

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 308**

51 Int. Cl.:

A61K 36/33 (2006.01)

A61K 36/63 (2006.01)

A61K 36/60 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2010 PCT/EP2010/000211**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2010 WO2010081720**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2010 E 10702412 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2379093**

54 Título: **Composiciones para el tratamiento de la enfermedad del reflujo gastroesofágico (ERGE)**

30 Prioridad:

16.01.2009 EP 09425009

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2017

73 Titular/es:

**BIONAP S.R.L. (100.0%)
Contrada Fureria - Zona Industriale Ovest, Fraz.
Piano Tavola
95032 Belpasso (CT) , IT**

72 Inventor/es:

**MUNAFÒ, SALVATORE y
RIZZA, LUISA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 613 308 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

Composiciones para el tratamiento de la enfermedad del reflujo gastroesofágico (ERGE)

5 La presente invención proporciona productos farmacéuticos orales, nutracéuticos, alimentos saludables y composiciones de dispositivos médicos para la prevención o el tratamiento de la ERGE (Enfermedad del Reflujo Gastroesofágico), dispepsia, síntomas gastrointestinales, faringitis, esófago de Barrett, adenocarcinoma esofágico y síntomas pulmonares relacionados con la ERGE, preferiblemente en combinación con diferentes sustancias activas para las mismas indicaciones médicas. Estas composiciones, que demostraron actuar sinérgicamente, permiten utilizar una dosis eficaz más baja de principios activos, mejorando su índice terapéutico

Antecedentes de la invención

10 El reflujo esofágico ocurre en condiciones fisiológicas, en particular en recién nacidos, pero cuando supera los mecanismos de defensa de la mucosa esofágica, puede causar enfermedades como la ERGE.

La ERGE es la enfermedad gástrica más frecuente y se debe al reflujo gástrico o entérico en el esófago, lo que lleva a la esofagitis por reflujo, una enfermedad muy común con inflamación típica de la mucosa esofágica y lesiones (erosiones y pequeñas úlceras) debido al reflujo gástrico o entérico del jugo en el esófago.

15 En la ERGE el reflujo conduce a síntomas similares a la esofagitis, pero no a las lesiones

Normalmente, un gradiente de presión entre el esófago y el estómago inhibe el flujo posterior del contenido gástrico en el esófago.

20 La estructura anatómica que interviene principalmente en el mantenimiento del gradiente de presión es el EEI (Esfínter Esofágico Inferior), un anillo muscular en el esófago y la articulación estomacal, que se relaja durante la deglución.

En las condiciones fisiológicas, cuando las sustancias gástricas (ácido) tienen un reflujo en el esófago, el peristaltismo esofágico (contracciones del músculo esofágico) las empuja de nuevo al estómago, y sus residuos ácidos son amortiguados y neutralizados por la saliva tragada.

25 La ERGE se caracteriza por la similitud entre las presiones en el esófago y en el estómago, respectivamente. Esto podría deberse a:

- tono de EEI disminuido o ausente;

- relajación del EEI en ausencia de deglución;

- Reducción de la eliminación de material ácido causada por un peristaltismo esofágico anormal;

30 - Función anormal de cardias, la válvula entre el estómago y el esófago que inhibe, en condiciones fisiológicas, el reflujo del contenido gástrico en el esófago.

El cierre imperfecto del cardias puede deberse a causas diferentes, como obesidad, humo, embarazos múltiples, esfuerzos físicos severos, tratamientos farmacológicos o hernia hiatal.

35 Los tipos graves de esofagitis por reflujo pueden conducir a la constricción (estenosis) del esófago causada por la cicatrización de la esofagitis en la recuperación o a lesiones precancerosas ("esófago de Barrett", adenocarcinoma esofágico) que producen una metaplasia de la mucosa esofágica, tomando un aspecto típico de la mucosa gástrica o duodenal. En algunos pacientes están involucrados otros factores tales como secreción disminuida de saliva, secreción ácida exagerada, vaciamiento gástrico retardado, reflujo de sales biliares o enzimas pancreáticas.

40 Estas enfermedades se caracterizan por ardor de estómago (quemazón retroesternal severa), eructos y regurgitación de alimentos o ácidos hacia la boca. Estos síntomas pueden asociarse con otros que afectan el sistema respiratorio (tos crónica, asma, ronquera, laringitis crónica), dientes (pérdida del esmalte) u oído (otalgia). La ERGE y esofagitis de reflujo, en caso de reflujo ácido, se tratan actualmente con 1) inhibidores de la bomba de protones (IBP, por ejemplo, omeprazol, lansoprazol) antagonistas del receptor H₂ (por ejemplo, cimetidina y ranitidina), que reducen la secreción gástrica ácida y consecuentemente el reflujo; 2) agentes procinéticos (por ejemplo, metoclopramida, domperidona, laevosulpirida), que aumentan el tono valvular del cardias y mejoran el vaciado gástrico; 3) agentes antiácidos (por ejemplo, bicarbonato, magnesio e hidróxido de aluminio) y agentes citoprotectores (por ejemplo sucralfato), que reducen la acidez gástrica y protegen la mucosa esofágica.

45 Sólo unos pocos fármacos son útiles en caso de regurgitación no ácida (entérica).

Las reglas dietéticas, posturales y conductuales que ayudan a reducir o prevenir los síntomas están asociadas con la terapia farmacológica. Por ejemplo, se recomienda evitar el alcohol, comidas abundantes o alimentos grasos, picantes o irritantes (menta, chocolate, café, té), y dormir con una almohada levantada en unos centímetros.

5 La terapia farmacológica no afecta a la causa de la enfermedad (cardias que funcionan mal) y debe tomarse durante períodos muy largos (incluso durante toda la vida) ya que casi todos los pacientes sufren recidiva de la enfermedad una vez que se interrumpe la terapia.

