

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 115**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/606** (2006.01)

**A61K 31/455** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2014 PCT/EP2014/077637**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15086838**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2014 E 14818934 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3079704**

54 Título: **Una composición farmacéutica que contiene combinaciones de nicotinamida y ácido 5-aminosalicílico para influir de forma beneficiosa en la microbiota intestinal y/o tratar la inflamación gastrointestinal**

30 Prioridad:

**13.12.2013 EP 13197261**

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

**10.06.2019**

73 Titular/es:

**CONARIS RESEARCH INSTITUTE AG (100.0%)  
Schauenburgerstrasse 116  
24118 Kiel, DE**

72 Inventor/es:

**WÄTZIG, GEORG y  
SEEGERT, DIRK**

74 Agente/Representante:

**ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María**

ES 2 716 115 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**

Una composición farmacéutica que contiene combinaciones de nicotinamida y ácido 5-aminosalicílico para influir de forma beneficiosa en la microbiota intestinal y/o tratar la inflamación gastrointestinal

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una nueva composición farmacéutica y a un régimen de tratamiento que contienen combinaciones de nicotinamida o de compuestos relacionados y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) o compuestos relacionados. Se cree que estas combinaciones influyen de forma beneficiosa en la microbiota intestinal. La composición farmacéutica se puede liberar específicamente (por ejemplo, liberar de forma selectiva) en el intestino delgado y/o el intestino grueso.

10

**Antecedentes**

15

Muchas enfermedades inflamatorias de la pared intestinal están provocadas o influenciadas por cambios en la microbiota intestinal y/o por una interacción alterada entre la microbiota intestinal y el intestino. Dichas inflamaciones intestinales se producen en los seres humanos, por ejemplo, enfermedades inflamatorias intestinales (EII), tales como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, pero también en otros mamíferos (por ejemplo, la colitis idiopática crónica en perros). Estas enfermedades se basan en procesos inmunológicos complejos que no se comprenden completamente.

20

Sin embargo, los cambios y las interacciones alteradas de la microbiota intestinal también pueden ser factores causantes de varias otras enfermedades. Los ejemplos incluyen enfermedades atópicas, tal como el eccema atópico, afecciones alérgicas o asma (véase, por ejemplo, Bisgaard *et al.* 2011, *J. Allergy Clin. Immunol.* 128:646; Iebba *et al.* 2011, *Dig. Dis.* 29:531; Abrahamsson *et al.* 2012, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129:434; Candela *et al.* 2012, *BMC Microbiol.* 12:95; Olszak *et al.* 2012, *Science* 336:489), así como enfermedades metabólicas con un componente inflamatorio, tales como la arterioesclerosis con la cardiopatías coronarias resultantes, obesidad o diabetes (Ott *et al.* 2006, *Circulation* 113:929; Koren *et al.* 2011, *PNAS* 108 Supl. 1:4592; para revisiones véase Caesar *et al.* 2010, *J. Intern. Med.* 268:320; y Vrise *et al.* 2010, *Diabetologia* 53:606).

25

30

Aunque los datos indican una relación patológica o fisiopatológica entre la microbiota intestinal y diversas enfermedades, no se ha entendido cómo influir en la microbiota de un modo que pudiera tener un efecto beneficioso sobre las enfermedades asociadas.

35

La nicotinamida (amida del ácido nicotínico) y el ácido nicotínico relacionado (niacina, vitamina B3) se han utilizado durante décadas para la terapia de enfermedades por deficiencia de niacina (por ejemplo, pelagra). Se sabe que la pelagra puede estar acompañada de una inflamación intestinal, que mejora después de la administración de niacina, donde el principio terapéutico es restablecer los cofactores de vitaminas necesarios para el crecimiento, diferenciación y desarrollo normales de las células intestinales (Segal *et al.* 1986, *Int. J. Colorectal Dis.* 1:238; y Clayton *et al.* 1991, *Eur. J. Pediatr.* 150:498).

40

Las formulaciones que contienen 5-ASA también se han utilizado durante décadas en la terapia de la EII, en particular en la colitis ulcerosa (revisado recientemente por: Sonu *et al.* 2010, *Gastroenterol. Clin. North Am.* 39:559; Klotz 2012, *Arzneimittelforschung/Drug Research* 62:53). El documento WO008/044099 divulga complejos de CTC del ASA con nicotinamidas protonadas como un compuesto de amonio cuaternario. El mecanismo de acción del 5-ASA todavía no está claro, pero se considera que es una influencia multifactorial sobre el sistema inmunitario y los procesos inflamatorios en la mucosa inflamada.

45

**Sumario de la invención**

50

El objeto de la presente invención es proporcionar nuevas formas de tratamientos para la terapia y/o la profilaxis de enfermedades en seres humanos y animales, asociadas con cambios en la microbiota intestinal y/o una interacción alterada entre la microbiota intestinal y el intestino, donde muchas de estas enfermedades están asociadas con inflamación intestinal.

55

De acuerdo con la invención, el problema anterior se resuelve mediante una composición farmacéutica o un régimen de tratamiento que abarca combinaciones de 5-ASA y nicotinamida u otro compuesto descrito en el presente documento, que influye de forma beneficiosa en la microbiota intestinal y su interacción con el intestino. La combinación puede estar presente en la misma forma farmacéutica o en formas farmacéuticas distintas, que pueden administrarse de forma simultánea o secuencial. En realizaciones preferentes, se administran uno o ambos de nicotinamida y 5-ASA para influir de forma local en la mucosa intestinal y la microbiota intestinal (por ejemplo, la otra sustancia activa se administra opcionalmente de forma sistémica o solo se libera en parte en la parte inferior del intestino delgado y/o el colon). Por ejemplo, la sustancia activa se formulada para administrarla de forma selectiva en el intestino delgado inferior y/o el colon, preferentemente en el íleon terminal y/o el colon, donde se encuentra la microbiota intestinal a modificar. La presente invención también contempla otras sustancias activas que se convierten

60

65

en nicotinamida en un cuerpo animal (por ejemplo, un cuerpo humano).

Por consiguiente, se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen nicotinamida y 5-ASA. Estas dos sustancias actúan en combinación entre sí de una manera antiinflamatoria y/o beneficiosa. Aunque los inventores no desean quedar ligados a teoría alguna, se cree que el mecanismo incluye un efecto sobre la microbiota en el intestino delgado y/o el intestino grueso; este efecto puede ser del todo o principalmente debido a la nicotinamida o compuestos relacionados. La composición es adecuada para la administración oral con liberación controlada y/o retardada del principio activo, para una eficacia local o tópica específica en el intestino delgado inferior y/o el colon, preferentemente en el íleon terminal y/o el colon. Las afecciones ejemplares tratadas incluyen la terapia o profilaxis de enfermedades inflamatorias del intestino delgado, enfermedades inflamatorias del intestino grueso, profilaxis del carcinoma de colon, y la terapia o profilaxis de otras enfermedades que son el resultado de cambios en la microbiota intestinal y/o de una interacción alterada entre la microbiota intestinal y el intestino. La composición también es adecuada para la administración (neo)rectal en el colon o el reservorio ileal para la terapia local y/o tópica de enfermedades inflamatorias del intestino grueso o de la reservoritis.

La invención también incluye métodos para tratar una o más de las enfermedades y afecciones descritas en el presente documento con una composición farmacéutica descrita en el presente documento. Además, la invención proporciona el uso de una composición farmacéutica descrita en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar una o más de las enfermedades y afecciones descritas en el presente documento.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las puntuaciones histológicas de la mucosa colónica de ratones expuestos a colitis por dextrano sulfato de sodio (DSS) y tratados con una formulación de gránulos de liberación controlada de NAM mezclada en la dieta en dos dosis (30 o 60 mg/kg; etiquetadas NAM 30 y NAM 60, respectivamente) sin o con una formulación de gránulos de liberación controlada de 5-ASA también mezclada en la dieta (dosis: 150 mg/kg). \*,  $p < 0,05$  frente al control; \*\*,  $p < 0,01$  frente al control.

La Figura 2 muestra el índice de actividad de enfermedad (DAI, forma siglada de *disease activity index*) combinado de los resultados de la puntuación de inflamación macroscópica, la consistencia de las heces (diarrea) y la presencia de sangre oculta en las deposiciones de ratones expuestos a dextrano sulfato de sodio (DSS) en una dieta normal suplementada con distintas dosis y combinaciones de gránulos de liberación controlada que contienen NAM o 5-ASA. \*,  $p < 0,0001$  frente al control (DSS); #  $p < 0,0001$  frente al valor inicial indicado.

La Figura 3 muestra los resultados de los parámetros individuales de los datos del índice de actividad de enfermedad (DAI) presentados en la Figura 2, en concreto la puntuación de inflamación macroscópica (A), la consistencia de las heces (diarrea) (B) y la presencia de sangre oculta en las deposiciones (C). \*,  $p < 0,0001$  frente al control (DSS); #  $p < 0,0001$  frente al valor inicial indicado.

