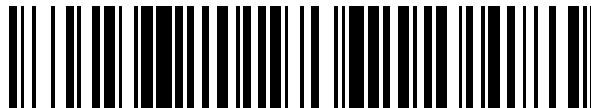


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 726**

51 Int. Cl.:

A61K 33/24 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2011** **E 11788574 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015** **EP 2616084**

54 Título: **Ion bismuto para su uso en la prevención y/o tratamiento del síndrome hemolítico urémico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2015

73 Titular/es:

FERNÁNDEZ, ADRIÁN HÉCTOR ANTONIO (33.3%)
Bolivar 161
San Isidro 1643, Buenos Aires, AR;
SOUBEIRAN, CHOBET (33.3%) y
FERNÁNDEZ, HÉCTOR MANUEL (33.3%)

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ, ADRIÁN HÉCTOR ANTONIO;
SOUBEIRAN, CHOBET y
FERNÁNDEZ, HÉCTOR MANUEL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 551 726 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

Ion bismuto para su uso en la prevención y/o tratamiento del síndrome hemolítico urémico

5 La presente invención se refiere a iones de bismuto, en particular con el ion Bi³⁺, para su uso en un método para prevenir y/o tratar el síndrome hemolítico urémico causado por una o más cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (por ejemplo, una o más cepas seleccionadas entre *Escherichia coli* O157:H7, O26:H11, O103:h2, O111:NM, O121:H19, y O145:NM). La administración de iones de bismuto a un paciente que los necesita. Además, también se refiere al uso de iones de bismuto en un método para impedir que las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga se diseminen en seres humanos y animales.

Antecedentes de la invención

15 La infección por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (ECTS) se ha asociado con enfermedades entéricas desde 1983, cuando Riley et al. comunicaron el aislamiento de la cepa O157:H7 de *Escherichia coli* en pacientes con colitis hemorrágica asociada a la ingesta de hamburguesas poco cocinadas (J Clin Microbiol 1983; 18 (3): 512-20). Ese mismo año, Karmali et al. comunicaron una asociación entre la infección por ECTS y el síndrome hemolítico urémico (SHU) (J Infect Dis 1985; 151 (5): 775-82). Las pruebas llevadas a cabo en modelos animales así como *in vitro* describen diferentes mecanismos de virulencia. Sin embargo, se ha propuesto que el mecanismo más importante es la producción de una potente citotoxina, codificada por un bacteriófago, denominada toxina Shiga (Stx). Las cepas de ECTS humanas, animales o que se encuentran en los alimentos pueden producir Stx1, Stx2 o variantes de Stx1 o Stx2, solas o como combinación de dos o más toxinas (Stx1/Stx2, Stx1/Stx2v, Stx1c/Stx2, Stx1c/Stx2d, Stx2/Stx2v) (Strockbine et al., Infect. Immun. 1986; 53: 135-40; Friedrich et al., J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 2448-53).

25 La secuencia de aminoácidos de Stx1 es idéntica a la de la toxina Shiga de la *Shigella dysenteriae* y Stx2 tiene un 58% de homología de secuencia con Stx1. Portan un plásmido de 60 MDa (po157), que participa en la expresión de fimbrias de adherencia (fimbrias de *Escherichia coli* enterohemorrágica [ECEH]) y una toxina RTX denominada enterohemolisina de EHEC (EHEC-Hly), que está asociada con la enfermedad grave en seres humanos (Schmidt H. et al., 1995; Infect Immun 1995; 63 (3): 1055-61). Se ha sugerido que una proteasa codificada por este plásmido (EspP) puede actuar como factor de virulencia adicional.

30 Al igual que la *E. coli* enteropatógena, la ECTS porta un gen cromosómico, denominado eae, que codifica una proteína denominada intimina. Esta proteína sería responsable de una adhesión íntima de la bacteria a los enterocitos y de la desorganización de las microvellosidades, con la producción de una lesión de tipo A/E (adherencia y eliminación). Las cepas portadoras del gen intimina y productoras de Stx2 están asociadas con la enfermedad grave en seres humanos.

35 La infección por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga se caracteriza no solo por su agresividad y virulencia, sino también por ser la responsable de enfermedades entéricas graves en seres humanos. Produce diarrea sanguinolenta y las complicaciones serias de esta pueden producir daño en las células sanguíneas, renales e incluso cerebrales, lo que da lugar al SHU. Las toxinas causan daño en el revestimiento mucoso del intestino grueso y, si se absorben en el torrente sanguíneo, pueden afectar a otros órganos, tales como los riñones.

