

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 876**

51 Int. Cl.:

A61K 9/28 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09740698 .7**

96 Fecha de presentación: **27.10.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2340018**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2011**

54 Título: **Revestimiento de película basados en polímero: almidón insolubles en agua para la liberación dirigida en el colon**

30 Prioridad:
27.10.2008 EP 08305740

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2012

73 Titular/es:
ROQUETTE FRERES (100.0%)
62136 Lestrem, FR

72 Inventor/es:
HAEUSLER, OLAF;
WILS, DANIEL;
SIEPMANN, JUERGEN y
KARROUT, YOUNESS

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 391 876 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

Revestimientos de película basados en polímero: almidón insolubles en agua para la liberación dirigida en el colon

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una forma de dosificación para el suministro controlado de ingrediente o ingredientes activos. La presente invención se refiere también al uso y método para producir la misma.

Antecedentes de la invención

La liberación dirigida en el colon puede ser de gran ayuda para muchas terapias con fármacos, incluido el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino tales como la enfermedad de Crohn (CD – siglas en inglés) y colitis ulcerosa (UC – siglas en inglés).

10 Si un fármaco de acción local se administra por vía oral utilizando una forma de dosificación farmacéutica convencional, esta última se disuelve rápidamente en el contenido del estómago, el fármaco se libera y es probable que sea absorbido en el torrente sanguíneo. Esto conduce a concentraciones de fármaco sistémicas elevadas y, así, a un riesgo incrementado de efectos secundarios indeseados y, al mismo tiempo, a bajas concentraciones de fármaco en el lugar de acción en el colon, dando como resultado una eficacia terapéutica deficiente. Estas limitaciones pueden superarse si se suprime la liberación de fármaco en el estómago y en el intestino delgado y, de forma controlada en el tiempo, en el colon. Este tipo de suministro al colon de fármacos específico para el lugar también podría ofrecer una oportunidad interesante para que fármacos proteicos y peptídicos sean absorbidos en la circulación sistémica tras la administración por vía oral.

20 Para permitir la liberación dirigida en el colon, el fármaco puede ser embebido, por ejemplo, dentro de un formador de la matriz polimérico o puede ser comprimidos o nódulos cargados con fármaco tales como perlas esféricas, de aproximadamente 0,5-1 mm de diámetro, o puede ser revestido con una película polimérica. En el tracto gastrointestinal (GIT – siglas en inglés) superior, la permeabilidad de las redes poliméricas para el fármaco debería ser baja, mientras que las barreras macromoleculares deben volverse permeables una vez que se alcanza el colon. Este aumento en la permeabilidad a fármacos de las redes poliméricas en el sitio de acción podría ser inducido mediante: (i) un cambio en el pH del contenido del GIT, (ii) un cambio en la calidad y/o cantidad de enzimas a lo largo del GIT, o (iii) cambios estructurales significativos dentro de la forma de dosificación que se produce después de un tiempo de retardo predeterminado (p. ej. formación de fisuras en revestimientos de película muy poco permeables que proporcionan modelos pulsátiles de liberación de fármacos). Alternativamente, la liberación del fármaco ya se podría iniciar en el estómago y continuar a lo largo del GIT a una velocidad que sea lo suficientemente baja como para asegurar que el fármaco siga estando dentro de la forma de dosificación una vez que se alcanza el colon.

Un intento para resolver el problema de la liberación dirigida en el colon se describe en el documento US2005220861A, el cual se refiere a una formulación de liberación controlada para suministrar metasulfobenzoato sódico de prednisolona. La formulación comprende metasulfobenzoato sódico de prednisolona rodeada por un revestimiento que comprende amilosa vítrea, etilcelulosa y sebacato de dibutilo, en donde la relación de amilosa a etilcelulosa es de (1:3,5) a (1:4,5), y en donde la amilosa es amilosa de cereal o maíz. En contraposición con la solicitud de patente americana número US2005220861, el sistema descrito en la presente invención está adaptado al estado patológico de pacientes. Este es un aspecto muy crucial, ya que para permitir la liberación dirigida en el colon, la forma de dosificación debe convertirse en más permeable para el fármaco una vez que se ha alcanzado el colon. Esto se puede asegurar, por ejemplo, mediante una degradación preferencial de un compuesto que impide una liberación rápida del fármaco en el tracto gastrointestinal superior. Esta degradación específica para el sitio puede basarse en diferencias significativas en la calidad y cantidad de enzimas presentes en el tracto gastrointestinal superior frente al colon. El compuesto no debería ser degradado en el tracto gastrointestinal superior (e impedir la liberación de fármacos), sino que debería ser degradado en el colon (y, así, permitir la liberación de fármacos). El comportamiento de este tipo de sistemas avanzados de suministro de fármacos depende fundamentalmente de las condiciones medioambientales en el colon de los pacientes, en particular de los tipos y concentraciones de las enzimas presentes en el colon. Es bien conocido y se ha documentado bien en la bibliografía que el estado patológico puede verse afectado significativamente por la calidad y cantidad de la microflora secretora de enzimas en el tracto gastrointestinal. Esto es particularmente cierto para la microflora en el colon de pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del intestino: así, la calidad y cantidad de enzimas presentes en el colon de un paciente pueden variar significativamente de las de un sujeto sano. Por consiguiente, el comportamiento de este tipo de sistemas de suministro de fármacos puede verse significativamente afectado por el estado patológico. Fracasan sistemas que se basan en la degradación preferencial por parte de enzimas que no están presentes en concentraciones suficientes en el estado patológico en el colon del paciente. La presente invención reseña, por vez primera, formas de dosificación que permiten el suministro controlado de ingrediente activo bajo condiciones

patofisiológicas: en heces de pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del intestino. Así, el comportamiento de estas formas de dosificación se asegura bajo las condiciones patofisiológicas dadas in vivo. Esto es decisivo para el éxito y la seguridad del tratamiento.

5 El documento US6534549 se refiere a un método para producir una composición de liberación controlada que comprende una mezcla de un polímero formador de película sustancialmente insoluble en agua y amilosa en un sistema disolvente que comprende (1) agua y (2) un disolvente orgánico miscible con agua que por sí mismo es capaz de disolver el polímero formador de película, se pone en contacto con un material activo y se seca la composición resultante. La composición es particularmente adecuada para suministrar agentes terapéuticos al colon. En contraposición con la presente invención, esa descripción acomete sistemas de suministro de fármacos 10 preparados utilizando un disolvente orgánico. Este no es el caso en la presente invención. El uso de disolventes orgánicos implica varias preocupaciones, incluidas la toxicidad y aspectos medioambientales, así como peligros de explosión. Además de ello, el uso de amilosa implica la extracción de este polímero y su estabilización. La amilosa se extrae del almidón después de una etapa de hidrólisis y de una etapa de purificación. Este proceso es complejo y es utilizable con dificultad a un nivel industrial. Esta formulación no tiene en cuenta la cinética de liberación del fármaco para pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del intestino. Se ha de señalar que los tipos y 15 cantidades de bacterias presentes en el colon de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino pueden diferir significativamente de los de sujetos sanos. Así, los tipos y cantidades de enzimas secretadas por estas bacterias y que están en contacto con el sistema de suministro de fármacos pueden diferir significativamente. Por consiguiente, el comportamiento del sistema de suministro de fármacos puede diferir significativamente.

20 Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar una forma de dosificación de suministro para controlar la velocidad y el grado de suministro de un ingrediente activo, por ejemplo, sin limitación, un ingrediente farmacéutico activo, ingredientes activos biológicos, químicos, nutracéuticos, agrícolas o nutricionales.

25 Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar nuevos revestimientos de película poliméricos que permitan la liberación dirigida en el colon del fármaco, específica para el sitio, y que puedan utilizarse para pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del intestino así como para pacientes con un colon sano.

Un objeto adicional de la presente invención consiste en proporcionar nuevos revestimientos de película poliméricos que tengan una estabilidad mecánica suficiente para resistir el esfuerzo de cizalla cuando se exponen al GIT superior (debido a la movilidad gastrointestinal) y a resistir la presión hidrostática potencialmente significativa desarrollada 30 dentro de las formas de dosificación debido a la penetración de agua en los sistemas tras el contacto con medios acuosos. De hecho, con revestimientos polímeros conocidos, el problema de la formación de una fisura accidental puede dar como resultado una liberación prematura del fármaco a través de canales llenos de agua.

Un objeto adicional de la presente invención consiste en proporcionar nuevos revestimientos de película poliméricos ajustables a las necesidades específicas de un tipo particular de tratamiento con fármacos, p. ej. la actividad 35 osmótica del fármaco y la dosis administrada.

La presente invención proporciona una forma de dosificación de suministro de liberación controlada para la liberación controlada de un ingrediente activo, que comprende un ingrediente activo revestido en una mezcla polimérica de:

- o al menos un polímero insoluble en agua y
- o una composición de almidón que comprende al menos un componente seleccionado del grupo que 40 consiste en un almidón que tiene un contenido en amilosa de entre 20 y 45%, preferiblemente de entre 25 y 44% y, más preferiblemente todavía, de entre 30 y 40%, teniendo un almidón modificado un contenido en amilosa de entre 50 y 80% y un almidón de legumbres.

Preferiblemente, la forma de dosificación de liberación controlada es una formulación oral y tiene una resistencia gástrica. En una realización preferida, la forma de dosificación farmacéutica de liberación controlada se encuentra en una forma sólida, líquida o semi-líquida. De manera ventajosa, la forma de dosificación farmacéutica de liberación controlada es una dispersión sólida. De acuerdo con la invención, la mezcla polimérica es una mezcla íntima del polímero insoluble en agua y la composición de almidón, no formando dicho almidón componentes en partículas en el polímero insoluble en agua.

50 En una realización de la presente invención, la mezcla polimérica de la forma de dosificación de suministro de liberación controlada es una mezcla de revestimiento, comprendiendo la forma de dosificación de suministro de liberación controlada un núcleo, estando el ingrediente activo dispersado o disuelto en el núcleo y/o en la mezcla del revestimiento.

En una realización adicional de la presente invención, la relación composición de almidón:polímero insoluble en agua en la forma de dosificación de suministro de liberación controlada oscila entre 1:2 y 1:8, preferiblemente entre 1:3 y 1:6 y, más preferiblemente, entre 1:4 y 1:5.

5 Preferiblemente, la composición de almidón tiene un contenido en almidón de al menos 50%, preferiblemente de entre 70 y 100%, más preferiblemente de 70 a 100%, todavía más preferiblemente entre 90 y 100%.

Típicamente, la composición de almidón exhibe un contenido en amilosa de entre 20 y 45%, preferiblemente un contenido en amilosa de entre 25 y 44%, más preferiblemente de entre 32 y 40%, expresándose este porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de almidón presente en dicha composición.

10 En una realización adicional de la invención, la composición de almidón comprende al menos un almidón de legumbres o cereales.

Preferiblemente, la legumbre se selecciona del grupo que consiste en guisantes, habas, haba ancha y haba equina.

De acuerdo con otra forma alternativa ventajosa, la legumbre es una planta, por ejemplo una variedad de guisante o de haba equina, que proporciona semillas que comprenden al menos 25%, preferiblemente al menos 40% en peso de almidón (seco/seco). Preferiblemente, el almidón de legumbre es un almidón de legumbre granular.

15 Ventajosamente, la legumbre es guisantes. Gránulos de almidón de guisantes tienen dos particularidades. La primera es un gran diámetro del gránulo, mayor que, por ejemplo, los gránulos de almidón de maíz, que mejora la superficie específica del gránulo y, así, contacta con el agua y las enzimas de la microflora en el colon. Además, gránulos de almidón de guisantes tienen una elevada capacidad de expansión que mejora su superficie específica y, así, la capacidad de digestión de los gránulos y, por consiguiente, la liberación de ingrediente activo en el colon.

20 De acuerdo con otra alternativa ventajosa, el almidón de legumbre es un almidón de legumbre nativa.

Ventajosamente, el contenido en almidón de la composición de almidón es mayor que 90% (seco/seco). En particular, puede ser mayor que 95%, preferiblemente mayor que 98%.

