

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
RAD: 13-250727- -3	FECHA: 2014-10-29 08:55:40
DEP: 2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	EVE: 378 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I
TRA: 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	FOLIOS: 8
ACT: 519 PRESENTACION	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado(a)/Señor(a)
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

Asunto: Radicación: 13-250727- -3
Trámite: 11
Evento: 378
Actuación: 519
Oficio: 13620
Folios: 8

Patente de Invención	X			Patente de Modelo de Utilidad	
Vía Nacional					
Vía PCT (Fase Nacional)	X	Capítulo I	X	Capítulo II	
No. Solicitud Internacional	PCT/JP2012/058280				
Fecha de Presentación Internacional	22/03/2012				

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Radicado No. 13-250727-00000-0000	22/Octubre/2013
Reivindicaciones:	Radicado No. 13-250727-00000-0000	22/Octubre/2013
	Radicado No. 13-250727-00002-0000	16/Mayo/2014
Prioridad:	JP 2011-066353	24/Marzo/2011

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de Prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Modificaciones no aceptadas (Art 34 D 486 y Art 19, 22 y 34 PCT)

Las modificaciones de las reivindicaciones 1 – 30, Radicado No. 13-250727-00002-0000, no son aceptadas porque amplían el objeto de la solicitud inicialmente presentada. La solicitud como fue presentada inicialmente reclama una composición farmacéutica que comprende rebamipida, un agente dispersante y un agente potenciador de viscosidad, y la cual tiene unas características de tamaño de partícula que están presentes en las composiciones ejemplificadas y que permiten obtener los resultados presentados. Adicionalmente, no se encuentra en los ejemplos ninguna

composición que no presente dichas características y permita llegar a los resultados deseados, por lo cual no se encuentra sustento en la descripción para la nueva reivindicación 1 que tiene un alcance mayor al de la reivindicación independiente inicialmente presentada.

4. Objeto de la invención

Título de la solicitud: “Una composición farmacéutica para tratar una enfermedad en la cavidad oral que comprende rebamipida”.

El problema planteado en esta solicitud consiste en una formulación líquida que tiene una alta concentración de rebamipida para asegurar la dispersabilidad y prevenir la agregación.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona una composición farmacéutica que comprende 10 mg/mL – 50 mg/mL de rebamipida con un tamaño medio de partícula menor que 500nm como ingrediente activo, al menos un agente dispersante, y al menos un agente potenciador de viscosidad, en donde la viscosidad de la preparación líquida está en un intervalo de 10 mPa.s – 500 mPa.s.

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): A61K 9/00 (2006.01), A61K 31/4704.

5. Excepción a la Patentabilidad (Art 20 D 486 literal (d))

El objeto de las reivindicaciones 20 – 25 no es patentable de acuerdo con el Art citado.

6. De la Solicitud de Patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Las reivindicaciones 1 y 2 se refieren a la viscosidad de la composición, que es un resultado a alcanzar, no define al producto porque la invención no queda definida por el resultado a alcanzar, puesto que la reivindicación incluiría no sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado. Se sugiere caracterizar la composición por sus componentes y las proporciones de éstos, ya que son éstas características esenciales, estructurales o funcionales, las que contribuyen a la obtención de ese efecto.

La reivindicación 1 no es concisa, ni se encuentra totalmente soportada en la descripción. Los rangos de concentración son amplios y no se encuentra en los ejemplos ninguna composición que presente una concentración de rebamipida mayor a 40mg/mL. Adicionalmente, el tamaño de partícula del fármaco se reclama como menor a 500 nm sin establecer un rango de posibilidades con sustento descriptivo (90 nm – 230 nm). Se sugiere presentar una generalización razonable de los rangos de acuerdo a lo soportado en la descripción.

La reivindicación 1 no es concisa porque los términos “agente dispersante” y “agente potenciador de viscosidad” cubren una amplia cantidad de posibles componentes, generando así una innumerable cantidad de posibilidades de composiciones, muchas de las cuales no cuentan con soporte descriptivo. Se sugiere establecer las posibilidades de agentes dispersantes y potenciadores de viscosidad de acuerdo a lo soportado en la descripción, con el fin de que sea posible establecer claramente el alcance de la solicitud.

La reivindicación 1 no es concisa porque no establece claramente cuáles son los componentes de la composición, y las proporciones de los mismos. Se recuerda al solicitante que una composición farmacéutica se debe caracterizar por sus componentes y las proporciones de los mismos.

La reivindicación 2 no es concisa porque reclama una composición estableciendo que el tamaño de partícula del ingrediente activo es menor a 300 nm, lo cual no establece un límite inferior. Se sugiere presentar un rango de tamaños de partícula razonable de acuerdo a lo soportado en la descripción.

La reivindicación 10 se refiere a un resultado a alcanzar porque señala que el agente potenciador de viscosidad no tiene ninguna acción agregativa para las partículas de rebamipida. Se sugiere eliminar la reivindicación del capítulo reivindicatorio ya que las posibilidades de agentes potenciadores de viscosidad deben ser incluidas en la reivindicación independiente y la reivindicación 10 no agrega ninguna característica técnica.

Las reivindicaciones 11 y 12 caracterizan la composición de las reivindicaciones 1 – 9 por su método de preparación lo cual no es aceptable porque son reivindicaciones de producto, y sólo pueden ser definidas en términos de su proceso de fabricación si: el producto es nuevo e inventivo y no se puede definir por sus características estructurales. Adicionalmente, la reivindicación 11 no presenta el proceso de preparación de la composición tal como se encuentra soportado en la descripción, tal como si lo hace la reivindicación 12. En este caso la composición puede ser definida por sus características estructurales por lo cual se sugiere eliminar las mencionadas reivindicaciones del capítulo reivindicatorio.

