

Descripción

TÍTULO DE LA INVENCION: SUSPENSION ORAL CON EFECTO ANTIULCEROSO Y QUIMIOPROTECTOR SOBRE EL CÁNCER DE COLON Y MÉTODO PARA SU PREPARACIÓN

[0001] En la presente invención se revela una nueva composición farmacéutica consistente en una suspensión acuosa oral para la prevención y tratamiento de las úlceras gástricas y el cáncer de colon, así como el procedimiento para prepararla. Esta suspensión se caracteriza por contener un extracto purificado con los alcoholes grasos de la cera de abejas, celulosa microcristalina y excipientes aceptados por la industria farmacéutica.

Sector técnico

[0002] Esta invención está relacionada con una nueva composición farmacéutica, consistente en una suspensión acuosa oral, así como con su procedimiento de obtención. Dicha suspensión presenta efectos antiulcerosos sobre la mucosa gástrica y efectos quimioprotectores frente al cáncer de colon, y se caracteriza por contener, como ingredientes activos un extracto purificado con los alcoholes grasos de la cera refinada de abejas *Apis mellifera*, al cual se le ha disminuido mediante un procedimiento tecnológico su tamaño de partícula a $<1,5$ micrómetros, y celulosa microcristalina. El extracto purificado de cera de abejas, además de los alcoholes grasos, contiene dioles, parafinas y sales potásicas de ácidos grasos como componentes minoritarios. Esta nueva composición presenta además una serie de excipientes aceptados por la industria farmacéutica, entre estos: uno o varios agentes emulsionantes, empleados en el paso de disminución del tamaño de partícula del extracto de alcoholes grasos, así como agentes humectantes, edulcorantes, suspendentes, preservantes, saborizantes y agua.

Técnica anterior

[0003] La úlcera gástrica es una lesión que se extiende a la capa mucosa y en ocasiones a la capa muscular del estómago, formando una cavidad con inflamación aguda y crónica a su alrededor, siendo esta la principal causa de sangrado digestivo, una de sus principales complicaciones (Valle 2002, Sadic 2009). Otras complicaciones son perforación, penetración y obstrucción, y todas conducen a una afectación importante de la calidad de vida del paciente (Sung 2010). La úlcera se produce por un desequilibrio entre factores agresivos (secreción ácida, pepsina, *H. pylori*, anti-inflamatorios no esteroidales) y defensivos (secreción de mucus y bicarbonato, microcirculación sanguínea, prostaglandinas, factores de crecimiento), siendo la infección por *H. pylori* y el uso continuado de antiinflamatorios no esteroidales los principales causantes (Ramakrishnan 2007). A pesar de los avances actuales en la terapia de erradicación del *H. pylori*, la tasa de mortalidad por complicaciones de la úlcera péptica permanece estable. En la práctica clínica, los fármacos más empleados para el tratamiento de las úlceras gástricas son los inhibidores de la bomba de protones y los antagonistas del receptor H₂, aunque estos presentan diversos efectos adversos como náuseas, estreñimiento, ginecomastia e impotencia (Forgerini 2018), los cuales limitan su uso y justifican la búsqueda y empleo de nuevas composiciones farmacéuticas, efectivas como antiulcerosas, y con mayores perfiles de seguridad. Los modelos farmacológicos más empleados para el estudio de sustancias potencialmente antiulcerosas se basan en inducir las úlceras con sustancias alcalinas, etanol, o por ligadura de píloro, como una forma de cubrir diferentes posibles mecanismos por el que la sustancia a evaluar ejerza su efecto antiulceroso.

[0004] Por otra parte, el cáncer es una de las principales causas actuales de muerte, con más de 8 millones de defunciones anuales a nivel mundial, siendo el cáncer de colon una de las cinco principales causas de muerte en todo el mundo con tendencia al incremento, sobre todo en los países con menos recursos (Torre 2015, Chatenoud 2014). Teniendo en cuenta la alta incidencia de esta enfermedad, así como el hecho de que su tratamiento es por lo general quirúrgico, seguido de quimioterapia, se justifica la búsqueda y el empleo de composiciones farmacéuticas quimioprotectoras que puedan

ser utilizadas en la prevención y tratamiento de los pacientes con este tipo de cáncer o con factores de riesgo para padecerlo, como son los procesos ulcerosos en las vías digestivas (colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y otras). Los modelos farmacológicos más empleados para el estudio de sustancias potencialmente quimioprotectoras frente a esta enfermedad se basan en emplear agentes inductores de cáncer. Entre estos últimos, uno de los más efectivos y empleados es la 1,2-dimetilhidrazina, la cual induce cáncer del colon en más del 80% de las ratas con más de 5 meses de tratamiento. El metabolismo de este carcinógeno comienza a generar sustancias citotóxicas para los colonocitos a las pocas horas de la inducción (Corpet 2003, Reddy 2004).

Breve descripción de la invención

[0005] En la presente invención se revela una nueva composición farmacéutica consistente en una suspensión acuosa oral para la prevención y tratamiento de las úlceras gástricas y el cáncer de colon, así como el procedimiento para prepararla. Esta suspensión se caracteriza por contener un extracto purificado con los alcoholes grasos de la cera de abejas, celulosa microcristalina y excipientes aceptados por la industria farmacéutica. El método de preparación de esta suspensión se caracteriza porque el extracto de alcoholes grasos se somete a un proceso de disminución de tamaño de partícula a $< 1,5$ micrómetros en presencia de un agente emulsionante a > 1000 rpm; la mezcla de dicho ingrediente activo con celulosa microcristalina en la proporción y concentración en que se formulan, hace que estos componentes actúen de forma sinérgica, confiriéndole potentes efectos antiulcerosos y quimioprotectores a esta composición

Problema técnico

[0006] Teniendo en cuenta que tanto la úlcera gástrica como el cáncer de colon afectan la calidad de vida y pueden provocar la muerte de quienes la padecen, constituyendo importantes problemas de salud a escala mundial, así como el hecho de que las terapias convencionales existentes se asocian a diversos efectos adversos que limitan su uso clínico y no siempre logran

curar ni evitar la incidencia de dichas enfermedades, se hace necesario buscar agentes terapéuticos efectivos para ambas condiciones médicas. La necesidad de nuevas estrategias terapéuticas anti-ulcerosas y anticancerígenas seguras y eficaces constituye una problemática actual.