25 De acuerdo con la invención, el almidón modificado está preferiblemente estabilizado. De hecho, de acuerdo con una realización preferida de la invención, los tratamientos químicos, que son particularmente bien adecuados para la preparación de una composición formadora de película, son los tratamientos "estabilizantes". Modificaciones de la estabilización comunes se pueden conseguir esterificando o eterificando alguno de los grupos hidroxilo a lo largo de la cadena del almidón. Preferiblemente, dicho almidón modificado está hidroxipropilado y/o acetilado; siendo posible que estos tratamientos estén opcionalmente suplementados mediante una fluidización que es un tratamiento de hidrólisis química o enzimática. Preferiblemente, dicho almidón modificado es tratado por fluidización, por ejemplo
30 mediante tratamiento con ácidos. La composición del almidón de acuerdo con la invención comprende, así, ventajosamente al menos un almidón estabilizado y, preferiblemente, un almidón hidroxipropilado que exhibe un grado de sustitución (DS – siglas en inglés) de a lo sumo 0,2. El término "DS" se entiende que significa, en la presente invención, el número medio de grupos hidroxipropilo por cada 10 unidades de anhidroglucosa. Este número medio se determina por los métodos analíticos convencionales bien conocidos por una persona experta en la
35 técnica.

40 En una realización adicional de la invención, la composición de almidón puede comprender, adicionalmente, al menos un polisacárido indigerible, seleccionado del grupo que consiste en xilo-oligosacáridos, inulina, oligofruktosas, fructo-oligosacáridos (FOS), lactulosa, galactomanano e hidrolizados adecuados de los mismos, polidextrosa indigerible, dextrina indigerible e hidrolizados parciales de los mismos, trans-galacto-oligosacáridos (GOS), xilo-oligosacáridos (XOS), acemanano, lentinano o beta-glucano e hidrolizados parciales de los mismos, polisacáridos-K (PSK), y maltodextrina indigerible e hidrolizados parciales de la misma, preferiblemente una dextrina indigerible o una maltodextrina indigerible.

45 De acuerdo con la invención, una maltodextrina indigerible o dextrina indigerible con entre 15 y 35% de enlaces 1 → 6 glucósido, un contenido en azúcar reductor de menos de 20%, un índice de polimolecularidad menor que 5 y una masa molecular media numérica Mn de a lo sumo igual a 4500 g/mol.

De acuerdo con una variante, la totalidad o algunas de dichas maltodextrinas indigeribles están hidrogenadas.

De acuerdo con una variante, el núcleo tiene un nivel de revestimiento de 5% a 30%, preferiblemente de 10% a 20%.

En una realización adicional, la mezcla polimérica comprende un plastificante. Preferiblemente, el contenido en plastificante oscila entre 25% y 30% p/p, referido al contenido en polímero insoluble en agua.

50 Preferiblemente, el polímero insoluble en agua se selecciona del grupo que consiste en etilcelulosa, derivados de

5 celulosa, polímeros de ésteres acrílicos y/o metacrílicos, polímeros o copolímeros de acrilato o metacrilato, poli(ésteres vinílicos), derivados de almidón poli(acetatos de vinilo), ésteres de ácido poliacrílico, copolímeros de butadieno-estireno, copolímeros de metacrilato-éster, acetato-ftalato de celulosa, poli(acetato-ftalato de vinilo), goma laca, copolímeros de ácido metacrílico, acetato-trimelitato de celulosa, ftalato de hidroxipropil-metilcelulosa, zeína, acetato de almidón.

10 De acuerdo con una realización adicional, el plastificante es un plastificante soluble en agua. Preferiblemente, el plastificante soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en polioles (glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles), ésteres orgánicos (ésteres de ftalato, sebacato de dibutilo, ésteres de citrato, triacetina), aceites/glicéridos (aceite de ricino, monoglicéridos acetilados, aceite de coco fraccionado), lecitina de soja sola o en forma de una mezcla de uno con otro.

En una realización preferida, la forma de dosificación de suministro de liberación controlada es una forma de dosificación multiparticulada.

15 La presente invención proporciona también un método para preparar una forma de dosificación de suministro de liberación controlada para la liberación controlada del ingrediente activo en el colon de pacientes con un desequilibrio en la microflora del colon o en el colon de sujetos sanos, según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo dicho método:

○ formar una mezcla polimérica de:

- al menos un polímero insoluble en agua y
- una composición de almidón que comprende al menos un

20 componente seleccionado del grupo que consiste en un almidón que tiene un contenido en amilosa de entre 20 y 45%, preferiblemente de entre 25 y 44% y, más preferiblemente todavía, de entre 30 y 40%, teniendo un almidón modificado un contenido en amilosa de entre 50 y 80% y un almidón de legumbres,

○ revestir dicho ingrediente activo en la mezcla polimérica.

25 En una realización adicional, la etapa de revestir el ingrediente activo es una etapa de revestimiento de un núcleo, estando el ingrediente activo dispersado o disuelto en el núcleo, y/o la etapa de revestimiento del ingrediente activo es una etapa de dispersar o disolver el ingrediente activo en la mezcla polimérica.

30 Las condiciones en el tracto gastrointestinal de pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del intestino (p. ej. enfermedades de Crohn y colitis ulcerosa) pueden diferir significativamente de aquellas en un sujeto sano. La variabilidad intra- e inter-individual puede ser sustancial con respecto al pH del contenido del GIT, tipos y concentraciones de bacterias secretoras de enzimas, así como los tiempos de tránsito dentro de los diversos segmentos del GIT. Por ejemplo, cantidades considerables de bifidobacterias están generalmente presentes en el colon de sujetos sanos y son capaces de degradar polisacáridos complejos debido a múltiples glucosidasas extracelulares. Sin embargo, en el estado patológico su concentración puede verse significativamente reducida. Por

35 ejemplo, se demostró que la actividad de la glucosidasa fecal (especialmente la de β -D-galactosidasa) disminuye en pacientes que padecen enfermedades de Crohn, y que la actividad metabólica de la flora del colon se ve fuertemente perturbada en el estado activo de la enfermedad. Así, el impacto de la patofisiología puede ser crucial y puede conducir al fracaso del tratamiento con fármacos.

40 Para evitar fracasos en el tratamiento para pacientes que padecen enfermedades del intestino inflamatorio, el sistema de suministro de fármacos específico para el sitio debe adaptarse a las condiciones dadas en el colon del paciente. Por ejemplo, se podrían utilizar revestimientos de película poliméricos que son degradados por enzimas, que están presentes en cantidades suficientes en las heces de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Sin embargo, sigue sin estar claro qué tipo o tipos de polímeros cumplen estos requisitos previos.

Breve descripción de los dibujos

45 Fig. 1: Contenido en agua de películas delgadas que consisten en diferentes tipos de mezclas de polímeros (indicados en las figuras) tras exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón fosfato pH 6,8. Por motivos de comparación se muestran películas que consisten solamente en etilcelulosa plastificada.

50 Fig. 2: Masa seca de películas delgadas que consisten en diferentes tipos de mezclas de polímeros (indicados en las figuras) tras exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón fosfato pH 6,8. Por motivos de comparación se muestran películas que consisten solamente en etilcelulosa plastificada.

Fig. 3: Contenido en agua y masa seca de películas delgadas que consisten en maltodextrina ramificada o almidón de guisantes mezclado con etilcelulosa tras exposición a tampón fosfato pH 6,8 que contiene o no pancreatina o extracto procedente del intestino de rata.

5 Fig. 4: Contenido en agua y masa seca de películas delgadas que consisten en diferentes tipos de polisacáridos mezclados con etilcelulosa tras exposición a medio de cultivo, medio de cultivo inoculado con heces de sujetos sanos y medio de cultivo inoculado con heces pacientes con enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerosa (UC) (tal como se indica en las figuras). Por motivos de comparación se muestran películas que consisten solamente en etilcelulosa plastificada.

10 Fig. 5: Imágenes de la microflora desarrollada tras incubación de películas poliméricas delgadas de diferente composición (indicada en la figura) con muestras fecales de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino.

15 Fig. 6: Absorción de agua y pérdida de masa seca de películas delgadas que consisten en mezclas de PS HP-PG:etilcelulosa tras exposición a HCl 0,1 M y tampón fosfato pH 6,8, respectivamente. En las figuras se indica la relación de la mezcla de polímeros. Por motivos de comparación, también se muestra el comportamiento de películas de etilcelulosa pura (plastificada).

Fig. 7: Cambios en la energía a la rotura de películas delgadas de PS HP-PG: etilcelulosa tras exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón fosfato pH 6,8. La relación de la mezcla de polímeros se indica en las figuras. Por motivos de comparación, también se muestran los resultados obtenidos con películas de etilcelulosa pura (plastificada).

20 Fig. 8: Absorción de agua y pérdida de masa seca de películas delgadas que consisten en mezclas de EURYLON® 7 A-PG:etilcelulosa tras exposición a HCl 0,1 M y tampón fosfato pH 6,8, respectivamente. En las figuras se indica la relación de la mezcla de polímeros. Por motivos de comparación, también se muestra el comportamiento de películas de etilcelulosa pura (plastificada).

25 Fig. 9: Cambios en la energía a la rotura de películas delgadas de EURYLON® 7 A-PG:etilcelulosa tras exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón fosfato pH 6,8. La relación de la mezcla de polímeros se indica en las figuras. Por motivos de comparación, también se muestran los resultados obtenidos con películas de etilcelulosa pura (plastificada).

30 Fig. 10: Absorción de agua y pérdida de masa seca de películas delgadas que consisten en mezclas de EURYLON® 6 A-PG:etilcelulosa tras exposición a HCl 0,1 M y tampón fosfato pH 6,8, respectivamente. En las figuras se indica la relación de la mezcla de polímeros. Por motivos de comparación, también se muestra el comportamiento de películas de etilcelulosa pura (plastificada).

35 Fig. 11: Cambios en la energía a la rotura de películas delgadas de EURYLON® 6 A-PG:etilcelulosa tras exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón fosfato pH 6,8. La relación de la mezcla de polímeros se indica en las figuras. Por motivos de comparación, también se muestran los resultados obtenidos con películas de etilcelulosa pura (plastificada).

Fig. 12: Absorción de agua y pérdida de masa seca de películas delgadas que consisten en mezclas de EURYLON® 6 HP-PG:etilcelulosa tras exposición a HCl 0,1 M y tampón fosfato pH 6,8, respectivamente. En las figuras se indica la relación de la mezcla de polímeros. Por motivos de comparación, también se muestra el comportamiento de películas de etilcelulosa pura (plastificada).

40 Fig. 13: Cambios en la energía a la rotura de películas delgadas de EURYLON® 6 HP-PG:etilcelulosa tras exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón fosfato pH 6,8. La relación de la mezcla de polímeros se indica en las figuras. Por motivos de comparación, también se muestran los resultados obtenidos con películas de etilcelulosa pura (plastificada).

45 Fig. 14: Cinética de absorción de agua de películas delgadas de almidón de guisantes:etilcelulosa tras exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón fosfato pH 6,8. En los diagramas se indica la relación de la mezcla de polímero:polímero (p:p).

Fig. 15: Cinética de la pérdida de masa seca de películas delgadas de almidón de guisantes:etilcelulosa tras exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón fosfato pH 6,8. En los diagramas se indica la relación de la mezcla de polímero:polímero (p:p).

50 Fig. 16: Propiedades mecánicas de películas delgadas de almidón de guisantes:etilcelulosa en estado seco: (a) resistencia por punción a la rotura, (b) % de alargamiento a la rotura y (c) energía a la rotura. En el eje x

se indica la relación de mezcla polímero:polímero (p:p).

Fig. 17: Cambios en la energía a la rotura de películas delgadas de almidón de guisantes:etilcelulosa tras exposición a: (a) HCl 0,1 M (durante 2 h), o (b) tampón fosfato pH 6,8 (durante 8 h) a 37°C. En los diagramas se indica la relación de mezcla polímero:polímero (p:p).

5 Fig. 18: Liberación de fármaco a partir de gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa 1:2 bajo condiciones que simulan el tránsito a través del tracto gastrointestinal superior: 2 h de exposición a HCl 0,1 M, seguido de 9 h de exposición a tampón fosfato pH 6,8. En el diagrama se indica el nivel de revestimiento así como la ausencia (curvas de trazo continuo) y presencia (curvas de trazo discontinuo) de enzimas (pepsina al 0,32% a pH bajo, pancreatina al 1% a pH neutro).

10 Fig. 19: Efectos de la relación de mezcla almidón de guisantes:etilcelulosa (p:p) y nivel de revestimiento (indicado en los diagramas) sobre la liberación de fármaco a partir de gránulos revestidos bajo condiciones que simulan el tránsito a través del tracto gastrointestinal superior: 2 h de exposición a HCl 0,1 M, seguido de 9 h de exposición a tampón fosfato pH 6,8. Las curvas de trazos continuos/trazos discontinuos indican la ausencia/presencia de enzimas (pepsina al 0,32% a pH bajo, pancreatina al 1% a pH neutro).

