

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 523**

51 Int. Cl.:

A61K 38/40 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2014 PCT/IB2014/064255**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15044809**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2014 E 14781676 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3049102**

54 Título: **Lactoferrina para el tratamiento de EII asociada con invasión bacteriana**

30 Prioridad:

25.09.2013 IT MI20131578

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

18.11.2020

73 Titular/es:

**GIELLEPI S.P.A. (100.0%)
Via Aurelio Saffi 21
20123 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**TERRUZZI, CARLO y
TERRUZZI, FABIO**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 794 523 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

Lactoferrina para el tratamiento de EII asociada con invasión bacteriana

5 La presente invención se refiere a los tratamientos de enfermedades inflamatorias intestinales asociadas con invasión por *Escherichia coli* adherente e invasiva (ECAI) y, en particular, se refiere a una formulación para su utilización en tales tratamientos.

10 La enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa (CU) y las EII de origen infeccioso, son enfermedades multifactoriales de etiología a menudo desconocida. La desregulación del sistema inmunitario innato y adaptativo dirigida contra las bacterias lumenales o sus productos y las respuestas inmunitarias inadecuadas a organismos en el intestino que no provocan normalmente una respuesta son factores inmunitarios característicos de EC, CU y otras EII.

15 Según el entendimiento actual, los microorganismos se aprovechan de la capa mucosa debilitada de pacientes que padecen enfermedades inflamatorias intestinales e incapacidad de aclarar las bacterias de las paredes intestinales, provocando de ese modo los síntomas de las enfermedades.

20 Algunos estudios han demostrado que la *Escherichia coli* adherente e invasiva (ECAI) es mucho más frecuente en pacientes con EC que en controles.

25 Otros estudios, tales como el publicado en Curr Opin Gastroenterol. 2007; 23(1):16-20 "Adherent-Invasive *Escherichia coli* and Crohn's Disease" por Nicolas Bamich, Arlette Darfeuille-Michaud, indicaron que, dado que el ciclo de infección de *E. coli* adherente e invasiva podía depender de la capacidad de ECAI de colonizar el tracto gastrointestinal de pacientes predispuestos genéticamente a la enfermedad de Crohn, los antibióticos que pueden erradicar las bacterias, o los probióticos que pueden sustituirlas en el tracto gastrointestinal, pueden ser de valor terapéutico en enfermedad de Crohn del íleon.

30 *Escherichia coli* adherente e invasiva abarca un subgrupo de *E. coli* spp. denominado así por su capacidad característica de adherirse a células intestinales, de invadir las células eucariotas infectadas y de replicarse en células epiteliales y macrófagos, provocando enfermedades intestinales en seres humanos. LF82, una cepa de *E. coli* (serotipo O83:H1) aislada originalmente de un paciente con enfermedad de Crohn, representa la cepa de ECAI prototipo, tal como se describe en Darfeuille-Michaud A., Neut C., Barnich N., Lederman E., Di Martino P., Desreumaux P. et al. "Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease", Gastroenterology, 115 (1998), págs. 1405-1413.

35 La lactoferrina (Lf), un miembro de la familia de transferrinas de glucoproteínas de unión a hierro, constituye uno de los principales sistemas antimicrobianos en leche y otras secreciones exocrinas. Las propiedades biológicas notificadas para Lf incluyen actividad antimicrobiana frente a una amplia gama de bacterias, hongos, protozoos y virus patógenos, así como actividades antiinflamatoria, antitumoral e inmunomoduladora, tal como se describe en Steijns, J.M. y Van Hooijdonk, A.C.M. "Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin" Br J Nutr 2000; 84, 511-517; y Superti, F.; Berlutti, F.; Paesano, R.; Valenti, P. "Structure and activity of lactoferrin - A multi functional protective agent for human health". Iron Metabolism and Disease; Fuchs, H., Ed.; Research Signpost: Kerala, India, 2008; págs. 1-32.

40 En general, el tratamiento de estados agudos de enfermedad inflamatoria intestinal comprende la utilización de medicamentos, por ejemplo, fármacos antibióticos, para tratar cualquier infección, y fármacos antiinflamatorios y corticosteroides para reducir la inflamación. Sin embargo, la utilización prolongada de antibióticos, fármacos antiinflamatorios y corticosteroides tiene efectos secundarios significativos, de modo que se debe evitar.

50 La Patente WO2007038623 da a conocer la utilización de una formulación oral de lactoferrina para el tratamiento de infección asociada con enfermedad de Crohn e EII por patógenos intestinales, tal como infección por *C. difficile*.

55 La Patente EP1350519 da a conocer una composición oral de liberación controlada que comprende lactoferrina utilizada para el tratamiento de varias afecciones, por ejemplo, EII.

60 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es dar a conocer una formulación para su utilización en el tratamiento de pacientes afectados por enfermedad inflamatoria intestinal asociada con invasión por *Escherichia coli* adherente e invasiva (ECAI), que no proporciona efectos secundarios significativos.

Este objetivo se ha logrado por medio de una formulación de liberación modificada que comprende lactoferrina para su utilización en el tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal asociada con invasión por *Escherichia coli* adherente e invasiva (ECAI), según la reivindicación 1, mientras que otras características se dan a conocer en el resto de reivindicaciones.

65 Según la presente invención, se ha descubierto que la lactoferrina, en particular, la lactoferrina bovina, ejerce fuertes

efectos inhibidores sobre la invasión por ECAI de células epiteliales intestinales, y se puede utilizar en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales y para el mantenimiento de la remisión en pacientes que presentan colonización por ECAI patógena temprana y lesiones crónicas del íleon.

5 De hecho, pruebas realizadas por los inventores muestran que un hidrolizado de lactoferrina con pepsina puede prevenir la adhesión e internalización de ECAI en células intestinales, mientras que no puede reducir la inflamación. Por el contrario, de manera sorprendente, la lactoferrina inhibe fuertemente la invasión por ECAI de células intestinales y reduce la inflamación.

10 Según la presente invención, se descubrió adicionalmente que, a una concentración no citotóxica y no bactericida, el tratamiento con lactoferrina no tuvo ningún efecto sobre la adhesión bacteriana, a la vez que pudo prevenir la invasión de células intestinales por la cepa de ECAI prototipo LF82 de una manera dependiente de la dosis.

15 Por lo tanto, las formulaciones de liberación modificada que comprenden lactoferrina se pueden utilizar en el tratamiento de afecciones inflamatorias crónicas asociadas con una invasión por ECAI.

20 En particular, la utilización de bLf, que está libre de efectos secundarios negativos, se pudo utilizar en el tratamiento de la enfermedad de Crohn y otras enfermedades inflamatorias intestinales asociadas con una invasión por ECAI, y en el mantenimiento del estado de remisión de los pacientes.

25 Siguiendo los hallazgos mencionados anteriormente, las formulaciones de liberación modificada que comprenden lactoferrina o, de manera preferente, lactoferrina bovina, según la presente invención, se han obtenido mediante una selección cuidadosa e intencional de los sistemas de liberación modificada conocidos y de las sustancias empleadas en los mismos.

30 De hecho, las formulaciones de liberación modificada de lactoferrina, según la presente invención, tienen una actividad localizada en tracto gastrointestinal diferente o una actividad sistémica, y una liberación controlada desde las primeras etapas de administración. Además, la homogeneidad de la liberación con el tiempo está garantizada y, al mismo tiempo, se permite que, una vez que se haya puesto a disposición una parte del principio activo, se active inmediatamente de manera tópica o a nivel sistémico, debido a su estado de microemulsión, solubilización o complejación.

35 Según la presente invención, se da a conocer una formulación oral para dosificación de liberación modificada que comprende lactoferrina para su utilización en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad intestinal debida a invasión por *Escherichia coli* adherente e invasiva (ECAI), de la manera más particular, para su utilización en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales debidas a una invasión por *Escherichia coli* LF82.

40 En particular, una dosificación de liberación modificada significa una liberación retardada que permite obtener la ventaja de una frecuencia de administración reducida y una liberación de la sustancia activa en sitios particulares del tracto gastrointestinal.