10 El cierre disfuncional de la válvula de cardias puede ser corregido con terapia quirúrgica: esto conduce a la recuperación perfecta de la enfermedad, pero si no está bien realizado puede determinar la aparición de nuevos síntomas. Por otra parte, el tratamiento quirúrgico se recomienda para los sujetos jóvenes, en excelente estado general y que necesitan una terapia continua de dosis altas. Recientemente, el Dr. Higa propuso un nuevo método quirúrgico capaz de reducir la ERGE, pero esta nueva técnica no está muy extendida (<http://www.medwatchtoday.com/1113.htm>)

15 No hay indicios claros para preferir una terapia farmacológica específica para el tratamiento de la ERGE o la esofagitis por reflujo: los médicos eligen en general en base a su experiencia personal. En consecuencia, la elección de la terapia es muy personal y no objetiva y es posible que un médico tenga que intentar más de una terapia farmacológica antes de encontrar la terapia que mejor se ajuste a la fisiología del paciente.

Para los pacientes con síntomas leves o ocasionales se recomiendan agentes antiácidos, agentes procinéticos, alginatos y, en los casos más graves, se recomiendan antagonistas de H₂ (anti H₂) e inhibidores de la bomba de protones (IBP).

20 Se proporcionan protocolos clínicos de escalamiento -donde los fármacos menos eficaces se unen o reemplazan gradualmente por principios activos más eficaces, respondiendo a la sintomatología- y protocolos clínicos de desescalamiento -donde la terapia comienza con principios activos altamente eficaces como los inhibidores de la bomba de protones y continúa con activos menos efectivos- (Bytzer P., Goals of therapy and guidelines for treatment success in symptomatic gastroesophageal reflux disease patients, Am. J. Gastroenterol. 2003; 98(3) Suppl: S31-S39).

30 Los IBP son activos muy eficaces, pero su uso prolongado (que es necesario en la terapia de esofagitis por reflujo) reveló efectos secundarios graves relacionados con el tratamiento a largo plazo con esta clase de activos como el aumento del riesgo de fractura de cadera como resultado de la absorción errática de calcio debida a la inducción de hipoclorhidia (Yang et al., Long term proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture, JAMA 2006, 296(94): 2947-2953), enfermedades musculares como también polimiositis y rabdomiolisis (Clark et al., Myopathy including polymyositis: a likely class adverse effect of proton pump inhibitors?, Eur. J. Clin. Pharmacol., 2006 Jun, 62(6): 473-479).

35 Diversos efectos secundarios de IBP fueron reportados de los datos de control de drogas generados en España desde el 1 de enero al 31 de diciembre de 2004 por Salquero et al. (Salquero et al., Safety profile of proton pump inhibitors according to the spontaneous reports of suspected adverse reactions, Int. J. Clin. Pharmacol. Ther., 2006 Nov, 44 (11): 548-556)

40 Los alginatos, que tienen un mecanismo físico de acción (gelificación y espumación a pH ácido gástrico, en presencia de HCO₃⁻) son más seguros que los IBP, pero no son útiles en el tratamiento del reflujo esofágico no ácido (Zentlin et al., An evaluation of the antireflux properties of sodium alginate by means of combined multichannel intraluminal impedance and pH-metry, Aliment Pharmacol Ther. 2005; 21: 29-34).

45 Sobre la base de lo anterior y del hecho de que están aumentando las enfermedades como la ERGE, esofagitis por reflujo y enfermedades relacionadas (dispepsia, esofagitis, tumor esofágico, trastornos gastrointestinales, faringitis crónica, esófago de Barrett, adenocarcinoma esofágico, disfunciones pulmonares relacionadas con la ERGE) es altamente deseable encontrar un tratamiento seguro y efectivo para la prevención y terapia de tales enfermedades, evitando que el paciente experimente diferentes tratamientos al mismo tiempo para obtener un resultado terapéutico eficaz.

Descripción de la invención

50 La invención proporciona productos farmacéuticos, nutracéuticos, alimentos saludables y composiciones de dispositivos médicos capaces de cooperar de manera sinérgica con sustancias activas útiles en la prevención y terapia de enfermedades de reflujo esofágico ácido y no ácido y sus complicaciones clínicas. Estas composiciones se caracterizan por contener un extracto polisacárido de cladodios de *Opuntia Ficus Indica*, bicarbonato de sodio, ácido alginico o sales de alginato y extracto de hojas de *Olea Europaea*.

Opuntia Ficus Indica (Nopal) es una planta perteneciente a Cactaceae, nativa de México y del suroeste de Estados Unidos, pero diseminado incluso en vegetación mediterránea propagada naturalmente.

Las frutas y los cladodios más jóvenes (más tiernos) se utilizan desde la antigüedad para uso dietético (los cladodios se utilizan frescos, salados, escabechados, confitados, como mermelada e incluso como forraje) o para preparar bebidas alcohólicas.

En la medicina popular la planta se utiliza de muchas maneras: las frutas son astringentes y fueron utilizadas por los marineros para evitar el escorbuto, gracias a su contenido de vitamina C; los cladodios jóvenes se utilizan como cataplasma (calentados en horno) y como agentes emolientes; el uso de la pulpa de cladodios en heridas cutáneas y úlceras es un excelente remedio antiinflamatorio, reepitelizante y curativo. Representa un viejo remedio tradicional siciliano utilizado todavía hoy en día en la tradición del país. La decocción de flores tiene propiedades diuréticas.