15 Fig. 10: Liberación de fármaco a partir de gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa 1:4 a un nivel de revestimiento de 15 ó 20% (según se indica) bajo condiciones que simulan el tránsito a través de todo el tracto gastrointestinal: 2 h de exposición a HCl 0,1 M, seguido de 9 h de exposición a tampón fosfato pH 6,8, seguido de 10 h de exposición a: (a) medio de cultivo inoculado con muestras fecales recientes procedentes de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino, o (b) medio de cultivo inoculado con Bifidobacterium. Por motivos de comparación, también se muestra en (a) (curvas de trazos discontinuos) la liberación de fármaco tras exposición al medio de cultivo exento de muestras fecales.

20 Fig. 21: Estabilidad al almacenamiento de gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa 1:4 al 10, 15 y 20%. Liberación de fármaco en HCl 0,1 M (durante 2 h) y tampón fosfato a pH 6,8 (durante 9 h) antes (curvas de trazos continuos) y después de 1 año de almacenamiento al aire libre (curvas de trazos discontinuos).

25 Fig. 22: Aspecto macroscópico del colon de ratas que reciben: (A) vehículo sólo por vía intrarrectal (grupo testigo negativo), (B) TNBS por vía intrarrectal (grupo testigo positivo), (C) TNBS por vía intrarrectal y gránulos revestidos con BMD:EC por vía oral, o (D) TNBS por vía intrarrectal y gránulos de Pentasa® por vía oral. TNBS/el vehículo solo fue administrado por vía intrarrectal el día 3. La dosis administrada por vía oral 5-ASA era de 150 mg/kg/día.

30 Fig. 23: Puntuaciones Ameho de ratas, que reciben: (i) TNBS por vía intrarrectal, (ii) TNBS por vía intrarrectal y gránulos de Asacol® por vía oral, (iii) TNBS por vía intrarrectal y gránulos de Pentasa® por vía oral, (iv) TNBS por vía intrarrectal y gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa por vía oral, (v) TNBS por vía intrarrectal y gránulos revestidos con BMD:etilcelulosa por vía oral. TNBS fue administrado por vía intrarrectal el día 3. La dosis administrada por vía oral de 5-ASA era 150 mg/kg/día.

35 Fig. 24: Secciones histológicas representativas (sección transparietal normal, x 200) de tejidos de colon de ratas. Se indican las diferentes capas: M –mucosa; SM – submucosa; Mu – capa muscular.

Tabla 1: Concentraciones de bacterias [log CFU/g] en las muestras fecales investigadas de sujetos sanos y pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino.

40 Tabla 2: Efectos del tipo de polisacárido mezclado con etilcelulosa y la relación de mezcla polisacárido:etilcelulosa sobre las propiedades mecánicas de películas delgadas en estado seco a la temperatura ambiente.

Tabla 3: Medios de disolución utilizados para simular el incremento gradual en el pH a lo largo del GIT.

Descripción detallada de la invención

45 Al describir y reivindicar la presente invención se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones según se recogen en esta memoria.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “ingrediente activo”, “fármaco” o “ingrediente farmacológicamente activo” o cualquier otro término o expresión similar significa cualquier material o compuesto químico o biológico adecuado para la administración por los métodos previamente conocidos en la técnica, y/o por los métodos enseñados en la presente invención, que induce un efecto biológico o farmacológico deseado, que puede incluir, pero no se limita a (1) que tiene un efecto profiláctico sobre el organismo y que previene un efecto biológico indeseado tal como previene una infección, (2) alivia un estado provocado por una enfermedad, por ejemplo

aliviando el dolor o la inflamación provocado como un resultado de la enfermedad, y/o (3) ya sea alivia, reduce o elimina por completo la enfermedad del organismo. El efecto puede ser local tal como proporcionar un efecto anestésico local, o puede ser sistémico.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “desequilibrio de la microflora del colon”, también denominada disbiosis o disbacteriosis, pretende dar a entender, en la presente invención, los desequilibrios microbianos tal como en calidad y en cantidad en el tracto gastrointestinal. Este fenómeno se refleja por la calidad y cantidad de las enzimas presentes en el colon. En particular, esta microflora alterada se observa en el colon de pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del intestino tales como enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerosa (UC).

10 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “suministro de liberación controlada” o “liberación controlada” significa que la liberación del ingrediente activo de la forma de dosificación se controla con respecto al tiempo o con respecto al sitio de suministro.

La expresión “almidón modificado” debería entenderse en un sentido amplio, esta expresión se refiere, por ejemplo, a almidón reticulado o acetilado o hidroxipropilado o, más generalmente, a almidón de esterificación o eterificación.

15 El término “revestimiento” se utiliza en esta memoria para abarcar revestimientos para soportes sólidos y también cápsulas que incluyen fluidos y/o sólidos, y el término “revestido” se utiliza de manera similar.

La expresión “polímero insoluble en agua” debería entenderse en un sentido amplio, esta expresión se refiere a polímeros que no se disuelven por completo en agua tales como, por ejemplo, etilcelulosa, determinados derivados de almidón o derivados del ácido acrílico/ácido metacrílico.

20 La expresión “polisacáridos indigeribles”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a sacáridos que no son digeridos o sólo lo son parcialmente en el intestino por la acción de ácidos o enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo superior humano (intestino delgado y estómago), pero que al menos son parcialmente fermentados por la flora intestinal humana. Polisacáridos indigeribles solubles en agua que pueden emplearse en realizaciones preferidas de la invención son xilo-oligosacáridos, inulina, oligofruktosas, fructo-oligosacáridos (FOS), lactulosa, galactomanano e hidrolizados adecuados de los mismos, polidextrosa indigerible, dextrinas indigeribles e hidrolizados parciales de las mismas, trans-galacto-oligosacáridos (GOS), xilo-oligosacáridos (XOS), acemananos, lentinanos o beta-glucanos e hidrolizados parciales de los mismos, polisacáridos-K (PSK) y maltodextrinas indigeribles e hidrolizados parciales de las mismas.

30 El polisacárido-K es también conocido como polisacárido krestina (PSK) en Japón, y como polisacárido péptido (PS-P) en China. Ambos tienen las mismas características químicas y estructurales. PSK es un proteoglicano que se encuentra en el hongo poliporo *Trametes versicolor* y contiene aproximadamente 35% de hidratos de carbono (91% de beta-glucano), 35% de proteína y el resto son residuos libres tales como azúcares, aminoácidos y humedad. PSK es una mezcla de polisacáridos enlazados covalentemente a diversos péptidos con un peso molecular medio de 100 kilodaltons. El componente polisacárido se encuentra en una clase de beta-glucanos que comprende unidades glucopiranosas. El análisis estructural demostró que PSK tiene una configuración de 1,4-glucano como la porción glucósido principal con ramas en las posiciones 3 y 6 a una frecuencia de una rama por cada varios grupos residuales de 1 - 4 enlaces.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término “cereal” pretende dar a entender, en la presente invención, cualquier planta perteneciente a las gramíneas, preferiblemente trigo, arroz, centeno, avena, cebada, maíz, sorgo y mijo.

40 El término “legumbre” pretende dar a entender, en la presente invención, cualquier planta perteneciente a las familias Caesalpiniaceae, Mimosaceae o Papilionaceae y, en particular, cualquier planta perteneciente a la familia Papilionaceae tal como, por ejemplo, guisante, haba, haba ancha, haba equina, lenteja, alfalfa, clavo o altramuza.

La expresión “derivado de almidón” significa un almidón que ha sido tratado enzimáticamente o químicamente.

El “nivel de revestimiento” significa la diferencia en peso entre núcleos no revestidos y revestidos, que es la ganancia en peso en porcentaje.

45 Esta definición incluye, en particular, todas las plantas descritas en una cualquiera de las tablas presentes en el documento de R. Hoover et al. titulado “Composition, Structure, Functionality and Chemical Modification of Legume Starches: A Review”.

El término “guisante” en este caso se considera en su sentido más amplio e incluye, en particular:

- todas las variedades salvajes de guisante liso y
- 50 ■ todas las variedades mutantes de guisante liso y de guisante arrugado, siendo este el caso para

cualesquiera usos para los que dichas variedades están generalmente destinadas (alimentos para el hombre, nutrición para animales y/u otros usos).

A dichas variedades mutantes se las alude, en particular, como “mutantes r”, “mutantes rb”, “mutantes rug 3”, “mutantes rug 4”, “mutantes rug 5” y “mutantes lam” tal como se describe en el documento por C-L Heydley et al. titulado “Developing Novel Pea Starches”, Proceedings of the Symposium of the Industrial Biochemistry and Biotechnology Group of the Biochemical Society, 1996, págs. 77-87.

La expresión “almidón de legumbre” se entiende que significa cualquier composición extraída, siendo este el caso de cualquier manera, de una legumbre según se define antes en esta memoria y que tiene un contenido en almidón mayor que 40%, preferiblemente mayor que 50% y, más preferiblemente todavía, mayor que 75%, expresándose estos porcentajes en peso seco con respecto al peso seco de dicha composición.

Además, es posible utilizar almidones que exhiben de forma natural un contenido en amilosa dentro del intervalo seleccionado de acuerdo con la invención. En particular, puede ser adecuado el almidón que resulta de legumbres. De acuerdo con la presente invención, este almidón de legumbres exhibe un contenido en amilosa menor que 45%, más específicamente entre 20 y 45%, preferiblemente entre 25 y 44% y, más preferiblemente todavía, entre 32 y 40%.

Para los fines de la invención, la expresión “maltodextrina ingerible” significa maltodextrina que contiene enlaces glucosídicos indigeribles que confieren a esas maltodextrinas propiedades adicionales idénticas a fibras dietéticas tales como “maltodextrinas ramificadas”. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “maltodextrina ramificada” pretende dar a entender las maltodextrinas ingeribles descritas en la patente europea EP 1 006 128, de las que la compañía solicitante es titular.

De acuerdo con una variante preferida, dichas matodextrinas ramificadas tienen un contenido en azúcares reductores de entre 2% y 5%, y una masa molecular media numérica Mn entre 2000 y 3000 g/mol.

Las maltodextrinas ramificadas tienen un contenido total en fibras mayor que o igual a 50% sobre una base seca, determinado de acuerdo con el método AOAC nº 2001-03 (2001).

La invención proporciona nuevos revestimientos de película polimérica para la liberación dirigida en el colon que están adaptados al estado patológico de los pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del intestino.

Nuevas películas poliméricas de acuerdo con la invención sirven como sustratos para bacterias del colon para pacientes sanos así como para pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del intestino y que es probable que exhiban efectos beneficiosos sobre el ecosistema del GIT de los pacientes. La película polimérica está especialmente adaptada a las condiciones en el sitio diana, también en el estado patológico, y es capaz de suministrar específicamente al colon ingredientes farmacológicamente activos.

En lo que sigue, la invención se ilustra por medio de los siguientes ejemplos así como las figuras.

Ejemplo 1:

A. Materiales y Métodos

A.1. Materiales

Maltodextrina ramificada (BMD – siglas en inglés) [una maltodextrina ramificada con enlaces glucósido no digeribles: α -1,2 y α -1,3, NUTRIOSE® FB 06 Roquette Frères], almidón de guisantes (almidón de guisante granular N-735) (35% de amilosa), un almidón de guisante de hidroxipropilo pre-gelatinizado (PS HP-PG) (LYCOAT® RS 780), una maltodextrina (MD) (GLUCIDEX® 1, Roquette Frères), EURYLON® 7 A-PG (un almidón de maíz acetilado y pre-gelatinizado, con alto contenido en amilosa (70% de amilosa) (Roquette Frères, Lestrem, Francia)), EURYLON® 6 A-PG (un almidón de maíz acetilado y pre-gelatinizado con alto contenido en amilosa (60% de amilosa) (Roquette Frères, Lestrem, Francia) y EURYLON® 6 HP-PG (un almidón de maíz hidroxipropilado y pregelatinizado con alto contenido en amilosa (60% de amilosa) (Roquette Frères, Lestrem, Francia); dispersión acuosa de etilcelulosa (Aquacoat® ECD 30; FMC Biopolymer, Philadelphia, EE.UU.); citrato de trietilo (TEC; Morflex®, Greensboro, EE.UU.); pancreatina (procedente del páncreas de mamíferos = mezcla que contiene amilasa, proteasa y lipasa; Fisher Bioblock, Illkirch, Francia); extracto de intestino de rata (polvo intestinal de rata, que contiene amilasa, sucrasa, isomaltasa y glucosidasa; Sigma-Aldrich, Isle d’Abeau Chesnes, Francia); agar Columbia con sangre, extractos de carne y levaduras así como triptona (= material digerido pancreático de caseína) (Becton Dickinson, Sparks, EE.UU.); hidrocloreto de L-cisteína hidrato (Acros Organics, Geel, Bélgica); agar McConkey (BioMerieux, Balme-les-Grottes, Francia); solución de Ringer cisteinada (Merck, Darmstadt, Alemania).