La reivindicación 16 no es concisa porque no establece las posibilidades de agente isotónico, edulcorante y/o saborizante de acuerdo a lo soportado en la descripción. Se sugiere incluir las posibilidades de agentes auxiliares que cuentan con sustento descriptivo.

7. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: Marzo 24 de 2011 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación*
D1	WO2007132907	Hydrogel suspension and manufacturing process thereof	22/Noviembre/2007
D2	Inflammopharmacology, Vol. 10, No. 4–6, pp. 391–399 (2002)	Therapeutic effect of rebamipide in a modified acetic acid-induced buccal mucosal ulcer model	01/Diciembre/2002

D1 http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20071122&CC=WO&NR=2007132907A1&KC=A1 Divulga una composición farmacéutica que comprende: 1% o 2% p/v rebamipida con un tamaño medio de partícula de 100nm (Ej. 1, Pág. 19, lín. 8; Ejs. 2 y 3, Pág. 20, lín. 6 y 25; Ej. 4, Pág. 23, lín. 14), un polímero tal como HPMC, alcohol polivinílico, MC, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa sódica, polietilenglicol, polisorbato 80, polioxietileno polioxipropilenglicol, entre otros (Pág. 13, lín. 1 – 13) y HPMC o MC (Pág. 14, lín. 1 – 4; Ej. 1, Pág. 19, lín. 10 – 12 y 17 – 19), en donde la viscosidad de la preparación puede ser 14.4, 14.7, 30, 40.9, 12.3 o 20.1 (Pág. 29, Tab. 1). El documento D1 también divulga un método para preparar la composición farmacéutica, que comprende: mezclar HPMC, con una solución acuosa de HCl, con una solución que comprende rebamipida sódica, para preparar una suspensión que comprende rebamipida con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 100nm (Ej. 1, Pág. 18 y Pág. 19, lín 7), añadir NaOH a la misma para ajustar el pH de la suspensión acuosa hasta aproximadamente 5.9 (Pág. 18, lín. 1).

18 – 21), dispersar y/o dializar la suspensión acuosa (Pág. 18, líns. 22 – 25 y Pág. 19 líns. 1 y 2), ajustar el pH de la suspensión acuosa hasta 5 – 7 (Pág. 7, lín. 21), y después añadir un agente potenciador de viscosidad a la misma (Pág. 7, lín. 25 y Pág. 9, líns. 1 – 4).

D2 Divulga un método para preparar la composición farmacéutica, que comprende: mezclar HPMC, con una solución acuosa de HCl, con una solución que comprende rebamipida sódica, para preparar una suspensión que comprende rebamipida con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 100nm (Ej. 1, Pág. 18 y Pág. 19, lín 7), añadir NaOH a la misma para ajustar el pH de la suspensión acuosa hasta aproximadamente 5.9 (Pág. 18, líns. 18 – 21), dispersar y/o dializar la suspensión acuosa (Pág. 18, líns. 22 – 25 y Pág. 19 líns. 1 y 2), ajustar el pH de la suspensión acuosa hasta 5 – 7 (Pág. 7, lín. 21), y después añadir un agente potenciador de viscosidad a la misma (Pág. 7, lín. 25 y Pág. 9, líns. 1 – 4).

8. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Novedad (Art 16 D486)

La reivindicación 1 consiste en una composición farmacéutica que comprende 10 mg/mL – 50 mg/mL de rebamipida con un tamaño medio de partícula menor que 500nm como ingrediente activo, al menos un agente dispersante, y al menos un agente potenciador de viscosidad, en donde la viscosidad de la preparación líquida está en un intervalo de 10 mPa.s – 500 mPa.s.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1
Una composición farmacéutica que comprende:	Una composición farmacéutica que comprende:
10 mg/mL – 50 mg/mL de rebamipida con un tamaño medio de partícula menor que 500nm como ingrediente activo	1% o 2% p/v rebamipida con un tamaño medio de partícula de 100nm (Ej. 1, Pág. 19, lín. 8; Ejs. 2 y 3, Pág. 20, lín. 6 y 25; Ej. 4, Pág. 23, lín. 14)
al menos un agente dispersante, y	Un polímero tal como HPMC o MC, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, Carboximetilcelulosa sódica, polietilenglicol, polisorbato 80, polioxietileno polioxipropilenglicol, entre otros (Pág. 12, líns. 18 – 25 y Pág. 13, líns. 1 – 13)
al menos un agente potenciador de viscosidad	HPMC, MC, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, Carboximetilcelulosa sódica, polietilenglicol, polisorbato 80, polioxietileno polioxipropilenglicol, entre otros (Pág. 13, líns. 1 – 13; Pág. 14, líns. 1 – 4; Ej. 1, Pág. 19, líns. 10 – 12 y 17 – 19)

Las características **esenciales** de la composición de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, el cual enseña una composición farmacéutica que comprende: 1% o 2% p/v rebamipida con un tamaño medio de partícula de 100nm (Ej. 1, Pág. 19, lín. 8; Ejs. 2 y 3, Pág. 20, lín. 6 y 25; Ej. 4, Pág. 23, lín. 14), un polímero tal como HPMC, alcohol polivinílico, MC, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa sódica, polietilenglicol, polisorbato 80, polioxietileno polioxipropilenglicol, entre otros (Pág. 13, líns. 1 – 13) y HPMC o MC (Pág. 14, líns. 1 – 4; Ej. 1, Pág. 19, líns. 10 – 12 y 17 – 19).

En consecuencia, la reivindicación 1 carece de novedad, según lo divulgado en el documento D1.