### Descripción detallada

La esencia de la invención es una composición farmacéutica o un régimen de tratamiento que comprende (i) una, dos o más sustancias activas seleccionadas de ácido nicotínico (NA); nicotinamida (NAM); un compuesto, por ejemplo, hexanicotinato de inositol, que se convierta en el cuerpo de un animal (por ejemplo, un cuerpo humano) en nicotinamida; nicotinamida adenina dinucleótido (NAD); nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP); un intermediario en la biosíntesis de NAD o NADP, para influir de forma beneficiosa en la microbiota intestinal en combinación con (ii) 5-ASA o un compuesto que se metabolice en 5-ASA. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se formula preferiblemente para influir de forma beneficiosa en la microbiota intestinal. Las formas de dosificación farmacéutica están diseñadas opcionalmente para una liberación retardada, de forma que se liberen (por ejemplo, se liberen parcialmente, se liberen de forma selectiva) en el intestino delgado inferior, preferentemente en el íleon terminal, el colon o en ambos.

Como se usa en el presente documento, el "intestino delgado inferior" es la segunda mitad del intestino delgado y el "íleon terminal" es la segunda mitad del íleon.

Se ha demostrado anteriormente que la liberación tópica de nicotinamida en el intestino delgado inferior y/o el colon utilizando distintas formulaciones de liberación controlada y retardada tiene un efecto antiinflamatorio sorprendente al influir en la microbiota intestinal (la totalidad de todos los microorganismos en los intestinos, en particular las bacterias) (documento PCT/EP2013/062363). Posteriormente, se ha demostrado que el mecanismo detrás de este efecto sorprendente implica cambios inducidos por la nicotinamida en el patrón de secreción de péptidos antimicrobianos en el intestino, lo que sustenta el mantenimiento y/o la regeneración de la microbiota intestinal normal y saludable (Hashimoto *et al.* 2012, Nature 487:477). Hashimoto *et al.* demostraron que la malabsorción del triptófano en ratones conduce a una gravedad significativamente aumentada de la colitis inducida por el irritante dextrano sulfato de sodio (DSS). La suplementación alimenticia de triptófano o nicotinamida previno este aumento de la colitis. Hashimoto *et al.* demostraron que la susceptibilidad aumentada a la colitis grave se debía a un cambio en el microbioma intestinal, el cual, cuando se trasplantaba a otros ratones, también aumentaba la gravedad de la colitis en los receptores. Se

encontró que el cambio perjudicial en el microbioma intestinal se debía a las cantidades fuertemente reducidas de determinados péptidos antimicrobianos (los AMP, forma siglada de *antimicrobial peptides*), especialmente alfa-defensinas, cuya expresión en células epiteliales del íleon terminal estaba controlada en gran medida por la señalización de mTOR inducida por triptófano o nicotinamida.

5 Los inventores ahora han reconocido que una combinación de nicotinamida y 5-ASA tiene un efecto antiinflamatorio sorprendentemente superior, en donde se cree que este efecto superior es el resultado de una adición de los efectos de los dos principios activos y/o un efecto sinérgico de los ingredientes. La microbiota intestinal alterada después de la administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención tiene menos efecto estimulante de la inflamación o es antiinflamatoria, provocando y/o sustentando así una clara reducción de los síntomas de la EII, tales como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, en seres humanos o en otros mamíferos (por ejemplo, la colitis idiopática crónica en perros).

15 Por lo tanto, como se usa en el presente documento, "influir de forma beneficiosa en la microbiota intestinal" se refiere a provocar un cambio en la microbiota intestinal que tiene un impacto beneficioso sobre la salud, especialmente sobre una o más de las enfermedades y afecciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, los impactos beneficiosos se asocian con la reducción del número de bacterias patógenas, la reducción de la relación de las bacterias patógenas con respecto a las bacterias beneficiosas, el aumento de la diversidad de la microbiota, la reducción de la cantidad de inflamación que la microbiota induce en el intestino y la inversión de forma parcial o completa de cambios patológicos en el enterotipo de la microbiota (por ejemplo, enterotipos asociados con *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus*). Las bacterias generalmente consideradas como patógenas en las enfermedades inflamatorias intestinales incluyen, por ejemplo, a *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, *Escherichia coli*), con propiedades invasivas o factores de virulencia, *Desulfotribium* spp. productoras de sulfuro y *Fusobacterium* spp con propiedades invasivas. Las bacterias consideradas generalmente como beneficiosas incluyen especies de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Faecalibacterium*, tales como *L. casei*, *L. plantarum* y *F. prausnitzii*. Para una revisión reciente de la microbiota intestinal en las enfermedades inflamatorias intestinales, véase Manichanh *et al.* 2012, Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 9:599.

30 Debido a que la inflamación intestinal crónica aumenta fuertemente el riesgo de desarrollar carcinoma de colon (para una revisión véase, por ejemplo, Ullman y Itzkowitz 2011, Gastroenterology 140:1807), un uso de la composición de acuerdo con la invención es también la profilaxis del carcinoma de colon en el caso de una inflamación intestinal crónica o recurrente.

35 La intervención terapéutica mediante el establecimiento o el restablecimiento de una microbiota intestinal normal o mediante la suplementación de bacterias beneficiosas ha demostrado ser eficaz en diversos modelos de enfermedad y en las enfermedades humanas respectivas. Por ejemplo, Olszak *et al.* (Science 2012, 336:489) recientemente demostraron que la acumulación patológica de linfocitos T citolíticos naturales invariantes en órganos enfermos en modelos murinos sin gérmenes de EII o de asma se puede prevenir mediante la colonización de ratones neonatos con una microbiota normal. En distintas enfermedades, los estudios han demostrado los efectos beneficiosos de determinados pre-, pro- o simbióticos. Por ejemplo, los lactobacilos pueden reducir los niveles sanguíneos de colesterol en la obesidad, pero el mecanismo aún no está completamente claro (revisado por Caesar *et al.* 2010, J. Intern. Med. 268:320). En enfermedades inflamatorias del intestino, algunos probióticos como VSL#3 (una mezcla de *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) se han utilizado de forma satisfactoria en un número limitado de estudios clínicos. Parece que la suplementación de al menos varias cepas de bacterias es habitualmente un requisito para proporcionar un beneficio terapéutico significativo. Un ejemplo reciente de la eficacia espectacular de una intervención bacteriana compleja es el uso satisfactorio de trasplantes de heces contra *Clostridium difficile* (van Nood *et al.* 2013, New Engl. J. Med. 368:407). Sin embargo, la presente invención utiliza un enfoque más sutil que un trasplante completo de un ecosistema microbiano, mediante el empleo de los mecanismos de señalización propios del intestino para influir de forma beneficiosa e, idealmente, normalizar la microbiota endógena y, por lo tanto, endémica intestinal.

55 Debido a que los cambios patológicos en la microbiota intestinal pueden también desempeñar un papel causal en numerosas otras enfermedades originadas en trastornos atópicos, así como en enfermedades metabólicas con un componente inflamatorio, la terapia y/o la profilaxis de tales enfermedades también están dentro del alcance de la invención. En particular, las siguientes enfermedades son ejemplos de tales indicaciones:

- piel: alergia, eczema atópico, psoriasis;
- 60 - pulmón: fibrosis quística, asma, EPOC;
- vasos: cardiopatía coronaria, arteriosclerosis, aterosclerosis;
- sistema endocrino: diabetes, obesidad.

65 En una realización preferente, la invención se refiere al uso tópico específico de una combinación de 5-ASA y

nicotinamida (y sustancias activas relacionadas) para influir de forma local en la mucosa intestinal y la microbiota intestinal, las inflamaciones intestinales y la terapia directa de la mucosa intestinal. Es preferente que al menos el compuesto activo (o compuestos activos) de NA/NAM (especialmente NAM) se use para la eficacia tópica, mientras que en muchos casos es aún más preferente que se usen para la eficacia tópica tanto el compuesto activo (o compuestos activos) NA/NAM como 5-ASA.