Solución al problema

[0007] El extracto purificado de cera refinada de abejas empleado en la composición objeto de la presente invención, así como su proceso de obtención, fueron previamente patentados, habiéndose reivindicado dicho extracto como una mezcla natural de alcoholes alifáticos primarios superiores para el tratamiento de úlceras gástricas y duodenales, con actividad antiinflamatoria, cuya forma más adecuada de administración era en forma de tabletas, grageas o cápsulas (CU 22412 A1), o sea en formas terminadas sólidas. En consonancia con lo anterior, una tableta con este ingrediente activo, estandarizada a una dosis de 50 mg de alcoholes grasos, fue registrada como suplemento nutricional en Cuba y en otros países como alimento funcional o medicina alternativa. Sin embargo, esta formulación presenta varios inconvenientes como: un gran tamaño (655 mg) que conlleva a una elevada masa de excipientes y altos costos de producción; rechazo creciente en diferentes países al empleo de dos de sus excipientes (croscarmelosa sódica y polivinilpirrolidona); y muy baja biodisponibilidad de los alcoholes grasos que contiene (<10%).

[0008] Debe señalarse que la potencia farmacológica, como antiulceroso, de dicha tableta, es muy inferior a la potencia que alcanza la suspensión objeto de la presente invención. Al ser sometido el extracto de alcoholes grasos a procesos tecnológicos de cizallamiento o precipitación por cambio de temperatura con agitación, en presencia de agentes emulsionantes específicos, para disminuir su tamaño de partícula, y posteriormente ser formulado en una suspensión acuosa, mezclado con celulosa microcristalina en proporciones y concentraciones específicas, se potencia sinérgicamente su eficacia farmacológica, lo cual no resultaba deducible del estado del arte. La suspensión acuosa objeto de esta invención supera de forma significativa el efecto antiulceroso, tanto del extracto de alcoholes grasos en forma de tabletas, como de la celulosa microcristalina, y presenta

un potente efecto quimioprotector sobre el cáncer de colon que no se había reportado previamente para ninguna de estas dos sustancias, lo cual podrá ser apreciado en los ejemplos de realización.

[0009] Por otra parte, la celulosa microcristalina (derivado de la alfacelulosa) se ha empleado fundamentalmente en la fabricación de cremas y suspensiones sólidas para cosméticos, detergentes y como estabilizador en alimentos (Nsor-Atindana, 2017). En la industria farmacéutica se utiliza para la preparación de tabletas y cápsulas, como agente de compresión y de relleno, aunque también ha sido reportada su capacidad secuestradora de ácidos biliares (Paniagua 1999) y se ha empleado como ingrediente activo de una suspensión con efecto antiulceroso en una dosis del 12 % (Barzaga 2004). Debe señalarse que el efecto farmacológico reportado para dicha suspensión al 12% es muy inferior al que se logra con la suspensión que se revela en la presente invención, cuya dosis de celulosa microcristalina es mucho menor ($\leq 2\%$), según puede apreciarse en el ejemplo de realización número 3. Lo anterior es resultado del efecto sinérgico que ocurre al mezclar en proporciones y concentraciones específicas la celulosa microcristalina con el extracto purificado de alcoholes grasos de la cera de abejas, lo cual potencia su efecto antiulceroso y hace que la composición adquiera un potente efecto quimioprotector frente al cáncer de colon no encontrado para las formulaciones previas, lo cual no resultaba deducible del estado del arte.

[0010] El empleo de la cera refinada de abejas y de la celulosa microcristalina en la industria farmacéutica se ha limitado hasta el presente a la formulación de medicamentos sólidos cuyas formulaciones permiten una liberación controlada del ingrediente activo (Kállai 2010; Reiner, 2018), o al uso de ambos como excipientes inertes de relleno en supositorios u otras formulaciones (Lee, 2018). El empleo conjunto de un extracto de alcoholes grasos de la cera de abejas y celulosa microcristalina en una suspensión acuosa, donde ambas sustancias actúan de forma sinérgica aportando potentes efectos antiulcerosos y quimioprotectores a la composición, tampoco aparece reportado con anterioridad a la presente invención. Al emplear ambas sustancias en forma de tabletas (CU 22412 A1) tampoco se logran los efectos observados con la suspensión acuosa descrita en la

presente invención, según se puede apreciar en los Ejemplos de Realización.

[0011] El procedimiento para la obtención de la composición farmacéutica objeto de la presente invención se caracteriza por: A) mezclar un extracto de alcoholes grasos extraído de la cera de abejas (1-2%), con aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado o polisorbato (2-4%), sustancias empleadas como agentes emulsionantes; B) someter dicha mezcla a un proceso tecnológico para disminuir el tamaño de partícula del extracto a <1,5 micrómetros, lo cual puede hacerse con un equipo homogeneizador capaz de cizallar las partículas a > 1000 rpm y >80°C durante > 1 minuto, o sometiendo dicha mezcla a una velocidad de agitación > 1000 rpm y >80°C durante > 1 minuto para luego disminuir la temperatura a < 60°C con igual velocidad de agitación; C) manteniendo la agitación, incorporar a la mezcla la celulosa microcristalina como segundo ingrediente activo (1-2%), metil y propil parabenos como agentes preservantes (0,1-0,6%), glicerina como agente humectante (20-30%), sorbitol o sacarina sódica como agentes edulcorantes (1-6%), carboximetilcelulosa como agente suspendente (0,1-1%), aceites esenciales como agentes saborizantes (0,01-0,05%) y agua purificada (50-70%). El resultado de este procedimiento es una nueva composición farmacéutica, caracterizada por ser una suspensión acuosa para uso oral, cuyos ingredientes activos: extracto de alcoholes grasos y celulosa microcristalina actúan de forma sinérgica, confiriéndole potentes efectos antiulcerosos y quimioprotectores.