40 El síndrome hemolítico urémico (SHU) es una microangiopatía trombótica generalizada, principalmente acompañada de anemia hemolítica y diferentes grados de insuficiencia renal. En la actualidad, la mortalidad en la fase aguda oscila entre el 2,5 y el 4 %. De todos los niños afectados, el 55 % se cura, el 5 % nunca recupera la función renal normal y manifiesta diferentes grados de proteinuria y/o hipertensión arterial, mientras que el 35 % evoluciona hacia la cronicidad después de períodos de tiempo variables.

45 En la actualidad, el tratamiento del SHU es sintomático, consistiendo en el diagnóstico precoz y normalmente implica el uso de plasmaféresis, diálisis o hemodiálisis en los casos de insuficiencia renal. Asimismo, pueden ser necesarias transfusiones de sangre en pacientes con anemia grave y cuidados intensivos en pacientes en estado crítico.

50 La Academia Estadounidense de Pediatría (*American Academy of Pediatrics*), no recomienda el uso de antibióticos ni anti-diarréicos que inhiban la motilidad intestinal, tales como loperamida, en lactantes y niños en los que se sospecha que padecen una gastroenteritis infecciosa. (En: Pickering LK, ed. Red Book Report of the Committee on Infectious Diseases, 25^a ed., Elk Grove Village, 2000).

55 Se ha demostrado en estudios anteriores que el uso de antibióticos para el tratamiento de la infección por ECEH puede aumentar significativamente el riesgo de desarrollar SHU. Las lesiones de la membrana bacteriana producidas por los antibióticos pueden aumentar la liberación masiva de toxina preformada. Además, el uso de antibióticos puede ocasionar una ventaja selectiva para la ECEH frente a otras bacterias menos resistentes al tratamiento con antibióticos, promoviendo la proliferación de ECEH.

60

También se ha demostrado que ciertos antibióticos son inductores potentes de la expresión del gen de la toxina Shiga y pueden provocar un aumento de los niveles de toxina en el intestino. Asimismo, las cepas de ECTS también demostraron resistencia a cefalosporinas de tercera generación y a otros antibióticos, tales como la trimetoprim-sulfa y tetraciclinas, además de ser productoras de beta-lactamasas de amplio espectro.

5 Las infecciones por cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga, un patógeno que se encuentra en los alimentos en países industrializados, son la principal causa de la alta incidencia de SHU en los niños menores de 5 años en Argentina.

10 Argentina tiene la tasa más alta de incidencia de SHU del mundo (alrededor de 12,5 casos cada 100.000 niños menores de 5 años), con aproximadamente 400 nuevos casos por año, lo que representa la segunda causa de insuficiencia renal crónica (IRC) y de indicaciones de trasplante renal en dicho país.

15 En su actualización del 6 de junio de 2011, la Organización Mundial de la Salud (OMS) comunicó los siguientes casos en Alemania:

- 630 casos de SHU, 15 de ellos fatales.
- 1601 casos de diarrea causada por *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), 6 de ellos fatales.

20 Además, se comunicó que la infección se extendió de Alemania a 13 países, entre los que se incluyen 12 países de la Unión Europea.

25 Varios estudios demostraron que la infección se transmite a través de los alimentos, siendo las heces bovinas la fuente más común de contaminación. La dosis infecciosa es muy baja, de alrededor de 102 UFC. La transmisión se produce a través de los alimentos y el agua contaminada con heces bovinas y de persona a persona. La experiencia en EE. UU. demuestra que la reducción de la contaminación de la carne durante la matanza no es suficiente. Los vectores de los últimos brotes fueron vegetales contaminados con O157:H7, probablemente a través de fertilizantes o agua de riego contaminada con heces bovinas. También se ha reconocido como factor de riesgo el contacto de los niños con animales de granja. Todas estas pruebas apoyan además la necesidad de reducir la excreción de ECTS en la etapa previa a la matanza.

30 Se podría prevenir la diseminación de la bacteria patógena entre el ganado de la granja mediante prácticas de manejo adecuadas. Debe tenerse en cuenta que, si bien algunas cepas de ECTS son patógenas para los terneros, la mayoría, incluyendo O157:H7, son agentes zoonóticos que no afectan la salud de los rebaños. Así, surgirían medidas preventivas a partir de la necesidad de proteger la salud pública y mejorar la productividad.

35 Pero, hasta el momento, no se dispone de un método para que los profesionales de la salud prevengan o traten el síndrome hemolítico urémico (SHU).