Más recientemente se observó que: 1) los frutos de Opuntia Ficus Indica tienen propiedades antioxidantes marcadas (Tesoriere et al., Supplementation with cactus pear (Opuntia ficus-indica) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C, Am J Clin Nutr. 2004 Aug; 80(2): 391-395); 2) un extracto de Opuntia Ficus Indica es eficaz en la terapia para resaca por alcohol (Wiese J et al., Effect of Opuntia Ficus Indica on symptoms of the alcohol hangover, Arch Intern Med. 2004 Jun 28; 164(12): 1334-1340); 3) la alta concentración de polisacáridos en los cladodios de Opuntia, esencialmente formada por un polímero de galactosa, arabinosa y otros azúcares, tiene la propiedad de enlazar la grasa y los azúcares tragados (evitando así su absorción) mejorando así los metabolismos glicolipídicos y el síndrome metabólico; 4) Los mucilagos y pectinas de Opuntia Ficus Indica cladodios demostraron ser gastroprotectores en modelos animales experimentales (Vazquez-Ramirez R. et al., Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of Opuntia Ficus Indica mucilage, World J. Gastroenterol. 2006 Jul 21; 12(27): 4318-4324). Trombetta et al. (Trombetta D. and al., Effects of polysaccharides from Opuntia Ficus Indica (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat, Phytomedicine, 13 (2006) 352-358) observaron que los polisacáridos extraídos de los cladodios de Opuntia Ficus Indica tienen un efecto curativo cutáneo en la matriz celular.

Ahora se ha encontrado inesperadamente que los polisacáridos extraídos de los cladodios de Opuntia Ficus Indica ejercen actividades sinérgicas con bicarbonato de sodio, ácido alginico o sales de alginato y extracto de hojas de Olea Europaea en la prevención y tratamiento de la ERGE y sus complicaciones.

Por lo tanto, la invención proporciona formulaciones de productos farmacéuticos, nutracéuticos, alimentos saludables y dispositivos médicos adecuados para administración oral, que comprenden polisacáridos extraídos de cladodios de Opuntia Ficus Indica en combinación con bicarbonato de sodio, ácido alginico o alginatos, extracto de hojas de Olea Europaea para uso en la prevención y terapia de enfermedades del tracto gastrointestinal superior seleccionadas de ERGE, dispepsia, perturbaciones gastrointestinales, faringitis, esófago de Barrett, adenocarcinoma esofágico y disfunciones pulmonares relacionadas con ERGE. Las composiciones de la invención pueden contener o usarse en combinación con sustancias activas conocidas para prevenir y curar las mismas enfermedades, que se seleccionan entre agentes antiácidos, inhibidores de la bomba de protones, antagonistas H₂, agentes procinéticos, quitosanos, hidróxido de aluminio, carbonato de calcio o magnesio, y sus combinaciones.

Las composiciones de la invención permiten reducir la dosis de sustancias farmacológicamente activas y poseen alta seguridad terapéutica, lo cual es particularmente importante en niños, mujeres embarazadas y ancianos, o en aquellos casos en los que la terapia prolongada con AINES (Fármacos Anti-inflamatorios no Esteroides) es coadministrada.

Esto permite llevar a cabo un tratamiento tópicamente dirigido eficaz y seguro, capaz de prevenir o curar enfermedades del tracto gastrointestinal tales como dispepsia, esofagitis, tumor esofágico, esófago de Barrett, adenocarcinoma esofágico, disfunciones pulmonares relacionadas con la ERGE, también en combinación con otras terapias para las mismas enfermedades.

De acuerdo con la presente invención, el término "combinación" indica una asociación física o funcional de extractos y sustancias activas. En el primer caso (asociación física), los ingredientes activos son formulados en la misma composición con vehículos, excipientes u otros ingredientes adecuados para el propósito de uso. En este último caso (asociación funcional), los ingredientes activos pueden administrarse en composiciones separadas o por vías separadas, con el fin de alcanzar un efecto terapéutico combinado.

De acuerdo con la presente invención, pueden proporcionarse polisacáridos de cladodios de Opuntia Ficus Indica que están opcionalmente soportados por maltodextrinas (hasta un 50%) -en forma de mucilagos, que pueden aislarse mediante compresión de cladodios o por tratamiento con agua a temperatura ambiente-. Alternativamente, los cladodios se presan, el jugo así obtenido se centrifuga y el sobrenadante líquido se somete a ultrafiltración, obteniendo de este modo una solución acuosa enriquecida en polisacáridos (Peso Molecular superior a 10⁴ Da). Posteriormente, la solución acuosa se puede concentrar y secar. El contenido de polisacáridos en el extracto de

cladodio de *Opuntia ficus indica* generalmente oscila entre 1 y 70% en peso. Se ha estudiado y caracterizado la estructura y composición química del polisacárido de cladodio de *Opuntia ficus indica* (D. McGarvie, H. Parolis, Methylation analysis of the mucilage of *Opuntia ficus indic*. Carbohydrate Research, (1981) 88: 305-314; M.S. Karawya et al. Mucilages and Pectines of *Opuntia*, *Tamarindus* and *Cydonia*. *Planta Medica* (1980) Supplement: 68-75; M. E. Malainine et al. Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus indica*. Cellulose extraction and characterisation. Carbohydrate polymers (2003) 51:77-83).

Los mucilagos están hechos de residuos de ácido 1,4- α -D-galactopiranosil-urónico y 1,2- β -L-ramnopiranosidos que están unidos a cadenas cortas de 1,6- β -D-galactopiranososa en la posición 4 de todos los residuos de ramnopiranososa. La mayoría de los restos de galctósidos llevan cadenas en O-3 u O-4 que consisten principalmente en restos de arabinofuranósido, arabinofuranósido-xilopiranosido (D. McGarvie, H. Parolis, Methylation analysis of the mucilage of *Opuntia ficus indic*. Carbohydrate Research, (1981) 88: 305-314). Los mucilagos contenidos en los cladodios de *Opuntia ficus indica* generalmente se aíslan a través de un proceso de compresión (D. Trombetta et al. Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. *Phytomedicine* (2006) 13: 352-358) o por tratamiento con agua ((R. Vázquez-Ramírez et al. Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *World J Gastroenterol* (2006) 12(27):4318-4324).