Las reivindicaciones dependientes 1 – 18 no mencionan alguna característica que haga nueva a la composición de la reivindicación 1, por lo cual se considera que no son nuevas.

La reivindicación 19 consiste en un método para preparar la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 18, que comprende mezclar al menos un agente dispersante, una solución ácida acuosa, una solución acuosa que comprende una sal de rebamipida soluble en agua, y otro/s ingrediente/s o disolvente/s opcionales para preparar una suspensión acuosa que comprende rebamipida con un tamaño medio de partícula menor que 500nm, añadir una base a la misma para ajustar el pH de la suspensión acuosa hasta 3 – 7, dispersar y/o dializar la suspensión acuosa, ajustar el pH de la suspensión acuosa hasta 5 – 7, y después añadir un agente potenciador de viscosidad a la misma y opcionalmente añadir un agente conservante (agente antiséptico), un agente isotónico, un agente edulcorante, y/o un saborizante a la misma.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1
Un método para preparar la composición farmacéutica, que comprende:	Un método para preparar la composición farmacéutica, que comprende:
mezclar al menos un agente dispersante, una solución ácida acuosa, una solución acuosa que comprende una sal de rebamipida soluble en agua, para preparar una suspensión acuosa que comprende rebamipida con un tamaño medio de partícula menor que 500nm	Mezclar HPMC, con una solución acuosa de HCl, con una solución que comprende rebamipida sódica, para preparar una suspensión que comprende rebamipida con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 100nm (Ej. 1, Pág. 18 y Pág. 19, lín 7),
añadir una base a la misma para ajustar el pH de la suspensión acuosa hasta 3 – 7	añadir NaOH a la misma para ajustar el pH de la suspensión acuosa hasta aproximadamente 5.9 (Pág. 18, lín. 18 – 21),
dispersar y/o dializar la suspensión acuosa	dispersar y/o dializar la suspensión acuosa (Pág. 18, lín. 22 – 25 y Pág. 19 lín. 1 y 2),
ajustar el pH de la suspensión acuosa hasta 5 – 7,	ajustar el pH de la suspensión acuosa hasta 5 – 7 (Pág. 7, lín. 21),
y después añadir un agente potenciador de viscosidad a la misma.	y después añadir un agente potenciador de viscosidad a la misma (Pág. 7, lín. 25 y Pág. 9, lín. 1 – 4).

Las características **esenciales** del método de preparación de la reivindicación 19 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, el cual enseña un método para preparar una composición farmacéutica de rebamipida, que comprende: mezclar HPMC, con una solución acuosa de HCl, con una solución que comprende rebamipida sódica, para preparar una suspensión que comprende rebamipida con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 100nm (Ej. 1, Pág. 18 y Pág. 19, lín 7), añadir NaOH a la misma para ajustar el pH de la suspensión acuosa hasta aproximadamente 5.9 (Pág. 18, lín. 18 – 21), dispersar y/o dializar la suspensión acuosa (Pág. 18, lín. 22 – 25 y Pág. 19 lín. 1 y 2), ajustar el pH de la suspensión acuosa hasta 5 – 7 (Pág. 7, lín. 21), y después añadir un agente potenciador de viscosidad a la misma (Pág. 7, lín. 25 y Pág. 9, lín. 1 – 4).

En consecuencia, la reivindicación 19 carece de novedad, según lo divulgado en el documento D1.

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La reivindicación 1 consiste en una composición farmacéutica que comprende 10 mg/mL – 50 mg/mL de rebamipida con un tamaño medio de partícula menor que 500nm como ingrediente activo, al menos un agente dispersante, y al menos un agente potenciador de viscosidad, en donde la viscosidad de la preparación líquida está en un intervalo de 10 mPa.s – 500 mPa.s.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Una composición farmacéutica que comprende:	Una composición farmacéutica que comprende:	Una composición farmacéutica que comprende:
10 mg/mL – 50 mg/mL de rebamipida con un tamaño medio de partícula menor que 500nm como ingrediente activo	1% o 2% p/v rebamipida con un tamaño medio de partícula de 100nm (Ej. 1, Pág. 19, lín. 8; Ejs. 2 y 3, Pág. 20, lín. 6 y 25; Ej. 4, Pág. 23, lín. 14). La anterioridad también señala que la concentración de rebamipida puede estar entre 0.5% y 5% p/v (Pág. 17, líns. 2 – 6).	Rebamipida (3-100mg/Kg) (Pág. 393, lín. 4) (El peso de las ratas es de 213-290g) (Pág. 392, Materiales y métodos).
al menos un agente dispersante, y	Un polímero tal como HPMC o MC, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, Carboximetilcelulosa sódica, polietilenglicol, polisorbato 80, polioxietileno polioxipropilenglicol, entre otros (Pág. 12, líns. 18 – 25 y Pág. 13, líns. 1 – 13)	Se suspende en una solución de carboximetilcelulosa sódica al 0.5% (Pág. 392, preparaciones químicas y medicamentosas)
al menos un agente potenciador de viscosidad	HPMC, MC, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, Carboximetilcelulosa sódica, polietilenglicol, polisorbato 80, polioxietileno polioxipropilenglicol, entre otros (Pág. 12, líns. 18 – 25; Pág. 13, líns. 1 – 13; Pág. 14, líns. 1 – 4; Ej. 1, Pág. 19, líns. 10 – 12 y 17 – 19)	No lo menciona

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque:

El documento D1 divulga una composición farmacéutica que comprende: 1% o 2% p/v rebamipida con un tamaño medio de partícula de 100nm (Ej. 1, Pág. 19, lín. 8; Ejs. 2 y 3, Pág. 20, lín. 6 y 25; Ej. 4, Pág. 23, lín. 14), un polímero tal como HPMC, alcohol polivinílico, MC, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa sódica, polietilenglicol, polisorbato 80, polioxietileno polioxipropilenglicol, entre otros (Pág. 13, líns. 1 – 13) y HPMC o MC (Pág. 14, líns. 1 – 4; Ej. 1, Pág. 19, líns. 10 – 12 y 17 – 19), en donde la viscosidad de la preparación puede ser 14.4, 14.7, 30, 40.9, 12.3 o 20.1 (Pág. 29, Tab. 1).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y la composición reclamada en la solicitud según lo establecido en la descripción es que la composición de la anterioridad es un hidrogel suspendible y la composición de la presente solicitud es una suspensión que comprende partículas de rebamipida no agregadas.

