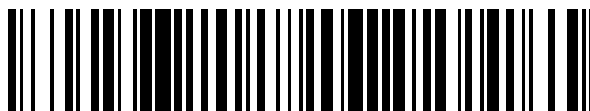


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 125**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/734 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01)
A61K 36/484 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01)
A61K 33/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2016** E 16181422 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** EP 3124048

54 Título: **Composición para su uso oral en el tratamiento de malestar o enfermedad por reflujo gastroesofágico**

30 Prioridad:
30.07.2015 IT UB20152623

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2021

73 Titular/es:
NEILOS S.R.L. (100.0%)
Via Bagnulo,95
80063 Piano di Sorrento (NA), IT

72 Inventor/es:
DI MAIO, UMBERTO

74 Agente/Representante:
FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

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

ES 2 811 125 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

Composición para su uso oral en el tratamiento de malestar o enfermedad por reflujo gastroesofágico

5 La presente invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de trastornos o enfermedades por reflujo gastroesofágico, preferiblemente en el tratamiento sintomático de trastornos o enfermedades por reflujo gastroesofágico. Dicha composición es para su uso oral y, desde el punto de vista físico, se encuentra en cualquier forma farmacéuticamente aceptable de administración. Además, dicha composición comprende una mezcla que comprende alginato de sodio, carbonato de calcio, bicarbonato de sodio, la enzima digestiva actinidina del extracto seco de fruta de *Actinidia chinensis Planch.* (kiwi), que tiene un contenido de actinidina de 16000 CDU/g, y regaliz (*Glycyrrhiza glabra L.*) en forma de extracto seco de raíz que contiene ácido glicirricico al 3%.

15 Se sabe que, actualmente, un número creciente de personas padecen trastornos o enfermedad por reflujo gastroesofágico que requieren tratamientos temporales o prolongados, según la gravedad, con composiciones o fármacos específicos. La enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) es un estado clínico caracterizado por el reflujo del contenido gastroduodenal hacia el esófago, con la aparición de síntomas capaces de interferir con la calidad de vida. Se estima que la pirosis retroesternal se produce al menos una vez al día en el 4-7% de la población general y en el 34-44% al menos una vez al mes. Se estima que la incidencia de ERGE es de 4.5/100.000, con un aumento notable a partir de los 40 años de edad.

20 El reflujo gastroesofágico se refiere al "paso involuntario e inconsciente de parte del contenido gástrico hacia el esófago, sin la participación conjunta de los músculos gástricos y abdominales." El esófago es un canal, de 25-30 cm de longitud, que conecta la boca con el estómago, y a lo largo del cual es posible identificar dos estructuras esfinterianas: la primera estructura esfinteriana se encuentra entre la hipofaringe y el tracto cervical del esófago (EES, esfínter esofágico superior), mientras que la segunda estructura esfinteriana, denominada esfínter esofágico inferior (EEI), se encuentra en el nivel de la unión gastroesofágica. Esta última es una zona de alta presión que representa la estructura antirreflujo principal, gracias a su ubicación entre la zona intratorácica de presión negativa y la zona intraabdominal de presión positiva. Por tanto, en condiciones normales, un aumento en la presión abdominal tiene repercusiones en el nivel del EEI, lo que evita el retorno de material ingerido hacia el esófago. En condiciones fisiológicas, el EEI se cierra y se relaja durante un tiempo de aproximadamente 3-10 segundos tras la deglución.

Otras estructuras anatómicas, además del EEI, que contribuyen al mantenimiento de la barrera antirreflujo son:

- 35 • El ángulo de His, un ángulo agudo formado entre el esófago y el fondo gástrico;
- El ligamento frenoesofágico;
- El collar diafragmático, que consiste en fascias del diafragma, que envuelven el esófago como una bufanda y constriñen la luz durante la inspiración.

40 Existen numerosos factores subyacentes a la patogénesis de ERGE, tales como, por ejemplo:

45 1. Insuficiencia de la barrera antirreflujo de esfínter esofágico inferior, que tiene el fin de evitar de manera mecánica que los jugos gástricos fluyan hacia el esófago.

2. Retraso en el vaciado gástrico debido a anomalías anatómicas o alteraciones funcionales: (i) anomalías anatómicas: estenosis del píloro (es la región terminal del estómago, que regula el paso del contenido gástrico en el duodeno); (ii) alteraciones funcionales: alteraciones motoras del fondo (región responsable del vaciado de líquidos).

50 3. Insuficiencia del mecanismo de aclaramiento esofágico, que tiene el fin de minimizar el contacto entre la mucosa esofágica y los jugos gástricos actuando tanto a través del peristaltismo esofágico como de la neutralización de residuos ácidos gracias a la saliva.

55 4. Hiperacidez gástrica.

5. Agresividad del contenido gástrico que fluye de vuelta hacia el esófago, debido a la acción de HCl.

60 6. Reflujo duodenogástrico con el paso de secreciones pancreáticas y biliares hacia el estómago que, en el caso de reflujo gastroesofágico, puede provocar lesiones más graves. Otros factores predisponentes incluyen el tabaquismo, el comportamiento dietético inadecuado (comidas abundantes, alimentos con alto contenido en grasas, cafeína), los fármacos, el embarazo y la obesidad, que pueden exacerbar la ERGE (enfermedad por reflujo gastroesofágico). Una hernia de hiato (extensión de una parte del estómago hacia el tórax a través de una abertura en el diafragma denominada hiato esofágico) también acompaña con frecuencia a la ERGE, y puede contribuir a la exposición prolongada al contenido gastroduodenal. En general, las paredes del hiato esofágico se adhieren estrechamente al esófago, pero puede suceder que las estructuras de anclaje de la parte inferior del esófago pierdan tono, favoreciendo el ascenso de una pequeña parte del estómago hacia el tórax.