A.2. Preparación de la película

5 Películas poliméricas delgadas se prepararon moldeando por colada mezclas de diferentes tipos de polisacáridos acuosos y dispersión acuosa de etilcelulosa en moldes de Teflon y subsiguiente secado durante 1 d a 60°C. El polisacárido soluble en agua se disolvió en agua purificada (5% p/p) y se mezcló con dispersión de etilcelulosa plastificada (TEC al 25%, agitación durante una noche; contenido en polímero 15% p/p) a una relación de 1:3 (polímero: polímero p:p). La mezcla se agitó durante 6 h antes del moldeo por colada.

A.3. Caracterización de la película

El grosor de las películas se midió utilizando un medidor del espesor (Minitest 600; Erichsen, Herner, Alemania). El espesor medio de todas las películas se encontraba en el intervalo de 300-340 µm. La absorción de agua y la cinética de pérdida de masa seca se midieron gravimétricamente tras exposición a:

- 10 (i) fluido gástrico simulado (HCl 0,1 M)
- (ii) fluido intestinal simulado [tampón fosfato pH 6,8 (Farm. USP 30) con o sin pancreatina al 1% o extracto al 0,75% procedente de intestino de rata]
- (iii) medio de cultivo inoculado con heces procedentes de sujetos sanos
- 15 (iv) medio de cultivo inoculado con heces procedentes de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino
- (v) medio de cultivo exento de heces por motivos de comparación.

20 El medio de cultivo se preparó disolviendo 1,5 g de extracto de carne, 3 g de extracto de levaduras, 5 g de triptona, 2,5 g de NaCl y 0,3 g de hidrocloreuro de L-cisteína hidrato en 1 L de agua destilada (pH 7,0 ± 0,2) y subsiguiente esterilización en un autoclave. Heces de pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, así como heces de sujetos sanos se diluyeron en la relación de 1:200 con solución de Ringer cisteinada; 2,5 mL de esta suspensión se diluyeron con medio de cultivo hasta 100 mL. Trozos de película de 1,5 x 5 cm se colocaron en recipientes de vidrio de 120 mL llenos de 100 mL de medio pre-calentado, seguido de sacudimiento horizontal a 37°C (GFL 3033, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Alemania). La incubación con muestras fecales se realizó en condiciones anaerobias (5% de CO₂, 10% de H₂, 85% de N₂). A intervalos de tiempo predeterminados se tomaron muestras, se retiró el agua en exceso, las películas se pesaron con exactitud (masa húmeda) y se secaron hasta un peso constante a 60°C (masa seca). El contenido en agua (%) y la masa de película seca (%) en el instante t se calcularon como sigue:

25

$$\text{contenido en agua (\%)} (t) = \frac{\text{masa húmeda (t)} - \text{masa seca (t)}}{\text{masa húmeda (t)}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

30

$$\text{masa de película seca (\%)} (t) = \frac{\text{masa seca (t)}}{\text{masa seca (t = 0)}} \cdot 100 \% \quad (2)$$

35

A.4. Análisis bacteriológico

Para el análisis bacteriológico de muestras fecales, estas últimas se diluyeron en la relación 1:10 con solución de Ringer cisteinada. Se prepararon ocho diluciones décuplas adicionales en solución de Ringer cisteinada y 0,1 mL de cada una de las diluciones se extendió en placas sobre agar Columbia con sangre no selectivo y modificado (para recuentos totales cultivables) y sobre agar McConkey (que es selectivo para enterobacterias). Las placas de agar Columbia con sangre se incubaron durante 1 semana a 37°C bajo condiciones anaerobias. (5% de CO₂, 10% de H₂, 85% de N₂). Las colonias fueron superadas en número; colonias predominantes se sub-cultivaron e identificaron en base a criterios de identificación fenotípicos. 25 placas de agar McConkey se incubaron durante 48 h a 37°C al aire. Las colonias fueron superadas en número y se identificaron utilizando el sistema API 20E (BioMerieux, Balme-les-Grottes, Francia). Los recuentos se expresaron como log de CFU/g (unidades formadoras de colonia por gramo) de heces recientes.

40

45

Para el análisis bacteriológico de la microflora desarrollada tras la incubación de la película con muestras fecales, se

tomaron fotomicrografías después de tinción Gram con un microscopio Axiostar plus (Carl Zeiss, Jena, Alemania), equipado con una cámara (unidad DS-L2, cabezal de la cámara DS DS-Fi 1; Nikon, Tokio, Japón). La incubación se realizó en un medio de cultivo exento de glúcidos que contenía sólo pequeñas cantidades de polipéptidos (favoreciendo así el uso de los polisacáridos investigados como sustratos) bajo condiciones anaerobias.

5 B. Resultados y discusión

B.1. Propiedades de la película en el GIT superior

La permeabilidad de un sistema polimérico para un fármaco depende grandemente de su contenido en agua y masa seca, que determinan la densidad y movilidad de las macromoléculas. Por ejemplo, en comprimidos de matriz basada en hidroxipropil-metilcelulosa (HP-MC) seca, el coeficiente de difusión aparente de un fármaco se aproxima a 10 cero, mientras que en un gel de HPMC completamente hidratado se pueden alcanzar capacidades de difusión que son del mismo orden de magnitud que en disoluciones acuosas. Con el contenido creciente en agua, la movilidad macromolecular aumenta significativamente y, así, el volumen libre disponible para la difusión. En algunos sistemas, el polímero se ve sometido a una transición de fase vítrea a cauchoide tan pronto como se alcanza el contenido crítico en agua. Esto conduce a un aumento escalonado significativo en la movilidad del polímero y el fármaco. Así, 15 el contenido en agua de un revestimiento de película polimérica puede proporcionar una perspectiva importante en la movilidad macromolecular y, por lo tanto, la permeabilidad de un fármaco. Las Figuras 1a y 1b muestran la cinética de absorción de agua de películas delgadas que consisten en diversos tipos de mezclas de polisacárido:polisacárido etilcelulosa en HCl 0,1 N y tampón fosfato pH 6,8, respectivamente. La presencia de etilcelulosa en todas las películas permite evitar una disolución prematura en el GIT superior. Los polisacáridos investigados son todos 20 solubles en agua y pretenden proporcionar la sensibilidad de la permeabilidad del fármaco de los revestimientos al entorno circundante. Una vez que se ha alcanzado el colon, los polisacáridos han de ser degradados enzimáticamente y ha de iniciarse la liberación de fármacos. La relación de mezcla polisacárido:polisacárido etilcelulosa en la Figura 1 es constante: 1:3. Claramente, las tasas y medidas de absorción de agua dependen significativamente del tipo de polisacárido. El revestimiento de película ideal que permite una liberación dirigida en el 25 colon debería absorber sólo pequeñas cantidades de agua a una baja velocidad en ambos medios con el fin de prevenir una liberación prematura del fármaco en el GIT superior. Como se puede observar, para este fin son muy prometedoras mezclas de etilcelulosa y BMD o almidón de guisantes. Películas de etilcelulosa plastificada sin polisacárido soluble en agua absorben sólo pequeñas cantidades de agua (círculos en blanco).

Además de la cinética de absorción de agua, también el comportamiento de la pérdida de masa seca de películas poliméricas delgadas sirve como un indicador de la permeabilidad de los revestimientos para el fármaco y, así, 30 constituyen un potencial para suprimir la liberación prematura dentro del GIT superior. Si las películas pierden cantidades significativas de masa seca tras su exposición a los medios de liberación, es de esperar que los revestimientos puedan volverse permeables para muchos fármacos, en particular aquellos con un bajo peso molecular tal como ácido 5-aminosalicílico (5-ASA, 153,1 Da). Las Figuras 2a y 2b ilustran la pérdida de masa seca 35 determinada experimentalmente de películas delgadas que consisten en diversas mezclas de polisacárido:polisacárido-etilcelulosa (relación constante = 1:3) tras exposición a HCl 0,1 N y tampón fosfato pH 6,8, respectivamente. La película ideal pierde sólo pequeñas cantidades de masa seca a una velocidad baja (o no pierde masa alguna en absoluto), asegurando redes poliméricas densas que son muy poco permeables para el fármaco incorporado bajo estas condiciones. Como se puede observar, la pérdida de masa seca de películas con contenido 40 en almidón de guisantes y BMD es muy baja, incluso después de hasta 8 h de exposición a estos medios de liberación. La disminución observada en la masa seca puede ser atribuida, al menos en parte, a la lixiviación del plastificante soluble en agua citrato de trietilo (TEC, utilizado para plastificar la dispersión acuosa de etilcelulosa) en el fluido a granel. Además, partes del polisacárido soluble en agua pueden desprenderse por lixiviación de las películas. Películas de etilcelulosa plastificadas sin polisacárido soluble en agua pierden sólo muy pequeñas 45 cantidades de agua, independientemente del tipo del medio de liberación (círculos en blanco). Sin embargo, se sabe que la permeabilidad de películas de etilcelulosa intactas es muy baja para muchos fármacos, lo cual puede ser atribuido, al menos en parte, a las bajas velocidades y grados de absorción de agua de estos sistemas. Por este motivo, películas de etilcelulosa intactas también se utilizan como revestimientos protectores de la humedad. Por favor, obsérvese que es de esperar que la pérdida del plastificante soluble en agua TEC en los fluidos a granel sea 50 mucho más pronunciada en películas que contienen 25% (p/p) de polisacáridos solubles en agua en comparación con películas de etilcelulosa pura (plastificada), ya que las velocidades y tasas de absorción de agua incrementadas (Figura 1) de los sistemas mezclados conducen a una movilidad de la cadena polimérica mucho más elevada y, así, también a una movilidad incrementada del TEC.

Se ha de señalar que los resultados mostrados en la Figura 2 se obtuvieron en ausencia de cualesquiera enzimas. 55 Es bien conocido que las enzimas pancreáticas pueden degradar determinados polisacáridos y, así, inducir potencialmente una pérdida de masa y una absorción de agua significativas bajo condiciones in vivo, dando como resultado una permeabilidad incrementada de la película para el fármaco. Para esclarecer la importancia de este fenómeno, la cinética de absorción de agua y el comportamiento a la pérdida de masa seca de las películas

delgadas se midieron también en presencia de pancreatina (= mezcla que contiene amilasa, proteasa y lipasa) y de un extracto procedente del intestino de rata (que contiene amilasa, sucrasa, isomaltasa y glucosidasa) en tampón fosfato pH 6,8 (Figura 3). Claramente, la adición de estas enzimas no afectaba significativamente a la absorción de agua ni a la cinética de pérdida de masa seca resultante de las películas investigadas. Así, estas últimas no sirven como sustratos para estas enzimas.