No es posible determinar el efecto logrado por el hecho de que las composiciones de la presente solicitud no se encuentren en forma de hidrogel porque no se presenta en la descripción ningún ejemplo comparativo que demuestre alguna ventaja o efecto superior de las composiciones reclamadas frente a las divulgadas en el documento D1.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “cómo modificar la suspensión divulgada en el documento D1 para conseguir una composición alternativa útil para el tratamiento de estomatitis”.

Sin embargo, el documento D2 divulga una composición en suspensión (Pág. 392, preparaciones químicas y medicamentosas) la cual demostró ser útil en el tratamiento de estomatitis a dosis de 10mg/Kg o más (Pág. 393, efectos de rebamipide e indometacina; Pág. 395, Fig. 3).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, se vería motivada por lo revelado en el documento D2 a modificar el gel divulgado en el documento D1 con el fin de obtener una suspensión útil para el tratamiento de estomatitis, para lo cual modificaría la cantidad del agente formador de gel, pues es conocido¹ que dichos agentes en proporciones diferentes pueden ser usados ya sea como formadores de gel o como viscosantes para la preparación de suspensiones estables. Por lo cual la reivindicación 1 se considera obvia.

Conclusión:

La reivindicación 1 no cumple el requisito de novedad (Art. 16), y tampoco cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18), al igual que sus reivindicaciones dependientes 2 – 18.

9. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	WO2007132907	1 – 19	Novedad
D1	WO2007132907	1 – 18	Nivel Inventivo
D2	Inflammopharmacology , Vol. 10, No. 4–6, pp. 391–399 (2002)	1 – 18	Nivel Inventivo

1 Handbook of pharmaceutical excipients. 6th edition. 2009. Pág. 118 – 121.

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir del día siguiente de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante de sesenta (60) días para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito.

Finalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones, no pagará la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente al pago por reivindicación adicional.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2014-11-04

Elaboró: Juanita Catalina Rico Valbuena
Revisó: Gloria Jacqueline Alfonso Roza

Therapeutic effect of rebamipide in a modified acetic acid-induced buccal mucosal ulcer model

HIRONOBU ISHIYAMA*, KAZUYOSHI KAWAI, ATSUSHI AZUMA
and CHIFUMI NAGANO

*Third Institute of New Drug Discovery, Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd., 463-10 Kagasuno
Kawauchi-cho, 771-0192 Tokushima, Japan*

Received 30 September 2002; accepted 6 November 2002

Abstract—Previous studies have suggested that rebamipide, a gastroprotective drug, might be effective for the treatment of aphthous oral ulcers in Behçet's disease patients. The aim of this study was to confirm the effect of rebamipide on experimentally induced stomatitis in a rat acetic acid-induced oral ulcer model. Buccal mucosal lesions were induced by local injection of 50 μ l of 99.7% acetic acid into the buccal mucosa, which produced a single large ulcer in each of the treated rats. The ulcer remained up to 14 days. Repeated dose of rebamipide (3–100 mg/kg) dose-dependently decreased the ulcer area. Histopathologically, increased fibrosis and regenerated epithelium were observed in the rebamipide-treated group. In contrast, indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor, impaired the healing of ulcers. We have successfully established an improved method for the administration of acetic acid to induce oral ulcers, and rebamipide accelerated the ulcer healing.

Key words: Rebamipide; indomethacin; acetic acid-induced buccal mucosal ulcer; rat.

1. INTRODUCTION

Rebamipide is used clinically in Japan and Korea to treat gastric ulcers, and acute gastritis and chronic gastritis at the stage of acute aggravation. Recently, it has been reported that rebamipide might be effective for the treatment of aphthous stomatitis in patients with Behçet's disease, an inflammatory disease in which recurrent aphthous oral ulcers are a major symptom (Matsuda *et al.*, 1994; Kaklamani *et al.*, 1998). The pathogenesis of this disease has not yet been clearly defined and there are few effective treatments for either oral ulcers or the other clinical features of the disease, such as eye involvement, skin lesions, and genital ulcers (Kaklamani *et al.*, 1998). We examined the effect of rebamipide in an animal model of stomatitis

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: h-ishiyama@research.otsuka.co.jp

to predict whether this drug could also be effective in the treatment of stomatitis in humans. Since rebamipide has previously been shown to be effective in promoting the healing of gastric ulcers induced by acetic acid in rats (Shiraki *et al.*, 1988; Yamasaki *et al.*, 1989), we postulated that the drug might have a similar healing effect on acetic acid-induced oral ulcers. We examined the therapeutic effect of rebamipide using a modified version of the acetic acid-induced buccal mucosal ulcer model of Slomiany *et al.* (1999), in which acetic acid was injected into the buccal mucosa, rather than applied by contact with the buccal mucosal surface. Rebamipide has a variety of effects on the gastric mucosa, such as mucoprotection and the facilitation of ulcer healing (Arakawa *et al.*, 1998), which are likely related to increased levels of endogenous prostaglandins resulting from the induction of cyclooxygenase (COX)-2 expression (Sun *et al.*, 2000). It is well known that COX plays a crucial role in the healing of gastric ulcers in rats (Shigeta *et al.*, 1998; Wallace *et al.*, 2000). Therefore, to determine whether COX plays a similar role in the healing of buccal mucosal ulcers, we also examined the effect of indomethacin, a non-selective COX inhibitor.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