Las composiciones de la invención pueden ser líquidas o sólidas, adecuadas para administración oral, preferiblemente en forma de soluciones orales, suspensiones orales, emulsiones orales, comprimidos, polvos y comprimidos para preparación extemporánea. Tal como se utiliza aquí, el término "dispositivo médico" significa un "dispositivo médico activo" (clase I) de acuerdo con la clasificación de la Directiva 93/42/CEE, Anexo IX.

Las composiciones de la invención pueden incluir conservantes, agentes tamponados iónicos y no iónicos y aditivos utilizados comúnmente en la preparación de composiciones orales.

Para composiciones orales líquidas tales como soluciones, suspensiones o emulsiones, el disolvente es preferiblemente agua o una solución acuosa de múltiples componentes compatible con el uso oral.

Las hojas de *Olea Europaea* se pueden extraer con disolventes acuosos o hidroalcohólicos (10-80% de etanol) a temperatura ambiente o calentando hasta 60-70 °C, o por tratamiento con microondas, ultrasonidos o por extracción líquida con sobrecalentamiento (Lee O.H. et al. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities *Bioresour Technol* (2009) Epub ahead of print; Mylonaki S. et al. Optimisation of the extraction of olive (*olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Canal Bioanal Chem.* (2008) 392(5): 977-85 ; Japón-Lujan R, Luque de Castro MD. Small branches of olive tree: a source of biophenols complementary to olive leaves. *J Agric Food Chem.* (2007) 30; 55(11): 4584-8; Vassiliki T Papat, Maria Z. Tsimidou. Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (*Olea europeae* L.) leaves. *J Agric Food Chem* 2009, 57, 3470-3477; Japón-Luján R, Luque de Castro MD. Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J Chromatogr A.* (2006) 1136(2): 185-91). El proceso de extracción hidroalcohólica puede repetirse varias veces para obtener un enriquecimiento en los biofenoles. Una vez terminada la extracción, se elimina el disolvente acuoso o hidroalcohólico al vacío a 40°C. Se puede obtener un enriquecimiento adicional en los biofenoles cargando el extracto seco sobre resinas de estireno y eluyendo con una solución de etanol/agua 50:50.

El extracto de hojas de *Olea Europaea* contiene fenoles (tirosoles, hidroxitirosoles y sus derivados), ácidos cinámicos, flavonoides (apigenina, luteolina y derivados glucosídicos de la misma, rutina, quercetina), lignanos, secoiridoides (oleurosidea, oleuropeína y sus derivados, ácido elenólico) y específicamente contiene el siguiente perfil polifenólico: 2-40% de flavonoides (apigenina, luteolina y derivados de los mismos), 0,5-10% de oleuropeína, 1-30% de hidroxitirosoles y derivados del mismo.

Los métodos para preparar composiciones farmacéuticas o nutracéuticas son conocidos en la técnica. El contenido de polisacáridos extraídos de *Opuntia Ficus Indica* oscila preferiblemente entre 0,5 y 50% p/p de las composiciones totales; los otros activos pueden estar en cantidades de 1 a 30%.

Los polisacáridos de *Opuntia ficus indica*, que se utilizan actualmente en las dietas, son adecuados y seguros para categorías particulares de pacientes, como personas mayores, niños o mujeres embarazadas.

Las condiciones patológicas que pueden beneficiarse del tratamiento con las composiciones de la presente invención son: reflujo gastroesofágico, la ERGE, dispepsia, esofagitis y tumor esofágico, perturbaciones gastrointestinales, faringitis crónica, esófago de Barrett, adenocarcinoma esofágico, disfunciones pulmonares relacionadas con la ERGE.

Breve descripción de las figuras

Otras características y ventajas de la presente invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción y ejemplos no limitantes con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Figura 1A: fotografía de cladodios y frutos de *Opuntia Ficus Indica*;

Figura 2: modelo in vitro de mucoadhesión;

5 Figura 3: comparación del efecto sinérgico de polisacáridos extraídos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica* con alginato de sodio con respecto a los componentes individuales en un modelo in vitro sobre células epiteliales de la mucosa bucal;

Figura 4: Mucoadhesión (porcentaje de inhibición de la unión de lectina después del tratamiento) para cada sustancia ensayada comparada en la Fig. 3.

10 Figura 5: efecto antiulcerogénico gástrico de diferentes sustancias o combinación de sustancias probadas en diferentes modelos experimentales de úlcera gástrica química en ratas. Los datos se reportan como media \pm DS de 6 animales; entre paréntesis el porcentaje de inhibición comparado con el grupo de control.

15 Figura 6: efecto esofágico antiulcerogénico de diferentes sustancias o combinación de sustancias probadas en un modelo de reflujo gastroesofágico inducido quirúrgicamente. Los datos se reportan como media \pm DS de 6 animales; entre paréntesis el porcentaje de inhibición comparado con el grupo de control.

Ejemplos de composiciones de acuerdo a la invención se describen en las siguientes tablas.