B.2. Propiedades de la película en el colon

Una vez que se ha alcanzado el colon, los revestimientos de película polimérica deberían volverse permeables al fármaco. Esto se puede inducir, por ejemplo, mediante degradación enzimática (parcial). De manera importante, las concentraciones de determinadas enzimas son mucho mayores en el colon que en el GIT superior. Éstas incluyen enzimas que son producidas por la microflora natural del colon (esta parte del GIT contiene muchas más bacterias que el estómago y el intestino delgado). Sin embargo, debe tomarse gran precaución cuando se utiliza este tipo de estrategia de liberación dirigida al colon, ya que la microflora de pacientes que padecen enfermedades del intestino inflamatorio puede ser significativamente diferente de la microflora de sujetos sanos. Así, el sistema de suministro de fármacos debe estar adaptado al estado patológico del paciente. La Tabla 1 muestra, por ejemplo, la concentración de las bacterias determinada en las muestras fecales de los sujetos sanos, así como de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa incluidos en este estudio. De manera importante, existían diferencias significativas, en particular con respecto a las concentraciones de *Bifidobacterium* (que es capaz de degradar polisacáridos complejos debido a las múltiples glucosidasas extracelulares) y *Escherichia coli*, que estaban presentes a concentraciones mucho más elevadas en las heces de sujetos sanos en comparación con las heces de los pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino. En contraposición, las muestras fecales de los pacientes con la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa contenían *E. coli* lactosa negativa, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter cloacae*, que no se detectaron en sujetos sanos. Así, existen diferencias fundamentales en la calidad y cantidad de la microflora que deben tenerse en cuenta: revestimientos de películas poliméricas que permiten la liberación dirigida en el colon bajo condiciones fisiológicas en un voluntario sano podrían caer bajo las condiciones patofisiológicas en el estado patológico de un paciente. Para acometer este punto muy crucial, que a menudo se descuida, se determinaron la absorción de agua y la pérdida de masa seca de películas delgadas que consistían en diversos tipos de mezclas de polisacárido:polisacárido etilcelulosa tras exposición a muestras fecales procedentes de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, así como a las heces de sujetos sanos y a medio de cultivo puro por motivos de comparación (Figura 4). Películas apropiadas deberían absorber cantidades considerables de agua y mostrar una significativa pérdida de masa seca tras exposición a heces de los pacientes con el fin de inducir la liberación del fármaco en el sitio de inflamación en el colon. Como se puede observar en las Figuras 4a y 4b, películas basadas en etilcelulosa:BMD y etilcelulosa:almidón de guisantes (que son los dos tipos más prometedores de mezclas de polímeros basadas en los resultados arriba descritos, obtenidos en medios que simulan el contenido del GIT superior) muestran una absorción de agua y una pérdida de masa seca significativas tras exposición a las heces de pacientes con enfermedad de Crohn, pacientes con colitis ulcerosa, así como de sujetos sanos. Por favor, obsérvese que también otros tipos de mezclas de polímeros parecen ser prometedoras con respecto a la absorción de agua de las películas y al comportamiento de pérdida de masa seca presentadas tras exposición a muestras fecales (o incluso más apropiadas que mezclas de etilcelulosa:BMD y etilcelulosa:almidón de guisantes). Sin embargo, estos sistemas ya absorben cantidades considerables de agua y pierden de manera notoria masa seca tras el contacto con medios que simulan el contenido del GIT superior (Figuras 1 y 2).

El hecho de que las películas poliméricas investigadas sirvan como sustratos para las bacterias en heces procedentes de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino podía ser confirmado adicionalmente mediante el análisis de la microflora desarrollada tras la exposición de la película a muestras fecales bajo condiciones anaerobias a 37°C (Figura 5). Claramente, tipos específicos de bacterias proliferaban tras la incubación con las películas mezcladas. De manera importante, se puede esperar que este fenómeno sea muy beneficioso para el ecosistema del GIT de los pacientes en el estado patológico, normalizando la microflora en el colon. Este efecto prebiótico muy positivo se produce, además del efecto de liberación dirigida del fármaco. Muestras biológicas incubadas sin películas poliméricas algunas o con películas de etilcelulosa (plastificada) mostraban un desarrollo bacteriano mucho menor (Figura 5).

Los nuevos revestimientos de película polimérica identificados para la liberación dirigida en el colon están constituidos por mezclas insolubles en agua de polímero:polisacárido, particularmente etilcelulosa:BMD, etilcelulosa:almidón de guisantes, etilcelulosa:MD, etilcelulosa:EURLON® 6 A-PG, etilcelulosa:EURLON® 6 HP-PG y etilcelulosa:EURLON® 7 A-PG, que están adaptadas al estado patológico de los pacientes. De manera importante, una absorción de agua y velocidades y grados de pérdida de masa seca bajos en medios que simulan el contenido del GIT superior se pueden combinar con una absorción de agua y una pérdida de peso seco elevados tras el contacto con heces procedentes de pacientes con la enfermedad inflamatoria del intestino. Cambios en la composición de la flora en el colon de pacientes indican que estos polisacáridos sirven como sustratos para bacterias del colon en el estado patológico y es probable que exhiban efectos beneficiosos en el ecosistema del GIT de los

pacientes. El nuevo conocimiento obtenido proporciona, así, la base para el desarrollo de nuevos revestimientos de película polimérica capaces de suministrar fármacos específicamente al colon. De manera importante, estas barreras poliméricas están adaptadas a las condiciones del sitio diana en el estado patológico.

Ejemplo 2:

5 A. Materiales y Métodos

A.1. Materiales

Almidón de guisantes hidroxipropilado y pre-gelatinizado (PS HP-PG – siglas en inglés) [LYCOAT® RS 780, Roquette Frères], EURYLON® 7 A-PG (un almidón de maíz acetilado y pre-gelatinizado, con alto contenido en amilosa (70% de amilosa) (Roquette Frères, Lestrem, Francia)), EURYLON® 6 A-PG (un almidón de maíz acetilado y pre-gelatinizado con alto contenido en amilosa (60% de amilosa) (Roquette Frères, Lestrem, Francia) y EURYLON® 6 HP-PG (un almidón de maíz hidroxipropilado y pregelatinizado con alto contenido en amilosa (60% de amilosa) (Roquette Frères, Lestrem, Francia); dispersión acuosa de etilcelulosa (Aquacoat ECD 30; FMC Biopolymer, Philadelphia, EE.UU.); citrato de trietilo (TEC; Morflex, Greensboro, EE.UU.).

A.2. Preparación de películas poliméricas delgadas

15 Películas poliméricas delgadas se prepararon moldeando por colada mezclas de diferentes tipos de polisacáridos y dispersión acuosa de etilcelulosa en moldes de Teflon y subsiguiente secado durante 1 d a 60°C. El polisacárido soluble en agua se disolvió en agua purificada (5% p/p, en el caso de EURYLON® 7 A-PG, EURYLON® 6 A-PG y EURYLON® 6 HP-PG en agua caliente), se mezcló con dispersión acuosa de etilcelulosa plastificada (TEC al 25,0, 27,5 ó 30,0% p/p, referido al contenido en etilcelulosa, agitación durante una noche; contenido en polímero 15% p/p) a una relación de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 (polímero: polímero p:p) según se indica. Las mezclas se agitaron durante 6 h antes del moldeo por colada.

A.3. Caracterización de la película

El grosor de las películas se midió utilizando un medidor del espesor (Minitest 600; Erichsen, Herner, Alemania). El espesor medio de todas las películas se encontraba en el intervalo de 300-340 µm. La absorción de agua y la cinética de pérdida de masa seca se midieron gravimétricamente tras exposición a: HCl 0,1 M y tampón fosfato pH 6,8 (Farm. USP 30) como sigue: trozos de película de 1,5 x 5 cm se colocaron en recipientes de vidrio de 120 mL llenos de 100 mL de medio pre-calentado, seguido de sacudimiento horizontal a 37°C (80 rpm; GFL 3033, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Alemania). A instantes predeterminados se tomaron muestras, se retiró el agua en exceso, las películas se pesaron con exactitud (masa húmeda) y se secaron hasta un peso constante a 60°C (masa seca). El contenido en agua (%) y la masa de película seca (%) en el instante t se calcularon como sigue:

$$\text{masa húmeda } (t) - \text{masa seca } (t)$$

$$\text{contenido en agua } (\%) (t) = \frac{\text{masa húmeda } (t) - \text{masa seca } (t)}{\text{masa húmeda } (t)} \cdot 100 \% \quad (1)$$

$$\text{masa de película seca } (\%) (t) = \frac{\text{masa seca } (t) - \text{masa seca } (t=0)}{\text{masa seca } (t=0)} \cdot 100 \% \quad (2)$$

40 A.4. Propiedades mecánicas de películas delgadas

Las propiedades mecánicas de las películas en el estado seco y mojado se determinaron con un analizador de la textura (TAXT.Plus, Winopal Forschungsbedarf, Ahnsbeck, Alemania) y el ensayo de punción. Muestras de películas se montaron sobre un soporte de película (n = 6). La muestra de punción (extremo esférico: 5 mm de diámetro) se fijó sobre la celda de carga (5 kg) y se accionó hacia abajo con una velocidad de la cruceta de 0,1 mm/s hacia el centro del agujero del soporte de película. Se registraron curvas de carga frente a desplazamiento hasta la ruptura de la película y se utilizaron para determinar las propiedades mecánicas, como sigue:

$$\text{Resistencia a la punción} = \frac{F}{A} \quad (3)$$

en que F es la carga requerida para punzar la película y A es el área en sección transversal del borde la película situado en la trayectoria.

5

$$\% \text{ de alargamiento a la rotura} = \frac{\sqrt{R^2 + D^2} - R}{R} \cdot 100 \% \quad (4)$$

Aquí, R significa el radio de la película expuesta en el agujero cilíndrico del soporte y D significa el desplazamiento.

$$\text{Volumen unidad de energía a la rotura} = \frac{AUC}{V} \quad (5)$$

10

En que AUC es el área bajo la curva de carga frente al desplazamiento y V es el volumen de la película situada en la cavidad del troquel del soporte de película.

B. Resultados y discusión

B.1 Mezclas de PS HP-PG:etilcelulosa

15 La Figura 6 muestra la absorción de agua determinada gravimétricamente y la cinética de pérdida de masa seca de películas delgadas que consisten en diferentes tipos de mezclas de PS HP-PG:etilcelulosa tras exposición a HCl 0,1 M y tampón fosfato pH 6,8, respectivamente. PS HP-PG es un almidón modificado pre-gelatinizado. Al igual que en el caso de MD, el grado y velocidad resultantes de la penetración del agua en los sistemas aumentaba significativamente cuando se incrementaba la relación de polisacárido:etilcelulosa de 1:5 a 1:2 (Figura 12, fila superior). Esto se puede atribuir de nuevo al mayor carácter hidrófilo del polisacárido en comparación con etilcelulosa. Es probable que se requieran niveles de revestimiento apropiadamente elevados para suprimir la liberación prematura de fármacos libremente solubles en agua y de bajo peso molecular en el GIT superior a contenidos iniciales elevados de PS HP-PG. También, la velocidad y el grado de la pérdida de masa seca de las películas aumentaban significativamente con contenidos crecientes de PS HP-PG debido a la lixiviación parcial de TEC y polisacáridos. En todos los casos, las velocidades y grados de la penetración de agua y la pérdida de masa seca eran mayores en tampón fosfato pH 6,8 en comparación con HCl 0,1 M, debido a la ionización dependiente del pH de SDS tal como se ha comentado antes. Al igual que en el caso de mezclas de MD:etilcelulosa, la estabilidad mecánica de películas de PS HP-PG:etilcelulosa podría ajustarse de manera eficaz variando el contenido inicial en etilcelulosa. Esto era cierto para la resistencia a la punción, % del alargamiento a la rotura y energía a la rotura en el estado seco a la temperatura ambiente (Tabla 2), así como para la resistencia mecánica en el estado mojado tras exposición a HCl 0,1 M y tampón fosfato pH 6,8 (Figura 7). La disminución en la energía a la rotura con el tiempo puede ser atribuida de nuevo a un plastificante parcial y a polisacáridos que se lixivian en los fluidos a granel, independientemente del tipo de medio de liberación.

30

B. 2. Mezclas de EURYLON® 7 A-PG:etilcelulosa

35 En la Figura 8 se muestra la absorción de agua y la cinética de pérdida de masa seca de películas delgadas que consisten en mezclas de 1:2 a 0:1 de EURYLON® 7 A-PG:etilcelulosa en HCl 0,1 M y tampón fosfato pH 6,8. EURYLON® 7 A-PG es un almidón de maíz acetilado y pre-gelatinizado con alto contenido en amilosa (70% de amilosa) (Roquette Frères, Lestrem, Francia). Como se puede ver, se observaron las mismas tendencias que con mezclas de MD:etilcelulosa y PS HP-PG:etilcelulosa: (i) las velocidades y grados de absorción de agua aumentaban con los contenidos decrecientes de etilcelulosa, (ii) las velocidades y grados de pérdida de masa seca aumentaban con los contenidos crecientes de polisacáridos, (iii) estos efectos eran más pronunciados en tampón fosfato pH 6,8 que en HCl 0,1 M. De manera importante, el contenido en agua de las películas tras exposición durante 2 h a fosfato eran considerables: aproximadamente 50% p/p. Así, también a elevados contenidos iniciales en EURYLON® 7 A-PG es probable que se requieran elevados niveles de revestimiento con el fin de suprimir la liberación prematura de fármacos libremente solubles en agua y de bajo peso molecular en el GIT superior. De manera importante, la resistencia mecánica de las películas basadas en EURYLON® 7 A-PG:etilcelulosa era significativamente mayor que la de películas que consisten en mezclas de MD:etilcelulosa y PS HP-PG:etilcelulosa en estado seco a la temperatura ambiente (Tabla 2). Sin embargo, estas diferencias se volvieron menores cuando las películas fueron expuestas a HCl 0,1 M y tampón fosfato pH 6,8, independientemente del tipo de medio de liberación (Figura 9). De

45

manera importante, la variación de la relación de mezcla del polímero permitió de nuevo un ajuste eficaz de la estabilidad mecánica de las películas.