Como se usa en el presente documento, la expresión "eficacia tópica" se refiere a un efecto tópico, en el sentido farmacodinámico, y por lo tanto se refiere a una diana local, en lugar de sistémica, de un medicamento. Por consiguiente, eficacia local significa una terapia y/o profilaxis local de una sustancia activa específica o selectivamente en un emplazamiento donde, por ejemplo, la medicación debe suministrar su efecto terapéutico y/o profiláctico directo, y no entra al sistema circulatorio, o solo lo hace en un grado bajo, por ejemplo, no provocando de este modo ninguna, o solo una baja, acción sistémica. En este sentido, la eficacia tópica de la presente invención también se contrasta con las administraciones entérica (en el tubo digestivo) e intravascular/intravenosa (inyectada en el sistema circulatorio). En comparación con las composiciones que tienen como objetivo una alta disponibilidad sistémica, la eficacia tópica de las composiciones también se puede caracterizar por tiempos de latencia más largos hasta que los niveles sistémicos de la sustancia activa aumenten. Dichos tiempos de latencia para la liberación tópica pueden correlacionarse con los tiempos de tránsito intestinal conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Davis *et al.* 1986, Gut 27:886; Evans *et al.* 1988, Gut 29:1035; Kararli 1995, Biopharm. Drug Dispos. 16:351; Sutton 2004, Adv. Drug Deliv. Rev. 56:1383). Por ejemplo, después de un tiempo variable para el vaciado gástrico (dependiendo de la forma farmacéutica y el estado de alimentación, y variando de menos de 1 hora y más de 10 horas), los tiempos de tránsito del intestino delgado son más bien constantes, de habitualmente 3-4 horas entre formulaciones y estudios (Davis *et al.* 1986, Gut 27:886). Por lo tanto, un tiempo de latencia ejemplar en un paciente en ayunas sería de al menos 2 horas, en cuyo momento una formulación alcanza el intestino delgado inferior y los niveles sistémicos pueden comenzar a aumentar. Particularmente, en el contexto de la presente invención, eficacia tópica significa preferentemente que los niveles sanguíneos y/o plasmáticos y/o séricos de la sustancia activa (por ejemplo, componente NA/NAM), y/o los metabolitos de la misma, no superan niveles que son de dos órdenes (preferentemente un orden) de magnitud mayores que los niveles medidos en la misma persona antes de la dosificación. Como alternativa o adicionalmente, la eficacia tópica se puede expresar en términos de una reducción de los niveles sanguíneos y/o plasmáticos y/o séricos de al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso el 95 % o más, con respecto a la misma cantidad de agente activo administrado de forma pura (sin una formulación) de la misma manera y en las mismas condiciones.

Aunque es preferente, de acuerdo con la invención, que la composición farmacéutica comprenda tanto el componente 5-ASA como el componente NA/NAM dentro de una sola preparación, puede ser beneficioso tener dos composiciones farmacéuticas separadas, comprendiendo cada una solo uno de los principios activos (componente 5-ASA o componente NAM/NA) a administrar juntos en un régimen de tratamiento. Se debe tener en cuenta que tal conjunto de composiciones farmacéuticas (a administrar juntas en un régimen de tratamiento) también es por definición, para la presente solicitud, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

En este sentido, la presente invención también comprende preparaciones de combinación de las sustancias activas de la presente invención, tales como una combinación de dosis variable o una combinación de dosis fija del componente 5-ASA y el componente NA/NAM. La combinación descrita en el presente documento puede estar presente en la misma forma farmacéutica o en formas farmacéuticas distintas, que pueden administrarse de forma simultánea o secuencial. Incluso dentro de la misma forma farmacéutica, el componente 5-ASA y el componente NA/NAM pueden estar físicamente separados.

Como se usa en el presente documento, la expresión "combinación de dosis variable" se refiere a una combinación de fármacos/fármaco de dos o más sustancias activas, mediante lo cual cada una de estas sustancias se aplica en forma de una composición farmacéutica separada, por ejemplo, dos formas de dosificación unitarias, cuya composición farmacéutica separada pueden administrarse juntas mediante un régimen de administración consecutiva o posterior. Por ejemplo, una composición farmacéutica de 5-ASA en cualquier dosificación adecuada del mismo puede administrarse conjuntamente, consecutivamente o posteriormente, con una composición farmacéutica separada de nicotinamida en cualquier dosificación adecuada de la misma. Por lo tanto, las dosificaciones variables de una sustancia activa, por ejemplo, de 5-ASA, puede combinarse con dosificaciones variables de otra sustancia activa, por ejemplo, de nicotinamida. Estas combinaciones de dosis variables pueden usar composiciones farmacéuticas disponibles convencionalmente o se pueden conseguir por politerapia a medida a través de formulación magistral.

En contraste con una combinación de dosis variables, una combinación de dosis fija es un fármaco de combinación que es una formulación que incluye dos o más principios farmacéuticos activos, por ejemplo, sustancias activas, combinadas en una forma de dosificación unitaria, que se fabrique y distribuya en las determinada dosis fijas respectivas. Una combinación de dosis fijas se refiere principalmente a un producto producido en masa que tiene una combinación de fármacos (sustancias activas) y de dosificaciones respectivas predeterminados (en oposición a la politerapia a medida a través de formulación magistral).

El uso tópico difiere significativamente de los usos convencionales de las sustancias activas, en que estas sustancias se absorben y se supone que actúan sistémicamente. A causa de su nuevo efecto antiinflamatorio y/o su efecto de

modificación de la microbiota intestinal, las nicotinamidas (y los otros compuestos descritos en el presente documento) son, por lo tanto, adecuadas como sustancias activas para tratar enfermedades inflamatorias del intestino delgado y/o intestino grueso en combinación con 5-ASA. Las condiciones particulares incluyen el tratamiento de inflamaciones intestinales, la profilaxis del carcinoma de colon, y la terapia o profilaxis de otras enfermedades que son el resultado de cambios en la microbiota intestinal y/o de una interacción alterada entre la microbiota intestinal y el intestino. Preferentemente, estas sustancias activas y combinaciones se utilizan en una formulación farmacológica que protege la mayor cantidad posible de sustancia activa de ser absorbida por el cuerpo en el intestino delgado superior y que, en cambio, efectúe una liberación (por ejemplo, liberación controlada y/o liberación retardada) en el intestino delgado inferior y/o el colon, preferentemente el íleon terminal y/o el colon, donde se emplaza la microbiota intestinal a modificar (por ejemplo, la sustancia activa se libera de forma selectiva en el intestino delgado inferior y/o el colon, preferentemente en el íleon terminal y/o el colon).

En una realización, la nicotinamida (o compuesto relacionado) se administra para influir de forma local (por vía tópica) en la mucosa intestinal y el 5-ASA (o compuesto relacionado) se administra de forma que se libere todo o en parte en cualquier parte del estómago, el intestino delgado o el intestino grueso (por ejemplo, el colon). El 5-ASA también puede formularse para controlar la liberación, tal como de acuerdo con formulaciones conocidas, tales como el recubrimiento con etilcelulosa (por ejemplo, PENTASA), tecnología de multimatriz (por ejemplo, LI ALDA) y recubrimiento entérico (por ejemplo, polímeros de ácido metacrílico y copolímeros tales como en APRISO, ASACOL, ASACOL HD).

En particular, las combinaciones descritas en el presente documento son, así, adecuadas para ser usadas en medicamentos para la terapia de la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la reservoritis, otras enfermedades crónicas del intestino grueso o inflamaciones del intestino grueso, colitis por derivación, enteritis infecciosa, diarrea asociada a antibióticos tales como la diarrea asociada a *C. difficile*, colitis infecciosa, diverticulitis e inflamaciones que se forman por irradiación, por antibióticos, por agentes quimioterapéuticos, por productos farmacéuticos o por productos químicos, así como para la profilaxis del carcinoma de colon y para la terapia o profilaxis de otras enfermedades que son el resultado de cambios en la microbiota intestinal y/o de una interacción alterada entre la microbiota intestinal y el intestino.

Las sustancias reivindicadas son igualmente utilizables para la terapia o la profilaxis de enfermedades de origen similar en humanos y otros mamíferos, en particular en animales domésticos y animales útiles. Los ejemplos de tales animales son los perros, gatos, caballos, camellos o vacas, sin restricción objetiva.

Las sustancias activas, es decir, la nicotinamida, pueden usarse en cualquier forma disponible en el mercado, por ejemplo, las producidas por Merck KgaA.

Como componente NA/NAM, además del ácido nicotínico o la nicotinamida, en la invención descrita en el presente documento se pueden usar como sustancias activas otros compuestos relacionados. Por ejemplo, son adecuados compuestos que se convierten en uno de estos agentes (por ejemplo, por hidrólisis, metabolismo) en el cuerpo humano o animal, tales como ésteres de ácido nicotínico (por ejemplo, inositol hexanicotinato). Además, se pueden usar intermedios en la síntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) o NAD fosfato (NADP), tales como N-formilquinurenina, L-quinurenina, 3-hidroxi-L-quinurenina, 3-hidroxiantranilato, 2-amino-3-carboximuconato semialdehído, quinolinato y beta-nicotinato D-ribonucleótido. Los ejemplos adicionales incluyen NAD y NADP.

Como componente 5-ASA, además de 5-ASA, en la invención descrita en el presente documento se pueden usar como sustancias activas otros compuestos relacionados. Por ejemplo, son adecuados compuestos que se convierten en 5-ASA (por ejemplo, por hidrólisis, metabolismo) en el cuerpo humano o animal, tales como los profármacos sulfasalazina y balsalazida.