45 La formulación oral para dosificación de liberación modificada para su utilización, según la presente invención, comprende lactoferrina disuelta y/o dispersada y/o embebida en una matriz y un revestimiento exterior, en la que dicha matriz comprende:

- sustancias seleccionadas del grupo de: sustancias lipídicas, sustancias hidrófilas, sustancias anfífilas, y mezclas de las mismas; y
- opcionalmente, excipientes aceptables farmacéuticamente destinados a facilitar la viabilidad de la forma farmacéutica.

50 Como la lactoferrina en la formulación oral, según la presente invención, se puede utilizar lactoferrina bovina. La cantidad de lactoferrina en las formulaciones orales, según la presente invención, es, de manera preferente, adecuada para permitir la administración de lactoferrina en una dosificación diaria de entre 50 mg y 250 mg; de manera preferente, entre 100 mg y 200 mg, en una o más administraciones diarias.

60 Dicho revestimiento exterior está formado, de manera preferente, por materiales provistos de propiedad de solubilidad gástrica o propiedad de resistencia gástrica y/o con propiedad de liberación en pH intestinal específico (propiedad de liberación dependiente del pH) o propiedad de liberación retardada independiente del pH.

65 Los materiales adecuados para dicho revestimiento exterior de las formulaciones orales, según la presente invención, comprenden acetato-ftalato de celulosa, acetato metacrílico, polímeros de ácido metacrílico, goma laca, etilcelulosa, ácidos alginicos, y combinación de los mismos; de manera preferente, se pueden mencionar agentes de revestimiento gastrorresistentes seleccionados del grupo que consiste en goma laca, polimetacrilatos, acetofalato de celulosa, derivados de alginato. De manera preferente, se puede utilizar goma laca acuosa (por ejemplo, el producto Aquagold® de Harke), y combinaciones de la misma, o una combinación de etilcelulosa y sales de ácido

algúnico comercializada como sistema de revestimiento entérico nutricional Nutrateric® por Colorcon Inc. de Westpoint, Pa.

5 Las sustancias lipídicas que se pueden utilizar en la matriz de la composición oral, según la presente invención, incluyen alcoholes grasos, ácidos grasos, triglicéridos y ceras. De manera preferente, dichas sustancias lipídicas se seleccionan del grupo que consiste en ácido palmítico, alcohol cetílico, alcohol cetosteárico, cera de carnauba y ácido esteárico.

10 Las sustancias hidrófilas que se pueden utilizar en la matriz de la composición oral, según la presente invención, comprenden hidrogeles, es decir, sustancias que cambian de estado anhidro a estado hidratado, que muestran un fenómeno de relajación molecular, caracterizado por un aumento sustancial en el volumen del sistema y por un aumento en el tamaño y el peso tras la coordinación de un gran número de moléculas de agua por los grupos polares presentes en la cadena polimérica. Los hidrogeles que se pueden utilizar, según la presente invención, se seleccionan del grupo de polímeros o copolímeros de ácido acrílico o metacrílico, polímeros de alquil vinil éter, 15 hidroxialquilcelulosas, carboxialquilcelulosas, polisacáridos, alginatos, pectinas, almidones, gomas naturales y sintéticas, poliacrílico, y mezclas de los mismos. De manera preferente, dichas sustancias hidrófilas comprenden hidroxipropilmetilcelulosa (por ejemplo, vendida con los nombres comerciales Methocel® K4M, K15M, K100M, 100LV), carboximetilcelulosa (por ejemplo, vendida con el nombre comercial Blanose®), hidroxipropilcelulosa (por ejemplo, vendida con los nombres comerciales Klucel® EF, LF, JF, GF, MF, HF), celulosa microcristalina, almidones, 20 tales como almidón de maíz, y lactosa.

25 Las sustancias anfífilas de matriz que se pueden utilizar en las formulaciones, según la presente invención, comprenden lecitina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, alquil éteres de glicol, tales como monometil éter de dietilenglicol, macrogol glicéridos, hidroxistearatos de polietilenglicol, ceras, laurilsulfato de sodio, dodecilsulfato de sodio, polisorbatos, ácido cólico, poloxámero, sulfosuccinato de sodio, laurilsarcosinato de sodio, y mezclas de los mismos. De manera preferente, dichas sustancias anfífilas comprenden lauroil polioxiglicéridos (por ejemplo, el producto comercializado con el nombre comercial Gelucire® 44/14 o Labrafil®M2130Cs), aceite de coco 30 hidrogenado, ésteres de PEG 1500, estearoil polioxiglicéridos (por ejemplo, el producto comercializado con el nombre comercial Gelucire® 50/13), aceite de palma hidrogenado, lecitina (por ejemplo, los productos comercializados con el nombre comercial Epikuron®, Phosal®, Phospholipon® 100 H, Lipoid®).

35 Dichos excipientes aceptables farmacéuticamente que están destinados a facilitar la viabilidad de la forma farmacéutica se pueden seleccionar de entre agentes deslizantes, diluyentes, agentes antiadherentes, lubricantes, disgregantes, agentes de fluencia libre, estabilizantes.

40 Según una realización alternativa, la formulación oral para su utilización, según la presente invención, está en forma de un sistema de depósito, en el que la lactoferrina está disuelta y/o dispersada y/o embebida en un núcleo de depósito que está revestido por membranas de celulosa semipermeables al agua, de manera preferente, membranas de etilcelulosa.

45 Los núcleos de depósito se pueden considerar depósitos de lactoferrina que están revestidos de manera adecuada con membranas semipermeables elaboradas de derivados de celulosa, tales como etilcelulosa, metilcelulosa, metilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa.

50 Otros componentes opcionales de las composiciones orales, según la presente invención, son excipientes formadores de película y excipientes de granulación que, a su vez, se pueden seleccionar de entre agentes de revestimiento gastrosolubles, agentes de revestimiento gastrorresistentes, agentes de revestimiento dependientes del pH, agentes de revestimiento independientes del pH, provistos de propiedades de liberación específicas de sitio, e incluyen acetato-ftalato de celulosa, polímeros de ácido metacrílico, goma laca, etilcelulosa y ácidos alginicos.

55 Además, las formulaciones para su utilización, según la presente invención, pueden comprender otras sustancias activas, tales como fármacos antiinflamatorios, mesalamina, derivados de mesalamina, corticosteroides, azatioprina, ciclosporina y anticuerpos monoclonales.

60 Las formulaciones orales para su utilización, según la presente invención, se pueden producir mediante un procedimiento de fabricación seleccionado de entre aquellos utilizados normalmente en áreas de fabricación farmacéutica, tales como proceso de compresión directa, proceso de granulación en húmedo, proceso de compactación/granulación en seco y un proceso que comprende granulación por fusión y carga/molienda conjunta y llenado final de polvo.

65 En particular, las formulaciones orales para su utilización, según la presente invención, se pueden obtener mediante un procedimiento que consiste en las siguientes etapas:

- a) mezclar lactoferrina tamizada con sustancias de matriz seleccionadas de entre sustancias lipídicas, sustancias hidrófilas y sustancias anfífilas;
- b) opcionalmente, añadir cualesquiera otras sustancias activas;

c) realizar una etapa seleccionada del grupo que consiste en granulación en húmedo, granulación en seco, llenado directo, molienda conjunta y granulación por fusión;

d) opcionalmente, añadir otros excipientes aceptables farmacéuticamente destinados a facilitar la viabilidad de la forma farmacéutica, tales como: agentes deslizantes, diluyentes, agentes antiadherentes, lubricantes y disgregantes, para obtener la forma sólida en polvo y/o gránulos y/o minicomprimidos y/o microgránulos con buenas propiedades de fluencia libre y compresibilidad;

e) realizar un revestimiento por película por medio de excipientes gastrosolubles o gastrorresistentes o excipientes dependientes del pH y/o independientes del pH que pueden retardar la liberación de lactoferrina, con el fin de obtener un revestimiento externo que proporciona una liberación específica de sitio en el tracto gastrointestinal.