Tabla 1: polvo oral (bolsas) 2

Componentes	%
Alginato de Sodio	10-20 g
Bicarbonato de Sodio	5-10 g
Extracto de hojas de <i>Olea Europeae</i>	5-20 g
Polisacáridos de cladodios de <i>Opuntia Ficus Indica</i>	1-20 g

Tabla 2: Cápsula 2

Componentes	mg/cápsula
Clorhidrato de ranitidina	84 mg
ácido algínico	500.0 mg
Polisacáridos de cladodios de <i>Opuntia Ficus Indica</i>	200 mg
Extracto de hojas de <i>Olea Europaea</i>	200 mg
Bicarbonato de Sodio	165.25 mg
Estearato de Magnesio	0.75 mg
Relleno	350 mg

20 Determinación in vitro de mucoadhesión de polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica* solos y en combinación con ácido algínico sobre las células epiteliales de las mucosas bucales

25 Con el fin de evaluar la capacidad mucoadhesiva de los polisacáridos de los cladodios de *Opuntia Ficus Indica*, el ensayo de mucoadhesión in vitro descrito por Patel (Patel D. and al., An in vitro mucosal model predictive of bioadhesive agents in the oral cavity. J Control Release, 1999, 61(1-2): 175-183) se aplicó a las células epiteliales suspendidas de la mucosa bucal. En esta prueba, se determina la mucoadhesión (capacidad de adhesión de las sustancias sometidas a prueba a las células mucosas) como una función de la inhibición de enlace a la glicoproteína de la membrana lectina inducida por el enmascaramiento de la superficie celular debido a la sustancia mucoadhesiva.

30 Materiales y Métodos

El tratamiento de las células mucosas con lectina biotilada y peroxidasa de estreptavidina confiere un color amarillo a la muestra; el pretratamiento de las células mucosas con una sustancia mucoadhesiva (30 °C, durante 15 minutos antes del tratamiento con lectina) oculta el sitio de enlace de la lectina, reduciendo la intensidad final de coloración amarilla.

5 La lectina es una proteína contenida en algunas plantas de Leguminosae (*Canavalia ensiformis*), con alta tendencia a enlazar residuos glucosídicos y manosídicos de las glicoproteínas de membrana; la biotina (vitamina H) se une a la lectina a través de la peroxidasa de estreptavidina que se añade a la suspensión celular para obtener el complejo de de proteína-glucosa-lectina-biotina-estreptavidina peroxidasa.

10 Por adición de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (d-of) y peróxido de hidrógeno a la suspensión celular, el d-of es oxidado por el complejo de proteína-glucosa-lectina-biotina-estreptavidina peroxidasa a 2,3-diaminofenazina y la muestra se vuelve amarilla (Fig. 2)

La reacción es entonces bloqueada después de 1 minuto añadiendo 1M de H₂SO₄. La intensidad del color se lee en el espectrofluorímetro y está proporcionalmente relacionada con la unión entre lectina y residuos glucosídicos en la membrana celular.

15 Se obtuvieron células de la mucosa bucal de voluntarios sanos, hombres y mujeres, raspando suavemente la mejilla interior con una espátula de madera. Las células luego se retiraron y se suspendieron en 10 ml de Tris isotónico 0,05M (TBS) pH 7,6 (Patel D. et al., An in vitro mucosal model predicative of bio-adhesive agents in the oral cavity. J Control Release, 1999, 61(1-2): 175-183). A continuación se añadió una muestra de suspensión (0,1 ml de azul de tripano al 0,5% (p/v)) y se determinó el número total de células usando un hemocitómetro: cada muestra contenía 48
20 x 10⁴ células de mucosa bucal. Los polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica* y el alginato de sodio se solubilizaron en solución isotónica de NaCl al 0,9% a 0,5% p/v y estas soluciones se utilizaron entonces para el pretratamiento de células de mucosa bucal. Los resultados se expresan como porcentaje de la sustancia ensayada y la unión de las células de la mucosa, que es inversamente proporcional al porcentaje de reducción de la coloración de la muestra en comparación con el control.

25 El experimento completo se repitió 5 veces para el control y para cada sustancia ensayada.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba post hoc de Bonferroni.

Resultados

30 Como se muestra en las Figuras 3 y 4, el ensayo muestra una mucoadhesión de 55,81% de polisacáridos de *Opuntia Ficus Indica* a las células suspendidas de la mucosa bucal, significativamente mayor que la observada con el alginato de sodio (mucoadhesión 5,36%, p <0,05). Se observó además que al añadir alginato de sodio a los polisacáridos de los cladodios de *Opuntia ficus Indica*, la mucoadhesión alcanza el 74,83%.

Conclusiones

35 Los resultados obtenidos con el ensayo in vitro de mucoadhesión mostraron que los polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica* presentan mayor mucoadhesión que la observada con alginato de sodio. Además, se encontró inesperadamente que la combinación de estas sustancias determina un efecto sinérgico que garantiza una actividad mucoadhesiva fortalecida.

Evaluación in vivo de la actividad antiulcerosa de una composición que contiene alginato de sodio/antiácido/polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica*/extracto de hojas de *Olea Europaea*

40 El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antiulcerosa de la combinación de alginato de sodio/antiácido, polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica* y extracto de hojas de *Olea Europaea* en un modelo animal de úlcera (ratas) inducida por etanol e indometacina.

Materiales y métodos

45 Protocolo experimental para la evaluación de 5 composiciones de prueba en comparación con el vehículo: combinación de alginato/antiácido (A), polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica* (B), extracto de hojas de *Olea Europaea* (C), combinación de alginato/antiácido/polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica* (D), combinación de alginato/antiácido/polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica*/extracto de hojas de *Olea Europaea* (E) y suspensión de Carbopol 919 0,3% p/v en agua como vehículo (F).

50 Cada muestra se obtuvo por suspensión acuosa (concentraciones indicadas en la Tabla 7) y se administró con una bomba oral (1 ml 100 g de peso).

Tabla 3: composiciones de prueba

Componentes	Composiciones (% p/v)					
	A	B	C	D	E	F
Alginato de Sodio	5	-	-	5	5	-
Bicarbonato de Sodio	2.67	-	-	2.67	2.67	-
polisacáridos de cladodios de Opuntia Ficus Indica	-	2	-	2	2	-
Extracto de hojas de Olea Europeae	-	-	1	-	1	-
Carbopol 919						0.3

5 El experimento se realizó en ratas adultas Wistar (*Rattus norvegicus*), con un peso de 180 a 200 g. Los animales fueron expuestos a la luz natural (ciclos de 12:12 horas de luz y noche) en temperatura controlada (24 ± 1 °C) y condiciones de humedad ($60\% \pm 4$), y se suministró un estándar de alimentos y agua (rata GLP Morini Mill) ad libitum durante una semana. Los animales fueron entonces privados de alimento por 24 horas, y de agua por 2 horas antes del inicio del experimento (F. Vitali, Antilcer potential of a standardized extract of red orange juice in the rat, *Int J Food Properties*, 10, 331-344, 2007).