[0012] Esta nueva composición farmacéutica está destinada a prevenir o tratar procesos ulcerativos y otras afecciones relacionadas, dado su carácter protector sobre las vías digestivas, y sus efectos quimioprotectores sobre el cáncer de colon. La proporción en que se encuentran presentes los ingredientes activos en esta composición farmacéutica es el resultado de varios estudios realizados con vistas a estandarizar los contenidos de ambos ingredientes activos y excipientes en la composición final a concentraciones y proporciones específicas que garantizan los efectos farmacológicos deseados, los cuales son el resultado de una acción sinérgica de los ingredientes activos que contiene. Los potentes efectos farmacológicos de la presente composición son muy superiores a los

efectos de administrar separadamente ambos ingredientes activos, incluso a dosis superiores a las dosis en que se encuentran presentes en la presente composición, lo cual puede ser apreciado en los Ejemplos de Realización y demuestra la ocurrencia de un efecto sinérgico no deducible del estado del arte.

Efectos ventajosos de la invención

[0013] La ventaja de esta composición sobre otras existentes es que su eficacia antiulcerosa es superior a la de las tabletas con 50 mg de alcoholes grasos de cera de abejas registradas en la actualidad, e igualmente superior a la de la suspensión de celulosa microcristalina al 12%, cuyo desarrollo fue reportado previamente; o sea, que la presente composición presenta efectos antiulcerosos muy superiores a los de ambas formulaciones previas, aun con menores dosis de los ingredientes activos. Por otra parte, se ha demostrado que la presente composición presenta un efecto quimioprotector eficaz sobre el cáncer de colon, significativamente superior al de ambos ingredientes activos por separado en suspensiones similares, según puede apreciarse en el Ejemplo de Realización número 6. Este efecto no había sido demostrado antes para el extracto purificado de la cera de abejas ni para la celulosa microcristalina, siendo resultado de una acción sinérgica de ambas sustancias en la suspensión objeto de la presente invención. Adicionalmente, la producción industrial de esta suspensión resulta más económica que la producción de las tabletas con 50 mg de alcoholes grasos y no contiene ningún excipiente con limitaciones de uso en la industria farmacéutica actual.

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1.

[0014] En un recipiente auxiliar de acero inoxidable con 50 L de capacidad (R1), se adicionaron 12 L de agua purificada y se incorporó poco a poco, a intervalos y con agitación 1kg de celulosa microcristalina. Se agitó a 60 rpm durante 30 minutos, hasta obtener una pasta homogénea. Se adicionó con agitación 5 kg de sorbitol al 70 % y 24 kg de glicerina y se continuó la

agitación durante 10 minutos para obtener la Mezcla 1 (M1). Por otra parte, en un reactor de acero inoxidable de 300 L de capacidad, se calentaron 60 L de agua hasta 90°C, se separaron 10 Litros en un recipiente auxiliar (R2), se incorporaron con agitación de 1200 rpm 3 kg de polisorbato 80 y se agitó durante 5 minutos a 1200 rpm. Se adicionó poco a poco y a intervalos 1,2 kg del extracto purificado de alcoholes grasos y se mantuvo la agitación durante 10 minutos para obtener la Mezcla 2 (M2), después de lo cual se disminuyó la temperatura hasta 30 ± 2 °C, manteniendo la agitación. En otro recipiente se disolvieron con agitación a 60 rpm 0,18 kg de metilparabeno y 0,02 kg de propilparabeno en 1,5 litros de etanol. Se humectaron 0,2 kg de carboximetilcelulosa sódica A/V, se incorporaron 0,03 kg de saborizante y se agitó por 5 minutos para obtener la Mezcla 3 (M3). En otro recipiente auxiliar de 5 L, se mezcló 1 kg de glicerina con 0,5 L de etanol y se agitó durante 5 minutos a 60 rpm para obtener la Mezcla 4 (M4). En el reactor donde se encontraba la mezcla M2 se incorporó M1, arrastrando los restos con la mínima cantidad de agua separada en R2 y se agitó durante 10 minutos a 60 rpm. Transcurrido este tiempo, se incorporó M3 y se arrastraron los restos con M4. Posteriormente, se arrastró lo que quedó de la suspensión con el agua caliente que se encontraba en R2 y se agitó por 10 minutos. Luego se detuvo la agitación y se dejó reposar por 10 horas. Transcurrido este tiempo, se roció sobre la superficie de la suspensión el alcohol restante y se enrasó con agua para completar 100 litros de suspensión. Se agitó por 5 minutos a 1200 rpm, se filtró la suspensión y se tomó una muestra para control de calidad. La preparación final se envasó en frascos de vidrio ámbar que se taparon con tapas plásticas de rosca y los frascos se almacenaron a temperatura ambiente.

Ejemplo 2.