40 **Breve descripción de la invención**

La presente invención se refiere a iones de bismuto, en particular el ion Bi+3, para su uso en un método para la prevención y/o el tratamiento del síndrome hemolítico urémico y, en particular, para prevenir y/o tratar infecciones causadas por cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga. Preferentemente, los iones de bismuto son adecuados para administración oral. Además, la invención se refiere a iones de bismuto para su uso en un método para la inhibición de la diseminación del gen que codifica los factores de virulencia de las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga en seres humanos y animales.

50 **Descripción detallada de la invención**

Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que los iones de bismuto, particularmente los iones Bi+3, son eficaces para suprimir los factores de virulencia de la *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga que causan diarrea sanguinolenta y SHU.

55 Los presentes inventores han investigado el efecto de los iones de bismuto sobre los principales factores patogénicos de la *E. coli* productora de toxina Shiga, incluyendo toxinas Shiga y bacteriófagos lisogénicos que codifican toxinas Shiga. Inesperadamente, descubrieron que los iones de bismuto inhiben de manera eficaz la actividad de las toxinas Shiga y dan lugar a la reducción de los títulos de fagos que codifican la toxina Shiga aislados.

60 La presente invención se refiere iones de bismuto, en particular iones Bi+3, para su uso en un método para prevenir y/o tratar el síndrome hemolítico urémico y, en particular, para prevenir y/o tratar infecciones causadas por las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga.

65 Algunos ejemplos de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga son, por ejemplo, las cepas O157:H7, O26:H11, O103:h2, O111:NM, O121:H19 y O145:NM.

Además, un objetivo en particular de la invención es el uso de iones de bismuto en un método para prevenir y/o tratar el síndrome hemolítico urémico y, aún más particularmente, para prevenir, propagar, reducir la excreción de y/o tratar las infecciones causadas por las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga.

5 Preferentemente, los iones de bismuto son para administración oral, aunque los expertos habituales en la técnica reconocerán, a partir de las enseñanzas incluidas en el presente documento, que también son posibles otras formas de administración. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, pueden administrarse iones de bismuto a un paciente por cualquier ruta de administración adecuada. Las rutas de administración adecuadas incluyen, sin limitación, las rutas oral, parenteral, transdérmica, entérica, intraabdominal, etc.

10 Se contempla, dentro del ámbito de la presente invención, que los iones de bismuto puedan administrarse en un medicamento que comprenda adicionalmente otros compuestos terapéuticamente activos. Dichos compuestos terapéuticamente activos pueden seleccionarse, sin limitación, entre compuestos antibióticos, compuestos antibacterianos, pectina u otros compuestos con actividad antidiarréica.

15 Tal como se usa en la presente invención, el término "administrar" y las variantes del mismo (por ejemplo, "administración" de un compuesto) en relación con los iones de bismuto significa introducir dichos iones en el sistema de un paciente que necesite dicho tratamiento. Cuando se proporcionan iones de bismuto en combinación con uno o más compuestos activos adicionales (por ejemplo, otro antidiarréico o un antibiótico), el término "administración" y sus variantes deben entenderse como que incluyen la introducción secuencial o concurrente de iones de bismuto y otros agentes.

20 Tal como se usa en la presente invención, el término "paciente" incluye seres humanos y otros animales, en particular mamíferos y otros organismos. Por lo tanto, los métodos pueden estar destinados para tratamiento a seres humanos como también para aplicaciones veterinarias. Por consiguiente, en una realización particular, el paciente es un mamífero. En otra realización particular, el paciente es un ser humano.

25 A menos que se indique lo contrario, cuando se usan en la presente invención, los términos "tratar" y "tratamiento" hacen referencia a una acción que se produce mientras que un paciente padece una enfermedad o un trastorno particular y que reduce su gravedad, retrasa o reduce la progresión de la enfermedad o del trastorno, o que cura la enfermedad o el trastorno.

30 A menos que se indique lo contrario, los términos "prevenir" y "prevención" se refieren a una acción que se produce antes de que un paciente comience a padecer una enfermedad o afección específica inhibiendo o reduciendo la gravedad de dicha enfermedad o afección. En otras palabras, los términos abarcan la profilaxis.

35 A menos que se indique lo contrario, una "cantidad profilácticamente eficaz" de un compuesto es una cantidad suficiente para prevenir una enfermedad o afección, o uno o más de los síntomas asociados o prevenir la recurrencia de la misma. Una cantidad profilácticamente eficaz de un compuesto significa una cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico para prevenir la enfermedad. El término "cantidad profilácticamente eficaz" puede incluir una cantidad que mejore la profilaxis general o aumente la eficacia profiláctica de otro agente profiláctico.

