C-R2 sono rispettivamente 62 µg/ml, e 2500 µg/ml; quelle dell'associazione polisorbato-claritromicina sono 32 µg/ml e 2,5 µg/ml. In questo caso, la CMB si è ridotta fino a livelli di claritromicina considerati pressoché attivi (1 µg/ml, secondo alcuni, 2 µg/ml, secondo altri).

- Il fatto che l'associazione con polisorbato migliora grandemente l'efficacia battericida dei due antibiotici metronidazolo e claritromicina ha una immediata rilevanza per quanto concerne il metronidazolo, in quanto è stato già visto che bassi livelli di resistenza al metronidazolo possono essere superati aumentando la posologia del farmaco. Si può certamente ipotizzare che anche nel caso della claritromicina la riduzione della resistenza dovuta all'associazione con polisorbato si traduca in una maggiore efficacia del trattamento.
- L'associazione amoxicillina/polisorbato 80 e l'associazione levofloxacina/polisorbato 80, al contrario, hanno mostrato attività di tipo esclusivamente additivo. Facendo l'esempio dei ceppi G50 e 10K, le MBC del polisorbato sono rispettivamente 4 µg/ml e 6,2 µg/ml. Quelle dell'amoxicillina sono 0,04 µg/ml e 0,08 µg/ml. Le CMB dell'associazione polisorbato/amoxicillina sono 0.02 µg/ml (in un altro esperimento si è ottenuto 2/0,04 µg/ml) e 6,2/0,08 µg/ml. Le CMB della levofloxacina per i due ceppi sono rispettivamente 0,16 µg/ml e 0,31 µg/ml. Quelle dell'associazione polisorbato/levofloxacina sono 4/0.08 µg/ml e 6,2/0,31 µg/ml.

Sempre con riferimento alla stessa Tabella, in relazione alla sperimentazione con acido ferulico è risultato quanto segue.

- L'acido ferulico ha mostrato attività battericida nei confronti di tutti i ceppi di *H. pylori*, anche dei due ceppi metronidazolo/claritromicina-resistenti. Le CMB oscillano tra 0,8 e 1,2 mg/ml.
- L'associazione acido ferulico/polisorbato ha mostrato attività di tipo additivo.

Dallo studio sperimentale riportato in sintesi in quanto precede è possibile, in conclusione, trarre le seguenti conclusioni:

- L'associazione polisorbato/metronidazolo e l'associazione polisorbato/claritromicina diversamente dalle associazioni di polisorbato

con altri antibiotici, mostrano un'attività battericida sinergica, che si mantiene anche nei confronti di ceppi resistenti ai due antibiotici.

- Il prodotto antiossidante di origine naturale acido ferulico è attivo come antibatterico nei confronti dell'*H. Pylori*, anche se l'associazione acido ferulico/polisorbato mostra attività soltanto additiva.

La presente invenzione è stata descritta con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione specifiche, ma è da intendersi che variazioni o modifiche potranno essere ad essa apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica per il trattamento dell'infezione da *Helicobacter pylori* contenente, come ingredienti attivi, polisorbato e un antibiotico scelto tra claritromicina, metronidazolo e una miscela degli stessi.
2. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, in cui detto antibiotico è claritromicina.
3. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, in cui detto antibiotico è metronidazolo.
4. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui detto polisorbato è polisorbato 80.
5. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 4, formulata in un preparato farmaceutico in forma di soluzione, sospensione colloidale, emulsione, sciroppo o granulato.
6. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 5, in cui ciascuna unità di dosaggio di detta composizione, liquida, semisolida o solida, contiene da 500 a 750 mg di polisorbato e 500 mg di claritromicina o 500 mg di metronidazolo.
7. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 4, contenente, come ulteriore ingrediente attivo, acido ferulico.
8. Uso di un'associazione di polisorbato e un antibiotico scelto tra claritromicina, metronidazolo e una miscela degli stessi per la produzione di un preparato per il trattamento dell'infezione da *Helicobacter pylori*.
9. Uso secondo la rivendicazione 8, in cui detto preparato è un'associazione di polisorbato e claritromicina.
10. Uso secondo la rivendicazione 8, in cui detto preparato è un'associazione di polisorbato e metronidazolo.
11. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 8-10, in cui detto polisorbato è polisorbato 80.
12. Uso secondo la rivendicazione 11, in cui detto preparato con-

tiene, come ulteriore ingrediente attivo, acido ferulico.

13. Uso secondo la rivendicazione 8, in cui detto preparato è per il trattamento di eradicazione dell'*Helicobacter pylori*.

14. Uso secondo la rivendicazione 13, in cui detto *Helicobacter pylori* appartiene a un ceppo resistente alla claritromicina e/o al metronidazolo.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

CLAIMS

1. A pharmaceutical composition for the treatment of infection by *Helicobacter pylori* containing, as active ingredients, polysorbate and an antibiotic selected from clarithromycin, metronidazole and a mixture of the same.
2. A pharmaceutical composition according to claim 1, wherein the said antibiotic is clarithromycin.
3. A pharmaceutical composition according to claim 1, wherein the said antibiotic is metronidazole.
4. A pharmaceutical composition according to any one of claims 1-3, wherein the said polysorbate is polysorbate 80.
5. A pharmaceutical composition according to claim 4, formulated in a pharmaceutical preparation in the form of a solution, a colloidal suspension, an emulsion, a syrup or a granulate.
6. A pharmaceutical composition according to claim 5, wherein each liquid, semisolid or solid dosage unit in the said composition contains from 500 to 750 mg of polysorbate and 500 mg of clarithromycin or 500 mg of metronidazole.
7. A pharmaceutical composition according to claim 4 containing, as a further active ingredient, ferulic acid.
8. Use of a combination of polysorbate and an antibiotic selected from clarithromycin, metronidazole and a mixture of the same for the production of a preparation for the treatment of infection by *Helicobacter pylori*.
9. Use according to claim 8, wherein the said preparation is a combination of polysorbate and clarithromycin.
10. Use according to claim 8, wherein the said preparation is a combination of polysorbate and metronidazole.
11. Use according to any one of claims 8-10, wherein the said polysorbate is polysorbate 80.

12. Use according to claim 11, wherein the said preparation contains, as a further active ingredient, ferulic acid.

13. Use according to claim 8, wherein the said preparation is for the treatment of eradication of *Helicobacter pylori*.

14. Use according to claim 13, wherein the said *Helicobacter pylori* belongs to a strain resistant to clarithromycin and/or to metronidazole.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.