[0015] En un recipiente auxiliar de acero inoxidable con 50 L de capacidad (R1), se adicionaron 12 L de agua purificada y se incorporó poco a poco, a intervalos y con agitación a 40 rpm 1kg de celulosa microcristalina. Se agitó durante 30 minutos, hasta obtener una pasta homogénea. Se adicionó con agitación 5 kg de sorbitol al 70 % y 24 kg de glicerina y se agitó a 40 rpm durante 10 minutos para obtener la Mezcla 1 (M1). Por otra parte, en un

reactor de acero inoxidable de 300 L de capacidad, equipado con un sistema homogenizador del tipo Polytron, se calentaron 60 L de agua hasta 90°C, se separaron 10 Litros en un recipiente auxiliar (R2), se incorporaron con agitación de 9000 rpm 3 kg de cremophor RH 40 y se agitó durante 5 minutos. Se adicionó poco a poco y a intervalos 1,2 kg del extracto purificado de alcoholes grasos y se mantuvo la agitación durante 10 minutos para obtener la Mezcla 2 (M2), después de lo cual se disminuyó la temperatura hasta 30 ± 2 °C, manteniendo la agitación. En otro recipiente se disolvieron con agitación a 40 rpm 0,18 kg de metilparabeno y 0,02 kg de propilparabeno en 1,5 litros de etanol. Se humectaron 0,3 kg de carboximetilcelulosa sódica A/V, se incorporaron 0,03 kg de saborizante y se agitó por 5 minutos para obtener la Mezcla 3 (M3). En otro recipiente auxiliar de 5 L, se mezcló 1 kg de glicerina con 0,5 L de etanol y se agitó durante 5 minutos para obtener la Mezcla 4 (M4). En el reactor donde se encontraba la mezcla M2 se incorporó M1, arrastrando los restos con la mínima cantidad de agua separada en R2 y se agitó durante 10 minutos a 40 rpm. Transcurrido este tiempo, se incorporó M3 y se arrastraron los restos con M4. Posteriormente, se arrastró lo que quedó de la suspensión con el agua caliente que se encontraba en R2 y se agitó por 10 minutos a 1000 rpm. Luego se detuvo la agitación y se dejó reposar por 12 horas. Transcurrido este tiempo, se roció sobre la superficie de la suspensión el alcohol restante y se enrasó con agua para completar 100 litros de suspensión. Se agitó por 5 minutos a 1000 rpm, se filtró la suspensión y se tomó una muestra para control de calidad. La preparación final se envasó en frascos de vidrio ámbar que se taparon con tapas plásticas de rosca y los frascos se almacenaron a temperatura ambiente.

Ejemplo 3.

[0016] La composición obtenida en el ejemplo 1 (AGCM) fue sometida a un ensayo preclínico con animales, en el que se comparó su efecto antiulceroso con los efectos antiulcerosos de la tableta de alcoholes grasos registrada (TAR), y de suspensiones de Alcoholes Grasos (AG) y de celulosa microcristalina (CM), respectivamente, estas dos últimas preparadas con dosis de AG y CM iguales a las dosis de ambas sustancias

en la suspensión AGCM. El modelo experimental utilizado en este ensayo fue el de la inducción de úlceras gástricas en ratas mediante hidróxido de sodio.

[0017] Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos (250-300 g) las cuales fueron adaptadas durante 7 días a las condiciones habituales del laboratorio a 20-25 °C, humedad relativa de $60 \pm 5 \%$, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con libre acceso al agua y a pienso estándar para roedores. Tras culminar la cuarentena, los animales se distribuyeron aleatoriamente en 10 grupos experimentales (10 ratas/grupo): un control negativo que solo recibió el vehículo y 9 grupos a los que se les indujo la úlcera con hidróxido de sodio 0,2 N, entre estos un control positivo no tratado con ningún agente antiulceroso y 8 grupos tratados con las sustancias a evaluar según se aprecia en la tabla 1. Las suspensiones se administraron tal cual, mientras que la TAR se preparó en vehículo goma acacia/agua (1%). El empleo de un grupo control negativo (no sometido a daño con hidróxido de sodio), así como el de un control positivo (sometido a daño y sin tratamiento con ninguna sustancia) permitió corroborar la validez del modelo en las condiciones experimentales, y comparar la eficacia anti-ulcerosa de las sustancias evaluadas. Todos los tratamientos y el hidróxido de sodio se administraron por vía oral, como dosis única, mediante entubación intragástrica. Las dosis seleccionadas se encuentran dentro del rango de dosis efectivas comprobadas en experiencias preliminares previas. Para inducir la úlcera gástrica, los animales fueron sometidos a un ayuno de 24 horas previas al experimento, con libre acceso al agua. Una hora después de la administración de dosis únicas del vehículo, y los diferentes tratamientos, cada rata recibió el agente inductor de úlcera (1 mL/200 g) mediante entubación gástrica. Una hora después, las ratas se sacrificaron en atmósfera de halotano, los estómagos fueron extraídos y se abrieron por la curvatura mayor.

[0018] Las lesiones en la mucosa gástrica se cuantificaron por dos observadores independientes a ciegas. El puntaje de la lesión se definió como la suma total del tamaño de las lesiones en mm² (Ohara 1992). La comparación estadística entre los promedios de las áreas de úlcera en los diferentes grupos se realizó mediante el test no paramétrico de la U de

Mann Whitney. A priori se fijó un nivel de significación $\alpha = 0,05$ y se utilizó el paquete comercial Statistic para Windows (Release 4.2, StatSoft, Inc USA). [0019] [Tabla 1]. Efectos de las suspensiones AGCM, CM, AG, y la TAR sobre la ulcera gástrica inducida por hidróxido de sodio en ratas.