5 En cualquier caso, sea cual sea el motivo, el contacto frecuente y repetido de los materiales gástricos regurgitados con la mucosa esofágica ejerce una acción perjudicial sobre esta última, que es más grave cuanto más largo sea el tiempo de contacto y menor sea el pH del reflujo (materiales gástricos regurgitados). Con el tiempo, la acción flogística persistente que afecta a la mucosa esofágica conduce a una reacción inflamatoria que puede evolucionar para dar úlceras, estenosis y la denominada metaplasia columnar (o epitelio de Barrett, el factor de riesgo individual más importante para el desarrollo de adenocarcinoma esofágico). Los síntomas que se consideran típicos son pirosis retroesternal (definida por el paciente como una sensación de ardor que comienza en el estómago o en la parte inferior del tórax y se eleva hacia el cuello) y regurgitación (percepción de líquido ácido y de sabor amargo en el interior de la cavidad oral), síntomas cuya especificidad para la ERGE es igual al 89 y al 95%, respectivamente. Los síntomas frecuentes, aunque menos específicos, son odinofagia, disfagia, arcadas, dolor epigástrico, distensión abdominal y dificultades digestivas. Algunos de estos síntomas caracterizan el diagnóstico de dispepsia funcional, y se sabe que entre el 10% y el 17% de los pacientes que requieren intervención médica para la dispepsia presentan ERGE (enfermedad por reflujo gastroesofágico).

15 El documento WO 2015/105346 divulga composiciones farmacéuticas para el tratamiento de reflujo gástrico que comprenden alginato de sodio, carbonato de calcio y bicarbonato de sodio y un extracto de *Glycyrrhiza*. También pueden añadirse aromatizantes, incluyendo extracto de kiwi.

20 El documento US 2013/210762 divulga composiciones farmacéuticas para el tratamiento de dispepsia que comprenden alginato de sodio, bicarbonato de sodio y carbonato de calcio.

Alim. Pharmac. Ther. 2000, 14(6), 669 divulga antiácidos a base de alginato, tales como Gaviscon®, que comprenden alginato de sodio, bicarbonato de sodio y carbonato de calcio.

25 El documento US 2015/037315 divulga complementos alimenticios para el tratamiento de disfunción digestiva y trastornos gastrointestinales (o sus síntomas), tales como reflujo gástrico, que comprenden extractos de la fruta del kiwi y amilasa.

30 El documento US 2010/143319 divulga que los extractos de la fruta del kiwi son útiles para gestionar la salud intestinal y tratar trastornos del tracto gastrointestinal, tales como reflujo gástrico.

J. Diet. Suppl. 2015, 12(2), 138 divulga mezclas de carbonato de calcio y extracto de regaliz para su uso en el tratamiento de gastroesofágico reflujo.

35 El documento WO 2010/092468 divulga composiciones que comprenden alginatos, tales como alginato de sodio, y antiácidos, incluyendo carbonato de calcio y bicarbonato de sodio, para su uso en el tratamiento de reflujo gastroesofágico y dispepsia.

40 Por tanto, existe la necesidad constante de poder tener composiciones o fármacos para el tratamiento de reflujo gastroesofágico que se toleren bien, sean eficaces y, si es posible, no tengan efectos secundarios, especialmente en el caso de individuos que tienen que tomar fármacos o composiciones antirreflujo durante periodos de tiempo prolongados. Después de una larga e intensa actividad de investigación y desarrollo, el solicitante ha identificado una combinación (mezcla) de compuestos y sustancias que son capaces de actuar eficazmente, de manera mutuamente sinérgica, contra trastornos o enfermedad por reflujo gastroesofágico.

45 Ventajosamente, dicha combinación (mezcla) de compuestos y sustancias se tolera bien y no muestra efectos secundarios, incluso si se administra a lo largo de periodos prolongados en forma de una composición para su uso oral.

50 La presente invención se refiere a una composición que comprende una mezcla, que tiene las características tal como se definen en la reivindicación independiente adjunta.

55 La presente invención se refiere a dicha composición para su uso como medicamento, que tiene las características tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

60 La presente invención se refiere a dicha composición para su uso oral en el tratamiento de trastornos o enfermedades por reflujo gastroesofágico, que tiene las características tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas. Preferiblemente, el tratamiento de trastornos o enfermedad por reflujo gastroesofágico incluye la reducción de los tiempos de vaciado gástrico.

Las realizaciones preferidas de la presente invención se ilustran a continuación.

65 El solicitante ha desarrollado una mezcla de compuestos y sustancias que realizan una actividad mutuamente sinérgica.

Según la invención, la mezcla comprende alginato de sodio, carbonato de calcio, bicarbonato de sodio, la enzima digestiva actinidina del extracto seco de fruta de *Actinidia chinensis Planch.* (kiwi), que tiene un contenido de actinidina de 16000 CDU/g, y regaliz (*Glycyrrhiza glaba L.*) en forma de extracto seco de raíz que contiene ácido glicirrónico al 3%.