Según la invención, para la preparación de un sistema de matriz monolítico, se prepara una matriz lipídica o anfifílica o hidrófila que contiene la lactoferrina, a continuación se añaden diversos excipientes funcionales para diluir y hacer que el producto sea viable a través de procedimientos farmacéuticos adecuados. La proporción entre las cantidades de fármaco y sustancias de matriz con respecto a los excipientes que se añaden en esta etapa no supera normalmente 1:4; la cantidad óptima de fármaco y sustancias de matriz es de entre el 0,1 % y el 20 % en peso de la cantidad de excipientes.

A esta mezcla, es posible añadir diluyentes en una cantidad de hasta el 50 % en peso, lubricantes en una cantidad del 0,5-3 % en peso, agentes deslizantes en una cantidad del 0,5-3 % en peso y disgregantes en una cantidad del 0,1-40 % en peso, refiriéndose todos los porcentajes al peso de la forma de dosificación unitaria final.

Una forma farmacéutica alternativa de lactoferrina consiste en sistemas de depósito. Para preparar un sistema de depósito de lactoferrina, se prepara un núcleo que contiene lactoferrina farmacéutica multiparticulada o monolítica mediante la carga de lactoferrina en excipientes inertes, tales como diluyentes, agentes deslizantes o lubricantes. La proporción en peso entre la lactoferrina y los agentes diluyentes puede ser, por ejemplo, 1:1; la proporción en peso entre la lactoferrina y los agentes deslizantes puede ser, por ejemplo, 1:0,5; la proporción en peso entre la lactoferrina y los lubricantes puede ser, por ejemplo, 1:0,5. A continuación, el núcleo resultante se reviste con una membrana semipermeable que regula el periodo de latencia y el tiempo de liberación. La membrana puede estar formada de polímeros de celulosa y derivados de los mismos, y el revestimiento proporciona un aumento del peso del sistema desde el 0,5 % hasta el 30 %.

En cuanto a las características de disolución, el contacto de estas formulaciones con agua o fluidos acuosos provoca la liberación modificada y/o retardada y/o ralentizada y/o específica de sitio de la sustancia activa que se dispersa, solubiliza inmediatamente en el sistema formulado de ese modo. Los excipientes y polímeros presentes en la estructura rigen la humectabilidad del sistema y la solubilización homogénea de la lactoferrina en intervalos de liberación estrechos, favoreciendo de ese modo su actividad localizada y/o una absorción continua y gradual o la liberación tópica gradual en el tracto gastrointestinal.

Ventajas y características adicionales de las formulaciones de lactoferrina para su utilización, según la presente invención, resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de los siguientes ejemplos con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- la figura 1 es un gráfico que muestra el efecto de bLf y bLfH (1 mg/ml) sobre la capacidad de adhesión de LF82 a células epiteliales;

- la figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de bLf y bLfH (1 mg/ml) sobre la capacidad de invasión de LF82 a células epiteliales;

- las figuras 3A, B y C son gráficos que muestran el efecto de bLf (1 mg/ml) sobre la expresión de ARNm de TNF-alfa, IL-8 e IL-6 en células epiteliales;

- las figuras 4A y B son gráficos que muestran el efecto de bLf sobre la expresión de ARNm de TNF-alfa, IL-8 e IL-6 en explantos de mucosa cultivados infectados con LF82 durante 6 horas (A) y 24 horas (B); y

- la figura 5 es un gráfico que muestra el efecto de la adición de bLf sobre la expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias, en particular, TNF-alfa, en células tratadas con INF-gamma.

Materiales y procedimientos

Las cepas de *E. coli* adherente e invasiva utilizadas en este estudio fueron LF82 (cepa de Crohn del íleon, proporcionada amablemente por Arlette Darfeuille-Michaud, Clermont Université, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, Francia).

LF82 se cultivó en placas de agar MacConkey durante 24 h a 37 °C y luego se subcultivó en caldo Luria Bertani (LB, Oxoid) con incubación durante la noche en aire a 37 °C. Antes de la infección de células, las bacterias se lavaron y resuspendieron en medio de cultivo celular a las concentraciones adecuadas.

Cultivos de líneas celulares

Las células Caco-2 (adenocarcinoma colorrectal humano) se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo

(ATCC, Rockville, MA). Las células se hicieron crecer a 37 °C en una atmósfera humidificada con el 5 % de CO₂ en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM, Gibco) complementado con suero fetal bovino inactivado al 10 % (FCS, Euroclone) y L-glutamina 2 mM.

5 Cultivo de órganos

El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario Umberto I, en el que los pacientes fueron admitidos. Para cada paciente, se obtuvo el consentimiento informado de los padres. Después del consentimiento escrito, se obtuvieron biopsias de sujetos con EC a partir de tejido intestinal no implicado macroscópicamente en procesos de inflamación crónica. Para el cultivo de órganos, las muestras se colocaron de inmediato en medio Trowell T8 y se trataron tal como se describe a continuación.

Las muestras de biopsia de mucosa se colocaron en rejillas de hierro con la cara de la mucosa hacia arriba en el pocillo central de una placa de cultivo de órganos (Falcon, Becton Dickinson, NJ, EE.UU.) que contenía medio Trowell T8 y medio NCTC-135 (proporción 3:1) (Biowest, Miami, FL, EE.UU.) complementado con FCS al 10 % (Euroclone). Las placas se colocaron en una cámara de incubadora modular (MP Biomedicals, Aurora, Ohio, EE.UU.) a una alta saturación de oxígeno (95 %) y se incubaron a 37 °C.

20 Productos químicos

La lactoferrina bovina (bLf) y su hidrolizado con pepsina (bLfH), producido por Morinaga Milk Industry Co., Ltd. se disolvieron en PBS a la concentración de 80 mg/ml.

25 Ensayo de citotoxicidad

Para establecer la dosis no citotóxica máxima de bLf o hidrolizado de bLf, se incubaron diluciones en serie de cada preparación a 37 °C con las diferentes líneas celulares hechas crecer en los diferentes medios de crecimiento a 37 °C en una incubadora con el 5 % de CO₂ humidificada. Después de 24, 48 y 72 h, se evaluarán los siguientes parámetros: enumeración, morfología y viabilidad de las células después de la dispersión en células individuales con tripsina.

30 Actividad antibacteriana

Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de bLf y bLfH se determinaron mediante procedimientos de microdilución en caldo. Las pruebas fueron realizadas con células LF82 hechas crecer previamente hasta la fase de crecimiento exponencial en caldo Mueller-Hinton a una concentración final de 5×10^5 UFC/ml.

Se añadieron cien microlitros de bacterias a los pocillos de una placa de 96 pocillos con 100 µl de diferentes concentraciones de bLf o bLfH (diluciones dobles en serie que oscilan entre 0,08 y 40 mg/ml). La CIM se definió como la concentración más baja de proteína o hidrolizado que provocó una inhibición completa del crecimiento bacteriano después de 24 horas de incubación a 37 °C.

Para determinar la concentración bactericida mínima (CBM), se tomó un volumen de 100 µl de los pocillos en los que no se había detectado crecimiento, se extendió en placas de TSA y se incubó a 37 °C durante 24 h. La CBM se definirá como la concentración a la que hay una disminución >99,9 % (3 log) en células viables.

45 Inhibición de la adhesión de LF82 a células Caco-2

Se prepararon monocapas de células Caco-2 en placas de cultivo tisular de 24 pocillos (Falcon).