B.3. Mezclas EURYLON® 6 A-PG:etilcelulosa y EURYLON® 6 HP-PG:etilcelulosa

5 EURYLON® 6 A-PG es un almidón de maíz acetilado y pre-gelatinizado, con alto contenido en amilosa (60% de amilosa) (Roquette Frères, Lestrem, Francia) y EURYLON® 6 HP-PG es un almidón de maíz hidroxipropilado y pre-gelatinizado con alto contenido en amilosa (60% de amilosa) (Roquette Frères, Lestrem, Francia). De manera interesante, la pérdida de masa seca de películas delgadas que consisten en mezclas de EURYLON® 6 A-PG:etilcelulosa y EURYLON® 6 HP-PG:etilcelulosa era mucho menos pronunciada que la de otras mezclas polímeras investigadas tras exposición a HCl 0,1 M y tampón fosfato pH 6,8, respectivamente (Figuras 10 y 12, filas inferiores). Esto era cierto para ambas cosas, las velocidades y los grados de la pérdida de masa seca y para todas las relaciones de mezclas polímeras investigadas. En contraposición, las velocidades y grados de absorción de agua de estas películas tras exposición a los diferentes medios de liberación eran similares a los de las otras mezclas de polisacárido:etilcelulosa, que alcanzan contenidos en agua de aproximadamente 50% p/p después de 1-2 h de exposición a tampón fosfato pH 6,8 en el caso de elevados contenidos iniciales en polisacáridos (Figuras 10 y 12, filas superiores). Así, también para mezclas de EURYLON® 6 A-PG:etilcelulosa y EURYLON® 6 HP-PG:etilcelulosa es probable que se requieran elevados niveles de revestimiento para suprimir una liberación prematura de fármacos libremente solubles en agua y de bajo peso molecular en el GIT superior a bajos contenidos iniciales de etilcelulosa. Como se puede ver en la Tabla 2, las propiedades mecánicas de películas delgadas que consisten en estos tipos de mezclas de polímeros en el estado seco a la temperatura ambiente son similares a los de mezclas de EURYLON® 7 A-PG:etilcelulosa a las mismas relaciones de mezcla. Como en el caso de estas últimas mezclas, la exposición a HCl 0,1 M o tampón fosfato pH 6,8 dio como resultado una disminución en la estabilidad mecánica de las redes macromoleculares, independientemente del tipo del medio de liberación y de la relación de mezcla de polímeros (Figuras 11 y 13). De manera importante, las estabilidades del sistema deseadas pueden ajustarse de nuevo eficazmente variando la relación de mezcla del polímero.

25 Las propiedades clave de películas poliméricas delgadas que consisten en mezclas de polisacárido:polímero insoluble en agua que exhiben un potencial interesante para proporcionar un suministro al colon del fármaco específico para el sitio (y que están adaptadas a la patofisiología de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino) se puede ajustar eficazmente variando la relación de mezcla de polímeros y el tipo de polisacárido. Esto incluye la absorción de agua y la cinética de pérdida de masa seca, así como las propiedades mecánicas de las películas antes y tras exposición a medios acuosos que simulan el contenido del GIT superior. Así, se pueden proporcionar fácilmente amplias gamas de propiedades de revestimiento de películas, adaptadas a las necesidades del tratamiento con fármacos respectivo (p. ej. actividad osmótica de la formulación del núcleo y dosis administrada).

Ejemplo 3:

A. Materiales y métodos

35 A.1. Materiales

Almidón de guisantes N-735 (almidón de guisantes; Roquette Frères, Lestrem, Francia); Aquacoat ECD 30 (dispersión acuosa de etilcelulosa; FMC Biopolymer, Bruselas, Bélgica); citrato de trietilo (TEC; Morflex, Greensboro, NC, EE.UU.); ácido 5-aminosalicílico (5-ASA; Sigma-Aldrich, Isle d'Abeau Chesnes, Francia), celulosa microcristalina (Avicel PH 101; FMC Biopolymer); bentonita y polivinilpirrolidona (PVP, Povidona K30) (Cooperation Pharmaceutique Francaise, Melun, Francia); pancreatina (procedente del páncreas de mamíferos = mezcla de amilasa, proteasa y lipasa) y pepsina (Fisher Bioblock, Illkirch, Francia); extractos de carne y de levadura así como triptona (= material digerido pancreático de caseína) (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.); hidrocloreuro de L-cisteína hidrato (Acros Organics, Geel, Bélgica); solución de Ringer cisteinada (Merck, Darmstadt, Alemania).

A.2. Preparación de películas libres

45 Se prepararon películas libres delgadas moldeando por colada mezclas de almidón de guisantes y dispersión acuosa de etilcelulosa (plastificada con TEC al 25%) sobre moldes de Teflon y subsiguiente secado controlado (1 d a 60°C). El almidón de guisantes se dispersó en agua purificada a 65-75°C (5% p/p). Dispersión acuosa de etilcelulosa (contenido en sólidos de 15% p/p) se plastificó durante 24 h con TEC al 25% (p/p) referido al contenido en sólidos de la dispersión). Las dispersiones de almidón de guisantes y etilcelulosa se mezclaron a la temperatura ambiente a las siguientes relaciones: 1:2, 1:3, 1:4 y 1:5 (polímero:polímero, p:p). Las mezclas se agitaron durante 6 h antes del moldeado por colada.

A.3. Caracterización de películas libres

El grosor de las películas se midió utilizando un medidor del espesor (Minitest 600; Erichsen, Herner, Alemania). El

espesor medio de todas las películas se encontraba en el intervalo de 300-340 µm.

La absorción de agua y la cinética de pérdida de masa seca se midieron gravimétricamente tras exposición a: (i) fluido gástrico simulado (HCl 0,1 M) y (ii) fluido intestinal simulado [tampón fosfato pH 6,8 (Farm. USP 32)] a 37°C, como sigue: trozos de película de 1,5 x 5 cm se colocaron en recipientes de vidrio de 120 mL llenos de 100 mL de medio pre-calentado, seguido de sacudimiento horizontal a 37°C (80 rpm; GFL 3033, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Alemania). A instantes predeterminados se tomaron muestras, se retiró el agua en exceso, las películas se pesaron con exactitud (masa húmeda) y se secaron hasta un peso constante a 60°C (masa seca). El contenido en agua (%) y la masa de película seca (%) en el instante t se calcularon como sigue:

$$\text{contenido en agua (\%)} (t) = \frac{\text{masa húmeda (t)} - \text{masa seca (t)}}{\text{masa húmeda (t)}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

$$\text{masa de película seca (\%)} (t) = \frac{\text{masa seca (t)}}{\text{masa seca (t = 0)}} \cdot 100 \% \quad (2)$$

Las propiedades mecánicas de las películas se determinaron con un analizador de la textura (TAXT.Plus, Winopal Forschungsbedarf, Ahnsbeck, Alemania) y el ensayo de punción en el estado seco y tras exposición a HCl 0,1 M y tampón fosfato pH 6,8 (en el estado húmedo). Muestras de películas se montaron sobre un soporte de película (n = 6). La muestra de punción (extremo esférico: 5 mm de diámetro) se fijó sobre la celda de carga (5 kg) y se accionó hacia abajo con una velocidad de la cruceta de 0,1 mm/s hacia el centro del agujero del soporte de película. Se registraron curvas de carga frente a desplazamiento hasta la ruptura de la película y se utilizaron para determinar las propiedades mecánicas, como sigue:

$$\text{Resistencia a la punción a la rotura} = \frac{F}{A} \quad (3)$$

en que F es la carga requerida para punzar la película y A es el área en sección transversal del borde la película situado en la trayectoria.

$$\% \text{ de alargamiento a la rotura} = \frac{\sqrt{R^2 + D^2} - R}{R} \cdot 100 \% \quad (4)$$

Aquí, R significa el radio de la película expuesta en el agujero cilíndrico del soporte y D significa el desplazamiento.

$$\text{Volumen unidad de energía a la rotura} = \frac{AUC}{V} \quad (5)$$

En que AUC es el área bajo la curva de carga frente al desplazamiento y V es el volumen de la película situada en la cavidad del troquel del soporte de película.

A.4. Preparación de gránulos revestidos

Núcleos iniciadores de gránulos cargados con fármaco (ácido 5-aminosalicílico, 5-ASA) (diámetro: 0,7-1,0 mm; 60% de 5-ASA, 32% de celulosa microcristalina, 4% de bentonita, 4% de PVP) se prepararon mediante extrusión y subsiguiente esferonización como sigue: los polvos respectivos se mezclaron en un granulador a alta velocidad (Gral 10; Collette, Antwerp, Bélgica) y se añadió agua purificada hasta que se obtuvo una masa homogénea (41 g de agua para 100 g de mezcla de polvos). La mezcla humedecida se hizo pasar a través de una extrusora de cilindros (SK M/R agujeros: diámetro de 1 mm, grosor de 3 mm, velocidad de rotación: 96 rpm; Alexanderwerk, Remscheid, Alemania). Los productos extrudidos se esferonizaron subsiguientemente a 520 rpm durante 2 min (esferonizador modelo 15; Calveva, Dorset, Reino Unido) y se secaron en un lecho fluidizado (ST 15; Aeromatic, Muttentz, Suiza) a 40°C durante 30 min. La fracción de tamaño de 0,7-1,0 mm se obtuvo mediante tamizado. Estos núcleos de iniciador cargados con fármaco se revistieron luego en un dispositivo de revestimiento de lecho fluidizado equipado con un

inserto de Wurster (Strea 1; Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Suiza) con diferentes mezclas de almidón de guisantes:etilcelulosa hasta alcanzar una ganancia de peso de 5, 10, 15 ó 20% (p/p). Las formulaciones de revestimiento se prepararon de la misma manera que las dispersiones utilizadas para la colada de la película (tal como se describe en la sección 2.2. Preparación de películas libres). Los parámetros del proceso eran como sigue:
 5 temperatura de entrada = $39 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura del producto = $40 \pm 2^\circ\text{C}$, tasa de atomización = 1,5-3 g/min, presión de atomización = 1,2 bar, diámetro de la boquilla = 1,2 mm. Después de ello, los gránulos se fluidizaron adicionalmente durante 10 min y subsiguientemente se curaron en una estufa durante 24 h a 60°C .

A.5. Liberación del fármaco a partir de gránulos revestidos

La liberación de fármacos a partir de gránulos revestidos se midió en medios que simulan las condiciones en el:

10 tracto gastrointestinal superior: se colocaron gránulos en recipientes de plástico de 120 mL, se llenaron con 100 mL de medio de disolución: HCl 0,1 M (que contiene opcionalmente 0,32% de pepsina) durante las primeras de 2 h y tampón fosfato pH 6,8 (Farm. USP 32) (que contiene opcionalmente 1% de pancreatina) durante las subsiguientes 9 h. Los matraces se agitaron en un sacudidor horizontal (80 rpm, GFL 3033). A
 15 instantes predeterminados se tomaron muestras de 3 mL y se analizaron mediante espectrofotometría UV en cuanto a su contenido en fármaco ($\lambda = 302,6 \text{ nm}$ en HCl 0,1 M; $\lambda = 330,6 \text{ nm}$ en tampón fosfato pH 6,8) (UV-1650; Shimadzu, Champs sur Marne, Francia). En presencia de enzimas, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 11.000 rpm y subsiguientemente se filtraron ($0,2 \mu\text{m}$) antes de las mediciones UV. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

Tracto gastrointestinal completo: se expusieron gránulos a HCl 0,1 M durante 2 h y subsiguientemente a tampón fosfato pH 6,8 (Farm. US 32) durante 9 h en un aparato USP 3 (Bio-Dis; Varian, París, Francia) (velocidad de inmersión = 10 dpm). Después de ello, los gránulos se transfirieron a matraces de 120 mL llenos de: (i) 100 mL de medio de cultivo inoculado con heces procedentes de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino, (ii) medio de cultivo inoculado con Bifidobacterium o (iii) medio de cultivo exento de heces y bacterias por motivos de comparación. Las muestras se agitaron (50 rpm) a 37°C bajo condiciones anaerobias (5% de CO_2 , 10% de H_2 , 85% de N_2). El medio de cultivo se preparó disolviendo 1,5 g de extracto de carne, 3 g de extracto de levaduras, 5 g de triptona, 2,5 g de NaCl y 0,3 g de hidrocloreto de L-cisteína hidrato en 1 L de agua destilada ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$) y subsiguiente esterilización en un autoclave. Heces de pacientes que padecen la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa se diluyeron en la relación 1:200 con solución de Ringer cisteínada; 2,5 mL de esta suspensión se diluyeron con medio de cultivo hasta 100 mL. A instantes predeterminados se tomaron muestras de 2 mL, se centrifugaron a
 20 13.000 rpm durante 5 min, se filtraron ($0,22 \mu\text{m}$) y se analizaron mediante HPLC en cuanto a su contenido en fármaco (ProStar 230; Varian). La fase móvil consistía en 10% de metanol y 90% de una disolución acuosa de ácido acético (al 1% p/v) (Siew et al., 2000a). Las muestras se inyectaron en un columna Pursuit C18 (150 x 4,6 mm; $5 \mu\text{m}$) y el caudal era 1,5 mL/min. El fármaco se detectó por espectrofotometría UV a $\lambda = 300 \text{ nm}$.