Tratamiento	Dosis (mg/kg/día)	Índice Ulcera (mm ²)	I (%)
Control negativo (Vehículo)	0	0 ± 0,00***	--
Control positivo (Vehículo + NaOH)	0	83,70 ± 13,8	--
CM + NaOH	25	80 ± 10,6	4,4
CM + NaOH	200	75,4 ± 12,5	9,9
AG + NaOH	25	67,2 ± 11,2	19,7
AG + NaOH	200	50,3 ± 13,5**	39,9
TAR + NaOH	25	51,4 ± 10,4 ** Δ	38,6
TAR + NaOH	200	40,5 ± 12,70*** Δ	51,6
AGCM + NaOH	25	11,3 ± 3,00*** °a b	86,5
AGCM + NaOH	200	1,2 ± 0,3*** ° a b	98,6

AGCM: Suspensión de alcoholes grasos más celulosa microcristalina

CM: Suspensión de celulosa microcristalina

AG: Suspensión de alcoholes grasos

TAR: Tableta de alcoholes Grasos registrada como suplemento nutricional

I inhibición, Datos como Media ± EEM (error estándar de la media)

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.0001, comparación vs control positivo

Δ p < 0.05, ° p < 0.0001 comparación vs similar dosis de AG,

a p < 0.0001 comparación vs similares dosis de CM

b p < 0.0001 comparación vs similares dosis de TAR

[0020] Como se aprecia en la tabla 1, la administración de NaOH (0,2 N) por vía oral produjo lesiones gástricas en los animales del grupo control positivo respecto a los animales sanos (control negativo), lo que demuestra la validez del modelo en las condiciones experimentales.

- [0021] La administración oral con AGCM, AG y TAR redujo el índice de úlceras gástricas, mientras que la CM solo produjo ligeras reducciones que no resultaron significativas.
- [0022] La suspensión AGCM (25 y 200 mg/kg) produjo una reducción del índice de úlceras, que fue significativo no solo comparado con el control positivo, sino además respecto a iguales dosis de las suspensiones de CM, AG y TAR. Por tanto, la mayor eficacia anti-ulcerosa se alcanzó con la suspensión de AGCM, máxime que produjo una inhibición ~ 100%, o sea total, del índice de úlceras gástricas con la mayor dosis ensayada de 200 mg/kg.
- [0023] Además, la suspensión AGCM produjo porcentajes de inhibición superiores a la sumatoria de los alcanzados con las suspensiones de CM y AG por separado, mostrando un sinergismo de la AGCM, donde la presencia del extracto de AG y la CM en las proporciones y concentraciones en que aparecen promueve la mayor eficacia anti-ulcerosa.
- [0024] Debe señalarse además que el efecto antiulceroso de la suspensión AGCM es muy superior al efecto reportado para la suspensión de CM al 12% (Barzaga 2004), ambas evaluadas en modelos de inducción de úlceras por gastritis alcalina. Así, los porcentajes de inhibición alcanzados con 25 y 200 mg/kg de la suspensión AGCM (86,5 y 98,6%, respectivamente) son superiores al reportado para la CM que fue de 50% a una dosis mayor (356,38 mg/kg) (Barzaga 2004), lo cual está en correspondencia con el efecto sinérgico de la AGCM observada en este ejemplo.
- [0025] Vale señalar además que, en el presente ejemplo, la dosis más baja ensayada de 25 mg/kg de la suspensión AGCM produjo un elevado porcentaje de inhibición de 86,5% sobre las úlceras gástricas, lo que indica que además de una alta eficacia, la suspensión AGCM presenta también una elevada potencia.

Ejemplo 4.

- [0026] La composición obtenida en el ejemplo 2 (AGCM) fue sometida a un ensayo preclínico con animales, en el que se comparó su efecto antiulceroso con los efectos antiulcerosos de la tableta de alcoholes grasos registrada (TAR), y de suspensiones de Alcoholes Grasos (AG) y de

celulosa microcristalina (CM), estas dos últimas preparadas con dosis de AG y CM iguales a las dosis de ambas sustancias en la suspensión AGCM. El modelo experimental utilizado en este ensayo fue el de la inducción de úlceras gástricas en ratas mediante etanol.

[0027] Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos (250-300 g) las cuales fueron adaptadas durante 7 días a las condiciones habituales del laboratorio a 20-25 °C, humedad relativa de 60 ± 5 %, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con libre acceso al agua y a pienso estándar para roedores. Tras culminar la cuarentena, los animales se distribuyeron aleatoriamente en 11 grupos experimentales (10 ratas/grupo): un control negativo que solo recibió el vehículo y 10 grupos a los que se les indujo la úlcera con etanol al 60%, entre estos un control positivo no tratado con ningún agente antiulceroso, 8 grupos tratados con las sustancias a evaluar y un grupo tratado con Omeprazol como sustancia de referencia, según se aprecia en la tabla 2. Las suspensiones se administraron tal cual, mientras para administrar la tableta se preparó una suspensión con goma acacia al 1%. El empleo de un grupo control negativo (no sometido a daño con etanol), así como el de un control positivo (sometido a daño y sin tratamiento con ninguna sustancia) permitió comprobar el funcionamiento del modelo y comparar la eficacia anti-ulcerosa de las sustancias evaluadas. Todos los tratamientos y el etanol se administraron por vía oral, como dosis única, mediante entubación intragástrica. Las dosis seleccionadas se encuentran dentro del rango de dosis efectivas comprobadas en experiencias preliminares previas y la dosis de omeprazol (20 mg/kg), también ha resultado efectiva en este modelo. Para inducir la úlcera gástrica, los animales fueron sometidos a un ayuno de 24 horas previas al experimento, con libre acceso al agua. Una hora después de la administración de dosis únicas del vehículo, y los diferentes tratamientos, cada rata recibió el agente inductor de úlcera (1 mL/200 g) mediante entubación gástrica. Una hora después las ratas se sacrificaron en atmósfera de halotano, los estómagos fueron extraídos y se abrieron por la curvatura mayor. La cuantificación del índice de úlceras gástricas se realizó según lo descrito en el ejemplo 3.