5 Los alginatos, tales como alginato de sodio, son polisacáridos naturales que precipitan en contacto con el ácido gástrico, formando un gel de baja densidad (con un pH casi neutro) en sólo unos minutos. El cambio en el pH está provocado por bicarbonatos y carbonatos, que también están presentes juntos en la mezcla de la invención, sin dióxido de carbono, que queda atrapado dentro del gel de alginato, lo que provoca que flote en el contenido gástrico. El gel de alginato se forma en la parte del estómago cerca de la unión gastroesofágica, precisamente donde se desarrolla la bolsa de ácido. De esta manera, se bloquea o se reducen en gran medida el reflujo de ácido desde el estómago al canal esofágico.

15 El bicarbonato de sodio y el carbonato de calcio juntos son eficaces en la neutralización de HCl, el componente fundamental del jugo gástrico producido por las células parietales del estómago. Una vez que llegan al estómago, los bicarbonatos, tales como bicarbonato de sodio, reaccionan con el HCl, produciendo dióxido de carbono, y garantizan una acción antiácida inmediata. Por tanto, el dióxido de carbono producido queda atrapado dentro del gel de alginato, lo que provoca que flote en el contenido gástrico.

20 El segundo motivo, en orden de importancia, de la aparición de síntomas de reflujo gastroesofágico, es el vaciado gástrico tardío. Cuanto más tiempo permanezcan los alimentos en el estómago, más probable será que pueda producirse un episodio de reflujo gastroesofágico.

25 Las enzimas digestivas, tomadas juntas, son esenciales para digerir las proteínas de los alimentos, que se reducen para dar fragmentos moleculares que son lo suficientemente pequeños como para permitir su absorción. A través de su acción, las enzimas digestivas son capaces de romper los enlaces peptídicos que unen los diversos aminoácidos y cuya concatenación repetida da lugar a moléculas de proteína; esto facilita el proceso de la digestión.

30 El uso de la enzima digestiva actinidina de *Actinidia chinensis Planch.* (kiwi) en la presente mezcla, en asociación con alginato de sodio, bicarbonato de sodio y carbonato de calcio, sirve para modificar el tiempo de vaciado gástrico, reduciéndolo. Este efecto se debe a la acción sinérgica combinada debida a la presencia de los compuestos/sustancias individuales.

35 El efecto de vaciado gástrico obtenido en tiempos más cortos y con eficacia y control mejorados se debe a una acción sinérgica combinada, que se obtiene gracias a la presencia de los compuestos/sustancias individuales, incluyendo la asociación entre dicha enzima digestiva actinidina de *Actinidia Chinensis Planch.* (kiwi) y regaliz.

40 Preferiblemente, dicha composición para su uso oral en el tratamiento de trastornos o enfermedad por reflujo gastroesofágico incluye la reducción de los tiempos de vaciado gástrico, comprendiendo dicha composición una mezcla que tiene las características tal como se definen en la reivindicación adjunta.

45 El regaliz (*Glycyrrhiza glaba L.*) pertenece a la familia *Leguminosae*, y contiene, entre sus constituyentes principales, saponinas triterpénicas, especialmente glicirricina (ácido glicirrónico). El regaliz (*Glycyrrhiza glaba L.*) presente en la mezcla en forma de extracto seco (e.s.) de la raíz ejerce, en sinergia con los otros compuestos o sustancias presentes en la mezcla, una acción eficaz en la reducción de la secreción gástrica, que es importante para reducir, en la medida de lo posible, la cantidad de ácido producido.

50 Ventajosamente, la mezcla de la presente invención y, por consiguiente, la composición que la contiene, es capaz de ejercer (i) una acción antirreflujo con el objetivo de reducir el paso de ácido desde el estómago al esófago, (ii) una acción antiácida, con el objetivo de neutralizar la hiperacidez gástrica, (iii) una acción digestiva, con el objetivo de reducir los tiempos de vaciado gástrico y/o (iv) una acción antiulcerosa/antiinflamatoria.

55 La composición de la presente invención comprende dicha mezcla, que comprende alginato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de calcio, dicha enzima digestiva actinidina de *Actinidia chinensis Planch.* (kiwi) y regaliz (*Glycyrrhiza glaba L.*) en forma de extracto seco de raíz; siendo dicha composición para su uso en el tratamiento de trastornos o enfermedad por reflujo gastroesofágico, preferiblemente en el tratamiento sintomático de trastornos o enfermedad por reflujo gastroesofágico. Siendo dicha composición para su uso oral en cualquier forma farmacéuticamente aceptable de administración, tal como, por ejemplo, en forma de cápsulas, pastillas, comprimidos, gránulos o polvos solubles o dispersables en agua envasados en barras o sobres, jarabe o disolución. Preferiblemente, dicha composición para su uso de la presente invención también puede aplicarse de manera válida como un agente gastroprotector en el tratamiento de trastornos o enfermedad por reflujo gastroesofágico que incluye la normalización y mejora de la función digestiva.