Las composiciones farmacéuticas que contienen una combinación de 5-ASA y nicotinamida (o una de las otras sustancias descritas anteriormente), pueden administrarse preferentemente por vía oral (por ejemplo, con una liberación de sustancia activa retardada) o también preferentemente a través de un modo de aplicación rectal (por ejemplo, enemas o supositorios). El sitio de suministro de la sustancia activa, particularmente la nicotinamida, es preferentemente las porciones inferiores del intestino delgado y/o el colon, para inhibir los procesos inflamatorios y, por lo tanto, difiere fundamentalmente de los modos de aplicación que, por ejemplo, para la terapia de la pelagra con nicotinamida, persiguen la absorción y el metabolismo máximos en el organismo y, por lo tanto, un efecto sistémico. Además, el modo de administración de acuerdo con la invención y la dosificación de acuerdo con la invención minimizan la probabilidad de que se presenten efectos secundarios, por ejemplo, como se describe en relación con la administración sistémica de dosis mayores de nicotinamida.

Para producir formulaciones administradas por vía oral de una combinación activa que tenga un efecto antiinflamatorio y/o modificador sobre la microbiota intestinal en el íleon terminal y/o en el colon, es ventajoso, por lo tanto, usar modos de liberación controlada y/o retardada. En contraste con los modos de liberación convencionales (en algunos casos también la retardada) para una suplementación óptima con nicotinamida, por ejemplo, en el caso de la pelagra, determinadas realizaciones de la presente invención evitan parcial o sustancialmente una absorción en el estómago y en las porciones superiores del intestino delgado.

Para tratar la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, son adecuados los modos de aplicación oral y/o rectal (por ejemplo, como enema). Para tratar la reservoritis o la colitis ulcerosa, es preferente la aplicación rectal (por ejemplo, como enema). Esto puede ser respaldado con una administración oral de las formulaciones orales descritas anteriormente, por ejemplo, preparaciones de liberación retardada. Para la terapia sintomática de cualquier otra forma de colitis, se pueden escoger las aplicaciones oral y rectal para la modificación terapéutica de la microbiota intestinal. Es preferente la aplicación oral para la profilaxis del carcinoma de colon, en particular en el caso de la colitis ulcerosa, y para la terapia y/o profilaxis de otras enfermedades que son parcialmente o sustancialmente el resultado de cambios en la microbiota intestinal y/o de una interacción alterada entre la microbiota intestinal y el intestino.

Para la administración oral, las formas farmacéuticas particulares que controlan y/o retrasan la liberación de la sustancia activa debido a una formulación galénica especial (denominadas formas de liberación controlada, de liberación lenta o de liberación retardada) son particularmente adecuadas. Dichas formas farmacéuticas pueden ser comprimidos simples y también comprimidos recubiertos, por ejemplo, comprimidos con película o grageas. Los comprimidos son habitualmente redondos o biconvexos. También son posibles formas de comprimidos oblongas, que permiten separar la tableta. Además, son posibles gránulos, esferoides, bolitas o microcápsulas, que se rellenan en sobrecitos o cápsulas, cuando sea apropiado.

La expresión "liberación retardada" se refiere preferentemente a una formulación farmacéutica que libera los principios activos después de un período de retardo. En determinadas realizaciones, el retardo es suficiente para que al menos una porción de las sustancias activas en una formulación se libere en el intestino delgado inferior (por ejemplo, el íleon terminal) y/o el colon.

La expresión "liberación controlada" se refiere preferentemente a una formulación farmacéutica o componente de la misma que libera, o suministra, uno o más principios activos durante un período prolongado de tiempo (liberación dependiente del tiempo) y/o en determinadas condiciones fisiológicas (por ejemplo, liberación dependiente del pH). En determinadas realizaciones, el período de tiempo o la liberación de acuerdo con las condiciones fisiológicas (por ejemplo, el pH) es suficiente para que al menos una porción de las sustancias activas en una formulación se libere en el intestino delgado inferior (por ejemplo, en el íleon terminal) y/o el colon.

La demora y/o la liberación retardada, y/o la liberación controlada se logran ventajosamente, por ejemplo, mediante recubrimientos que son resistentes al jugo gástrico y se disuelven dependiendo del pH, por medio de microcelulosa y/o de tecnologías de matriz múltiple (MMX), mediante el uso de distintas matrices transportadoras o una combinación de estas técnicas. Los ejemplos incluyen recubrimientos de película que contienen polímeros acrílicos y/o de metacrilato en diversas mezclas para liberación controlada y/o retardada. Por ejemplo, la sustancia activa (o sustancias activas) puede estar contenida en una matriz convencional de celulosa microcristalina o gelatina, o con tecnología MMX, que está recubierta con un material, que proporciona la liberación retardada de la sustancia activa (o sustancias activas). Una sustancia activa se puede administrar en cápsulas de gran volumen (por ejemplo, cápsulas de gelatina que tienen un contenido de 0,68 ml), que se recubren mediante métodos conocidos. Los agentes de recubrimiento adecuados son las ceras insolubles en agua, tal como la cera de carnauba, y/o polímeros, tal como los poli(met)acrilatos [por ejemplo, la cartera de productos de poli(met)acrilato con el nombre comercial Eudragit®, en particular Eudragit® L 30 D-55 (una dispersión acuosa de polímeros aniónicos con ácido metacrílico como grupo funcional), Eudragit® L 100-55 (que contiene un copolímero aniónico a base de ácido metacrílico y acrilato de etilo), Eudragit® L 100 o L 12,5, o S 100 o S 12,5 (copolímeros aniónicos a base de ácido metacrílico y metacrilato de metilo), o Eudragit® FS 30 D (una dispersión acuosa de un copolímero aniónico a base de acrilato de metilo, metacrilato de metilo y ácido metacrílico); Evonik Industries AG, Essen, Alemania) y/o celulosas insolubles en agua (por ejemplo, metilcelulosa, etilcelulosa). Cuando sea adecuado, el material de recubrimiento también puede contener polímeros solubles en agua (por ejemplo, polivinilpirrolidona), celulosas solubles en agua (por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa o hidroxipropilcelulosa), emulsionantes y estabilizantes (por ejemplo, polisorbato 80), polietilenglicol (PEG), lactosa o manitol.

Por ejemplo, una combinación de compuestos Eudragit® S y L (por ejemplo, Eudragit® L/S 100) efectúa una liberación controlada de las sustancias activas de acuerdo con la invención a  $\text{pH} > 6,4$ , lo que se produce en el íleon terminal. Los usos adicionales de las preparaciones de Eudragit® y las mezclas de las mismas (compuestos FS, L, S y R) también son concebibles para el envasado de una sustancia activa y, por lo tanto, se puede lograr un uso tópico en porciones seleccionadas de todo el tracto gastrointestinal mediante la liberación controlada a determinados valores de pH. Un estudio sistemático de direccionamiento entérico con cápsulas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y polímeros Eudragit® desarrollados más recientemente fue publicado por Cole *et al.* en 2002 (Int. J. Pharm. 231:83).

La composición farmacéutica también puede contener sustancias excipientes farmacéuticos adicionales, tales como aglutinantes, cargas, emolientes, lubricantes y agentes reguladores de flujo. Las compuestos de acuerdo con la invención se pueden formular, cuando sea adecuado, junto con sustancias activas adicionales y con excipientes convencionales en composiciones farmacéuticas, por ejemplo, talco, goma arábiga, lactosa, almidón, estearato de magnesio, manteca de cacao, vehículos acuosos y no acuosos, componentes lipídicos de origen animal o vegetal, derivados de parafina, glicoles (en particular, polietilenglicol), diversos plastificantes, dispersantes, emulsionantes y/o conservantes.

Para producir enemas o supositorios para aplicación rectal, las preparaciones de una sustancia activa pueden disolverse en un disolvente adecuado y procesarse adicionalmente en enemas o supositorios de acuerdo con métodos farmacéuticos conocidos.

5 Para la nicotinamida y las sustancias activas relacionadas, el contenido de sustancia activa en la forma farmacéutica final es de 1 - 5000 mg, tal como 1 - 3000 mg, preferentemente de 10 - 1000 mg, en el caso de administración oral; los enemas y/o supositorios pueden contener una cantidad de 10 mg a 5000 mg de la sustancia activa. Dependiendo de la intensidad y de la gravedad de la enfermedad inflamatoria, las formas farmacéuticas se administran una o varias veces al día, o en otro régimen de dosificación para ser elegido por un médico. La dosis diaria de nicotinamida para un ser humano adulto es habitualmente de 50 mg - 2 g, tal como 50-200 mg o 500 mg a 2 g.

15 Para el 5-ASA, el contenido de sustancia activa en la forma farmacéutica final es de 1 - 5000 mg, 1 - 3000 mg, preferentemente de 10 - 1500 mg, en el caso de administración oral; los enemas y/o supositorios pueden contener una cantidad de 10 mg a 5000 mg de la sustancia activa. Dependiendo de la intensidad y de la gravedad de la enfermedad inflamatoria, las formas farmacéuticas se administran una o varias veces al día, o en otro régimen de dosificación para ser elegido por un médico. La dosis diaria de 5-ASA para un ser humano adulto es habitualmente de 500 mg - 5 g, tal como 1-4,8 g.