Modelo experimental de ulcera causada por etanol

10 Los animales se dividieron aleatoriamente en 6 grupos (1-6) de 6 animales cada uno. El grupo 1 se usó como control y se trató con el vehículo (muestra F, Carbopol 919 0,3% p/v carbonato de calcio 1% p/v en agua destilada neutralizada con NaOH, 1 ml/100 g de peso) y, después de 1 hora, con el agente ulcerogénico: etanol absoluto 1 ml/rata; a los grupos 2-6 se les administró por vía oral las muestras A (767 mg/kg peso, Grupo 2), B (200 mg/kg peso-Grupo 3), C (100 mg/kg peso-Grupo 4), D (967 mg/kg Peso-Grupo 5) y E (1067 mg/kg peso-Grupo 6). Después de 1 hora desde la administración de las muestras A-E, los animales de los grupos 2-6 recibieron 1 ml/animal de etanol absoluto, para inducir la úlcera. 1 hora después del tratamiento con etanol, todos los animales se anestesiaron con éter dietílico y se sacrificaron. Después se retiró el estómago de cada animal, se cortó al nivel de la curva grande y se aclaró suavemente con solución de NaCl al 0,9%, sin eliminar la mucosa superficial.

Modelo experimental de ulcera causada por Indometacina

20 Los animales se dividieron aleatoriamente en 6 grupos (1-6) de 6 animales cada uno. A los animales del Grupo 1 (control) se les administró por vía oral el vehículo (muestra F, Carbopol 919 0,3% p/v carbonato de calcio 1% p/v en agua destilada neutralizada con NaOH, 1 ml/100 g peso) y después de 1 Hora, el agente ulcerogénico indometacina (suspensión en agua destilada que contiene carboximetilcelulosa al 1%) a una dosis de 0,03 g/Kg, (1 ml/Kg peso) s.c. Los grupos 2-6 se trataron como se describió anteriormente para la úlcera inducida por etanol, con las muestras A-E y, después de 1 hora, con suspensión de indometacina. Después de 5 horas del tratamiento con indometacina, los animales se anestesiaron con éter dietílico y se sacrificaron. Después se retiró el estómago de cada animal y se analizó como se describe en el experimento con etanol.

Evaluación de la eficacia de las composiciones analizadas

30 Se analizó visualmente la superficie de la mucosa gástrica. La longitud (mm) de cada lesión en la mucosa se determinó usando una escala arbitraria (Tabla 8).

35 En ambos modelos experimentales, se calculó entonces el índice de ulceración (I.U) para cada estómago, añadiendo las puntuaciones asignadas a la úlcera y el Porcentaje de Inhibición de la úlcera (P.I.U.): $[(I.U._{Control} - I.U._{Muestra}) / I.U._{Control}] * 100$. Los datos se expresan como una media aritmética \pm SEM para cada grupo; La relevancia de los datos se analizó por medio de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn. Se consideró relevante un valor de $p < 0,05$.

La puntuación de la evaluación de la úlcera para los 2 modelos se presenta en la Tabla 8.

Resultados

40 Los resultados de estos experimentos se ilustran en la Fig. 5. En ambos modelos experimentales el Porcentaje de Inhibición de la Ulceración (PIU) obtenido con el grupo D (tratado con la combinación de alginato de sodio/antiácido/polisacáridos de cladodios de Opuntia Ficus Indica) es mayor que el obtenido con los componentes individuales de la misma combinación y superior a la suma de sus P.I.U.s, lo que indica un efecto sinérgico de la

combinación de sustancias individuales. Inesperadamente, la adición de extracto de hojas de *Olea Europaea* (grupo E) aumenta la P.I.U. Por más de la suma de P.I.U.s del extracto de hojas de *Olea Europaea* como componente individual y la combinación de alginato de sodio/antiácido/polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica*, revelando su acción sinérgica.

5 Tabla 4: Evaluación de la úlcera en los modelos de úlcera inducida químicamente

Puntuación	Lesión
0	Sin úlcera
0.5	Hiperemia
1	Manchas hemorrágicas
2	1-5 úlceras pequeñas
3	Muchas úlceras pequeñas
4	1-5 úlceras pequeñas y 1-3 úlceras grandes
5	Muchas úlceras pequeñas y grandes
6	Estómago lleno de úlceras junto con perforación

Conclusiones

10 Este ensayo in vivo reveló una potenciación sinérgica inesperada del efecto del alginato de sodio/antiácido determinado por polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica*. El efecto sinérgico es aún más potenciado por el extracto de hojas de *Olea Europaea*. Las lesiones de úlcera observadas en animales que recibieron tratamientos convencionales (alginato de sodio mas bicarbonato de sodio) obtuvieron una puntuación muy alta en comparación con los animales tratados con la combinación de la invención, demostrando un efecto sinérgico de sus componentes individuales.

15 Evaluación in vivo de la combinación de alginato de sodio/antiácido/polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica*/extracto de hojas de *Olea Europaea* para reducir el reflujo gastroesofágico inducido quirúrgicamente (ligadura pilórica)

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de la combinación de alginato de sodio/antiácido/polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica* agregado con extracto de hojas de *Olea Europaea* en reducir el reflujo gastroesofágico inducido quirúrgicamente por una ligadura pilórica en ratas.