40 De acuerdo con la presente invención, los iones de bismuto pueden administrarse en forma de sales o bases farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" o una "base farmacéuticamente aceptable" de bismuto se refiere a una sal o a una base que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacéutica deseada del compuesto inicial. Debe entenderse que las sales y bases farmacéuticamente aceptables no son tóxicas. Puede obtenerse más información acerca de las sales y bases farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, que se incorpora al presente documento por referencia. En una realización especialmente preferida, los iones de bismuto están presentes en forma de iones Bi+3.

45 En realizaciones particulares, el bismuto puede administrarse en forma de óxido de bismuto, subnitrito de bismuto, subsalicilato de bismuto, subcitrato de bismuto, subgalato de bismuto o hidróxido de bismuto. En realizaciones preferidas de la invención, el ion de bismuto se le administra a un paciente que lo necesita en forma de hidróxido de bismuto y, aún más preferentemente, en forma de gel de hidróxido de bismuto coloidal. En una realización especialmente preferida, el ion de bismuto se administra en forma de gel de hidróxido de bismuto coloidal.

50 En realizaciones particularmente preferidas de la invención, el ion de bismuto se le administra a un paciente como parte de formulaciones farmacéuticas disponibles comercialmente, tales como Crema de Bismuto Chobet® y Bismuto Chobet®.

55 Tal como se usa en la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de ion de bismuto que, cuando se administra a un paciente, trata la enfermedad de manera eficaz. La cantidad de un compuesto de la invención que constituye una "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar en función de una serie de factores, entre los que se incluyen la actividad, la estabilidad metabólica, la velocidad de excreción y la duración de la acción del compuesto, la edad, el peso, el estado general de salud, el sexo, la dieta y la especie del paciente, el modo y la

frecuencia de administración del compuesto, la administración concurrente de adyuvantes o tratamientos adicionales y la gravedad de la enfermedad para la cual se busca un efecto terapéutico. La cantidad terapéuticamente eficaz en una circunstancia en particular puede determinarse sin experimentación indebida. En realizaciones preferidas, las dosis aceptables oscilan entre 450 y 1800 mg administrados por vía oral cada 4 horas aproximadamente. Tal como se sabe en la técnica, puede ser necesario realizar ajustes en función de la edad, el peso, el estado general de salud, el sexo, la dieta y la especie del paciente y el modo y la frecuencia de administración del compuesto, la administración concurrente de adyuvantes u otros ingredientes adicionales terapéuticamente activos y la gravedad de la enfermedad para la cual se busca un efecto terapéutico y dichas dosis se pueden determinar rápidamente mediante experimentación rutinaria.

Puede administrarse a un paciente ion de bismuto en cualquier forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa aceptable. Las formas de dosificación aceptables incluyen, pero sin limitación, pastillas para chupar, cápsulas, soluciones, aerosoles, cremas, emulsiones, gases, geles, gránulos, linimentos, lociones, supositorios, pomadas, pastas, polvos, suspensiones, inyectables, jarabes y comprimidos. En una realización preferida de la invención, se administra el ion de bismuto al paciente en forma líquida. En una realización particular, la forma líquida se comercializa en forma de suspensión.

En una realización particularmente preferida, la suspensión contiene como principio activo gel de hidróxido de bismuto coloidal (GHBC), que corresponde a 3 g de bismuto cada 100 ml de producto. De acuerdo con la invención, en realizaciones particulares, por ejemplo, dicha suspensión puede administrarse a adultos y niños mayores de 12 años, en una cantidad que oscila entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60 ml cada 4 a 6 horas. En niños menores de 12 años, se pueden administrar entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 ml cada 4 a 6 horas. En lactantes, se pueden administrar aproximadamente 5 ml cada 4 a 6 horas. Sin embargo, debe entenderse que, de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención y según el criterio del médico, se pueden utilizar otras dosis y cantidades.

En una realización particular para el tratamiento del SHU, el bismuto se administra hasta que desaparezcan los síntomas de diarrea.

En una realización particular para la profilaxis de la infección por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga en animales, es posible administrar, por ejemplo, 0,5 ml por kg de peso corporal en una suspensión que contenga como principio activo gel de hidróxido de bismuto coloidal, correspondiente a 3 gramos cada 100 ml de producto cada 24 horas. Preferentemente, el animal que se va a tratar se selecciona entre rebaños de ganado bovino, porcino, ovino, caprino o equino. Del mismo modo, se puede tratar a las aves comestibles ajustando la formulación del gel de hidróxido de bismuto para tal fin.