20 Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y "que trata" se refieren a invertir, aliviar, retrasar el inicio o inhibir la evolución de una enfermedad o trastorno, o de uno o más síntomas del mismo, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el tratamiento se puede administrar después de que se hayan desarrollado uno o más síntomas. En otras realizaciones, el tratamiento se puede administrar en ausencia de síntomas. Por ejemplo, el tratamiento se puede administrar a un individuo susceptible antes de la aparición de los síntomas (por ejemplo, a la vista de antecedentes de síntomas y/o a la vista de factores genéticos u otros factores de susceptibilidad). El tratamiento también puede continuar después de que los síntomas se hayan resuelto, por ejemplo, para prevenir o retrasar la recaída.

30 Como se usa en el presente documento, los términos "profilaxis" y "prevenir" se refieren a retrasar el inicio o reducir la probabilidad de desarrollar una enfermedad o trastorno, o de uno o más síntomas del mismo, en comparación con una población no tratada de control.

Un aspecto adicional de la invención descrita en el presente documento es el uso eficaz de los medicamentos reivindicados basándose en datos genéticos y/o microbiológicos, y las necesidades específicas de los individuos a tratar. Los nuevos conocimientos sobre la predisposición genética de los individuos para todos los tipos de enfermedades (en particular, también las enfermedades en que se ve afectada la interacción entre la microbiota intestinal y el intestino) y en farmacogenética, indican que una medicina personalizada basada en la evidencia que incluye análisis genéticos de genes de riesgo importantes y también de genes que codifican, por ejemplo, receptores de superficie celular, proteínas transportadoras, enzimas metabólicas o proteínas para la transducción de señales, que interactúan con el medicamento y/o sus metabolitos, y/o sus efectores aguas abajo, pueden aportar información y mejoras con respecto al tipo de uso, el modo de aplicación, el momento (o momentos) de uso, la dosis y/o el régimen de dosificación de los medicamentos descritos en el presente documento. Los individuos que pueden beneficiarse de este tratamiento personalizado incluyen aquellos con triptófano sérico reducido, expresión alterada de B<sup>0</sup>AT1 (por ejemplo, en las células epiteliales) y polimorfismos de B<sup>0</sup>AT1. Esto se aplica de manera análoga a los análisis de la microbiota intestinal, particularmente cuando una muestra de heces indica un cambio en la microbiota. Por lo tanto, la presente invención también comprende el uso de métodos de prueba genéticos y/o microbiológicos adecuados para identificar individuos particularmente susceptibles a los medicamentos de acuerdo con la invención, y/o para adaptar el uso de los medicamentos de acuerdo con la invención a las circunstancias individuales. Esto también comprende expresamente el uso de 5-ASA en combinación con distintas sustancias (nicotinamida y/o sustancias activas relacionadas), en distintos modos de administración, dependiendo de las propiedades genéticas y microbiológicas del individuo. Para estos fines, es posible utilizar pruebas de laboratorio y/o kits de prueba adecuados, y también métodos, dispositivos y/o kits de medición para ser empleados por un médico, usuario y/o paciente, por ejemplo, para tomar muestras de heces o analizar parámetros adecuados en la sangre, orina u otros líquidos corporales.

#### EJEMPLIFICACIÓN

55 Hay posibilidades variables para desarrollar ventajosamente, y desarrollarse adicionalmente, la enseñanza de la presente invención. Para este fin, se hace referencia a los siguientes ejemplos, que describen la invención de modo representativo.

#### 60 Ejemplo 1:



Para caracterizar el efecto combinado del 5-ASA y la nicotinamida (NAM) en formulaciones de liberación controlada para el suministro dirigido de ambas sustancias al epitelio intestinal, se realizó un estudio en un modelo de colitis con dextrano sulfato de sodio (DSS) de ratones. En este estudio, se analizó una formulación de gránulos de liberación controlada en dos dosis distintas (30 mg/kg y 60 mg/kg). Como una formulación de liberación controlada representativa para 5-ASA, se utilizaron gránulos de 5-ASA (PENTASA®; Ferring Pharmaceuticals, Saint-Prex, Suiza) tanto solos como en combinación con los gránulos de NAM.

La formulación de liberación controlada para NAM es un granulado de nicotinamida al 25 %, fosfato de calcio dibásico al 70 % y povidona K30 al 5 %. El tamaño de partícula medio era de 234 µm. El granulado se recubrió posteriormente con película con etilcelulosa 7 para conseguir una ganancia de peso del 30 % y un tamaño de partícula medio de 640 µm. El filtrado eliminó las partículas con un tamaño de menos de 355 µm. Los gránulos de control reemplazaron la NAM con una cantidad equivalente de fosfato de calcio dibásico.

Se trasladaron ratones C57BL/6J machos (exentos de patógenos específicos; Charles River Laboratories, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, Francia) a la instalación de prueba con más de 12 semanas de edad y se aclimataron durante 1 semana. La dieta durante la fase de aclimatación fue la dieta A4, producida por SAFE (Scientific Animal Food and Engineering, Augy, Francia). Después de la aclimatación, la dieta se cambió a una dieta a medida sin triptófano o ácido nicotínico, o nicotinamida (dieta sin Trp/Nia/NAM), fabricada por Ssniff (Soest, Alemania). La dieta sin Trp/Nia/NAM se suministró como un polvo, que se usó para preparar bolitas de alimento sin gránulos (control), con gránulos de NAM, con gránulos de 5-ASA o con una combinación de gránulos de NAM y de 5-ASA. Los gránulos se dispersaron de forma homogénea en la dieta. Se formaron gránulos de alimento de aproximadamente 2 cm de longitud y 1 cm de diámetro con una cantidad mínima de agua estéril, para el almacenamiento se congelaron en alícuotas de un solo uso a -20 °C y se descongelaron a diario para alimentar a los ratones. El contenido de los gránulos de las bolitas de alimento se definió como sigue, con una base de cálculo de 30 g de peso corporal y una ingesta diaria de alimento de 3 g. Los gránulos de 5-ASA (dosis objetivo de 5-ASA: 150 mg/kg de peso corporal; contenido de 5-ASA: 52 %): 4,5 mg de 5-ASA necesarios en 3 g de alimento; 8,65 mg de gránulos necesarios en 3 g de alimento; 2,88 g de gránulos añadidos por kg de alimento. Las dosis fijas para los otros gránulos se calcularon de forma análoga.

Gránulos de NAM (dosis objetivo de NAM: 30 o 60 mg/kg de peso corporal; contenido de NAM: 19,1 %): para 30 mg/kg de NAM, 1,57 g de gránulos por kg de alimento; para 60 mg/kg de NAM, 3,14 g de gránulos por kg de alimento; para 120 mg/kg de NAM, 6,28 g de gránulos por kg de alimento.

La dieta sin Trp/Nia/NAM con o sin gránulos se administró hasta el sacrificio de los ratones. Después de 10 días de dieta sin Trp/Nia/NAM, los ratones se expusieron a DSS al 1,5 % (TDB Consultancy, Uppsala, Suecia) en el agua de bebida durante 5 días y se sacrificaron después de otros 3 días durante los cuales se les suministró agua de bebida normal.

El régimen de tratamiento se llevó a cabo con seis grupos de 15 ratones cada uno, que se trataron como sigue:

Grupo 1: alimento de control.

Grupo 2: gránulos de NAM en la dieta (dosis final: 30 mg/kg de peso corporal).

Grupo 3: gránulos de NAM en la dieta (dosis final: 60 mg/kg de peso corporal).

Grupo 4: gránulos de 5-ASA en la dieta (dosis final: 150 mg/kg de peso corporal).

Grupo 5: gránulos de NAM en la dieta (dosis final: 30 mg/kg de peso corporal) más gránulos de 5-ASA en la dieta (dosis final: 150 mg/kg de peso corporal).

Grupo 6: gránulos de NAM en la dieta (dosis final: 60 mg/kg de peso corporal) más gránulos de 5-ASA en la dieta (dosis final: 150 mg/kg de peso corporal).

Después del sacrificio, se realizó la evaluación de la inflamación y de las lesiones colónicas a nivel histológico de acuerdo con Dieleman *et al.* 1998 (Clin. Exp. Immunol. 114:385). La puntuación incluye los siguientes parámetros: la gravedad de la inflamación, su extensión (porcentaje de afectación) y la presencia de daño de las criptas en todo el colon.