65 Junto con una acción antirreflujo, antiácida y antiinflamatoria, la composición para su uso de la presente invención asocia una acción dirigida realizada por la enzima digestiva actinidina de *Actinidia chinensis Planch.* (kiwi), permitiendo de ese modo una reducción apreciable en el tiempo de vaciado gástrico, gracias a una digestión más rápida y más

eficaz, y una reducción simultánea en la cantidad de ácido clorhídrico producido que entra en contacto con la mucosa gástrica. La reducción en el tiempo de vaciado gástrico, la reducción en la cantidad de ácido clorhídrico producido y la reducción en los tiempos de contacto entre el ácido clorhídrico y la mucosa gástrica permiten que la composición para su uso de la presente invención mejore los síntomas de la ERGE.

5 En una realización preferida de la presente invención, la composición para su uso comprende una mezcla que contiene, en relación con 10 ml de volumen: (i) alginato de sodio: 500 mg; (ii) bicarbonato de sodio: 150 mg; (iii) carbonato de calcio: 266,66 mg; (iv) la enzima digestiva actinidina del extracto seco de fruta de *Actinidia chinensis Planch.* (kiwi), contenido de actinidina de 16000 CDU/g: 20 mg; y (v) extracto seco de raíz de *Glycyrrhiza glabra L.* (regaliz) que contiene ácido glicirrónico al 3%: 30 mg. La composición se prepara usando técnicas y equipos conocidos por el experto en la técnica, que es capaz de mezclar juntos los diversos componentes/sustancias y crear una forma farmacéutica, por ejemplo cápsulas, pastillas, comprimidos, gránulos o polvos solubles o dispersables en agua envasados en barras o sobres, jarabe o disolución.

15 La composición para su uso de la presente invención permite la sinergia de las siguientes acciones:

- Acción antirreflujo, con el objetivo de reducir el paso de ácido desde el estómago al esófago;
- Acción antiácida, con el objetivo de neutralizar la hiperacidez gástrica;
- Acción digestiva, con el objetivo de reducir los tiempos de vaciado gástrico;
- Acción antiulcerosa/antiinflamatoria.

25 Tal como ya se indicó, la ERGE está provocada por el paso involuntario e inconsciente de parte del contenido gástrico hacia el esófago; este paso provoca daño a la mucosa esofágica que varía basándose en el número de reflujos a lo largo del tiempo y la cantidad de ácido que entra en contacto con la mucosa. Este último factor puede verse particularmente influido por el tiempo de vaciado gástrico; de hecho, cuanto más tiempo permanezcan los alimentos ingeridos a través de la dieta en el estómago, mayor será la cantidad de ácido producido por las células parietales, con el consiguiente aumento en los síntomas asociados con la ERGE.

30 Una vez administrados por vía oral, los alginatos contenidos en el producto de la invención formarán, tal como se describió previamente, un "tapón" que reduce la cantidad de jugo gástrico que se eleva desde el estómago hacia el esófago, minimizando de ese modo el tiempo de exposición de la mucosa a ácidos. Simultáneamente, el bicarbonato de sodio y el carbonato de calcio reaccionan con el HCl, neutralizándolo; la acción antiácida reduce la cantidad de HCl que se transportará hacia el esófago tras el siguiente reflujo, reduciendo de ese modo el daño a la mucosa esofágica.

35 La enzima digestiva actinidina de *Actinidia chinensis Planch.* (kiwi) es capaz de romper los enlaces peptídicos que unen los diversos aminoácidos y cuya concatenación repetida da lugar a moléculas de proteína; esto facilita el proceso de digestión. La razón entre los tiempos de vaciado gástrico y los tiempos de exposición del esófago con respecto a los jugos gástricos es difícil de evaluar; un retardo en los tiempos de vaciado gástrico influye en la cantidad de ácido que consigue pasar la válvula gastroesofágica, pero no influye en el número total de reflujos. La reducción de los tiempos de vaciado gástrico reduce la cantidad de ácido producido a lo largo del tiempo; por tanto, la acción de las enzimas digestivas es reducir la cantidad de ácido que pasa a través de la válvula gastroesofágica, reduciendo de ese modo los tiempos de exposición de la mucosa a la acción dañina de los ácidos y protegiendo adicionalmente a la mucosa gástrica de la acción prolongada de los ácidos. Finalmente, la acción antiinflamatoria del regaliz mejora los síntomas asociados con la exposición prolongada de la mucosa a la acción de los jugos gástricos.

50 Parte experimental

Estudio llevado a cabo sobre la composición de la presente invención para el tratamiento de reflujo gastroesofágico.

Se realizó una evaluación del efecto de una composición de la presente invención C1 y los constituyentes individuales de la misma (con el fin de observar un efecto sinérgico entre los componentes individuales) (i) sobre el vaciado gástrico, (ii) sobre la esofagitis por reflujo, (iii) sobre la secreción gástrica (volumen de contenido gástrico, pH y acidez total) y (iv) sobre la úlcera gástrica.

Materiales y métodos: Animales

60 Se usaron ratones macho de la raza ICR suministrados por la empresa Charles River y que pesaban 20-25 g. Los animales se alojaron en salas con temperatura controlada (temperatura de 23±2°C, humedad del 50±2%, ciclos de luz-oscuridad de 12 horas).

65 Los ratones tenían acceso libre a agua y alimento, que consistía en una dieta convencional suministrada por la empresa Mucedola Mangimi (Settimo Milanese, Italia).

Todos los experimentos se realizaron en cumplimiento con el Decreto Legislativo n.º 116 del 27 de enero de 1992 y según las directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609/CCE y 2010/63/UE).