50 Antes de la prueba de adhesión, las células se incubaron a 37 °C en DMEM complementado con FCS al 10 % en presencia o ausencia de bLf o bLfH (1 mg/ml). Después de 2 h, las células fueron infectadas con LF82 a una multiplicidad de infección (MOI, *multiplicity of infection*) de 1 o 10 bacterias por célula. Después de 3 h de incubación a 37 °C, las células se lavaron 3 veces y se lisaron con Triton X-100 al 0,1 %, y se determinó el número de UFC mediante siembra en placa. La adhesión bacteriana en las diferentes condiciones experimentales se definió como el porcentaje de bacterias unidas en comparación con la adhesión de bacterias sin tratar tomadas como el 100 %. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

60 Inhibición de la invasión por LF82 en células Caco-2

Para determinar la invasión bacteriana, se infectaron monocapas de células Caco-2 con 1 o 10 bacterias por célula. Después de 3 h de incubación a 37 °C, las células se lavaron 3 veces y se incubaron durante 2 h adicionales en medio complementado con gentamicina 0,1 mg/ml para destruir las bacterias extracelulares. La actividad de inhibición de bLf o bLfH 1 mg/ml se evaluó mediante la incubación de las células 2 h antes y durante la infección, en presencia o ausencia de proteínas. A continuación, se lavaron las monocapas y se lisaron mediante la adición de

agua desionizada que contenía Triton X-100 al 0,1 % durante 5 min para liberar las bacterias internalizadas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La invasión bacteriana en las diferentes condiciones experimentales se definió como el porcentaje de las bacterias intracelulares que podían cultivarse después del tratamiento con gentamicina y la lisis celular en comparación con bacterias sin tratar tomadas como el 100 %.

5

Análisis de citocinas en células Caco-2 infectadas

Se incubaron células Caco-2 en ausencia o presencia de bLf de bLfH durante 2 h antes y durante la infección (3 h a 37 °C) con LF82 (MOI de 1 o 10). Después de la infección, se recogieron los sobrenadantes de cultivo, se aclararon de cualesquiera células y patógenos mediante centrifugación y se mantuvieron congelados a -80 °C hasta su utilización. Los sobrenadantes y los extractos celulares se procesaron para citocinas (IL-6, IL-8 y TNF-alfa) mediante PCR en tiempo real cuantitativa.

10

15

Análisis de citocinas en cultivos de órganos infectados

Se incubaron cultivos de órganos en ausencia o presencia de bLf antes (2 h a 37 °C) y durante la infección con LF82 (108 UFC/ml). A continuación, las placas se colocaron en una cámara de incubadora modular (MP Biomedicals, Aurora, OH) a una alta saturación de oxígeno (95 %) y se incubaron a 37 °C. Después de 6 y 24 horas, se recogieron biopsias y se extrajo el ARN total para análisis por PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

20

Inducción de citocinas en células Caco-2

La inducción de citocinas proinflamatorias se realizó mediante el tratamiento de las células Caco-2, en ausencia o en presencia de bLf, con 5 ng/ml de interferón-gamma durante 6 horas. Los sobrenadantes y los extractos celulares se procesaron para citocinas (IL-6, IL-8 y TNF-alfa) mediante PCR en tiempo real cuantitativa.

25

PCR en tiempo real

La expresión de TNF-alfa, IL-8 e IL-6 se detectó mediante PCR en tiempo real. Los cebadores se diseñaron para secuencias no redundantes utilizando Primer Express V3.0 (Applied Biosystems, Foster City, California. Estados Unidos).

30

Los cebadores fueron: TNF-alfa: dir. 5'-TCTGGCCCAGGCAGTCAGATC-3'; inv. 5'-CAGTGATGTTGGGGATAAAGAGC-3'; IL-8: dir. 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3'; inv. 5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTTCTC-3'; IL-6: dir. 5'-AGGGCTCTTCGGCAAATGTA-3'; inv. 5'-GAAGGAATGCCCATTAACAACAA-3'.

35

El ARN total (1 µg) se sometió a transcripción inversa para ADNc mediante un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems). La amplificación mediante PCR en tiempo real se realizó con un sistema de detección de secuencias ABI@PRISM 7300, utilizando el kit SYBR@Green (Applied Biosystems). Los niveles de transcripción relativos se determinaron utilizando GAPDH como los genes de control endógeno: cebadores utilizados: 5'-TCATCAATGGAAATCCCATCA-3' y 5'-GCCAGCATCGCCCACTT-3'.

40

45

Resultados

Efecto de la lactoferrina y su hidrolizado con pepsina sobre la adhesión de LF82 a células Caco-2

Se llevó a cabo un conjunto preliminar de experimentos con el fin de determinar la concentración no citotóxica y no bactericida máxima de la lactoferrina y su hidrolizado con pepsina. Para este fin, diluciones dobles en serie de proteínas a partir de 4 mg/ml en MEM se incubaron con células Caco-2 durante 24 h a 37 °C. En estas condiciones, hasta 4 mg/ml de proteína no afectaron a ninguno de los parámetros de citotoxicidad (datos no mostrados). A continuación, se investigó la actividad antibacteriana de la lactoferrina y su hidrolizado con pepsina, y los resultados obtenidos mostraron que todas las proteínas, hasta 40 mg/ml, no afectaron a la viabilidad de células bacterianas. Posteriormente, se sometió a prueba el efecto de 1 mg/ml de proteínas sobre la adhesión de LF82 a células Caco-2.

50

Tal como se muestra en la figura 1, la unión de LF82 a las membranas de células Caco-2 no se vio afectada significativamente por bLf, mientras que el tratamiento con bLfH inhibió la adhesión bacteriana en aproximadamente el 95 y el 75 % con MOI 1 y MOI 10, respectivamente.

55

Efecto de la lactoferrina y su hidrolizado con pepsina sobre la invasión por LF82 en células Caco-2

A continuación, se sometió a prueba el efecto de bLf y bLfH sobre la invasión por LF82. Tal como se muestra en la figura 2, la internalización de LF82 en células Caco-2 se inhibió significativamente tanto por bLf como por bLfH, siendo bLfH más activa que bLf. De hecho, el tratamiento con bLfH dio como resultado una inhibición de la invasión bacteriana de aproximadamente el 90 y el 65 % con MOI 1 y MOI 10, respectivamente, mientras que, en las mismas

60

65

condiciones experimentales, bLf redujo la entrada de LF82 en aproximadamente el 75 y el 60 %.

Efecto de bLf y bLfH sobre la expresión de citocinas proinflamatorias

5 Con el fin de entender si bLf y bLfH podían influir en la producción de citocinas proinflamatorias y, por tanto, modular la inflamación, la expresión de ARNm del factor necrosis de tumoral alfa (TNF-alfa), la interleucina 8 (IL-8) y la interleucina 6 (IL-6) se analizó en células Caco-2 infectadas o no con LF82. La infección de monocapas se realizó en ausencia o presencia de bLf o bLfH, tal como se describe para la prueba de adhesión. En estas condiciones experimentales, la ausencia de actividad antibacteriana de bLf y bLfH fue relevante para excluir que diferentes expresiones de ARNm de citocinas pueden estar relacionadas con un número diferente de bacterias adherentes viables. Los resultados obtenidos mostraron que la adición de bLf no influyó en la expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias en células infectadas de forma simulada, mientras que disminuyó significativamente la expresión de ARNm de TNF-alfa, IL-8 e IL-6 en células infectadas con LF82 (figura 3). Este efecto no se debió a una acción directa sobre la invasión bacteriana, ya que bLfH, aunque puede prevenir la internalización bacteriana, no pudo regular negativamente la expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias (datos no mostrados).

Efecto de bLf sobre la expresión de ARNm de TNF-alfa, IL-8 e IL-6 en explantos de mucosa cultivados infectados con LF82

20 Para emular las condiciones *in vivo*, el efecto de bLf sobre la expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias también se analizó en las biopsias tomadas de dos sujetos con EC, tal como se describe en la sección Materiales y procedimientos, que se infectaron con LF82 y se cultivaron durante 6 y 24 horas, tal como se describe en la sección Materiales y procedimientos. De manera similar a los experimentos *in vitro*, los resultados obtenidos mostraron que la adición de bLf disminuyó la expresión de ARNm de TNF-alfa, IL-8 e IL-6 en explantos de mucosa cultivados infectados con LF82, siendo su inhibición más evidente después de 24 horas (figura 4).