[0028] Los resultados sobre el índice de úlcera inducida por etanol (tabla 2) muestran que la administración oral de etanol produjo la formación de

lesiones gástricas en los animales del grupo control positivo respecto a los animales del grupo control negativo (sanos). Los animales tratados con la suspensión AGCM a las dosis de 25 y 200 mg/kg fueron los que mostraron un índice de úlcera menor respecto a los animales con daño (control positivo). El tratamiento con dicha suspensión disminuyó marcada y significativamente el índice de úlcera gástrica, alcanzando un 93,95 y 99,85% de inhibición a las dosis de 25 y 200 mg/kg, respectivamente. Las comparaciones estadísticas entre los efectos de los diferentes tratamientos empleados, a dosis similares, demostró diferencias significativas, destacando que la suspensión AGCM mostró los mejores resultados, incluso superiores a la suma de los porcentajes de inhibición de las suspensiones AG y CM, demostrando una mayor protección de la mucosa gástrica. La sustancia de referencia empleada (Omeprazol), también disminuyó el índice de úlceras, lo cual corrobora la validez de los resultados obtenidos en nuestras condiciones experimentales. Es de destacar, que la suspensión AGCM alcanzó efectos superiores a los del Omeprazol, si bien no se encuentran administrados a las mismas dosis, ya que no era objetivo del estudio comparar ambas sustancias.

[0029] [Tabla 2]. Efectos de las suspensiones AGCM, CM, AG, y la TAR sobre la úlcera gástrica inducida por etanol en ratas.

Tratamiento	Dosis(mg/kg/día)	Índice Úlcera(mm ²)	I (%)
Control negativo (Vehículo)	0	0,15 ± 0,07***	--
Control positivo (Vehículo + etanol)	0	169,09 ± 12,8	--
CM+ etanol	25	155,5 ± 11,6	8
CM+ etanol	200	133,3 ± 13,7	21,1
AG + etanol	25	149,13 ± 12,2	11,7
AG + etanol	200	89,19 ± 14,5**	47,3
TAR + etanol	25	106,60 ± 11,40** Δ	37
TAR + etanol	200	41,74 ± 13,70*** Δ	75,4

OMP + etanol	20	35,97 ± 14,48***	78,8
AGCM + etanol	25	10,38 ± 3,00*** °a b	93,95
AGCM + etanol	200	0,40 ± 0,34*** ° a b	99,85

AGCM: Suspensión de alcoholes grasos más celulosa microcristalina

CM: Suspensión de celulosa microcristalina

AG: Suspensión de Alcoholes grasos

TAR: Tableta de alcoholes Grasos registrada como suplemento nutricional

I inhibición, Datos como Media ± EEM (error estándar de la media)

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.0001, comparación vs control positivo

Δ p < 0.05, ° p < 0.0001 comparación vs similar dosis de AG,

a p < 0.0001 comparación vs similares dosis de CM

b p < 0.0001 comparación vs similares dosis de TAR

(Test de la U de Mann Whitney)

[0030] Como conclusión del ensayo presentado en este ejemplo, se puede plantear que la administración oral con la suspensión AGCM inhibió marcada y significativamente la formación de ulcera gástrica inducida por etanol en ratas, con una eficacia superior a la alcanzada con la tableta registrada y con las suspensiones AG y CM a las mismas dosis. Adicionalmente se apreció que la eficacia de la suspensión AGCM fue superior a la suma de las eficacias de las suspensiones AG y CM en ambas dosis evaluadas, lo que demuestra la existencia de un efecto sinérgico en la composición objeto de la presente invención.

Ejemplo 5.

[0031] La composición obtenida en el ejemplo 2 (AGCM) fue sometida a un ensayo preclínico con animales, en el que se comparó su efecto antiulceroso con los efectos antiulcerosos de la tableta de alcoholes grasos registrada (TAR), y de suspensiones de Alcoholes Grasos (AG) y de celulosa microcristalina (CM), estas dos últimas preparadas con dosis de AG y CM iguales a las dosis de ambas sustancias en la suspensión AGCM. El modelo experimental utilizado en este ensayo fue el de la inducción de úlceras gástricas en ratas por ligadura de píloro, el cual es un modelo

dependiente de ácido, a diferencia del modelo presentado en el ejemplo anterior.

[0032] Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos (250-300 g), las cuales fueron adaptadas durante 7 días a las condiciones habituales del laboratorio a 20-25 °C, humedad relativa de $60 \pm 5 \%$, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con libre acceso al agua y a pienso estándar para roedores. Tras culminar la cuarentena, los animales se distribuyeron aleatoriamente en 11 grupos experimentales (10 ratas/grupo): un control negativo que solo recibió el vehículo y 10 grupos a los que se les indujo la úlcera por ligadura de píloro, entre estos un control positivo no tratado con ningún agente antiulceroso, 8 grupos tratados con las sustancias a evaluar y un grupo tratado con Omeprazol como sustancia de referencia, según se aprecia en la tabla 3. Las suspensiones se administraron tal cual, mientras para administrar la tableta se preparó una suspensión con goma acacia al 1%. El empleo de un grupo control negativo (no sometido a ligadura de píloro), así como el de un control positivo (sometido a daño y sin tratamiento con ninguna sustancia) permitió comprobar el funcionamiento del modelo y comparar la eficacia anti-ulcerosa de las sustancias evaluadas. Todos los tratamientos se administraron por vía oral, como dosis única, mediante entubación intragástrica. Las dosis seleccionadas se encuentran dentro del rango de dosis efectivas comprobadas en experiencias preliminares previas y la dosis de omeprazol (20 mg/kg), también ha resultado efectiva en este modelo. Para inducir la úlcera gástrica, los animales fueron sometidos a un ayuno de 24 horas previas al experimento, con libre acceso al agua. Una hora después de la administración de dosis únicas del vehículo, y los diferentes tratamientos, los animales se anestesiaron por inyección intraperitoneal con tiopental sódico (35 mg/kg), se les realizó una incisión de 2cm de longitud en el tercio anterior de la línea media abdominal, localizándose el estómago y ligando el esfínter pilórico con hilo de sutura de seda número 2 y la pared abdominal se suturó con hilo de seda.