Vaciado gástrico

5 Se evaluó el vaciado gástrico con el método descrito por Smits y Lefebvre (1996). Con el fin de determinar el vaciado gástrico, a los animales se les administró por vía oral un marcador (0,2 ml/ratón de una suspensión que contenía 50 mg de rojo de fenol en 100 ml de carboximetilcelulosa al 1,5%). Después de veinte minutos, se sacrificaron los animales en una atmósfera saturada con CO₂ y se extrajo el estómago. Posteriormente, se colocó el estómago dentro de un tubo de ensayo que contenía 4 ml de solución salina; después de 20 segundos de agitación, se añadieron 2 ml de NaOH 1 M a cada tubo de ensayo con el fin de lograr la máxima intensidad de color.

10 Se llevó a cabo un análisis espectrofotométrico (560 nm) sobre 1 ml de esta disolución. El porcentaje de vaciado gástrico se calculó según la siguiente fórmula: $100 \times (1 - [\text{cantidad de rojo de fenol presente en el estómago después de 20 min}] / [\text{cantidad de rojo de fenol presente en el estómago en el momento 0}])$.

Esofagitis por reflujo y secreción/úlceras gástricas

20 Se indujeron esofagitis por reflujo y secreción/úlceras gástricas usando el modelo experimental de ligadura del píloro descrito por Shay *et al.* (1945). Los animales, en ayunas durante 24 horas pero con acceso libre a agua, se anestesiaron, se abrió el abdomen y se ligó el píloro. Cuatro horas después del procedimiento quirúrgico (tiempo necesario para determinar una lesión submáxima de la mucosa del esófago), los ratones se sacrificaron en una atmósfera saturada con CO₂ y se extrajeron el esófago y el estómago para la evaluación de: 1) el daño esofágico y gástrico macroscópico, 2) el grado de inflamación esofágica y gástrica (actividad de mieloperoxidasa) y 3) los parámetros característicos de secreción gástrica (volumen del contenido gástrico, pH y acidez total).

1) Daño esofágico y gástrico macroscópico

30 El esófago (abierto longitudinalmente) y el estómago (abierto a lo largo de la curvatura mayor), se extendieron sobre un soporte de poliestireno y se analizaron con la ayuda de un microscopio para identificar lesiones de la mucosa. El daño a la mucosa se determinó usando una escala de puntuación que tiene en cuenta la gravedad y el grado de hiperemia y erosiones hemorrágicas.

2) Grado de inflamación del esófago y el estómago

35 El grado de inflamación del esófago y el estómago se evaluó determinando la actividad de mieloperoxidasa (MPO). La MPO es una proteína que se encuentra en los gránulos azurófilos de neutrófilos polimorfonucleares y se usa como un marcador de infiltración de leucocitos. Con el fin de evaluar la actividad de MPO, se sometieron los tejidos a tres ciclos de homogeneización de 10 s de duración cada uno, a velocidad máxima, en un tampón de lisis adecuado definido como MOPS (HTAB al 0,5% en MOPS 10 mM), en una razón de 50 mg de tejido/ml de MOPS. Los homogeneizados se sometieron a centrifugación a 12.000 rpm durante 20 min a 4°C. Posteriormente, se incubaron los sobrenadantes con NaPP (tampón fosfato de sodio, pH 5,5) y TMB 16 mM (tetrametilbencidina) y, después de cinco minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió H₂O₂ diluido en NaPP. Se bloqueó la reacción con ácido acético frío 2 M, y se tomó una lectura de 1 ml de la disolución de reacción en un espectrofotómetro a una longitud de onda (X) de 650-655 nm. Los valores obtenidos se compararon con la curva de calibración de MPO y los resultados se expresaron como U/ml de MPO.

3) Evaluación de los parámetros característicos de secreción gástrica

50 Se recogió el contenido gástrico con el fin de determinar el valor de pH y la cantidad total de jugo gástrico (volumen). Posteriormente, se añadieron 2 ml de agua destilada al contenido gástrico, que se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min para la determinación de la acidez total, llevada a cabo sobre el sobrenadante mediante valoración hasta pH=7 (usando fenolftaleína al 2% como indicador) con NaOH 0,01 N. La acidez total se expresó como mequiv. de [H⁺]/ml/4 h.

Tratamiento farmacológico

Los ratones se dividieron en 6 grupos:

60 Grupo 1: control, composición C1 basada en una dieta convencional.

Grupo 2: composición de la presente invención C2 basada en: bicarbonato de sodio, alginato de sodio, carbonato de calcio, enzimas digestivas y regaliz,

65 Grupo 3: composición C3 basada en: bicarbonato de sodio, alginato de sodio y carbonato de calcio,

Grupo 4: composición C4 basada en: bicarbonato de sodio, alginato de sodio, carbonato de calcio y enzimas digestivas,

5 Grupo 5: composición C5 basada en: [composición C2] + una mezcla de extractos vegetales que consiste en e.s. de higo chumbo, e.s. de aceituna y menta.

Grupo 6: composición C6 basada en: composición C5 a la mitad de dosificación de C5.

10 Los tratamientos se administraron por vía oral 30 minutos antes de la administración oral del marcador adoptado para medir el vaciado gástrico (ensayo de vaciado gástrico) e inmediatamente después de la ligadura del píloro (ensayo de secreción gástrica).