Como se muestra en la Figura 1, la monoterapia con gránulos de NAM o de 5-ASA solo condujo a una tendencia a la mejora histológica, mientras que su combinación condujo a un efecto terapéutico significativo (\*, p = 0,04 para 30 mg/kg de NAM más 5-ASA; \*\*, p = 0,005 para 60 mg/kg de NAM más 5-ASA), demostrando un efecto terapéutico combinado de las dos sustancias activas en este contexto bastante severo. Es sorprendente que haya mejorado el efecto del 5-ASA solo, dado que la dosis administrada es la dosis optimizada para este modelo de colitis por DSS.

## Ejemplo 2:

En un segundo estudio mucho más amplio, los gránulos de liberación controlada de NAM y de 5-ASA se usaron otra vez en el modelo murino de colitis por DSS (véase el Ejemplo 1) para confirmar las propiedades antiinflamatorias del NAM en una dosis baja (30 mg/kg) y para investigar dos dosificaciones más altas (120 o 240 mg/kg) no administradas en el primer estudio.

5 En particular, este segundo estudio estaba dirigido a investigar las posibles propiedades antiinflamatorias sinérgicas del NAM combinado con una dosis subóptima de gránulos de 5-ASA (75 mg/kg en lugar de la dosis óptima de 150 mg/kg).

10 Una diferencia muy importante con respecto al primer estudio descrito en el Ejemplo 1 fue el hecho de que los ratones recibieron alimento normal con niveles normales de triptófano, ácido nicotínico y nicotinamida (dieta SAFE A4; Scientific Animal Food and Engineering, Augy, Francia; véase el Ejemplo 1). Por lo tanto, los efectos observados en este segundo estudio no pueden deberse a la suplementación con NAM en ratones privados de NA/NAM/Trp.

## 15 1. Materiales y métodos

### 1.1. Sistema de prueba y diseño experimental

20 En el presente estudio, se utilizó el mismo modelo de colitis por DSS en ratones C57BL/6J que en el Ejemplo 1, aunque con algunas modificaciones menores: se usó DSS al 2,5 % para proporcionar una exposición a DSS más fuerte. Los animales se aclimataron durante una semana para estabilizar su microbiota, se distribuyeron al azar en 9 grupos distintos, como se ilustra a continuación en Tabla 1, y después se mantuvieron durante 10 días en las distintas dietas (días -10 a -1) antes de inducir la colitis por DSS en el agua de bebida (día 0 - día 6), seguido de un período de reposo con agua de bebida normal (día 6 - día 9). Todos los grupos recibieron DSS al 2,5 %.

25

**Tabla 1:**

Grupos (n = 15)	Tratamiento	Compuesto(s) activo(s)
1	Control de DSS control (solo alimento reconstituido)	ninguno
2	gránulos de 5-ASA en el alimento (150 mg/kg)	4,5 mg/día de 5-ASA
3	gránulos de 5-ASA en el alimento (75 mg/kg)	2,25 mg/día de 5-ASA
4	gránulos de NAM en el alimento (30 mg/kg)	0,9 mg/día de NAM
5	gránulos de NAM en el alimento (120 mg/kg)	3,6 mg/día de NAM
6	gránulos de NAM en el alimento (240 mg/kg)	7,2 mg/día de NAM
7	gránulos de NAM (30 mg/kg) + gránulos de 5-ASA (75 mg/kg) en el alimento	0,9 mg/día de NAM + 2,25 mg/día de 5-ASA
8	gránulos de NAM (120 mg/kg) + gránulos de 5-ASA (75 mg/kg) en el alimento	3,6 mg/día de NAM + 2,25 mg/día de 5-ASA
9	gránulos de NAM (240 mg/kg) + gránulos de 5-ASA (75 mg/kg) en el alimento	7,2 mg/día de NAM + 2,25 mg/día de 5-ASA

### 1.2. Especificaciones de dosificación, alimento y sustancias activas

30

**Tabla 2:**

<b>Método y vía</b>	administración oral, compuestos activos mezclados en el alimento
<b>Duración</b>	a diario desde el día -10 hasta el día 9 (eutanasia)
<b>Frecuencia</b>	alimento a demanda
<b>Volumen</b>	Dosificaciones basadas en el consumo diario de alimento de los ratones y determinadas para un ratón que pesa 30 g

35 Los gránulos de 5-ASA fueron los mismos que en el Ejemplo 1. Su contenido de 5-ASA fue del 52 % (un gránulo pesaba 0,5 mg y contenía 0,26 mg de 5-ASA). Los gránulos de 5-ASA se mezclaron con el alimento habitual para la preparación de alícuotas de alimento de un solo uso, que se almacenaron congeladas a -20 °C y se descongelaron a diario antes de alimentar a los ratones. Las alícuotas de alimento tenían un contenido de 5-ASA de 0,75 mg/g de alimento o 1,5 mg/g de alimento, dando como resultado un consumo diario de 2,25 mg o 4,5 mg de 5-ASA (en 3 g de alimento) y dosis de 75 o 150 mg/kg de peso corporal de 5-ASA (para un ratón de 30 g), respectivamente. Para administrar las dosis deseadas de 5-ASA por día, los ratones debían recibir una dosis con ~2 veces la cantidad de gránulos de 5-ASA, con un contenido del 52 % de 5-ASA (es decir, una dosis de 5-ASA de 150 mg/kg de peso corporal o de 4,5 mg/ratón precisaba un consumo diario de gránulos de 288 mg/kg o de 8,65 mg/ratón). Por lo tanto, el alimento se preparó con 2,88 g de gránulos por kg de alimento (para la dosis de 150 mg/kg) o de 1,44 g/kg (para la dosis de

40

75 mg/kg).

Los gránulos de NAM del presente ejemplo los produjo el mismo fabricante, con una formulación similar (diámetro: 0,355-0,500 mm; contenido de NAM: 19,1 %) al Ejemplo 1. Se prepararon tres tipos de alimento de forma análoga al alimento con gránulos de 5-ASA como se describe anteriormente. Para administrar las dosis deseadas de NAM por día, los ratones tenían que recibir una dosis con ~5 veces la cantidad de gránulos con un contenido del 19,1 % de NAM (por ejemplo, una dosis de NAM de 30 mg/kg de peso corporal o de 0,9 mg/ratón de NAM precisaba un consumo diario de gránulos de 157 mg/kg o de 4,71 mg/ratón). Por lo tanto, la preparación de alimento para los tres grupos de dosis se realizó de la siguiente manera: 1,57 g de gránulos por kg de alimento para el grupo de dosis de 30 mg/kg, 6,28 g de gránulos por kg de alimento para el grupo de dosis de 120 mg/kg y 12,56 g de gránulos por kg de alimento para el grupo de dosis de 240 mg/kg.

Para el grupo de control, el alimento sin gránulos se procesó de la misma forma que las preparaciones de alimento que contenían gránulos descritas anteriormente, para excluir los artefactos de preparación.

### 1.3. Análisis y puntuación de los parámetros del índice de actividad de enfermedad

Después de la eutanasia, se analizó el colon y se puntuó el índice de actividad de enfermedad (DAI; puntuación de 0-9) utilizando un sistema de DAI adaptado basado en Melgar *et al.* 2005 (Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 288:G1328). Como no se observó sangre visible, el parámetro de puntuación de sangre de acuerdo Melgar *et al.* se cambió a la puntuación de la fuerza de la señal para la sangre oculta en heces detectada por la prueba ColoScreen (Helena Laboratories, Beaumont, TX, EE.UU.). Esta puntuación de la intensidad de la señal se realizó de forma independiente por dos investigadores con ocultación de la identidad de las muestras.

**Tabla 3:**

Puntuación	Puntuación de inflamación	Puntuación de diarrea	Sangre oculta en heces
0	Normal	Bolitas normales	Ninguna
1	Inflamación leve	Deposiciones ligeramente sueltas	Señal débil
2	Inflamación y/o edema moderados	Deposiciones sueltas	Señal media
3	Inflamación y/o ulceraciones y/o edema intensos	Diarrea líquida	Señal fuerte

### 1.4. Análisis estadístico

Todas las comparaciones se analizaron utilizando la prueba de Anova para dos muestras independientes en el programa informático StatXact (Cytel, Cambridge, MA, Estados Unidos). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de p era <0,05.

### 2. Resultados y conclusiones

No se registró mortalidad.

El grupo de dosis con 150 mg/kg de 5-ASA representa el tratamiento óptimo en este modelo de acuerdo con la técnica anterior y sirvió como grupo de tratamiento de referencia.

Como se muestra en la Figura 2, el índice de actividad de enfermedad se redujo mucho, significativamente ( $p < 0,0001$ ), mediante todos los tratamientos. Curiosamente, duplicar la dosis de 5-ASA de 75 a 150 mg/kg condujo a una disminución más fuerte del DAI, mientras que el tratamiento con NAM no mostró respuesta a dosis en el DAI de 30 a 240 mg/kg. Esto estuvo en buena concordancia con los hallazgos del primer estudio descrito en el Ejemplo 1. Sin embargo, distintas dosis de NAM en combinación con la dosis subóptima de 75 mg/kg de 5-ASA mostraron consistentemente y en todos los parámetros (Figura 3) un efecto de dosis inverso con diferencias altamente significativas de la combinación óptima de 30 mg/kg de NAM y de 75 mg/kg de 5-ASA, en comparación con los valores iniciales de 30 mg/kg de NAM sola o de 75 mg/kg de 5-ASA solo. Esto indica un verdadero mecanismo sinérgico de la eficacia previamente desconocida más allá de los efectos meramente aditivos. A continuación, se resumen en la Tabla 4 las mejoras porcentuales del DAI en comparación con el grupo de control.