20 La reducción del reflujo gastroesofágico se midió a partir de las úlceras esofágicas en animales tratados con las combinaciones activas después de la inducción quirúrgica.

25 Ratas adultas Wistar (*Rattus norvegicus*) de 180 a 200 gramos de peso, fueron divididas aleatoriamente en 6 grupos (1-6), cada uno de 6 animales. De acuerdo con el protocolo experimental descrito por Min (Min et al.: The effects of apigenin-7-O-β-D-glucurono-pyranoside on reflux oesophagitis and gastritis in rats, *Autonomic & autacoid Pharmacology* 2005 Jul;25(3):85-91; Hayakawa T. et al.: Roles of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 in rat acid reflux oesophagitis, *Gut* 2006, 55: 450-456), los animales fueron anestesiados con pentobarbital y la esofagitis por reflujo ácido fue inducida ligando la región de transición entre la parte superior y la porción glandular y envolviendo el duodeno cerca del píloro. El grupo 1 (no tratado) fue el control positivo. Los grupos 2-6 se trataron intraduodenalmente con las composiciones A-E inmediatamente después de la ligadura del píloro y de la cresta limitante, usando las mismas dosis que en los modelos de úlcera inducida químicamente descritos anteriormente. Posteriormente, se realizó una cardiomiectomía longitudinal de aproximadamente 1 cm a través de la unión gastroesofágica para mejorar el reflujo desde el estómago hacia el cuerpo esofágico. Después de 30 6 h, los animales se sacrificaron bajo anestesia con éter dietílico y se recogió el esófago y el área total de las lesiones tuvo un puntaje según se indica en la Tabla 9.

35 El índice de ulceración final (I.U.) y el P.I.U. para cada grupo se calcularon como se ha descrito anteriormente

Tabla 5: Evaluación de las lesiones de la mucosa esofágica

Puntuación	Área total (mm ²)
0	No hay lesiones visibles

1	Escasas lesiones
2	Área total de lesiones ≤ 30 mm^2
3	Área total de lesiones ≥ 30 mm^2
4	Perforación

Resultados

5 Los resultados de este experimento se reportan en la Figura 6. Este modelo experimental confirmó el mayor Porcentaje de Inhibición de la Ulceración (P.I.U.) obtenido con el grupo D (tratado con el alginato de sodio/antiácido/polisacáridos de cladodios de Opuntia Ficus Indica) que el observado en los grupos experimentales tratados con los componentes individuales e incluso superior a la suma de sus P.I.U.s, revelando un marcado efecto sinérgico de la combinación de alginato de sodio/antiácido/polisacáridos de cladodios de Opuntia Ficus Indica en la reducción del reflujo gastroesofágico. Además la adición del extracto de hojas de Olea Europeae a esta combinación (grupo E) aumentó el P.I.U. a un nivel superior a la suma de los P.I.U.s del extracto de hojas de Olea Europaea como componente individual y la combinación D., confirmando los resultados obtenidos en los modelos de úlcera gástrica inducidos químicamente.

Conclusiones

15 Este ensayo in vivo muestra que el extracto de los cladodios de Opuntia Ficus Indica tiene un efecto potenciador en la reducción del reflujo gastroesofágico. Este efecto se incrementa aún más mediante la adición de extracto de hojas de Olea Europaea.

Reivindicaciones

1. Una composición que contiene polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica*, bicarbonato de sodio, ácido algínico o sales de alginato y extracto de hojas de *Olea Europaea*, para uso en la prevención y terapia de enfermedades del tracto gastrointestinal superior, donde dichas enfermedades se seleccionan entre la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), dispepsia, trastornos gastrointestinales, faringitis, esófago de Barrett, adenocarcinoma esofágico y síntomas pulmonares relacionados con la ERGE.
2. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichos polisacáridos de cladodios se proporcionan como mucílagos, zumo de cladodio o como solución acuosa de jugo de cladodio (ultra)filtrada, que se concentra y seca opcionalmente.
3. Una composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en la que dichos polisacáridos de cladodios están en cantidades de 0,5% a 50% por peso de la composición.
4. Una composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, que es adecuada para administración oral.
5. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 4, que está en forma de preparación farmacéutica o nutracéutica, alimento saludable o composición de dispositivo médico.
6. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 5, que está en forma de solución, suspensión, emulsión, tableta, cápsula, polvo o bolsa para la preparación extemporánea de suspensión oral o emulsión oral.
7. Una composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, que contiene además sustancias activas conocidas para prevenir y curar las mismas enfermedades que se seleccionan entre agentes antiácidos, inhibidores de la bomba de protones, antagonistas H₂, agentes procinéticos, quitosanos, hidróxido de aluminio, carbonato de calcio o magnesio.
8. Una composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, que se selecciona del grupo que consiste en:

C)

Polvo	
Alginato de Sodio	10-20 g
Bicarbonato de Sodio	5-10 g
Extracto de hojas de <i>Olea Europeae</i>	5 – 20 g
Polisacáridos de cladodios de <i>Opuntia Ficus Indica</i>	1-20 g

E)

Cápsula	mg/cápsula
Clorhidrato de ranitidina	84 mg
ácido algínico	500.0 mg
Polisacáridos de cladodios de <i>Opuntia Ficus Indica</i>	200 mg
Extracto de hojas de <i>Olea Europaea</i>	200 mg
Bicarbonato de Sodio	165.25 mg
Estearato de Magnesio	0.75 mg
Relleno	350 mg

9. Una preparación combinada que contiene polisacáridos de cladodios de *Opuntia Ficus Indica*, bicarbonato de sodio, ácido algínico o sales de alginato y extracto de hojas de *Olea Europaea*, para uso simultáneo o separado en la prevención o tratamiento de una condición, enfermedad o disfunción del tracto gastrointestinal superior, que es seleccionado de la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), dispepsia, trastornos gastrointestinales, faringitis, esófago de Barrett, adenocarcinoma esofágico y síntomas pulmonares relacionados con la ERGE.