[0033] Una hora después las ratas se sacrificaron en atmósfera de halotano, los estómagos fueron extraídos y el jugo gástrico recolectado en tubos de ensayo. Este último fue centrifugado a 3000 rpm, el sobrenadante separado y cuantificado en mL. Los estómagos se abrieron por la curvatura

mayor, el índice de úlceras gástricas se cuantificó según lo descrito en el ejemplo 3.

[0034] Los resultados sobre el índice de úlcera inducida por ligadura de píloro (tabla 3) muestran que se produjo la formación de lesiones gástricas en los animales del grupo control positivo respecto a los animales del grupo control negativo (sanos). Los animales tratados con la suspensión AGCM a las dosis de 25 y 200 mg/kg fueron los que mostraron un índice de úlcera menor respecto a los animales con daño (control positivo). El tratamiento con dicha suspensión disminuyó marcada y significativamente el índice de úlcera gástrica, alcanzando un 76,3 y 99,7 % de inhibición a las dosis de 25 y 200 mg/kg, respectivamente. Las comparaciones estadísticas entre los efectos de los diferentes tratamientos a dosis similares, demostró que la suspensión AGCM es la sustancia evaluada que presenta mayor eficacia anti-ulcerosa, ya que resultó significativamente superior a la TAR, y a las suspensiones con las monoterapias respectivas de AG y CM, respectivamente. Además, el hecho de que la inhibición alcanzada por la suspensión AGCM fuera superior a la suma de las alcanzadas individualmente con CM y AG, demuestra el efecto sinérgico de la presencia de estos dos componentes en la mezcla de la suspensión AGCM.

[0035] Por su parte, el Omeprazol, sustancia de referencia, disminuyó significativamente el índice de úlceras, lo cual corrobora la validez de los resultados obtenidos en nuestras condiciones experimentales.

[0036] El volumen de jugo gástrico no fue modificado por las suspensiones de AGCM, CM, AG, ni por la TAR, lo que sugiere que la acción antiulcerosa de estas sustancias no depende de un efecto sobre la formación del ácido gástrico. Solo el omeprazol redujo esta variable, lo cual está en consonancia con su mecanismo de acción como anti-secretor inhibidor de la bomba de protones.

[0037] [Tabla 3]. Efectos de las suspensiones AGCM, CM, AG, y la TAR sobre la úlcera gástrica inducida por ligadura de píloro en ratas.

Tratamiento	Dosis(mg/kg/día)	Índice Úlcera (mm ²)	I (%)	Volumen jugo gástrico
-------------	------------------	-------------------------------------	-------	--------------------------

Control negativo (Vehículo)	0	$0,0 \pm 0,00^{***}$	--	$0,0 \pm 0,00^{***}$
Control positivo (Vehículo + ligadura de píloro)	0	$23,2 \pm 3,2$	--	$9,9 \pm 1,2$
CM+ ligadura de píloro	25	$21,1 \pm 1,6$	9	$10 \pm 1,05$
CM+ ligadura de píloro	200	$20,5 \pm 1,7$	11,6	$9,5 \pm 1,2$
AG + ligadura de píloro	25	$18,3 \pm 2,2$	21,1	$9,8 \pm 1,3$
AG + ligadura de píloro	200	$13,3 \pm 3,1^{**}$	42,7	$9,7 \pm 1,1$
TAR + ligadura de píloro	25	$16,1 \pm 2,40^{**}$	30,6	$9,8 \pm 1,1$
TAR + ligadura de píloro	200	$10,6 \pm 3,2^{***}$	54,3	$9,6 \pm 0,8$
OMP + ligadura de píloro	20	$3,9 \pm 0,5^{***}$	83,2	$3,4 \pm 0,4^{***}$
AGCM + ligadura de píloro	25	$5,5 \pm 0,7^{*** \circ a}$ b	76,3	$9,5 \pm 0,7$
AGCM + ligadura de píloro	200	$0,3 \pm 0,3^{*** \circ a}$ b	98,7	$9,4 \pm 0,9$

AGCM: Suspensión de alcoholes grasos más celulosa microcristalina

CM: Suspensión de celulosa microcristalina

AG: Suspensión de alcoholes grasos

TAR: Tableta de alcoholes Grasos registrada como suplemento nutricional

I inhibición, Datos como Media $\pm$ EEM (error estándar de la media)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, comparación vs control positivo

$\circ$ $p < 0.0001$ comparación vs similar dosis de AG,

a $p < 0.0001$ comparación vs similares dosis de CM

b $p < 0.0001$ comparación vs similares dosis de TAR

(Test de la U de Mann Whitney)

[0038] Como conclusión del ensayo presentado en este ejemplo, se puede plantear que la administración oral con la suspensión AGCM inhibió marcada y significativamente la formación de ulcera gástrica inducida por ligadura de píloro en ratas, con una eficacia superior a la alcanzada con la tableta registrada y con las suspensiones AG y CM a las mismas dosis. Adicionalmente se apreció que la eficacia de la suspensión AGCM fue superior a la suma de las eficacias de las suspensiones AG y CM en ambas dosis evaluadas, lo que demuestra la existencia de un efecto sinérgico en la composición objeto de la presente invención.