**Tabla 4:**

	mejoras % del DAI frente a DSS
5-ASA 150 mg/kg	43
5-ASA 75 mg/kg	28
NAM 240 mg/kg	40

	mejoras % del DAI frente a DSS
<b>NAM 120 mg/kg</b>	40
<b>NAM 30 mg/kg</b>	39
<b>NAM 240 mg/kg + 5-ASA 75 mg/kg</b>	49
<b>NAM 120 mg/kg + 5-ASA 75 mg/kg</b>	57
<b>NAM 30 mg/kg + 5-ASA 75 mg/kg</b>	79

5 La Tabla 5 enumera los valores p del tratamiento de combinación más eficaz (30 mg/kg de NAM y 75 mg/kg de 5-ASA; abreviado NAM 30 + 5-ASA 75) frente a los valores iniciales del grupo de control (DSS), 30 mg/kg de NAM sola (NAM 30), 75 mg/kg de 5-ASA solo (5-ASA 75) o 150 mg/kg de 5-ASA solo (5-ASA 150, como tratamiento de referencia del estado de la técnica).

**Tabla 5:**

valor de p	NAM 30 + 5-ASA 75 frente a DSS	NAM 30 + 5-ASA 75 frente a NAM 30	NAM 30 + 5-ASA 75 frente a 5-ASA 75	NAM 30 + 5-ASA 75 frente a 5-ASA 150
<b>DAI</b>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<b>Inflamación</b>	<0,0001	0,049	0,00041	0,00041
<b>Diarrea</b>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<b>Sangre oculta</b>	<0,0001	0,01	0,01	no significativo

10 La reducción altamente significativa del DAI se basó en los siguientes tres parámetros importantes para juzgar la inflamación intestinal:

15 1. La puntuación de inflamación macroscópica, que representa la presencia y la cantidad de inflamación, ulceración y/o edema, mostró que todos los tratamientos redujeron con mayor o menor intensidad y de forma altamente significativa ( $p < 0,0001$ ) la inflamación inducida por DSS (Figura 3A). En este caso, se observó un ligero efecto dependiente de la dosis de NAM, mientras que las dos dosis de 5-ASA no mostraron diferencias. Como con los otros parámetros, se detectó una mejora significativa y sinérgica de la combinación óptima de 30 mg/kg de NAM y 75 mg/kg de 5-ASA en comparación con todos los valores iniciales (Figura 3A; Tabla 5).

20 2. La consistencia de las heces (diarrea) apenas mejoró con las distintas dosis de NAM o la dosis de 75 mg/kg de 5-ASA solo, solo el tratamiento óptimo con 150 mg/kg de 5-ASA mostró un efecto significativo (Figura 3B). Por el contrario, las distintas combinaciones de NAM y 75 mg/kg de 5-ASA mostraron efectos significativos e inversamente dependientes de la dosis, culminando en la superioridad altamente significativa y sinérgica de la combinación óptima de 30 mg/kg de NAM y 75 mg/kg de 5-ASA en comparación con todos los valores iniciales (Figura 3B; Tabla 5). En este grupo, los ratones incluso tenían heces normales.

30 3. En el día de la necropsia, se analizó la presencia de sangre en las heces para cada ratón. Como no se observó sangre visible, se midió la presencia de sangre oculta. En el grupo de control de DSS, se encontró sangre oculta en las heces de todos los ratones (Figura 3C). Como cabía esperar, se observó un efecto fuerte y significativo con 5-ASA administrado en su dosificación óptima de 150 mg/kg, en comparación con los ratones de control (53 % frente a 100 % de los ratones que tenían sangre en las heces). De forma similar a los otros parámetros analizados para la puntuación DAI, se midió una mejora significativa y sinérgica de la combinación óptima de 30 mg/kg de NAM y 75 mg/kg de 5-ASA, en comparación con todos los valores iniciales, excepto para la altamente eficaz de 150 mg/kg de 5-ASA (Figura 3C; Tabla 5).

35 En conjunto, se confirmó la eficacia protectora de NAM a una dosis baja (30 mg/kg) observada en el primer estudio (Ejemplo 1) y la combinación de una dosis claramente subóptima de 5-ASA (75 mg/kg) con distintas dosis de NAM condujo a una mejora altamente significativa, incluso dramática, y sinérgica sobre todos los valores iniciales. Como la relación de dosis con NAM fue inversa, la sinergia observada no se debe a efectos de dosis aditivos, sino a una sinergia sorprendente en el sentido más significativo. Además, el hecho de que las formulaciones y combinaciones de la presente invención sean activas incluso con niveles normales de triptófano y/o de NA, y/o de NAM en el alimento (véase el Ejemplo 1), indica claramente que la eficacia protectora de la NAM y/o combinaciones de NAM y 5-ASA no solo es debida a la suplementación de NAM en la dieta.

45 Los ejemplos anteriores sirven para explicar la invención, pero no pretenden limitar la alcance.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende

5 una combinación de ácido 5-aminosalicílico o un profármaco del mismo que se hidroliza y/o metaboliza a ácido 5-aminosalicílico, y una o más sustancias activas seleccionadas de nicotinamida; un compuesto que se convierte en el cuerpo de un animal o un ser humano en nicotinamida seleccionado del grupo que consiste en ésteres de ácido nicotínico y/o ácido nicotínico; nicotinamida adenina dinucleótido (NAD); nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP); un intermediario en la biosíntesis de NAD o NADP seleccionado del grupo que consiste en N-  
10 formilquinurenina, L-quinurenina, 3-hidroxi-L-quinurenina, 3-hidroxiantranilato, 2-amino-3-carboximuconato semialdehído, quinolinato y beta-nicotinato D-ribonucleótido;

para influir de forma beneficiosa en la microbiota intestinal, en donde la composición farmacéutica libera una o ambas sustancias activas para la eficacia tópica en el intestino delgado inferior, el colon o en ambos.

15 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, para influir de forma beneficiosa en la microbiota intestinal, en donde la composición farmacéutica libera una o ambas sustancias activas para la eficacia tópica en el íleon terminal, el colon o en ambos.

20 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, que comprende nicotinamida, en donde la nicotinamida se libera en el intestino delgado inferior, preferentemente en el íleon terminal, el colon o en ambos.

4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, que comprende preferentemente una combinación de ácido 5-aminosalicílico y nicotinamida, para influir de forma beneficiosa en la microbiota intestinal, en donde la composición farmacéutica libera las sustancias activas para la eficacia tópica en el íleon terminal, el colon o en ambos.

5. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, formulada para la administración oral con liberación retardada de los principios activos para la eficacia local específica en el intestino delgado inferior, preferentemente en el íleon terminal y/o el colon.

30 6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, formulada para la administración oral con liberación controlada de los principios activos para la eficacia local específica en el intestino delgado inferior, preferentemente en el íleon terminal y/o el colon.

35 7. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la terapia o la profilaxis de enfermedades inflamatorias del intestino delgado y/o de enfermedades del intestino grueso, y/o para la profilaxis del carcinoma de colon y/o para la terapia o la profilaxis de otras enfermedades que son el resultado de cambios en la microbiota intestinal y/o una interacción alterada entre la microbiota intestinal y el intestino, formulada preferentemente para la administración oral y más preferentemente con liberación retardada o controlada.

40 8. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la administración (neo)rectal en el colon o el reservorio ileal para la terapia de enfermedades inflamatorias del intestino grueso o de la reservoritis.

45 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, formulada para la administración (neo)rectal en el colon o el reservorio ileal.

10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada por que la aplicación oral se realiza con un contenido de sustancia activa de 1-3000 mg de nicotinamida y 1-3000 mg de ácido 5-aminosalicílico por forma farmacéutica terminada, preferentemente caracterizada por que la aplicación oral se realiza con un contenido de sustancia activa de 10-1000 mg de nicotinamida y 10-1500 mg de ácido 5-aminosalicílico por forma farmacéutica terminada.

55 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada por que la aplicación rectal se realiza para la terapia local de inflamaciones en el recto o el reservorio ileal.

12. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 y 11, caracterizada por que la aplicación rectal se realiza con un contenido de sustancia activa de 10-5000 mg de nicotinamida y 10-5000 mg de ácido 5-aminosalicílico por forma farmacéutica terminada.