15 La presente invención se refiere a una composición para su uso oral que comprende una mezcla que comprende o, alternativamente, consiste en bicarbonato de sodio, alginato de sodio, carbonato de calcio, enzimas digestivas (tal como se describió anteriormente) y regaliz, juntos con una mezcla de extractos vegetales que comprende o, alternativamente, que consiste en e.s. de higo chumbo, e.s. de aceituna y menta.

Una realización RefluWard™ comprende:

20 - glicerina vegetal,

- alginato de sodio,

25 - carbonato de calcio,

- bicarbonato de sodio,

30 - mezcla de extractos vegetales: extracto seco de cladodio de *Opuntia ficus-indica* Mill. (higo chumbo), extracto seco de hoja de *Olea europaea* L. (aceituna) que contiene el 3,7% de polifenoles, extracto seco de raíz *Glycyrrhiza glabra* L. (regaliz) que contiene ácido glicirrónico al 3%, extracto seco de hoja de *Mentha x piperita* L. (menta) 1:4 y extracto seco de fruta de *Actinidia chinensis* Planch. (kiwi), contenido de actinidina de 16000 CDU/g,

- lo conservantes sorbato de potasio y benzoato de sodio,

35 - aromatizantes.

Para dos envases de barra de 10 ml para su uso oral:

Mezcla de extractos vegetales de 326 mg, de los cuales:

40 - e.s. de higo chumbo: 104 mg,

- e.s. de aceituna: 76 mg,

45 - Polifenoles (derivados de e.s. de higo chumbo y e.s. de aceituna): 12 mg,

- e.s. de regaliz: 60 mg,

50 - e.s. de menta 1:4, 60 mg,

- e.s. de kiwi (16000 CDU de actinidina/g): 40 mg.

Para 100 ml:

55 Mezcla de extractos vegetales de 1630 mg, de los cuales:

- e.s. de higo chumbo: 520 mg,

- e.s. de aceituna: 380 mg,

60 - Polifenoles (derivados de e.s. de higo chumbo y e.s. de aceituna): 60 mg,

- e.s. de regaliz: 300 mg,

65 - e.s. de menta 1:4, 300 mg,

- e.s. de kiwi (16000 CDU de actinidina/g): 200 mg.

Opuntia ficus-indica (L.) Mill. (higo chumbo) es una planta perteneciente a la familia *Cactaceae*; los cladodios del higo chumbo (polímeros que contienen mucílago y pectina) realizan una actividad cicatrizante útil para tratar úlceras gástricas.

Olea europaea L. (aceituna) es una planta perteneciente a la familia *Oleaceae*. La aceituna tiene un alto poder antioxidante en virtud de las sustancias activas presentes en los extractos de la misma, incluyendo, entre otros, ácido oleico, polifenoles y escualenos. La acción antioxidante de la aceituna es eficaz en el tratamiento de reflujo gastroesofágico y otras patologías correlacionadas, tales como esofagitis. El reflujo de jugos gástricos hacia el esófago es un factor principal predisponente a la esofagitis; este último puede surgir no sólo debido al contacto entre los ácidos contenidos en el estómago y la mucosa esofágica, sino que también puede depender de otros factores.

Mentha x Piperita L. (menta) es una planta perteneciente a la familia *Lamiaceae*, útil en el tratamiento sintomático de trastornos digestivos tales como dispepsia (por ejemplo, trastornos espásticos en la parte superior del tracto gastrointestinal) y gastritis (una enfermedad inflamatoria de la mucosa gástrica). Ambas patologías se correlacionan con la ERGE: la primera representa un factor predisponente a la enfermedad, mientras que la última puede ser una consecuencia del contacto continuo de los jugos gástricos con la mucosa del estómago.

El solicitante llevó a cabo la siguiente prueba experimental *in vivo*, en la que sometió a prueba tres formulaciones, F1 (composición de la presente invención), F2 y F3; véanse la tabla 1 (composición F1), la tabla 2 (composición F2), la tabla 3 (composición F3) y la figura 1.

Grupo F1: Neilos	
COMPONENTES	POR 10 ml
Alginato de sodio	500 mg
Carbonato de calcio	266,66 mg
Bicarbonato de sodio	150 mg
Extracto seco de raíz <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (regaliz) que contiene ácido glicirrónico al 3%	30 mg
Extracto seco de fruta de <i>Actinidia chinensis</i> Planch. (kiwi), contenido de actinidina de 16000 CDU/g	20 mg
Aromatizante de menta	5 mg
Glicerina vegetal	c.s.p. 10 ml

Tabla 1

Grupo F2	
COMPONENTES	POR 10 ml
Alginato de sodio	500 mg
Carbonato de calcio	266,66 mg
Bicarbonato de sodio	150 mg
Aromatizante de menta	5 mg
Sorbato de potasio, benzoato de sodio	20 mg
Glicerina vegetal	c.s.p. 10 ml

Tabla 2

Grupo F3	
COMPONENTES	POR 10 ml
Alginato de sodio	500 mg
Carbonato de calcio	266,66 mg
Bicarbonato de sodio	150 mg
Extracto seco de fruta de <i>Actinidia chinensis</i> Planch. (kiwi), contenido de actinidina de 16000 CDU/g	20 mg
Aromatizante de menta	5 mg
Sorbato de potasio, benzoato de sodio	20 mg
Glicerina vegetal	c.s.p. 10 ml

Tabla 3

Materiales y métodos

Animales

Se usaron ratones macho de la raza ICR suministrados por la empresa Charles River y que pesaban 20-25 g. Los

animales se alojaron en salas con temperatura controlada (temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad del $50\pm 2\%$, ciclos de luz-oscuridad de 12 horas) y tenían acceso libre a agua y alimento (que consistía en una dieta convencional suministrada por la empresa Mucedola Mangimi (Settimo Milanese, Italia)), excepto para 20 minutos (o 18 horas) antes del experimento de vaciado gástrico. Todos los experimentos se realizaron en cumplimiento con el Decreto Legislativo n.º 116 del 27 de enero de 1992 y según las directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609/CEE y 2010/63/UE).