Ejemplo 6.

[0039] La composición obtenida en el ejemplo 1 (AGCM) fue sometida a un ensayo preclínico con animales, en el que se comparó su efecto quimioprotector con los efectos quimioprotectores de la tableta de alcoholes grasos registrada (TAR), y de suspensiones de Alcoholes Grasos (AG) y de celulosa microcristalina (CM), estas dos últimas preparadas con dosis de AG y CM iguales a las dosis de ambas sustancias en la suspensión AGCM. Para la evaluación se indujo el cáncer de colon a 45 ratas Holtzmann con 1,2- dimetilhidrazina (DMH). Los animales, con tres meses de edad y 250 ± 20 g; se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes grupos: polisorbato de sodio a 2 mL/kg; DMH 20 mg/kg; DMH más suspensión AGCM; DMH más suspensión AG; DMH más suspensión CM.

[0040] La DMH fue preparada a 4 mg/mL en agua destilada, con 0,4mg/ml de EDTA como estabilizante a pH 6,5. Se administró 20 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea una vez a la semana, durante 18 semanas y las suspensiones y el polisorbato se administraron por vía oral las 18 semanas que duró el estudio. Transcurrido el tiempo previsto, una hora después de la última administración, las ratas fueron sacrificadas con pentobarbital 100 mg/kg, y se les extrajo el colon para el análisis histopatológico, este fue lavado suavemente con solución salina para remover la sangre y los detritos adheridos al tejido; las zonas de masa tumoral fueron fijadas en solución de formol al 10%, tamponado por 7 días; luego, se seleccionó partes de 3-5 um y fijadas en parafina, posteriormente fueron teñidas con hematoxilina y eosina. La evaluación se basó en las observaciones microscópicas:

neoplasia y displasia. El análisis estadístico para evaluar el efecto quimioprotector fue la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y, posteriormente, la prueba no paramétrica de Krustal Wallis con un 95 % de nivel de confianza.

- [0041] En la Tabla 4 se resume el porcentaje de las observaciones histopatológicas del colon de ratas inducidas con cáncer de colon por DMH y que recibieron las diferentes suspensiones. Al aplicar la prueba de Krustal Wallis, con un nivel de confianza de 95% se encontró un $p < 0,05$ en todos los casos y al analizar los resultados de los diferentes grupos hubo una diferencia significativa entre los tipos de tratamiento y la fase de desarrollo de cáncer (normal, displasia y neoplasia). El 100% de los animales tratados solamente con DMH desarrolló displasias o neoplasias, lo cual evidencia el funcionamiento del modelo, y solamente en los grupos tratados con la suspensión AGCM, no se observó neoplasia y solo un 20% de estos animales desarrolló displasia, lo que implica que el 80% de los animales tratados con la suspensión AGCM no se vio afectado por la aplicación del agente cancerígeno. En el grupo tratado con la suspensión AG solo el 20% no se vio afectado por el agente inductor de cáncer, mientras que en el grupo tratado con la suspensión CM solo quedó protegido del agente cancerígeno el 10% de los animales. De esta manera, demostramos que hay un relevante efecto sinérgico entre el extracto de alcoholes grasos y la celulosa microcristalina, el cual le aporta un efecto quimioprotector a la suspensión objeto de la presente invención muy superior al efecto quimioprotector de las suspensiones con dichas sustancias por separado.
- [0042] [Tabla 4]. Resultados histopatológicos en colon de ratas tratadas con dimetilhidrazina (DMH) y que recibieron las diferentes suspensiones (porcentaje de frecuencia)

Resultado Histopatológico	Tratamiento	Frecuencia (%)
Sin Cambios (normal)	Vehículo (disolución de polisorbato)	100
	DMH	0
	DMH + suspensión AGCM	80
	DMH + suspensión AG	20
	DMH + suspensión CM	10
Displasia	Vehículo (disolución de polisorbato)	0
	DMH	30
	DMH + suspensión AGCM	20
	DMH + suspensión AG	50
	DMH + suspensión CM	60
Neoplasia	Vehículo (disolución de polisorbato)	0
	DMH	70
	DMH + suspensión AGCM	0
	DMH + suspensión AG	30
	DMH + suspensión CM	30

PS: polisorbato de sodio al 3%. La evaluación estadística se realizó mediante la prueba de Kruskal- Wallis, para determinar la distribución en cada grupo de etapa de cáncer respecto a las categorías de tratamiento; nivel de significancia de 0,05. Normal ($p=0,01$), displasia ($p=0,049$), neoplasia ($p=0,01$)

[0043] En conclusión, se puede plantear que los indicadores de estudio histopatológico revelaron que solo la suspensión que contenía la mezcla de alcoholes grasos y celulosa microcristalina (AGCM) demostró actividad antitumoral significativa en el cáncer de colon inducido por dimetilhidrazina en ratas con 100% de inhibición de neoplasia.

Aplicabilidad industrial

[0044] Esta invención tiene aplicación industrial, la composición es novedosa, y tanto la propia suspensión como su proceso de obtención tienen carácter inventivo, al no ser deducible del estado del arte que la mezcla de dos ingredientes activos antiulcerosos diferentes, en proporciones y

concentraciones específicas, ninguno de los cuales tiene demostrado un efecto quimioprotector sobre procesos cancerígenos, muestre un efecto sinérgico con beneficios farmacológicos sobre las úlceras gástricas y un efecto quimioprotector sobre el cáncer de colon. La presente invención se relaciona con la industria alimenticia y con la farmacéutica, pues la composición obtenida puede ser utilizada como suplemento nutricional, por sus efectos beneficiosos preventivos sobre las vías digestivas, y también como un medicamento para el tratamiento de las úlceras y el cáncer.