De acuerdo con la invención, los iones de bismuto se pueden administrar solos o pueden formularse dichos iones junto con excipientes, vehículos farmacéuticos, adyuvantes y otros agentes medicinales o farmacéuticos convencionales. Los excipientes aceptables incluyen, pero sin limitación: (a) agentes antiadherentes, tales como croscarmelosa de sodio, crospovidona, glicolato sódico de almidón, celulosa microcristalina, almidón y talco; (b) aglutinantes, tales como celulosa, gelatina, hidroxipropilcelulosa, lactosa, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, sorbitol, almidón y xilitol; (c) recubrimientos, tales como celulosa y goma laca; (d) disgregantes, tales como celulosa, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, celulosa microcristalina y glicolato sódico de almidón y almidón; (e) agentes aglomerantes, tales como carbonato de calcio, celulosa, fosfato de calcio dibásico y manitol; (f) agentes saborizantes/aromatizantes; (g) agentes colorantes; (h) emolientes, tales como estearato de calcio y dióxido de silicio coloidal; (i) lubricantes, tales como estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicol, y talco; (j) conservantes, tales como ácido cítrico, vitamina C y vitamina E. Los vehículos farmacéuticos incluyen polímeros solubles, micropartículas poliméricas, naturales o sintéticas, insolubles o biodegradables, microcápsulas, lipoproteínas, liposomas y micelas; y k) medios líquidos, tales como agua, glicerina, polietilenglicol y propilenglicol.

Una composición farmacéutica de la invención contendrá una cantidad terapéuticamente eficaz de ion de bismuto, comprendiendo el resto de la composición farmacéutica uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En general, el ion de bismuto estará presente en una proporción del 1 % al 20 % en volumen de composición farmacéuticamente aceptable consistiendo el resto de la composición en uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Típicamente, el ion de bismuto estará presente en una proporción del 2 % al 5 % en peso de la composición aceptable consistiendo el resto de la composición farmacéutica en uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los métodos para preparar las formas farmacéuticas de la invención son bien conocidos o serán evidentes para los expertos en la materia; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990).

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención variará en función de una serie de factores, entre los que se incluyen la actividad, la estabilidad metabólica, la velocidad de excreción y la duración de la acción del compuesto, la edad, el peso, el estado general de salud, el sexo, la dieta y la especie del paciente, el modo y la frecuencia de administración del compuesto, la presencia de adyuvantes, de ingredientes terapéuticamente activos adicionales en la composición y la gravedad de la enfermedad para la cual se busca un efecto terapéutico.

Los presentes inventores también descubrieron que la *Escherichia coli* productora de toxina Shiga O157:H7 es sensible al tratamiento con dosis habituales de GHBC.

Además, se descubrió que el GHBC es capaz de unirse a *Escherichia coli* productora de toxina Shiga O157:H7 y de eliminarla después mediante un leve centrifugado. Existe una relación directa entre la virulencia de la cepa bacteriana y su capacidad para adherirse a las paredes del epitelio gastrointestinal. Por lo tanto, de acuerdo con los resultados y sin desear quedar ligados a ninguna teoría particular, puede decirse que esta capacidad del GHBC para capturar y promover el la eliminación por arrastre de la bacteria impide la adhesión bacteriana al epitelio gastrointestinal y la formación de colonias. Teniendo en consideración que el GHBC no reduce la motilidad intestinal, la fijación mecánica al bismuto también debería favorecer una excreción rápida de la *Escherichia coli* productora de toxina Shiga O157:H7 del tracto gastrointestinal.

Para que un paciente desarrolle SHU, es necesario que la cepa de *Escherichia coli* tenga capacidad de producir toxina Shiga, ya que la citotoxina Stx es el principal mecanismo patógeno de la ECTS y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX, que está insertado en el genoma. Los resultados obtenidos por los presentes inventores demuestran una reducción significativa de la actividad citotóxica en células Vero a concentraciones subinhibitorias y subclínicas de GHBC. La cuantificación de las toxinas por inmunoabsorción no mostró diferencias significativas en comparación con los controles. Por consiguiente, y sin desear quedar ligados a ninguna teoría particular, se sugiere que la reducción de la actividad de Stx es el resultado de una interacción directa entre GHBC y la actividad de las toxinas en células eucariotas.