Vaciado gástrico

Se evaluó el vaciado gástrico con el método descrito por Smits y Lefebvre (1996) [1]. A los animales se les privó de alimento durante 18 horas y, posteriormente, se les dejó alimentarse 20 minutos antes del comienzo del experimento con el objetivo de garantizar que el contenido gástrico de alimento en cada animal fuera lo más similar posible. Con el fin de determinar el vaciado gástrico, a los animales se les administró por vía oral un marcador (0,2 ml/ratón de una suspensión que contenía 50 mg de rojo de fenol en 100 ml de carboximetilcelulosa al 1,5%). Después de veinte minutos, se sacrificaron los animales en una atmósfera saturada con CO_2 y se extrajo el estómago. Posteriormente, se colocó el estómago dentro de un tubo de ensayo que contenía 4 ml de solución salina; después de 20 segundos de agitación, se añadieron 2 ml de NaOH 1 M a cada tubo de ensayo con el fin de lograr la máxima intensidad de color. Se llevó a cabo un análisis espectrofotométrico (560 nm) sobre 1 ml de esta disolución. El porcentaje de vaciado gástrico se calculó según la siguiente fórmula: $100 \times (1 - [\text{cantidad de rojo de fenol presente en el estómago después de 20 min}] / [\text{cantidad de rojo de fenol presente en el estómago en el momento 0}])$.

Tratamiento farmacológico

Los tratamientos se administraron por vía oral 30 minutos antes de la administración oral del marcador adoptado para medir el vaciado gástrico (ensayo de vaciado gástrico). Las formulaciones se suspendieron en glicerol con el fin de administrar un volumen final de 100 μl por ratón.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (EEM) de los $n=8-10$ experimentos y se analizaron usando la prueba de la t de Student para evaluar los tratamientos individuales frente a la media del grupo de control y el análisis de la varianza seguido por la prueba de Tukey-Kramer para la comparación múltiple y el análisis de las medias de los tratamientos. Un valor de $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Vaciado gástrico

La figura 1 muestra los resultados con respecto al efecto de las formulaciones F1, F2 y F3 sobre el vaciado gástrico en animales privados de alimento durante 18 horas y que, posteriormente, se les dejó alimentarse durante 20 minutos antes del comienzo del experimento para permitir la presencia de una misma cantidad de alimento en el interior del estómago de todos los animales. Tal como puede observarse, la formulación F1, administrada por vía oral a una dosis 10 μl /ratón, fue capaz de aumentar significativamente el vaciado gástrico (efecto máximo: formulación F1 a $41,1\pm 0,6$). Por el contrario, las formulaciones 2 y 3, administradas a la misma dosis de 10 μl /ratón, resultaron inactivas.

La figura 1 se refiere al efecto de las formulaciones F1-F2-F3 (10 μl /ratón, v.o.) sobre el vaciado gástrico evaluado en ratones privados de alimento durante 18 horas y que, posteriormente, se les dejó alimentarse durante 20 minutos antes del comienzo de la administración de las formulaciones. Las formulaciones se administraron 30 minutos antes del comienzo del experimento. Cada punto representa la media de 8-10 animales. * $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$ frente al control; ° $P < 0,01$.

La figura 1 muestra los resultados con respecto al efecto de las formulaciones F1-F2-F3 sobre el vaciado gástrico en animales privados de alimento durante 18 horas y que, posteriormente, se les dejó alimentarse durante 20 minutos antes del comienzo del experimento para permitir la presencia de una misma cantidad de alimento en el interior del estómago de todos los animales.

Tal como puede observarse, la formulación F1, administrada por vía oral a una dosis 10 μl /ratón, fue capaz de aumentar significativamente el vaciado gástrico (efecto máximo: formulación F1 a $41,1\pm 0,6$).

Por el contrario, la composición F2 [que no contiene: i) enzimas digestivas y ii) regaliz (*Glycyrrhiza glaba* L.) en forma de extracto líquido o extracto seco] y la composición F3 [que no contiene: (ii) regaliz (*Glycyrrhiza glaba* L.) en forma de extracto líquido o extracto seco], administradas a la misma dosis de 10 μl /ratón, muestran porcentajes de vaciado gástrico comparables al grupo de control, al que no se le administró ninguna composición.

Cabe destacar que, al contrario de lo que cabría esperar, la formulación F3, que también contiene la enzima digestiva actinidina (extracto de kiwi), cuando se compara con la formulación F2, tiene un efecto decididamente más pequeño

sobre el vaciado gástrico que la formulación F2.