La liberación de fármacos se midió a partir de gránulos recientemente preparados (si no se establece de otro modo) así como a partir de gránulos almacenados durante 1 año a la temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad relativa ambiente ($55 \pm 5\%$) en viales de vidrio abiertos.
 35

B. Resultados y discusión

B.1. Absorción de agua y pérdida de masa seca de películas delgadas

De manera ideal, un revestimiento de película polimérica que permite el suministro al colon de fármaco específico para el sitio debería suprimir de manera eficaz la liberación de fármaco en la parte superior del tracto gastrointestinal: el estómago y el intestino delgado. Así, el revestimiento de película (que rodea al depósito de fármaco) debería ser muy poco permeable para el fármaco tras exposición a medios que simulan el contenido de estos órganos (con el fin de evitar una liberación prematura de fármaco y la subsiguiente absorción en el torrente sanguíneo). Si un revestimiento de película polimérica absorbe cantidades significativas de agua o pierde cantidades considerables de masa seca tras exposición a un fluido a granel, se puede esperar que su permeabilidad a las moléculas de fármaco aumente de manera notoria. Por este motivo, la absorción de agua y la cinética de pérdida de masa seca de películas delgadas de almidón de guisantes:etilcelulosa se vigilaron tras exposición a: (a) HCl 0,1 M (que simula el contenido del estómago) durante 2 h, y (b) tampón fosfato pH 6,8 (que simula el contenido del intestino delgado) durante 8 h. La Figura 14 muestra el contenido en agua experimentalmente determinado de las películas en función del tiempo. La relación de mezcla almidón de guisantes:etilcelulosa varió de 1:2 a 1:4, según se indica. Por motivos de comparación, también se estudiaron películas que consistían solamente en etilcelulosa (plastificada) (triángulos en negro). Como puede verse, las velocidades y grados de absorción de agua aumentaban con los contenidos crecientes de almidón de guisantes debido a la naturaleza hidrófila de este polímero. De manera importante, la absorción de agua permanecía siendo limitada en todos los casos (por debajo de 30%). Las velocidades y grados de absorción de agua ligeramente superiores a pH 6,8 en comparación con el pH de 1,2 (Figura 14b frente a 14a)
 40
 45
 50
 55

pueden ser probablemente atribuidos a la presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS – siglas en inglés) que está presente en la dispersión acuosa de etilcelulosa utilizada para la preparación de la película, que sirve como un estabilizador de esta dispersión. A pH bajo, el SDS está protonado y no cargado, mientras que a pH 6,8 está desprotonado y, así, cargado negativamente. Por lo tanto, su carácter hidrófilo aumenta y se facilita la penetración de agua en las películas.

La Figura 15 muestra la cinética de pérdida de masa seca medida experimentalmente de diversas películas de almidón de guisantes:etilcelulosa tras exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón fosfato pH 6,8. Como puede verse, la velocidad y el grado de pérdida de masa seca aumentaba ligeramente con el contenido creciente de almidón de guisantes, debido a que este polisacárido se expande significativamente tras el contacto con el agua y, así, facilita la lixiviación de composiciones de películas solubles en agua (p. ej. del plastificante soluble en agua TEC) en el fluido a granel circundante. La pérdida más baja de masa se observó con películas exentas de almidón de guisantes, independientemente del tipo de medio. Esto se puede atribuir al hecho de que la etilcelulosa se puede expandir y puede permear muy poco tras el contacto con medios acuosos. Impide eficazmente la lixiviación de composiciones solubles en agua.

Así, la absorción de agua y la cinética de pérdida de masa seca observadas de películas de almidón de guisantes:etilcelulosa son muy prometedoras con respecto al uso potencial de estas películas como membranas de barrera que impiden la liberación de fármaco en el estómago y en el intestino delgado. Si se requiere, se podrían incrementar el espesor de la película y/o el contenido en etilcelulosa. Sin embargo, debe tenerse cuidado de que en los revestimientos estén presentes cantidades suficientes de almidón de guisantes ya que este compuesto está destinado a inducir el inicio de la liberación del fármaco en el colon (siendo degradado por enzimas secretadas de las bacterias del colon).

B.2. Propiedades mecánicas de películas delgadas

Además de una absorción del agua y de una pérdida de masa seca limitadas, revestimientos de película polimérica que pretenden el suministro al colon de fármacos específicos para el sitio deberían proporcionar una estabilidad mecánica suficiente: debido a la movilidad fisiológica del estómago y del intestino delgado, se ejerce un esfuerzo mecánico sobre las formas de dosificación revestidas. Si los revestimientos de películas son frágiles, se produce la formación de fisuras, y el fármaco es rápidamente liberado a través de canales llenos de agua. Para evaluar la estabilidad mecánica de las mezclas de almidón de guisantes:etilcelulosa investigadas, se utilizaron un analizador de la textura y el ensayo de la punción. La Figura 16 muestra: (a) la resistencia de la punción a la rotura, (b) el % de alargamiento a la rotura y (c) la energía requerida para romper películas poliméricas delgadas en el estado seco. Claramente, la estabilidad mecánica de las películas aumentaba significativamente con el contenido creciente en etilcelulosa. De manera interesante, todos los valores son relativamente altos, sugiriendo que revestimientos de película con un grosor común pueden resistir el esfuerzo mecánico experimentado dentro del tracto gastrointestinal in vivo.

Sin embargo, se ha de señalar que los resultados mostrados en la Figura 16 se obtuvieron con películas secas. Tras el contacto con fluidos a granel acuosos, las propiedades mecánicas de un revestimiento de película polimérica pueden variar significativamente, por ejemplo debido a la lixiviación de la composición en el fluido a granel circundante y/o el efecto plastificante del agua. Por estos motivos, las propiedades mecánicas de las películas de almidón de guisantes:etilcelulosa investigadas se midieron también tras hasta 2 h de exposición a HCl 0,1 M y hasta 8 h de exposición a tampón fosfato pH 6,8. Las Figuras 17a y 17b muestran las energías respectivas requeridas para romper las películas mojadas de diferente composición. Claramente, la resistencia mecánica de todas las películas disminuía con el aumento del tiempo de exposición, independientemente del tipo de fluido a granel. Esto puede ser atribuido, al menos en parte, a la lixiviación del plastificante TEC soluble en agua en los fluidos a granel. Como era de esperar, un incremento en el contenido en etilcelulosa daba como resultado energías incrementadas requeridas para romper las películas en ambos medios. De manera importante, los valores observados sugieren que es probable que todos los revestimientos de película resistan el esfuerzo mecánico con el que se topa in vivo dentro del tracto gastrointestinal, también en el estado húmedo (a concentraciones de revestimiento habitualmente utilizadas).

B. 3. Liberación de fármaco en el tracto gastrointestinal superior

De manera ideal en el estómago e intestino delgado no debería liberarse nada de fármaco o sólo muy poco fármaco a partir de la forma de dosificación. Las curvas de trazos continuos en la Figura 18 muestran la cinética de liberación de fármaco experimentalmente determinada a partir de gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa 1:2 a un nivel de revestimiento de 0, 5, 10, 15 y 20% (p/p) en HCl 0,1 M (durante 2 h), seguido de tampón fosfato pH 6,8 (durante 9 h) a 37°C. Como se puede ver, ácido 5-aminosalicílico se liberó rápidamente de gránulos no revestidos así como de gránulos revestidos con sólo 5% de almidón de guisantes:etilcelulosa 1:2. Esto puede ser atribuido, al menos en parte, a la absorción de agua y a la pérdida de masa seca de estos revestimientos de película tras exposición a los medios de liberación (Figuras 14 y 15) en combinación con un grosor insuficiente de la barrera

polimérica. De manera importante, a niveles del revestimiento iguales a y superiores a 10% (p/p) se redujo eficazmente la liberación de fármaco (probablemente debido al incremento en la longitud de las trayectorias de difusión y la estabilidad mecánica incrementada de los revestimientos de película).

5 Sin embargo, se ha de señalar que la presencia de enzimas dentro del tracto gastrointestinal in vivo podría afectar de manera significativa a las propiedades de revestimiento de la película, p. ej. debido a una degradación parcial de polímero. Por este motivo, la liberación de fármaco a partir de los gránulos revestidos se midió también en: (i) HCl 0,1 M que contiene 0,32% de pepsina (durante 2 h), seguido de (ii) tampón fosfato pH 6,8 que contiene 1% de pancreatina (durante 9 h). Los resultados respectivos se indican por las curvas de trazos discontinuos en la Figura 18. Claramente, en todos los casos la tasa de liberación de fármaco aumentaba sólo ligeramente. Así, es probable
10 que se limite la importancia de una degradación enzimática in vivo de este tipo.

Dado que un aumento en el contenido relativo de etilcelulosa de las películas resultaba en una absorción de agua y en velocidades y grados de pérdida de masa seca disminuidos (Figuras 14 y 15) así como en una estabilidad mecánica incrementada de las películas en el estado seco y húmedo (Figuras 16 y 17) se midió también la liberación de fármaco a partir de gránulos revestidos con mezclas de almidón de guisantes:etilcelulosa 1:3, 1:4 y 1:5 a diferentes concentraciones de fármaco (Figura 19). de manera interesante, en estos casos incluso un revestimiento de la película de sólo 5% (p/p) es capaz de ralentizar la liberación de fármaco. Sin embargo, niveles de revestimiento de 10% o más son más apropiadas, ya que la liberación de fármaco se suprime casi por completo dentro del período de observación.

En base a los resultados obtenidos (Figuras 14-19) gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa 1:4 a un nivel de revestimiento de 15 y 20% se han seleccionado para estudios ulteriores.

B.4. Liberación de fármaco en el tracto gastrointestinal completo

Una vez que la forma de dosificación alcanza el colon, el revestimiento de película debería volverse permeable al fármaco y liberar este último de una manera controlada en el tiempo. La Figura 20a muestra la liberación experimentalmente medida de ácido 5-aminosalicílico a partir de gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa 1:4 a un nivel de revestimiento de 15 y 20% (p/p) en: (i) HCl 0,1 M durante 2 h, seguido de (ii) tampón fosfato pH 6,8 durante 9 h, y (c) medio de cultivo inoculado con muestras fecales procedentes de pacientes con la enfermedad inflamatoria del intestino durante 10 h (curvas de trazos continuos). Por motivos de comparación, también se ilustra (curvas con trazos discontinuos) la liberación de fármaco tras exposición a medio de cultivo exento de heces. Claramente, la liberación de fármaco se inicia tan pronto como los gránulos entraron en contacto con las muestras fecales. Esto puede ser atribuido a la degradación (al menos parcial) de almidón de guisantes por parte de las enzimas segregadas por las bacterias presentes en el colon de los pacientes. La disminución en el peso molecular del polímero y la subsiguiente difusión de productos de degradación en los fluidos a granel circundantes hace a la red macromolecular remanente más móvil. Por consiguiente, también la movilidad de las moléculas de fármaco dentro del revestimiento de película aumenta y, así, aumenta la velocidad de liberación. En contraposición,
35 la velocidad de liberación del fármaco permaneció siendo baja tras exposición a medio de cultivo exento de heces (curvas con líneas discontinuas en la Figura 20a). Esto confirma que la eliminación de fármaco es disparada por las enzimas presentes en el colon de pacientes de IBD (enfermedad inflamatoria del intestino). Desde un punto de vista práctico, parece preferirse un nivel de revestimiento del 15% frente a un nivel de revestimiento del 20% (que resulta potencialmente en una liberación demasiado lenta del fármaco en el colon).