La actividad de Stx está relacionada directamente con la función enzimática de la subunidad A citotóxica. Incluso sabiendo que algunos compuestos pueden actuar como neutralizantes en el proceso de unión de la toxina a su receptor, lo cual da origen a la inhibición de la citotoxicidad en células Vero (Gamage et al., J Bacteriol 186, 5506-5512, 2004), y sin desear quedar ligados a ninguna teoría particular, los presentes inventores sugieren que este efecto puede estar relacionado con la fijación del bismuto a uno o más sitios ricos en cisteína de Stx implicados en la citotoxicidad. Los datos experimentales coinciden en demostrar que los efectos del bismuto se basan en la inhibición por parte del catión Bi³⁺ de la actividad enzimática de las proteínas microbianas ricas en restos de cisteína. Bi³⁺ se une fuertemente a una proteína mediante la formación de puentes de Bi-S desplazando a otros cationes que están implicados en la función de las proteínas en cuestión.

Los resultados obtenidos en ensayos en los que se midió el efecto en el fago 933W libre son sumamente prometedores; el GHBC reduce el título del fago hasta un 80 % y un 90 %. Stx daña las células endoteliales y tubulares renales, que es el motivo por el que se consideran como los principales factores de virulencia (Williams et al., 1999). Las variantes Stx1 y 2 están codificadas en el genoma de profagos lamboides, y pueden inducirse por diferentes estímulos, tales como luz UV o mitomicina C. Como resultado de la inducción, las células hospedadoras bacterianas se lisan y liberan las partículas de fago, de este modo infectando a otras células vecinas o se liberan en el ambiente, permaneciendo como vehículos potenciales de genes de virulencia. Estos fagos, insertados dentro del genoma bacteriano, codifican la producción de toxina Shiga y son responsables de la diseminación de estos factores de virulencia a otras bacterias virulentas.

En los ejemplos que se incluyen a continuación, los estudios se llevaron a cabo usando gel de hidróxido de bismuto coloidal. Esta entidad química muy simple, en un medio acuoso, solo puede liberar iones de bismuto y radicales OH⁻. Es evidente que en el compuesto utilizado en los ejemplos, el ion de bismuto expuesto en el medio de ensayo es la única entidad química activa. El grupo OH del GHBC en el medio acuoso de ensayo y en las interfaces celulares carece de acción y significación terapéutica. Por esta razón, puede decirse que la presencia de un ion de bismuto es responsable de los resultados que se lograron en los ensayos. Por extrapolación, cualquier compuesto de bismuto que proporcione este ion al medio debería producir la misma actividad y los mismos efectos.

Los resultados obtenidos por los presentes inventores demuestran que GHBC posee una acción inhibitoria sobre la actividad citotóxica de las toxinas Shiga. Teniendo en consideración la concentración de GHBC que actualmente se utiliza como tratamiento de la diarrea, como antidiarréico y como protector de la mucosa gastrointestinal (30 mg/ml), es posible afirmar que la *Escherichia coli* productora de toxina Shiga O157:H7 es sensible a las dosis habituales de GHBC.

También se ha demostrado que el GHBC inhibe de manera significativa la replicación del bacteriófago libre, que es responsable de la virulencia de la *Escherichia coli* O157:H7. Estos fagos, insertados dentro del genoma bacteriano, codifican la producción de toxina Shiga y son responsables de diseminar la capacidad de producir estos factores de virulencia a otras bacterias no virulentas. Por lo tanto, el GHBC puede ser una herramienta útil para prevenir la diseminación de las cepas productoras de Stx en reservorios tanto humanos como animales.

De acuerdo con los resultados y sin desear quedar ligados a ninguna teoría particular, puede sugerirse que esta capacidad del GHBC para fijarse y promover el arrastre de la bacteria impidiendo la adhesión bacteriana al epitelio gastrointestinal podría prevenir la acumulación de colonias bacterianas. Teniendo en consideración que el GHBC no reduce la motilidad intestinal, la fijación mecánica al bismuto también debería favorecer una excreción rápida de la *Escherichia coli* productora de toxina Shiga O157:H7 fuera del tracto gastrointestinal.

Los ejemplos que se incluyen a continuación se presentan con el único fin de proporcionar realizaciones particulares de la invención y no deben interpretarse como limitantes de su alcance.

Ejemplos

5

Determinación de la sensibilidad a los iones de bismuto

La concentración inhibitoria mínima (CIM) es el indicador electivo utilizado con mayor frecuencia en el tratamiento antimicrobiano. Por lo tanto, se determinó el valor de la CIM del gel de hidróxido de bismuto coloidal (GHBC) para la *Escherichia coli* productora de toxina Shiga O157:H7. En este ensayo, se utilizaron diluciones 1/50, 1/25, 1/15, 1/10, 1/5 y 1/3, que corresponden a las siguientes concentraciones de bismuto: 0,6 mg/ml, 1,2 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 6 mg/ml y 10 mg/ml.