Efecto de bLf sobre la expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias en células Caco-2 tratadas con INF-gamma

30 La expresión de la lactoferrina está regulada positivamente en respuesta a estímulos inflamatorios. La actividad antiinflamatoria se produce a través de la inhibición de la unión de la endotoxina del lipopolisacárido a células inflamatorias, así como a través de la interacción con células epiteliales en sitios locales de inflamación para inhibir la producción de citocinas inflamatorias (Conneely OM. Anti-inflammatory activities of lactoferrin. J Am Coll Nutr. 2001 20:389S-395S). Para evaluar un posible efecto directo de bLf sobre la síntesis de citocinas proinflamatorias, se trataron células Caco-2 con INF-gamma durante 6 horas en presencia o ausencia de bLf. Los resultados obtenidos mostraron que la adición de bLf disminuyó la expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias, en particular, TNF-alfa, en células tratadas con INF-gamma (figura 5).

Los siguientes ejemplos no limitativos están destinados a explicar la presente invención con más detalle.

40 EJEMPLO 1.

Se cargan 200 g de lactoferrina bovina en una mezcladora de alta cizalladura equipada con camisa calefactora y se amasan con 50 g de alcohol cetílico calentado previamente hasta la temperatura de reblandecimiento.

45 A continuación, la mezcla se granula con una suspensión acuosa que contiene 15 g de polivinilpirrolidona hasta que se obtiene un producto granulado homogéneo.

50 Se añaden 5 g de polivinilpirrolidona y 80 g de matriz hidrófila de hidroxipropilmetilcelulosa en la misma mezcladora de alta cizalladura.

Los componentes se mezclan hasta la dispersión homogénea de las matrices. A continuación, se añaden 100 g de celulosa microcristalina, 5 g de estearato de magnesio, 5 g de talco y 10 g de sílice coloidal en el orden de mención.

55 La mezcla se comprime para obtener un peso unitario final de 470 mg/comprimido, adecuado para proporcionar 200 mg de principio activo para cada comprimido.

A continuación, los comprimidos resultantes se revisten con película con hidroxipropilmetilcelulosa y plastificantes.

60 Los comprimidos sometidos a la prueba de disolución en el jugo gástrico y en ambiente intestinal simulado, según la edición actual de la Farmacopea Europea, mostraron el siguiente perfil de liberación: después de 60 minutos, menos del 30 %, después de 180 minutos, menos del 60 %, después de 5 horas, menos del 80 %.

EJEMPLO 2.

65 Se cargan 20 g de lactoferrina bovina en una/un granuladora/homogeneizador y se añaden 10 g de cera de carnauba y 45 g de alcohol cetílico. La mezcla se calienta hasta la temperatura de reblandecimiento y se obtiene una

mezcla homogénea.

Se añaden 155 g de matriz hidrófila de hidroxipropilmetilcelulosa y 50 mg de policarbófilo en la misma mezcladora.

- 5 Los componentes se mezclan hasta que se obtiene una dispersión homogénea de las matrices. A continuación, se añaden 210 g de fosfato de calcio, 5 g de estearato de magnesio y 5 g de sílice coloidal en el orden de mención.

La mezcla se comprime hasta un peso unitario final de 500 mg/comprimido, adecuado para proporcionar 20 mg de principio activo para cada comprimido.

- 10 A continuación, los comprimidos resultantes se revisten con película con hidroxipropilmetilcelulosa y plastificantes.

- 15 Los comprimidos sometidos a la prueba de disolución en el jugo gástrico y en ambiente intestinal simulado, según la edición actual de la Farmacopea Europea, mostraron el siguiente perfil de liberación: después de 60 minutos, menos del 25 %, después de 180 minutos, menos del 50 %, después de 5 horas, menos del 70 %.

EJEMPLO 3.

- 20 Se cargan 300 g de microgránulos elaborados de celulosa microcristalina y almidón de maíz en un sistema de lecho fluidizado Wuster; se suspenden 100 g de lactoferrina bovina con 20 g de polivinilpirrolidona al mismo tiempo que se cargan sobre los microgránulos.

- 25 El revestimiento con película se realiza adicionalmente mediante una solución acuosa que contiene 50 g de polivinilpirrolidona y 50 g de etilcelulosa para obtener microgránulos homogéneos.

- A continuación, se llenan cápsulas de tamaño 0 con la mezcla hasta un peso unitario final de 520 mg/cápsula para obtener 100 mg de principio activo por cápsula individual.

- 30 Las cápsulas sometidas a la prueba de disolución en el jugo gástrico y en ambiente intestinal simulado, según la edición actual de la Farmacopea Europea, mostraron el siguiente perfil de liberación: después de 120 minutos en los jugos gástricos, el 0 %, después de 60 minutos en el jugo entérico, menos del 25 %, después de 180 minutos, menos del 50 %, después de 6 horas, menos del 80 %.

EJEMPLO 4.

- 35 Se cargan 200 g de celulosa microcristalina con 100 g de almidón de maíz en un lecho fluidizado con 200 g de lactoferrina bovina.

- 40 La mezcla se granula con una solución acuosa que contiene 50 g de polivinilpirrolidona para obtener un producto granulado homogéneo.

A continuación, se añaden 150 g de hidroxipropilmetilcelulosa, 5 g de estearato de magnesio y 5 g de sílice coloidal.

- 45 A continuación, la mezcla se comprime hasta un peso unitario final de hasta 710 mg/comprimido para proporcionar comprimidos individuales que contienen 200 mg de principio activo.

A continuación, los comprimidos resultantes se revisten con película con polimetacrilatos y plastificantes para garantizar la resistencia gástrica y evitar la liberación de principio activo en el estómago.

- 50 Los comprimidos sometidos a la prueba de disolución en el jugo gástrico y en ambiente intestinal simulado mostraron el siguiente perfil de liberación: después de 120 minutos en los jugos gástricos, el 0 %, después de 60 minutos en el jugo entérico, menos del 25 %, después de 180 minutos, menos del 50 %, después de 6 horas, menos del 80 %.

EJEMPLO 5.

Se cargan 800 g de lactoferrina bovina en una/un granuladora/homogeneizador, y se añaden 400 g de hidroxipropilmetilcelulosa, 480 g de manitol y 252 g de celulosa microcristalina.

- 60 La mezcla se agitó durante 15 minutos.

Se añadieron 20 g de ácido esteárico, 8 g de croscarmelosa, 20 g de lecitina, 40 g de sílice coloidal y 20 g de estearato de magnesio en el orden de mención.

- 65 La mezcla se comprimió hasta un peso unitario final de 510 mg/comprimido para proporcionar comprimidos individuales que contienen, cada uno, 200 mg de principio activo.

Los comprimidos obtenidos se revisten con 500 g de goma laca (Aquagold al 25%), 50 g de hidroxipropilmetilcelulosa, 25 g de glicerina para obtener un comprimido revestido con película entérica de 50 mg.

5 Los comprimidos revestidos se sometieron a la prueba de disolución en el jugo gástrico y en ambiente intestinal simulado, según la edición actual de la Farmacopea Europea. Las pruebas mostraron el siguiente perfil de liberación: después de 120 minutos en los jugos gástricos, el 0 %, después de 60 minutos en el jugo entérico, menos del 25 %, después de 180 minutos, menos del 50 %, después de 8 horas, no menos del 80 %, después de 12 horas > 80 %.

10

EJEMPLO 6

Se cargan 800 g de lactoferrina bovina en una/un mezcladora/homogeneizador, a continuación se añaden 400 g de hidroxipropilmetilcelulosa, 480 g de manitol y 252 g de celulosa microcristalina.

15

La mezcla se agitó durante 15 minutos para obtener una mezcla homogénea.

Se añaden, por este orden, 20 g de ácido esteárico, 8 g de croscarmelosa, 20 g de lecitina, 40 g de sílice coloidal y 20 g de estearato de magnesio.

20

La mezcla se comprimió hasta un peso unitario final de 510 mg/comprimido para proporcionar comprimidos que contienen 200 mg de principio activo por comprimido individual.

25

Los comprimidos obtenidos se revisten con una solución acuosa que contiene 40 g de hidroxipropilmetilcelulosa y 8 g de talco para obtener un comprimido revestido con película de 12 mg.