Male Sprague–Dawley rats (Charles River Japan), weighing 213–290 g, were given food (Oriental Yeast, Co., Ltd., Japan) and water *ad libitum*. Animals were housed under a 12-h light/dark cycle at an ambient temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$, humidity of $60 \pm 10\%$, and were acclimated for 7 days prior to use in the experiments. The care and handling of the animals were in accordance with the *Guidelines for Animal Experimentations* (Otsuka Pharmaceutical; October 1, 1994).

2.2. Chemicals and drug preparation

Acetic acid (99.7%) was obtained from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Rebamipide synthesized at the Saga factory of Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., was suspended in 0.5% carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) solution. Indomethacin, obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA), was dissolved in 3% NaHCO_3 solution. Both test compounds were administered in a volume of 4 ml/kg.

2.3. Experimental design

Buccal mucosal ulcers were induced in ether-anesthetized rats by injection of 99.7% acetic acid (10, 30 or 50 μl) into the left side buccal mucosa using a micro syringe with a 26G needle. After injection of acetic acid, the animals were killed at different time intervals up to day 14. The ulcers were removed, and the areas measured under a stereoscopic microscope (magnification, $\times 10$) using

a square grid micrometer. The study of test compounds was performed as follows. Indomethacin (0.4 or 2 mg/kg) was administered subcutaneously to rats once daily for 10 days starting on day 3 after injection of acetic acid (50 μ l). Rebamipide (3–100 mg/kg) was administered orally twice daily for 8 days beginning on day 5 after acetic acid treatment. The ulcer area was measured one day after the final dose. For histopathological analysis, the preparations were fixed in 10% buffered neutral formalin, then embedded in paraffin wax and cut into 4 μ m sections. The sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E), or azan (an indicator of collagen fiber). The histopathological evaluation was performed by making the degree of main view into the score. Scores for infiltration of inflammatory cells, angiogenesis, fibrosis, regeneration of buccal epithelium, thickness of buccal epithelium, or necrotic lesion in the ulcer base were as follows: H&E staining — 0, no change; 1, very slight change; 2, slight change; 3, moderate change; 4, intense change; Azan staining — 0, negative; 1, very weak positive; 2, weak positive; 3, moderate positive; 4, intense positive.

2.4. Statistics

Statistical analysis of the results (ulcer area) was performed by analysis of variance (ANOVA). Between groups variance was determined using Dunnet's test. Data were expressed as mean $\pm$ SD and were considered significant at $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Induction of acetic acid-induced buccal mucosal ulcers

When 50 μ l of 99.7% acetic acid was injected into the buccal mucosa, a single crater shaped ulcer (mean area = 16.3 ± 0.6 mm²) was observed in each of the acetic acid-treated rats on day 5 (Fig. 1A). In contrast, injection of 10 or 30 μ l of 99.7% acetic acid did not result in ulcerated lesions. Histopathological analysis of specimens obtained 5 days after acetic acid injection showed initial stages of granulation tissue formation (including infiltration of inflammatory cells, fibrogenesis and new capillaries in the ulcer base) and thickening of the buccal epithelium around the ulcer (Fig. 1B). The area of the ulcers reached maximal size by day 1 after acetic acid exposure, and then gradually decreased in size up to day 14 (Fig. 2).

3.2. Effects of rebamipide and indomethacin

Rebamipide (3–100 mg/kg, p.o.) reduced the area of ulcers in a dose-dependent manner, with statistically significant reductions occurring at doses of 10 mg/kg or higher (Fig. 3). Histopathologically, both control and rebamipide groups showed the formation of granulation tissue on day 14. In the 30 and 100 mg/kg rebamipide dose groups, the histopathological scores of fibrosis and regeneration of epithelium were higher than those in controls (Table 1). Indomethacin (0.4 and 2 mg/kg)