Bibliografía

- 5 [1] Smits GJ, Lefebvre RA. Influence of aging on gastric emptying of liquids, small intestine transit, and fecal output in rats. *Exp Gerontol.* 1996; 31(5):589-96.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una mezcla que comprende:
- 5 (i) alginato de sodio;
- (ii) carbonato de calcio;
- 10 (iii) bicarbonato de sodio;
- (iv) la enzima digestiva actinidina del extracto seco de fruta de *Actinidia chinensis Planch.* (kiwi), que tiene un contenido de actinidina de 16000 CDU/g, y
- 15 (v) regaliz (*Glycyrrhiza glaba L.*) en forma de extracto seco de raíz que contiene ácido glicirrónico al 3%.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla comprende además una mezcla de extractos vegetales que consiste en:
- 20 - *Opuntia ficus-indica Mill.* (higo chumbo), preferiblemente en forma de extracto seco de cladodio,
- *Olea europaea L.* (aceituna), preferiblemente en forma de extracto seco de hoja que contiene el 3,7% de polifenoles,
- 25 - *Mentha x piperita L.* (menta), preferiblemente en forma de extracto seco de hoja 1:4.
3. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para su uso como medicamento.
4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso oral en el tratamiento de trastornos o enfermedad por reflujo gastroesofágico.
- 30 5. Composición para su uso según la reivindicación 4, en la que el tratamiento de trastornos o enfermedad por reflujo gastroesofágico incluye la reducción de los tiempos de vaciado gástrico.
- 35 6. Composición para su uso según la reivindicación 4 ó 5, en la que el tratamiento de trastornos o enfermedad por reflujo gastroesofágico incluye la normalización y mejora de la función digestiva.

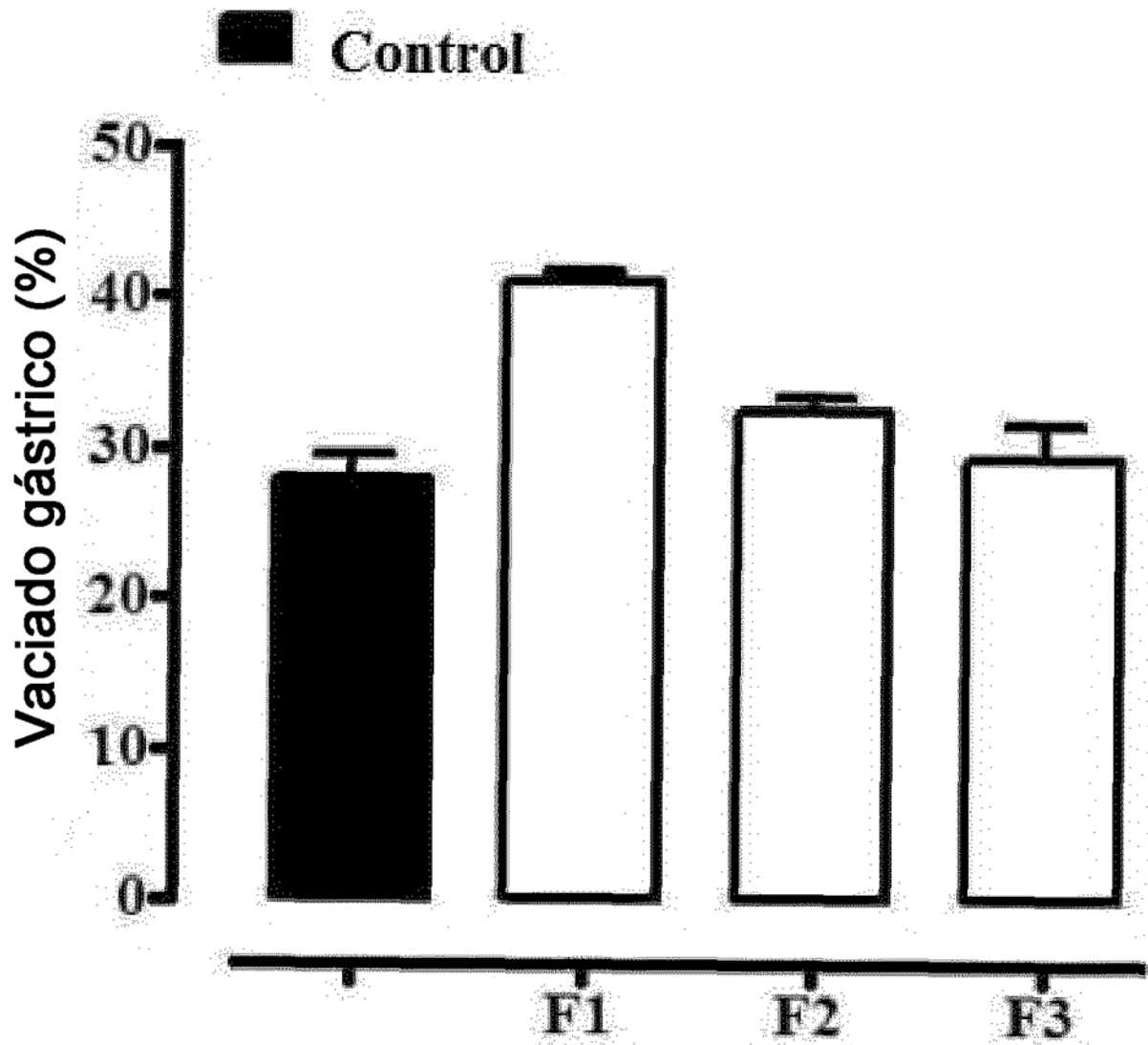


Figura 1