Los comprimidos sometidos a la prueba de disolución en el jugo gástrico y en ambiente intestinal simulado, según la edición actual de la Farmacopea Europea, mostraron el siguiente perfil de liberación: después de 60 minutos, menos del 25 %, después de 180 minutos, menos del 60 %, después de 8 horas, menos del 80 %.

30

EJEMPLO 7.

Se cargaron 800 g de lactoferrina bovina en una/un mezcladora/homogeneizador y se añaden 416 g de celulosa microcristalina y 496 g de manitol.

35

La mezcla se agitó durante 15 minutos. Se añaden 20 g de ácido esteárico, 160 mg de PVP reticulada, 60 g de croscarmelosa, 20 g de lecitina, 40 g de sílice coloidal y 20 g de estearato de magnesio en el orden mencionado.

La mezcla se comprimió hasta un peso unitario final de 510 mg/comprimido para proporcionar comprimidos que contienen 200 mg de principio activo por comprimido individual.

40

Los comprimidos obtenidos se revistieron con 480 g de goma laca (Aquagold al 25%), 48 g de hidroxipropilmetilcelulosa y 24 g de glicerina para conseguir un comprimido revestido con película entérica de 50 mg.

45

Los comprimidos revestidos sometidos a la prueba de disolución en el jugo gástrico y en ambiente intestinal simulado, según la edición actual de la Farmacopea Europea, mostraron el siguiente perfil de liberación: después de 120 minutos en los jugos gástricos, el 0 %, después de 60 minutos en el jugo entérico, menos del 25 %, después de 180 minutos, > 70 %, después de 300 minutos, > 80 %.

50 EJEMPLO 8

Se cargaron 200 g de lactoferrina bovina en una mezcladora de alta cizalladura con camisa calefactora y se amasaron con 50 g de lauroil polioxiglicéridos llevados previamente hasta la temperatura de reblandecimiento.

55

La mezcla se granuló adicionalmente con una solución/suspensión acuosa que contenía 15 g de polivinilpirrolidona hasta que se obtuvo un granulado homogéneo.

Se añadieron 5 g de crospovidona y 80 g de hidroxipropilmetilcelulosa en la misma mezcladora.

60

Los componentes se mezclaron hasta que se obtuvo una dispersión homogénea de las matrices. A continuación, se añadieron 100 g de celulosa microcristalina, 5 g de estearato de magnesio, 5 g de talco y 10 g de sílice coloidal en el orden de mención.

65

La mezcla se comprimió hasta un peso unitario final de 470 mg/comprimido que es adecuado para la administración de 200 mg de principio activo para cada comprimido.

A continuación, los comprimidos resultantes se revistieron con película con hidroxipropilmetilcelulosa y plastificantes.

Los comprimidos, sometidos a la prueba de disolución en el jugo gástrico y en ambiente intestinal simulado, según la edición actual de la Farmacopea Europea, mostraron el siguiente perfil de liberación: después de 60 minutos, no más del 30 %, después de 180 minutos, no más del 60 %, después de 5 horas, no más del 80 %.

EJEMPLO 9

Se cargaron 20 g de lactoferrina bovina en una/un granuladora/homogeneizador y, a continuación, se añadieron 55 g de estearoil glicéridos. La mezcla se granuló hasta la temperatura de reblandecimiento, para obtener una mezcla homogénea. A continuación, se añadieron 205 g de hidroxipropilmetilcelulosa en la misma mezcladora.

Los componentes se mezclaron hasta la dispersión homogénea de las matrices y, a continuación, se añadieron 210 g de fosfato de calcio, 5 g de estearato de magnesio y 5 g de sílice coloidal en el orden de mención.

La mezcla se comprimió hasta un peso unitario final de 500 mg/comprimido adecuado para la administración de 20 mg de principio activo para cada comprimido.

A continuación, los comprimidos resultantes se revistieron con película con hidroxipropilmetilcelulosa y plastificantes.

Los comprimidos sometidos a la prueba de disolución en el jugo gástrico y en ambiente intestinal simulado, según la edición actual de la Farmacopea Europea, mostraron el siguiente perfil de liberación: después de 60 minutos, no más del 25 %, después de 180 minutos, no más del 50 %, después de 5 horas, no más del 70 %.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Giellepi S.p.A.

<120> LACTOFERRINA PARA EL TRATAMIENTO DE EII ASOCIADA CON INVASIÓN BACTERIANA

<130> BW697M

<160> 8

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..21

<223> /mol_type="ADN sin asignar" /note="TNF-alfa: dir." /organism="Secuencia artificial"

<400> 1

tctggcccag gcagtcagat c 21

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..23

<223> /mol_type="ADN sin asignar" /note="TNF-alfa: inv." /organism="Secuencia artificial"

<400> 2

cagtgatgtt ggggataaag agc 23

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 794 523 T3

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 5 <223> /mol_type="ADN sin asignar" /note="IL-8: dir." /organism="Secuencia artificial"

<400> 3
 atgactcca agctggccgt ggct 24

10 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_type="ADN sin asignar" /note="IL-8: inv." /organism="Secuencia artificial"

20 <400> 4
 ttcagccct ctcaaaaac ttctc 25

25 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_type="ADN sin asignar" /note="IL-6: dir." /organism="Secuencia artificial"

35 <400> 5
 agggctcttc ggcaaatgta 20

40 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /mol_type="ADN sin asignar" /note="IL-6: inv." /organism="Secuencia artificial"

<400> 6
 gaaggaatgc ccattaaca caa 23

50 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="ADN sin asignar" /note="cebadores de GAPDH dir." /organism="Secuencia artificial"

60 <400> 7
 tcatcaatgg aaatcccatc a 21

65 <210> 8
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 794 523 T3

<220>

<221> fuente

<222> 1..18

<223> /mol_type="ADN sin asignar" /note="cebador de GAPDH inv." /organism="Secuencia artificial"

5

<400> 8

gccagcatcg cccactt

18

REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulaci3n oral que proporciona una dosificaci3n de liberaci3n modificada que comprende lactoferrina para su utilizaci3n en el tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal asociada con invasi3n por *Escherichia coli* adherente e invasiva (ECAI).
2. Formulaci3n oral para su utilizaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que dicha enfermedad inflamatoria intestinal es enfermedad de Crohn.
- 10 3. Formulaci3n oral para su utilizaci3n, seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende lactoferrina disuelta y/o dispersada y/o embebida en una matriz y un revestimiento exterior, en la que dicha matriz comprende:
- 15 - sustancias seleccionadas del grupo de: sustancias lip3dicas, sustancias hidr3filas, sustancias anf3filicas, y mezclas de las mismas;
- y, opcionalmente, excipientes aceptables farmac3uticamente.
- 20 4. Formulaci3n oral para su utilizaci3n, seg3n la reivindicaci3n 3, en la que dichas sustancias lip3dicas se seleccionan del grupo que consiste en alcoholes grasos, 3cidos grasos, triglic3ridos y ceras.
- 25 5. Formulaci3n oral para su utilizaci3n, seg3n la reivindicaci3n 3, en la que dichas sustancias hidr3filas se seleccionan del grupo que consiste en pol3meros o copol3meros de 3cido acr3lico o metacr3lico, pol3meros de alquil vinil 3ter, hidroxialquilcelulosas, carboxialquilcelulosas, polisac3ridos, alginatos, pectinas, almidones, gomas naturales y sint3ticas, policarb3filo, y mezclas de los mismos.
- 30 6. Formulaci3n oral para su utilizaci3n, seg3n la reivindicaci3n 3, en la que dichas sustancias anf3filicas se seleccionan del grupo que consiste en lecitina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, alquil 3teres de glicol, tales como monometil 3ter de dietilenglicol, macrogol glic3ridos, hidroxiestearatos de polietilenglicol, ceras, laurilsulfato de sodio, dodecilsulfato de sodio, polisorbatos, 3cidos c3licos, polox3mero, sulfosuccinato de sodio, laurilsarcosinato de sodio, y mezclas de los mismos.
- 35 7. Formulaci3n oral para su utilizaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, en la que la lactoferrina est3 disuelta y/o dispersada y/o embebida en un n3cleo de dep3sito que est3 revestido por una pel3cula semipermeable.
8. Formulaci3n oral para su utilizaci3n, seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adem3s agentes de revestimiento gastrorresistentes seleccionados del grupo que consiste en goma laca, polimetacrilatos, acetofalato de celulosa, derivados de alginato.
- 40 9. Dosificaci3n de formulaci3n oral para su utilizaci3n, seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la cantidad de lactoferrina est3 entre 50 mg y 250 mg.