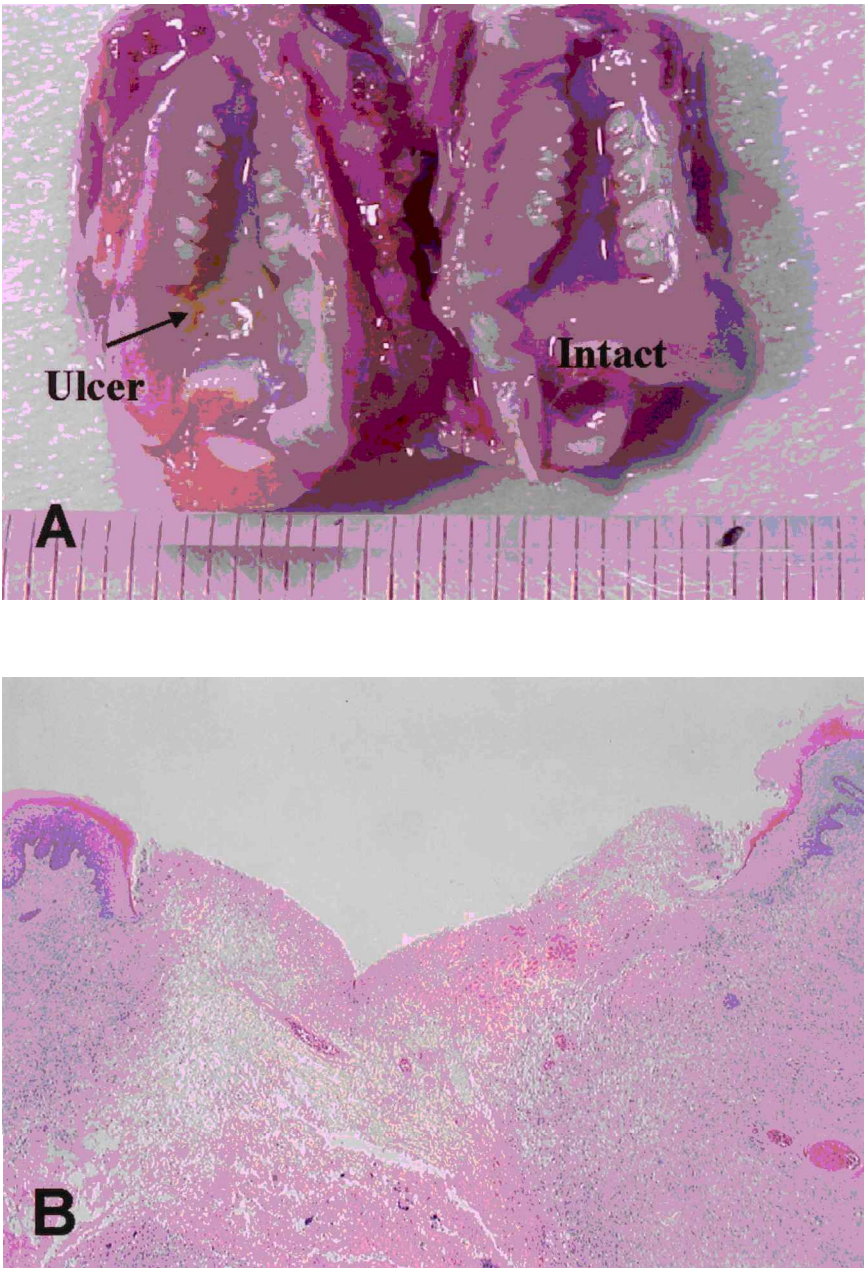


Figure 1. Macroscopic and histopathological appearances of buccal mucosal ulcer 5 days after injection of acetic acid. (A) Crater-like feature was seen in the oral cavity. (B) Microscopic appearance of the buccal mucosal ulcer (H&E staining, original magnification $\times 100$).

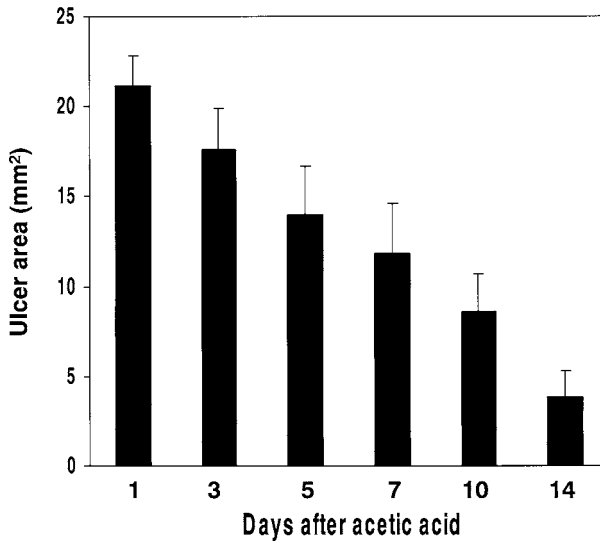


Figure 2. Change in the ulcer area after treatment with acetic acid (50 μ l/rat). The ulcer area was measured as described in Materials and Methods. Results were expressed as mean $\pm$ SD ($n = 5$).

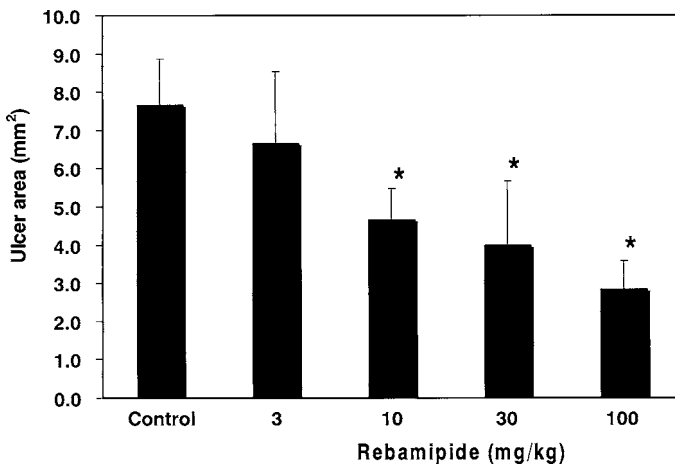


Figure 3. Effect of rebamipide on acetic acid-induced buccal mucosal ulcers in rats. Rebamipide (3–100 mg/kg) was administered orally to rats twice daily for 8 days starting on day 5 after acetic acid exposure. The ulcer area was measured as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 6$). * $p < 0.05$ vs. control.

significantly increased the ulcer area in a dose-dependent manner (Fig. 4). In the 4 mg/kg indomethacin group, the scores for infiltration of inflammatory cells were higher, and the scores for angiogenesis and fibrosis were lower, than those in the control group (Table 2).