60 13. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12,

(a) para la terapia o la profilaxis de una enfermedad inflamatoria intestinal, preferentemente colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, o reservoritis,

65 (b) para la terapia o la profilaxis del carcinoma de colon, o

(c) para la terapia o la profilaxis de enfermedades de otros órganos del cuerpo, que son el resultado de cambios en la microbiota intestinal y/o de una interacción alterada entre la microbiota intestinal y el intestino.

5 14. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la combinación se administra en la misma forma farmacéutica o en formas farmacéuticas separadas.

15. Uso de la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en un régimen de tratamiento para administrar las sustancias activas de forma simultánea o secuencial.

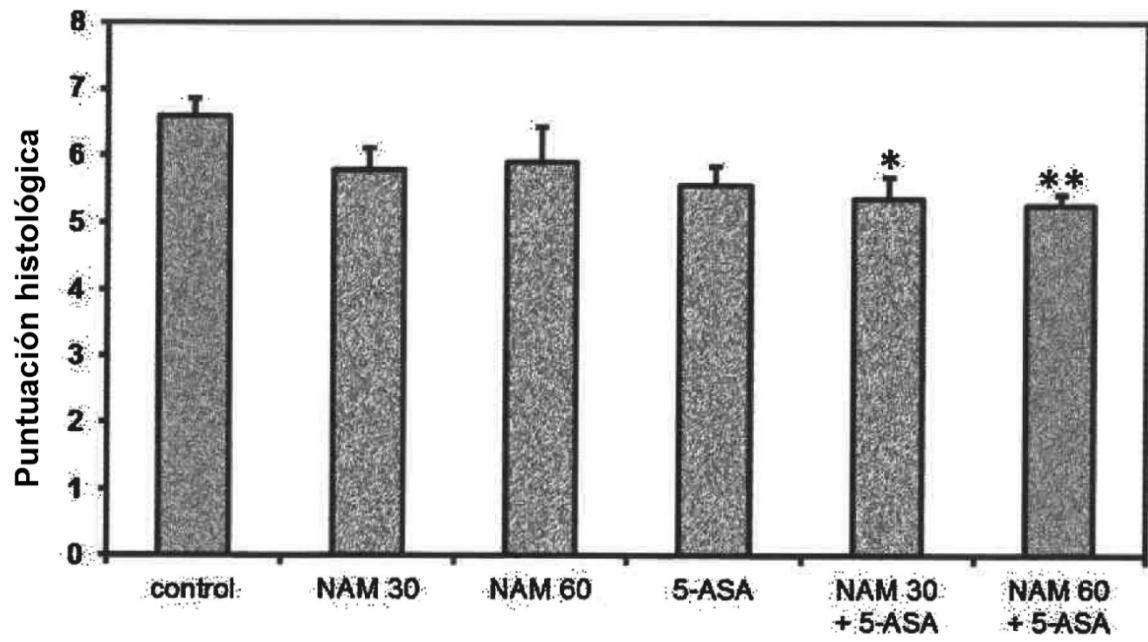


Fig. 1

Índice de actividad de enfermedad

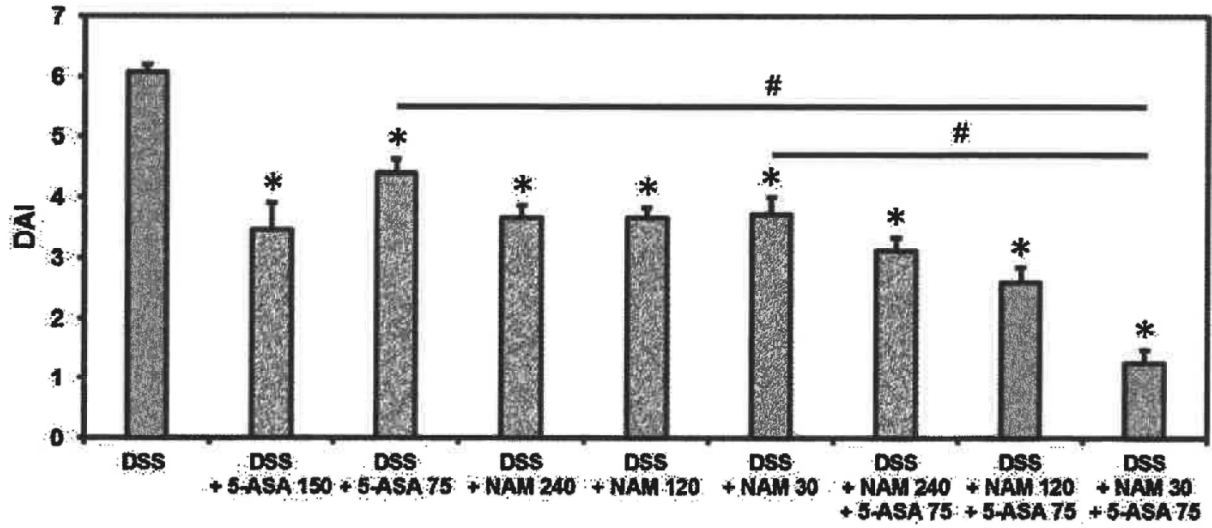


Fig. 2



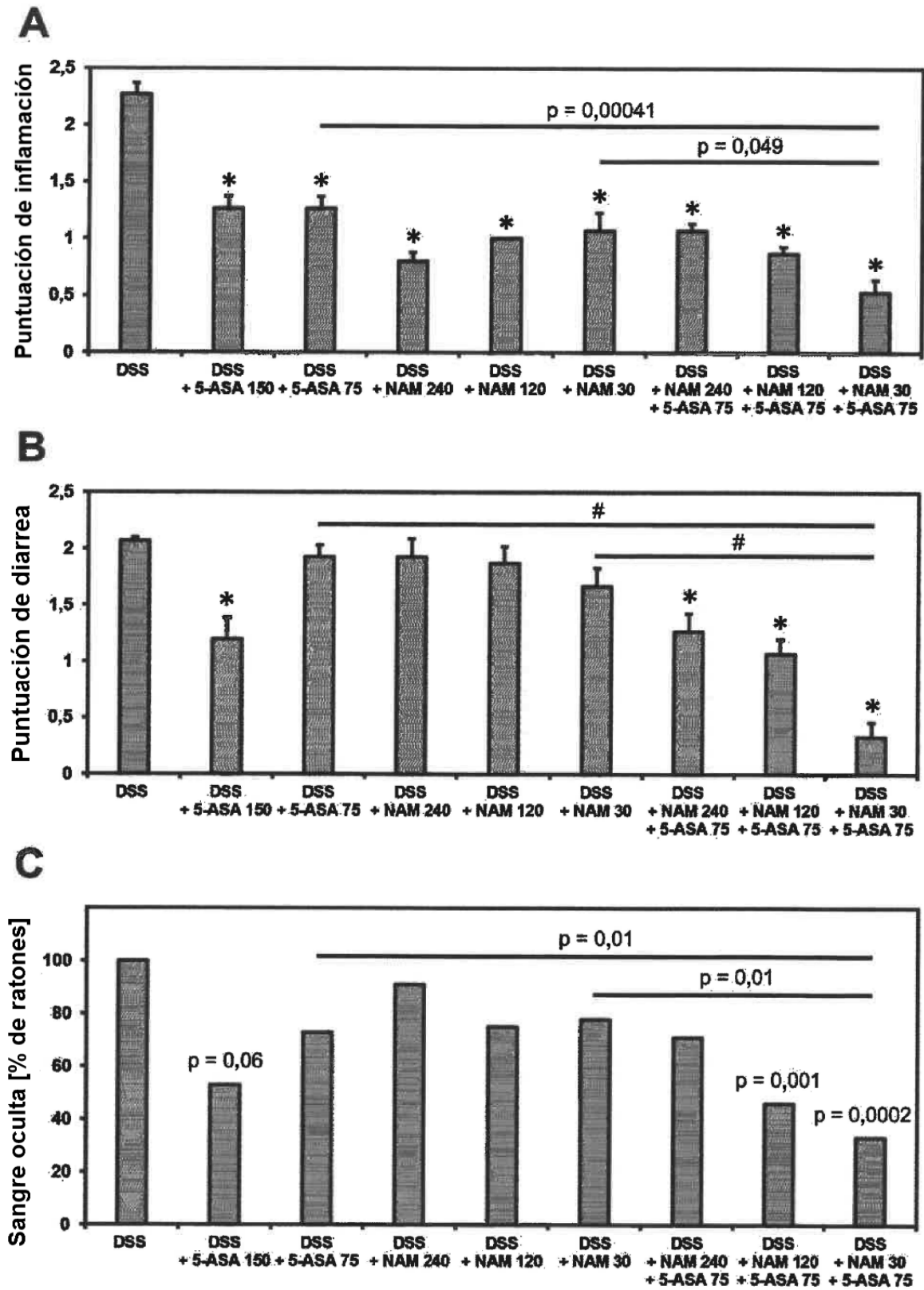


Fig. 3