FIGURA 1

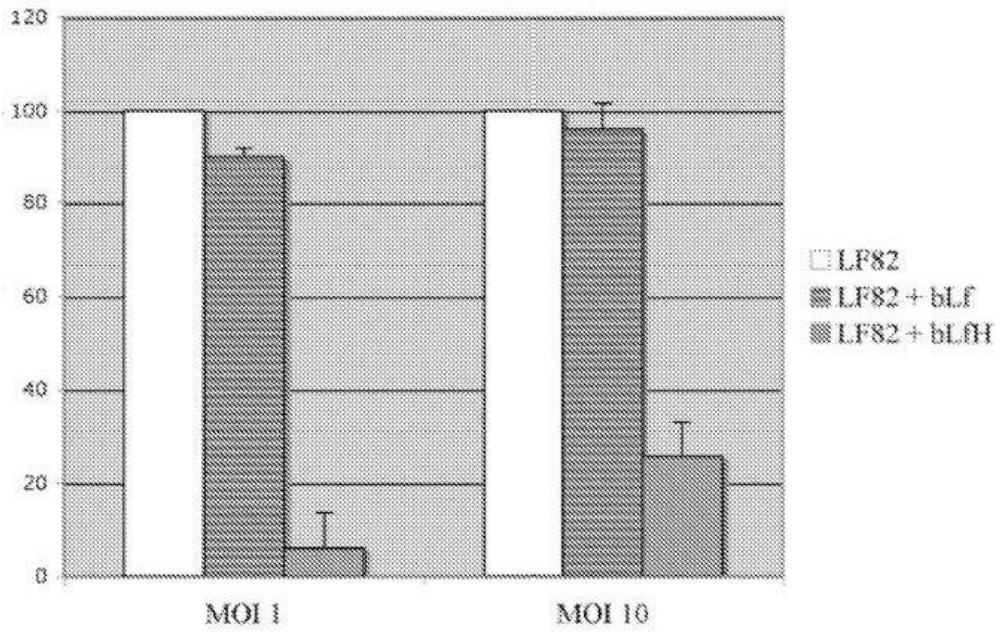


FIGURA 2

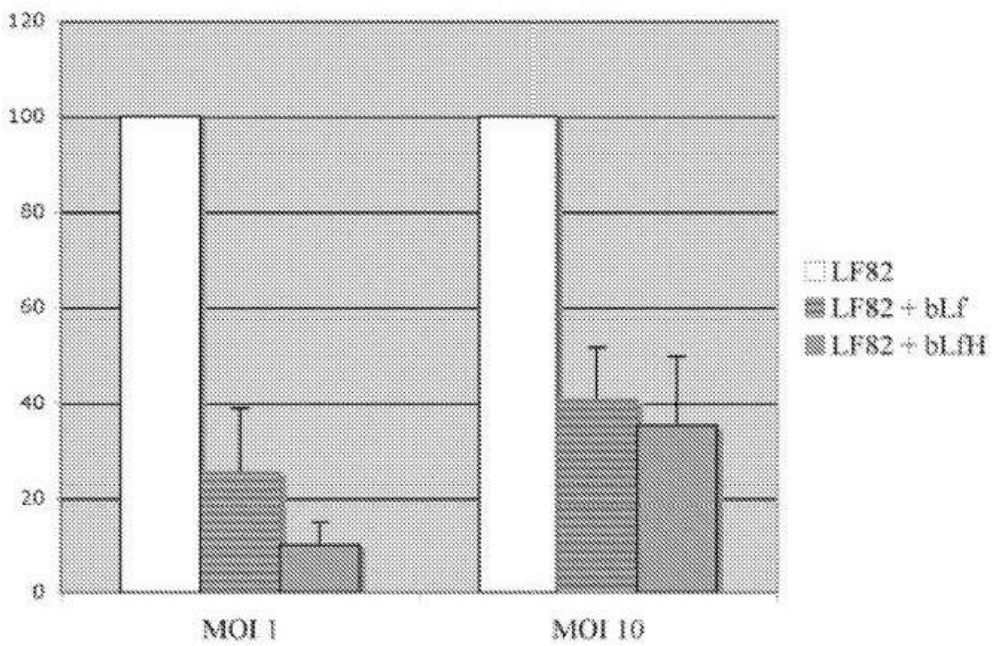


FIGURA 3

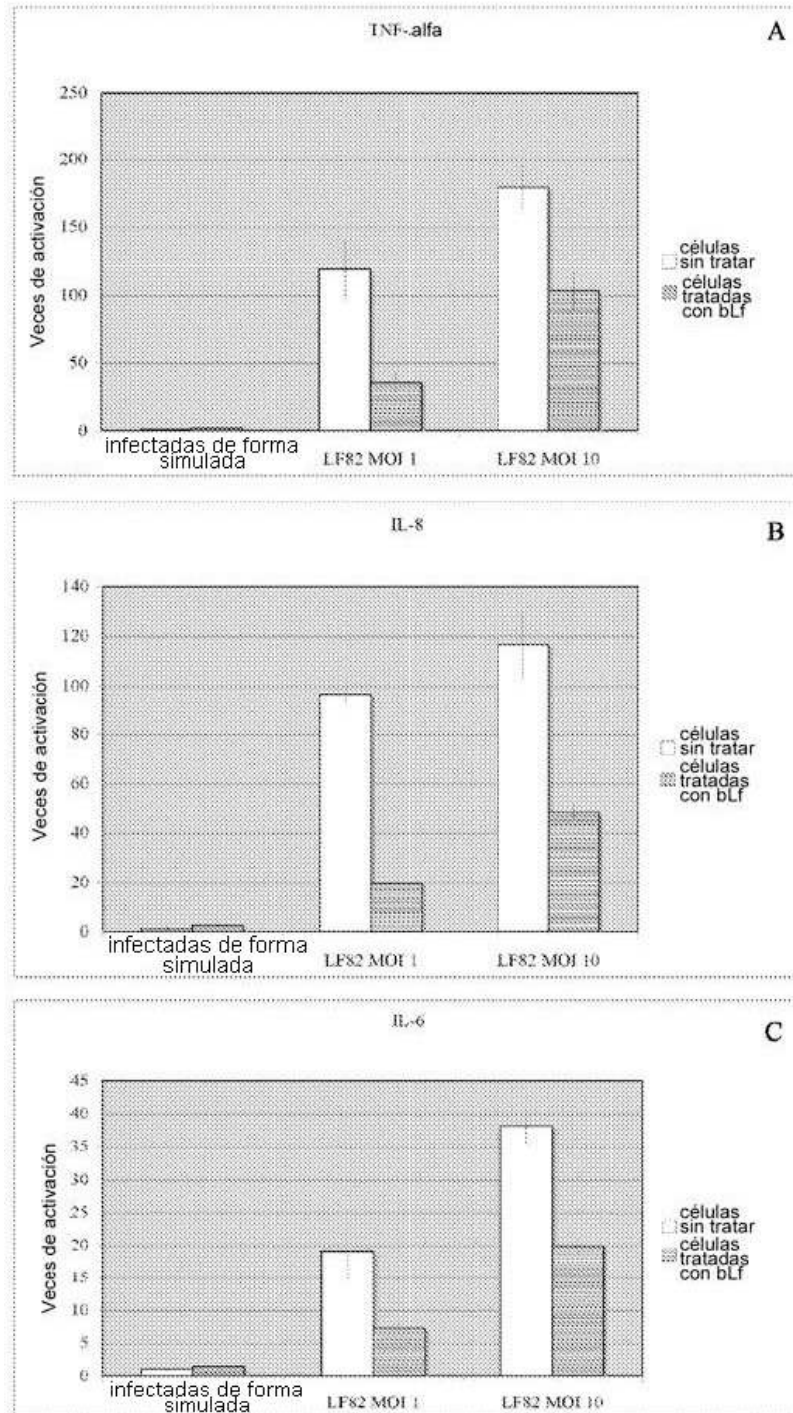


FIGURA 4

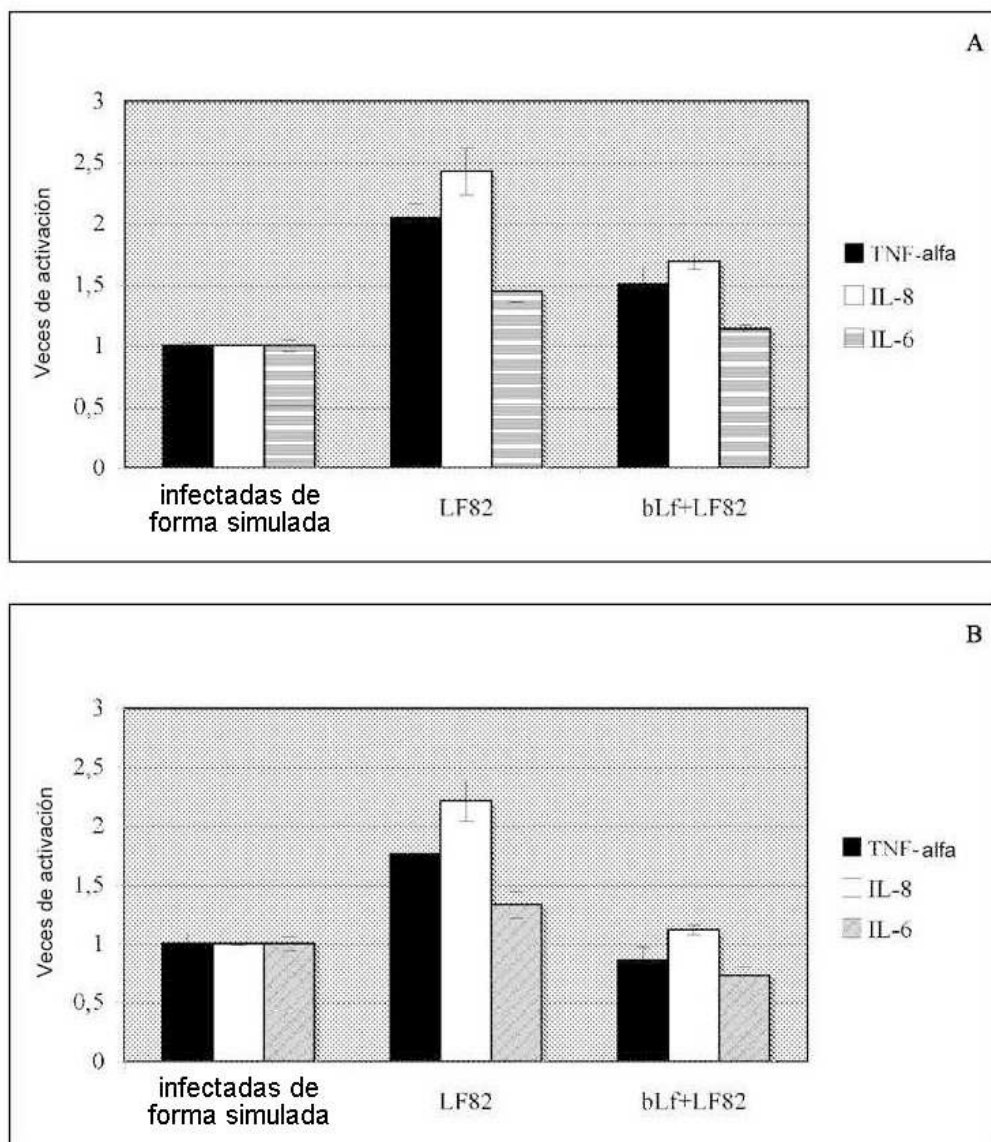
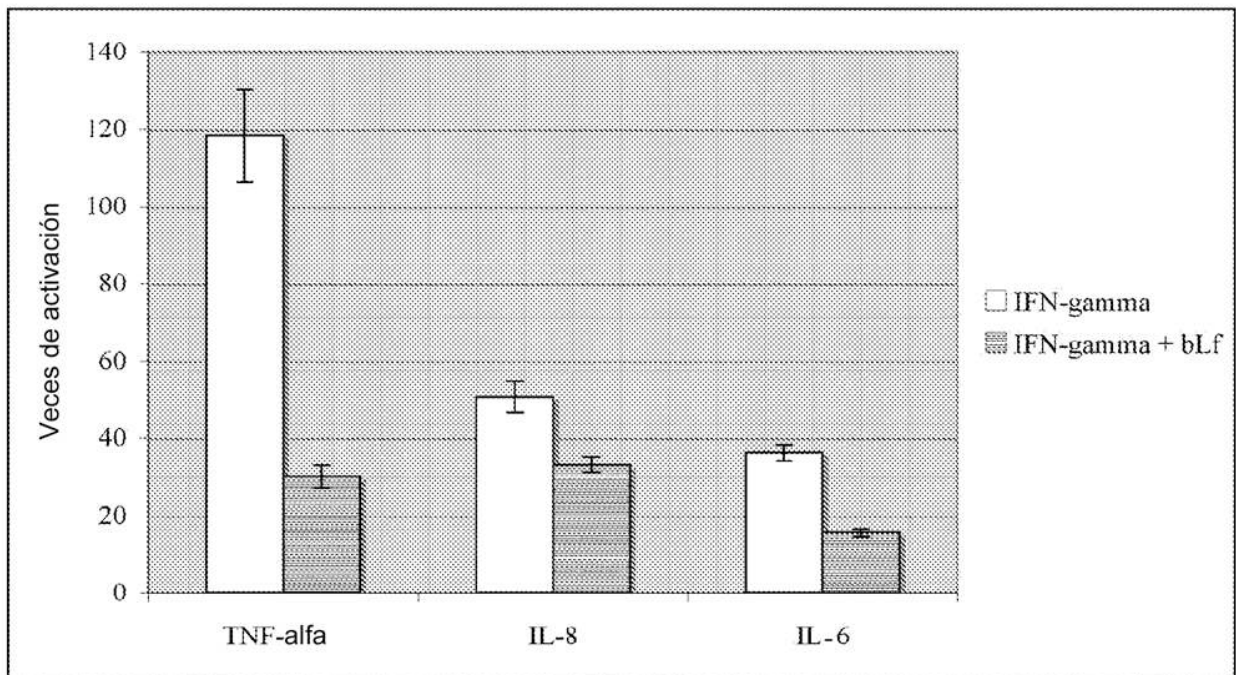


FIGURA 5



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2007038623 A
- EP 1350519 A

10

Literatura no patente citada en la descripción

- **NICOLAS BAMICH ; ARLETTE DARFEUILLE-MICHAUD.** Adherent-Invasive Escherichia coli and Crohn's Disease. *Curr Opin Gastroenterol.*, 2007, vol. 23 (1), 16-20
- **DARFEUILLE-MICHAUD A. ; NEUT C. ; BARNICH N. ; LEDERMAN E. ; DI MARTINO P. ; DESREUMAUX P. et al.** Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1998, vol. 115, 1405-1413
- Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. **STEIJNS, J.M. ; VAN HOOIJDONK.** Br J Nutr. A.C.M, 2000, vol. 84, 511-517
- Structure and activity of lactoferrin - A multi functional protective agent for human health. **SUPERTI, F. ; BERLUTTI, F. ; PAESANO, R. ; VALENTI, P.** Iron Metabolism and Disease. Research Signpost, 2008, 1-32
- **CONNELLYOM.** Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Am Coll Nutr.*, 2001, vol. 20, 389S-395S