Table 1.
Effect of rebamipide on histopathological scores in acetic acid-induced buccal mucosal ulcers

Score	Infiltration of inflammatory cells					Fibrosis					Angiogenesis					Regenerated buccal epithelium				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Groups																				
Control	0	0	1	4	1	0	1	5	0	0	0	2	3	1	0	0	1	4	1	0
Rebamipide 3 mg/kg	0	0	1	4	1	0	0	4	2	0	0	2	1	2	1	0	1	3	2	0
Rebamipide 10 mg/kg [#]	0	0	0	4	2	0	0	3	3	0	0	1	2	3	0	0	0	3	2	0
Rebamipide 30 mg/kg	0	0	1	3	2	0	0	2	2	2	0	1	1	4	0	0	0	1	5	0
Rebamipide 100 mg/kg [#]	0	0	2	3	0	0	0	1	2	2	0	0	3	1	1	0	0	0	2	2

Data represent the number of animals per histopathology score (*n* = 5–6).
[#] The number of rats per group varied because some of the specimens were unobservable.

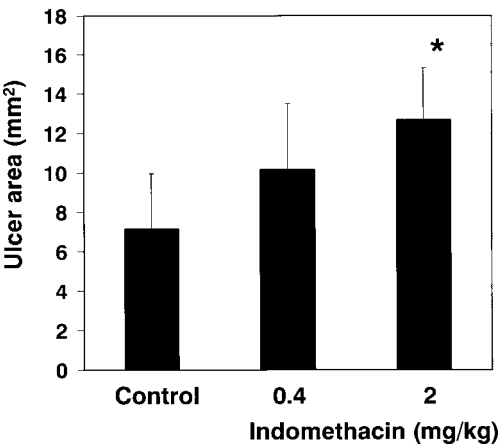


Figure 4. Effect of indomethacin on acetic acid-induced buccal mucosal ulcers in rats. Indomethacin (0.4 and 2 mg/kg) was administered subcutaneously to rats once daily for 10 days starting on day 3 after acetic acid. The ulcer area was measured as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean $\pm$ SD (*n* = 6). **p* < 0.05 vs. control.

Table 2.
Effect of indomethacin on histopathological scores in acetic acid-induced buccal mucosal ulcers

Score	Infiltration of inflammatory cells					Fibrosis					Angiogenesis					Necrotic lesion in ulcer base					Thickness of buccal epithelium				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Groups																									
Control [#]	0	0	2	3	0	0	0	2	3	0	0	0	2	3	0	0	0	3	2	0	0	0	4	1	0
Indomethacin 0.4 mg/kg [#]	0	0	0	5	0	0	1	3	1	0	0	0	3	2	0	0	0	1	2	2	0	0	1	4	0
Indomethacin 2 mg/kg	0	0	0	1	5	0	3	3	0	0	0	3	3	0	0	0	0	3	1	2	0	0	2	3	1

Data represent the number of animals per histopathology score (*n* = 5–6).
[#] The number of rats per group varied because some of the specimens were unobservable.

4. DISCUSSION

Appropriate experimental animal models of aphthous stomatitis have not yet been established. However, the acetic acid-induced buccal mucosal ulcer model (Slomiany *et al.*, 1999) may be useful for evaluating the efficacy of compounds in promoting oral ulcer healing. In the present study, we established a simple new method for inducing buccal mucosal ulcers. Injection of 50 μ l of acetic acid produced a single large buccal mucosal ulcer in each of the treated rats, and the ulcers remained at 14 days post-treatment. Histologically, the buccal mucosal ulcers resembled acetic acid-induced gastric ulcers, both with respect to gross morphology (crater-shape) and histopathology (defection of mucosal layer and formation of granulation tissue). Our findings suggest that this oral ulcer model is suitable for evaluating the therapeutic efficacy of test compounds.

Matsuda *et al.* (1994) reported that 5- or 6-month rebamipide treatment decreased the number of aphthous oral ulcers and alleviated pain in patients with Behçet's disease. One of the major symptoms of Behçet's disease is recurrent aphthous oral ulcer. In the studies reported here, repeated administration of rebamipide significantly decreased, in a dose dependent manner, the area of buccal mucosal ulcers induced by acetic acid in rats. Histopathological analysis showed that rebamipide increased the degree of fibrosis and regeneration of epithelial cells, suggesting that the healing of oral ulcers was accelerated. Rebamipide also accelerates the healing and prevented relapse of acetic acid-induced gastric ulcers in rats (Ishiyama *et al.*, 1985; Shiraki *et al.*, 1988; Yamasaki *et al.*, 1989). Rebamipide showed a mucoprotective action and acceleration of gastric ulcers healing, resulting from the increase of prostaglandins in gastric mucosa (Arakawa *et al.*, 1998). Recently, Sun *et al.* (2000) reported that rebamipide caused up-regulation of COX-2 protein expression in rat gastric mucosa. The elevation of prostaglandin levels through COX up-regulation is an important action for the protection of gastric mucosa and the course of gastric ulcer healing. However, there are few reports about the role of prostaglandins and COX in the pathogenesis of oral ulcers. It is well known that indomethacin inhibits both COX-1 and COX-2 activities. Wallace *et al.* (2000) observed that inhibition of both COX-1 and COX-2 was required for the induction of gastric damage by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in rats. It has been reported that indomethacin impairs the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats (Wang *et al.*, 1989; Shigeta *et al.*, 1998). Therefore, we examined whether indomethacin would similarly affect the healing of buccal mucosal ulcers. We used doses of indomethacin that were similar to those used in previous experiments in which indomethacin was reported to decrease gastric mucosal prostaglandin E₂ levels by inactivating COX. Interestingly, we observed that indomethacin impaired the healing of buccal mucosal ulcers. Histopathological analysis revealed a greater degree of infiltration of inflammatory cells, and malformations of both angiogenesis and fibrosis in the ulcers from the indomethacin-treated group as compared with those of controls. Thus, in addition to its role in the healing of gastric mucosal ulcers, COX might also be an important

factor for the healing of acetic acid-induced buccal mucosal ulcers. Further studies are necessary to confirm the mechanism of action of rebamipide and the precise role of COX in the healing of buccal mucosal ulcers.