Como resultado, se obtuvo una CIM correspondiente a 10 mg/ml de bismuto para la *Escherichia coli* productora de toxina Shiga O157:H7. Los valores de la CIM fueron del orden de concentraciones de 10 mg/ml de Bi+3.

15

Determinación de la fijación bacteriana a una suspensión de bismuto

Se ajustaron los cultivos de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga O157:H7 a 0,5 McFarland. Se agregó el compuesto de bismuto (Bi+3) al cultivo (concentración subinhibitoria de 2 mg/ml) y se incubó la suspensión a 37 °C, con agitación. Posteriormente se recogieron muestras, en períodos de tiempo específicos (5, 24 y 168 horas) a fin de determinar el número total de microorganismos viables, mientras que otras muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. Se consideró que las bacterias restantes en el sobrenadante no estaban fijadas y se contaron en placas de agar (Sox y Olson, 1989). El número de bacterias fijadas se obtuvo restando el número de bacterias no fijadas del total de bacterias viables. Como resultado, se determinó que la fijación bacteriana de la *Escherichia coli* productora de toxina Shiga O157:H3 al GHBC fue del orden de entre el 90 y el 98 %.

25

Efecto sobre las toxinas Shiga

Se utilizaron varias técnicas para evaluar la expresión de la toxina Shiga. Se cultivó la cepa de *E. coli* O157:H7 EDL933 en caldo LB, a 37 °C y durante 18 h, con agitación. Se fraccionó el cultivo bacteriano en alícuotas de 200 µl en 5 ml de caldo LB suplementado con los compuestos de prueba (diluciones de GHBC de 1/5 y 1/3, correspondientes a concentraciones de bismuto de 6 mg/ml y 10 mg/ml) y se volvió a incubar durante 18 h a 37 °C, con agitación a 140 rpm. Se utilizaron controles positivos sin fármaco, controles negativos sin cultivo bacteriano para cada fármaco y concentración y un control doble negativo sin fármaco ni cultivo bacteriano. Se centrifugaron los cultivos a 8000 rpm durante 10 min a 4 °C, se retiraron los sobrenadantes y se filtraron a través de una membrana de 0,43 µl. Luego, se los conservó a -20 °C y se los usó en las siguientes pruebas:

35

Ensayo de citotoxicidad:

Se utilizó un procedimiento en una microplaca de 96 pocillos y se sembró con cocultivo de células Vero con las muestras. Se permitió que las células Vero crecieran en MEM (medio esencial mínimo) Sigma 0643 [con 200 mg/l de estreptomycin y 100 mg/l de penicilina) con la adición de 10% de suero fetal bovino (SFB), a 37 °C, con CO₂ al 5%. Se recogieron las células en tripsina y se las transfirió a MEM sin SFB. Se sembraron muestras de 200 µl de sobrenadante puro de los cultivos bacterianos en la primera fila y se realizaron diluciones 2x usando MEM con 15% de SFB (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) en cada columna. Se sembró cada columna con muestras tratadas con el fármaco a diferentes concentraciones. Posteriormente, se inocularon 100 µl de una suspensión de 2,5 x 10⁶ células/ml en cada pocillo que contenía las muestras. Se incubaron las microplacas en un horno a 37 °C con CO₂ al 5 % y se realizaron lecturas durante 48 h a intervalos de 12 horas, mediante microscopía invertida. Después de 48 h, se determinaron los títulos de actividad citotóxica. Los títulos de actividad citotóxica al 50 % (CD50) se determinaron mediante dilución. Se realizó la tinción de las células y se las fijó con una solución de 0,75 % de Violeta Cristal en metanol al 40 % y se tomaron fotografías.

50

Determinación de la concentración de Stx mediante análisis inmunoenzimático:

Para detectar las toxinas Shiga 1 y 2 (Stx-I and Stx-II) se utilizó un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), RIDASCREEN® Verotoxin test (R-Biopharm Latinoamérica S.A.). Los sobrenadantes de los cultivos bacterianos se trataron con fármacos con bismuto para determinar la Stx extracelular. Las mediciones se realizaron fotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. Como resultado, se observó una reducción significativa de los títulos de toxinas Stx activas en las muestras tratadas con una dilución de GHBC a 1/5, que corresponde a concentraciones de 6 mg/ml de bismuto. No se observaron diferencias significativas (p = 0,6849) entre los sobrenadantes tratados y el control no tratado en las diluciones evaluadas.