Fig. 1

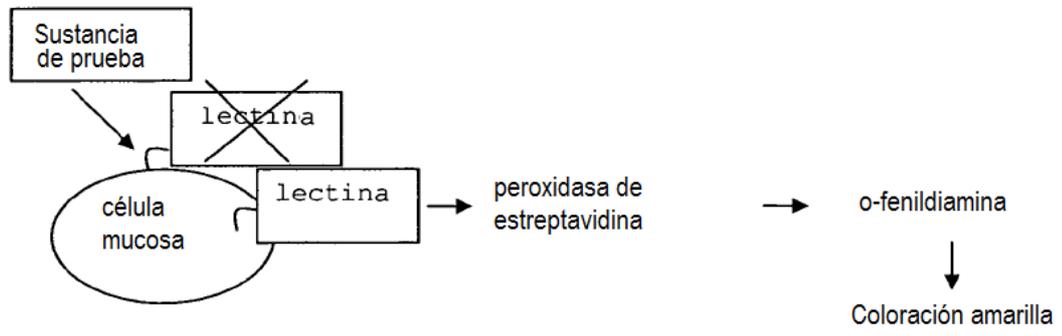


Fig. 2

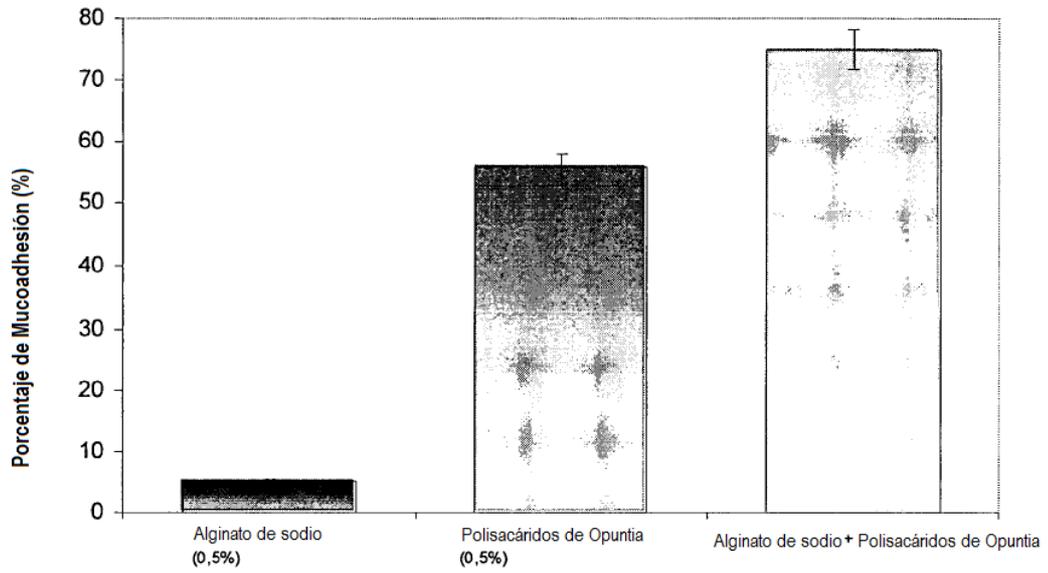


Fig. 3

Muestra	Valor de porcentaje de mucoadhesión (% \pm DS)
Alginato de sodio 0.5%	5.36 \pm 0.24
Polisacáridos de cladidos de Opuntia ficus indica 0.5%	55.81 \pm 2.34*
Alginato de sodio 0.5% + Polisacáridos de cladidos de Opuntia ficus indica 0.5%	74.83 \pm 3.10**

Fig. 4

Tratamiento y dosis	Índice de ulceración (porcentaje de inhibición)	
	Etanol	Indometacina
F (control)	5.80±0.22	5.11±0.26
A (alginato/bicarbonato)	4.65±0.18* (19.31)	4.13±0.26* (19.17)
B (polisacáridos de <i>O. ficus indica</i>)	5.14±0.24* (11.37)	4.32±0.18* (15.48)
C (extracto de <i>hojas de O. aves europea</i>)	5.25±0.28* (9.48)	4.35±0.22* (14.87)
D (alginato/bicarbonato/ <i>polisacáridos de O. ficus indica</i>)	3.70±0.29** (36.20)	3.41±0.15** (33.26)
E (alginato/bicarbonato/ <i>polisacáridos de O. ficus indica</i> / extracto de <i>hojas de O. europea</i>)	2.03±0.36** § (65.00)	1.42±0.18** § (72.21)

* $P < 0.05$ versus control, ** $P < 0.01$ versus control

§ $P < 0.05$ versus D (alginato/bicarbonato/
polisacáridos de O. ficus indica)

Fig. 5

Tratamiento	Índice de ulceración (porcentaje de inhibición)
	Ligadura pilórica
F (control)	4.68±0.25
A (alginato/bicarbonato)	3.72±0.33 * (20.51)
B (polisacáridos de <i>O. ficus indica</i>)	4.05±0.36 * (13.46)
C (extracto de hojas de <i>O. europea</i>)	3.84±0.29 * (17.94)
D (alginato/bicarbonato/ <i>polisacáridos de O. ficus indica</i>)	3.07±0.31 ** (34.40)
E (alginato/bicarbonato/ <i>polisacáridos de O. ficus indica</i> / extracto de hojas de <i>O. europea</i>)	1.65±0.24 ** § (64.95)

* $P < 0.05$ versus control, ** $P < 0.01$ versus control

§ $P < 0.05$ versus D (alginato/bicarbonato/
polisacáridos de O. ficus indica)

Fig. 6