In addition to its effect on COX-2, rebamipide has a variety of other effects on the gastric mucosa, such as the stimulation of mucus secretion (Ishihara *et al.*, 1992; Suetsugu *et al.*, 2000), inactivation of neutrophils (Ogino *et al.*, 1992), scavenging of free radicals (Yoshikawa *et al.*, 1993; Naito *et al.*, 1995), and up-regulation of endothelial growth factor (EGF) and EGF receptors (Tarnawski *et al.*, 1998). Accordingly, these factors and/or other unknown targets cannot be ruled out as potential mechanisms for the healing effect of rebamipide.

5. CONCLUSIONS

Buccal mucosal ulcers were readily produced by the injection of acetic acid into the buccal mucosa of rats. Repeated administration of rebamipide markedly accelerated the healing of acetic acid-induced buccal mucosal ulcers. These results are consistent with the previous clinical reports in which rebamipide was shown to be effective in the therapy of aphthous oral ulcers in Behçet's disease patients. In contrast, indomethacin delayed ulcer healing, suggesting that COX might be involved in the healing process of buccal mucosal ulcers.

Acknowledgements

We thank Mr. Toshihiro Osaka and Ms. Takako Nakashima for helpful technical support.

REFERENCES

- Arakawa, T., Kobayashi, K., Yoshikawa, T., *et al.* (1998). Rebamipide: overview of its mechanism of action and efficacy in mucosal protection and ulcer healing, *Dig. Dis. Sci.* **43**, 5S–13S.
- Ishihara, K., Komuro, Y., Nishiyama, N., *et al.* (1992). Effect of rebamipide on mucus secretion by endogenous prostaglandin-independent mechanism in rat gastric mucosa, *Arzneim-Forsch. Drug Res.* **42**, 1462–1466.
- Ishiyama, H., Yamasaki, K., Imaizumi, T., *et al.* (1985). Effect of OPC-12759, a new anti-ulcer agent, on the healing, recurrence and relapse of acetic acid-induced gastric ulcer in rats, *Dig. Dis. Sci.* **30**, 381.
- Kaklamani, V. G., Vaiopoulos, G. and Kaklamanis, P. G. (1998). Behçet's disease, *Semin. Arthritis Rheum.* **27**, 197–217.
- Matsuda, T., Yamada, H., Hoshi, K., *et al.* (1994). The beneficial effect of rebamipide on recurrent oral aphthous ulcers in Behçet's disease, *J. Clin. Exp. Med.* **170**, 773–774.
- Naito, Y., Yoshikawa, T., Tanigawa, T., *et al.* (1995). Hydroxyl radical scavenging by rebamipide and related compounds: electron paramagnetic resonance study, *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 117–123.
- Ogino, K., Hobara, T., Ishiyama, H., *et al.* (1992). Antiulcer mechanism of action of rebamipide, a novel antiulcer compound, on diethyldithiocarbamate-induced antral gastric ulcers in rats, *Eur. J. Pharmacol.* **212**, 9–13.

- Shigeta, J., Takahashi, S. and Okabe, S. (1998). Role of cyclooxygenase-2 in the healing of gastric ulcers in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 1383–1390.
- Shiraki, M., Yamasaki, K., Ishiyama, H., *et al.* (1988). Healing promoting effect of proamipide, a novel drug that increase gastric defense mechanisms, on acetic acid-induced gastric ulcers in the rat, *Folia Pharmacol. Jpn.* **92**, 389–395.
- Slomiany, B. L., Piotrowski, J. and Slomiany, A. (1999). Role of endothelin-1 and interleukin-4 in buccal mucosal ulcer healing: Effect of chronic alcohol ingestion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 373–377.
- Suetsugu, H., Ishihara, S., Moriyama, N., *et al.* (2000). Effect of rebamipide on prostaglandin EP4 receptor gene expression in rat gastric mucosa, *J. Lab. Clin. Med.* **136**, 50–57.
- Sun, W., Tsuji, S., Tsujii, M., *et al.* (2000). Induction of cyclooxygenase-2 in rat gastric mucosa by rebamipide, a mucoprotective agent, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 447–452.
- Tarnawski, A. S., Arakawa, T. and Kobayashi, K. (1998). Rebamipide treatment activates epidermal growth factor and its receptor expression in normal and ulcerated gastric mucosa in rats: One mechanism for its ulcer healing action?, *Dig. Dis. Sci.* **43**, 90S–98S.
- Wallace, J. L., Mcknight, W., Reuter, B. K., *et al.* (2000). NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2, *Gastroenterology* **119**, 706–714.
- Wang, J. Y., Yamasaki, S., Takeuchi, K., *et al.* (1989). Delayed healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats by indomethacin, *Gastroenterology* **96**, 393–402.
- Yamasaki, K., Ishiyama, H., Imaizumi, T., *et al.* (1989). Effect of OPC-12759, a novel antiulcer agent, on chronic and acute experimental gastric ulcer, and gastric secretion in rats, *Jpn. J. Pharmacol.* **49**, 441–448.
- Yoshikawa, T., Naito, Y., Tanigawa, T., *et al.* (1993). Free radical scavenging activity of novel anti-ulcer agent rebamipide studies by electron spin resonance, *Arzeim-Forsh. Drug Res.* **43**, 363–366.