60

Efecto sobre el fago 933W libre

Se analizó el efecto del GHBC sobre el fago lambda 933W que codifica la toxina Stx. Se tituló la solución de fago y se la incubó con los compuestos en cuatro diluciones diferentes: 1/24; 1/12; 1/6 y 1/3, que corresponden a concentraciones de 1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml y 10 mg/ml de bismuto, durante 24 horas, a 37 °C, con agitación

65

constante. Luego se observó la presencia de fagos usando el método de doble agar y *E. coli* DH5a como cepa receptora. Se contó la cantidad de placas de lisis formadas y se evaluó su efecto.

5 En cuanto al efecto del GHBC sobre el fago 933W que codifica la Stx, se observó una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el título del fago tratado con GHBC en comparación con el fago no tratado. Hubo una reducción del 90% en la cantidad de fago en la dilución de 1/3 de GHBC, que corresponde a una concentración de ion de bismuto de 10 mg/ml y del 86 % en la dilución de 1/6 de GHBC, que corresponde a una concentración de ion de bismuto de 5 mg/ml.

	% de UFC fijadas
	Gel de hidróxido de bismuto coloidal
	2 mg/ml
<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga	
6 hs	89,60%
24 hs	94,10%
168 hs	97,70%

10

Porcentaje de fijación de la *Escherichia coli* productora de toxina Shiga al GHBC

Efecto del GHBC sobre las toxinas Shiga en células Vero, expresado como porcentajes de citotoxicidad.

Dilución del extracto de toxina	Gel de hidróxido de bismuto coloidal		Control sin fármaco	
	3 mg/ml	6 mg/ml	3 mg/ml	
1/2	50%	10%	80%	80%
1/4	20%	-	80%	80%
1/8	-	-	60%	50%
1/16	-	-	50%	20%
1/32	-	-	-	-

15

Efecto del fármaco sobre el fago 933W que codifica la toxina Stx

Concentración de bismuto	Bacteriófago 933W	
	UFP/ml	Porcentaje de reducción del título de fagos (%)
0	394 ± 21	
Gel de hidróxido de bismuto coloidal		
1,25	93 ± 25 [^]	76
2,5	74 ± 13 [^]	80
5	48 ± 5 [^]	86
10	38 ± 6 [^]	90

Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar de 5 experimentos $\wedge p \leq 0,001$.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ion bismuto para su uso en un método para prevenir y/o tratar el síndrome hemolítico urémico causado por una o más cepas de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga.
2. Ion bismuto, de acuerdo con la reivindicación 1, donde una o más de las mencionadas cepas de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga pertenecen al grupo que comprende las cepas O157:H7, 6:H11, O103:h2, O111:NM, O121:H19 y O145:NM de *Escherichia coli*.
- 10 3. Ion bismuto, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ion de bismuto está en forma de una sal o una base farmacéuticamente aceptable.
- 15 4. Ion bismuto para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el ion de bismuto está en una forma seleccionada entre óxido de bismuto, subnitrito de bismuto, subsalicilato de bismuto subcitrato de bismuto, subgalato de bismuto e hidróxido de bismuto.
5. Ion bismuto para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ion de bismuto es Bi+3.
- 20 6. Ion bismuto para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el ion de bismuto comprende un ion Bi+3 en forma de hidróxido de bismuto.
7. Ion bismuto para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ion de bismuto comprende un ion Bi+3 en forma de gel de hidróxido de bismuto coloidal.
- 25 8. Ion bismuto para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ion de bismuto se administra por vía oral.
- 30 9. Ion bismuto para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ion de bismuto se administra por vía oral y donde el ion Bi+3 se presenta en una proporción del 1 % al 20 % en volumen del volumen total del medicamento.
- 35 10. Ion bismuto para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ion de bismuto se administra por vía oral y donde el ion Bi+3 se presenta en una proporción de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 5 % en volumen, del volumen total del medicamento.
- 40 11. Ion bismuto para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el método se aplica en seres humanos o en animales.
- 45 12. Ion bismuto para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ion de bismuto se utiliza en animales seleccionados entre el grupo mandas de ganado bovino, porcino, ovino, caprino o equino.
13. Ion bismuto para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde el método se utiliza en animales seleccionados entre aves comestibles.
- 50 14. Ion bismuto para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde el método se utiliza en seres humanos.
15. Ion bismuto para su uso en un método para prevenir y/o tratar una infección causada por una o más cepas de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga.
16. El ión bismuto para su uso en el método de acuerdo con la reivindicación 15 donde los iones bismuto inhiben la actividad de las toxinas Shiga y de los fagos codificantes de la producción de toxinas Shiga.