40 Dado que es difícil asegurar el suministro regular de muestras fecales recientes procedentes de pacientes de la enfermedad inflamatoria del intestino (y dado que las muestras no pueden congelarse profundamente ni liofilizarse sin un daño significativo de la microflora) es muy deseable proporcionar un tipo alternativo de medio de liberación que simula las condiciones en el colon de un paciente. Para sistemas de suministro de fármacos que son sensibles a la presencia de enzimas bacterianas, se ha de tomar la precaución de que el fluido a granel contenga los tipos y cantidades cruciales de bacterias. En este estudio, se ha sometido a ensayo medio de cultivo inoculado con Bifidobacterium como una alternativa potencial al medio de cultivo inoculado con muestras fecales recientes. La Figura 20b muestra la tasa de liberación de fármacos observada a partir de los mismos tipos de gránulos tal como se muestra en la Figura 20a, tras exposición a: HCl 0,1 M (durante 2h), tampón fosfato pH 6,8 (durante 9 h) y medio de cultivo inoculado con Bifidobacterium (durante 10 h). Comparando las Figuras 20a y 20b, resulta obvio que el medio de cultivo inoculado con Bifidobacterium muestra un potencial prometedor como sustituto de muestras fecales recientes de pacientes de IBD, en particular para aplicaciones rutinarias (tales como controles de calidad durante la producción a gran escala).

Se obtuvieron resultados similares utilizando sebacato de dibutilo como plastificante (datos no mostrados) que confirman que la eficacia del almidón de guisantes en el suministro de liberación controlada no depende del plastificante.

B.5. Estabilidad al almacenamiento

Un aspecto muy importante desde un punto de vista práctico es la estabilidad a largo plazo de un sistema de suministro de fármacos controlado. Formas de dosificación deberían ser, de manera ideal, estables durante al menos 3 años. En el caso de sistemas de suministro revestidos con polímeros, la tasa de liberación de fármacos resultante podría aumentar finalmente con el aumento en el tiempo de almacenamiento, p. ej. debido a la migración de fármaco al revestimiento de película. La Figura 21 muestra la cinética de liberación de fármacos a partir de gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa 1:4 a un nivel de revestimiento de 10, 15 y 15% (según se indica) antes y después de 1 año de almacenamiento en viales de vidrio abiertos (curvas de trazos continuos y discontinuos). Los sistemas se expusieron a HCl 0,1 M durante 2 h y subsiguientemente a tampón fosfato pH 6,8 durante 9 h. Como puede verse, la tasa de liberación permanecía inalterada durante el almacenamiento a largo plazo. Esto mismo es cierto para gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa 1:2, 1:3 y 1:5 a un nivel de revestimiento de 10, 15 y 20% (datos no mostrados). Así, los sistemas de suministro de fármacos propuestos son estables a largo plazo.

C. Conclusiones

Se han propuesto revestimientos de película basados en almidón de guisantes:etilcelulosa con un potencial muy prometedor para el suministro al colon de fármaco específico para el sitio. La liberación de fármacos a partir de gránulos revestidos puede suprimirse de manera eficaz en medios que simulan el contenido del estómago y del intestino delgado. Pero una vez que los dispositivos entran en contacto con las muestras fecales, se inicia la liberación del fármaco y se controla en el tiempo debido a la degradación parcial del almidón de guisantes por parte de enzimas secretadas de bacterias presentes en el colon de pacientes con enfermedad del intestino inflamatorio. Así, este tipo de sistemas de suministro avanzados permite evitar una liberación prematura del fármaco en el tracto gastrointestinal superior (y la subsiguiente absorción en el torrente sanguíneo), al tiempo que asegura que el fármaco sea liberado en el sitio de acción. Por consiguiente, es de esperar que se puedan minimizar efectos secundarios indeseados en el resto del cuerpo humano, al tiempo que es probable que se optimicen los efectos terapéuticos del fármaco.

Ejemplo 4

A. Materiales y Métodos

A.1 Materiales

Ácido 2,4,6-trinitrobenceno-sulfónico (TNBS) (Sigma-Aldrich, Isle d'Abeau Chesnes, Francia); solución de Ringer cisteinada (Merck, Darmstadt, Alemania); BMD (NUTRIOSE® FB 06; Roquette Frères, Lestrem, Francia); almidón de guisantes N-735 (almidón de guisantes; Roquette Frères, Lestrem, Francia); dispersión acuosa de etilcelulosa (Aquacoat ECD 30; FMC Biopolymer, Philadelphia, EE.UU.); citrato de trietilo (TEC; Morflex, Greensboro, EE.UU.); ácido 5-aminosalicílico (5-ASA; Sigma-Aldrich, Isle d'Abeau Chesnes, Francia); celulosa microcristalina (Avicel PH 101; FMC Biopolymer, Bruselas, Bélgica); polivinilpirrolidona (PVP, Povidona K30) (Cooperation Pharmaceutique Francaise, Melun, Francia), Pentasa® (gránulos revestidos, Ferring, número de lote: JX 155), Asacol® (gránulos revestidos, Meduna, número de lote; TX 143).

A.2. Preparación de gránulos revestidos con BMD:etilcelulosa y almidón de guisantes:etilcelulosa

Núcleos iniciadores de gránulos cargados con ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) (diámetro: 0,7-1,0 mm; 60% de 5-ASA, 32% de celulosa microcristalina, 4% de bentonita, 4% de PVP) se prepararon mediante extrusión y subsiguiente esferonización como sigue: los polvos respectivos se mezclaron en un granulador a alta velocidad (Gral 10; Collette, Antwerp, Bélgica) y se añadió agua purificada hasta que se obtuvo una masa homogénea (41 g de agua para 100 g de mezcla de polvo). La mezcla humedecida se hizo pasar a través de una extrusora de cilindros (SK M/R, agujeros: 1 mm de diámetro, 3 mm de grosor, velocidad de rotación: 96 rpm; Alexanderwerk, Remscheid, Alemania). Los productos extrudidos se esferonizaron subsiguientemente a 520 rpm durante 2 min (esferonizador modelo 15; Calveva, Dorset, Reino Unido) y se secaron en un lecho fluidizado (ST 15; Aeromatic, Muttenz, Suiza) a 40°C durante 30 min. La fracción de tamaño de 0,7-1,0 mm se obtuvo mediante tamizado.

Los núcleos de iniciador cargados con fármaco, obtenidos, se revistieron subsiguientemente en un dispositivo de revestimiento de lecho fluidizado equipado con un inserto de Wurster (Strea 1; Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Suiza) con mezclas de BMD:etilcelulosa 1:4 (gránulos revestidos con BMD:EC) o con mezclas de almidón de guisantes:etilcelulosa 1:2 (gránulos revestidos con almidón de guisantes:EC) hasta alcanzar una ganancia de peso de 15% (p/p) (gránulos revestidos con BMD:EC) o 20% (p/p) (gránulos revestidos con almidón de guisantes:EC).

BMD se disolvió en agua purificada (5% p/p), se mezcló con una dispersión acuosa plastificada de etilcelulosa (25% de TEC, agitación durante una noche; contenido en polímeros 15% p/p) a una relación de 1:4 (p/p, basado en la

masa seca del polímero no plastificado) y se agitó durante 6 h antes del revestimiento. Los núcleos de gránulos cargados con fármaco se revistieron en un dispositivo de revestimiento de lecho fluidizado equipado con un inserto de Wurster (Strea 1; Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Suiza) hasta alcanzar una ganancia de peso de 15% (p/p). Los parámetros del proceso eran como sigue: temperatura de entrada = $39 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura del producto = $40 \pm 2^\circ\text{C}$, tasa de atomización = 1,5-3 g/min, presión de atomización = 1,2 bar, diámetro de la boquilla = 1,2 mm. Después del revestimiento, las perlas se fluidizaron adicionalmente durante 10 min y subsiguientemente se curaron en una estufa durante 24 h a 60°C .

Almidón de guisantes se dispersó en agua purificada a $65\text{-}75^\circ\text{C}$ (5% p/p). Dispersión acuosa de etilcelulosa (15% p/p de contenido en sólidos) se plastificó durante 24 h con 25% de TEC (p/p, referido al contenido en sólidos de la dispersión). Las dispersiones de almidón de guisantes y etilcelulosa se mezclaron a la temperatura ambiente a la siguiente relación: 1:2 (polímero:polímero; p:p). La mezcla se agitó durante 6 h antes del revestimiento. Los núcleos de gránulos cargados con fármaco se revistieron en un dispositivo de revestimiento de lecho fluidizado equipado con un inserto de Wurster (Strea 1; Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Suiza) hasta alcanzar una ganancia de peso de 20% (p/p). Los parámetros del proceso eran como sigue: temperatura de entrada = $39 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura del producto = $40 \pm 2^\circ\text{C}$, tasa de atomización = 1,5-3 g/min, presión de atomización = 1,2 bar, diámetro de la boquilla = 1,2 mm. Después de ello, las perlas se fluidizaron adicionalmente durante 10 min y subsiguientemente se curaron en una estufa durante 24 h a 60°C .

A. 3 Inducción de colitis y diseño del estudio

Ratas Wistar machos (250 g) se utilizaron para el estudio in vivo, el cual se realizó en un establecimiento acreditado en el Institut Pasteur de Lille (A 35009) de acuerdo con las directrices gubernamentales (86/609/CEE). Por cada jaula se alojaron cuatro animales, todas las ratas tenían acceso libre a agua del grifo.

Al comienzo del experimento (día 0), las ratas se dividieron en seis grupos (5-8 animales/grupo). Dos grupos recibieron pienso estándar (grupos testigo negativo y positivo). Los otros grupos recibieron comida con gránulos de Pentasa® (n = 8), gránulos de Asacol® (n = 8), gránulos revestidos con BMD:etilcelulosa (n = 8) o gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa (n = 8). Estos cuatro piensos diferentes se prepararon utilizando la técnica de "mezcla de piensos". Todos los sistemas se añadieron para obtener una dosis de 5-ASA de 150 mg/kg/día.

En el día 3, la colitis se indujo como sigue: las ratas fueron anestesiadas durante 90-120 min utilizando pentobarbital (40 mg/kg) y recibieron una administración intrarrectal de TNBS (250 μl , 20 mg/rata) disueltos en una mezcla 1:1 de una disolución acuosa de NaCl al 0,9% con etanol al 100%. Ratas testigo (testigo negativo) recibieron una administración intrarrectal del vehículo solamente (mezcla 1:1 de una disolución acuosa de NaCl al 0,9% con etanol al 100%). Los animales fueron sacrificados 3 días después de la administración intrarrectal de TNBS o de vehículo (día 6).

A.4. Verificación macroscópica e histológica de colitis

Indicaciones macroscópicas e histológicas de colitis se evaluaron a ciegas por parte de dos investigadores. Una muestra de colon situada precisamente 4 cm por encima del canal anal se utilizó para la evaluación histológica de acuerdo con los criterios de Ameho. Esta graduación en una escala del 0 al 6 tiene en cuenta el grado de infiltrado de inflamación, la presencia de erosión, ulceración, o necrosis, y la profundidad y extensión en superficie de las lesiones.

A.5 Estadística

Todas las comparaciones se analizaron utilizando el ensayo no paramétrico (Mann-Whitney). Las diferencias se evaluaron estadísticamente significativas si el valor P era $< 0,05$.

B. Resultados y discusión

La colitis inducida por TNBS mejora mediante el tratamiento con gránulos revestidos con BMD:etilcelulosa y gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa.

Se caracterizó el desarrollo de colitis en animales sometidos a la administración intrarrectal de TNBS. Ratas testigo (grupo testigo negativo), sacrificadas 3 días después de la administración intrarrectal del vehículo solo (una mezcla 1:1 de una disolución acuosa de NaCl al 0,9% con etanol al 100%) no tenía lesiones macroscópicas en el colon (Figura 22A). En contraposición, se indujo una colitis grave en una fase tan temprana como 3 d después de la administración de TNBS (Figura 22B). Al nivel histológico no se detectaron anomalías en ratas testigo (Figura 24: testigo = grupo testigo negativo). En contraposición, 3 días después de la administración de TNBS, la histología del colon se caracterizó por grandes zonas de ulceración con un infiltrado neutrofilico, extendiéndose la necrosis

profundamente en la capa muscular (Figura 24: TNBS). El colon de animales tratados con gránulos revestidos con BMD:etilcelulosa mostró una reducción significativa de la lesión (Figura 22). Los resultados eran similares para ratas tratadas con gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa (datos no mostrados). Además de ello, utilizando la puntuación Ameho (Figura 29) se estudiaron los efectos de tratamientos con gránulos de Pentasa®, gránulos de Asacol®, gránulos revestidos con BMD:etilcelulosa y gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa sobre lesiones de colon inducidas por TNBS. Ratas con colitis, no tratadas, se investigaron por motivos de comparación. Se obtuvieron efectos óptimos con gránulos revestidos con BMD:etilcelulosa y con gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa. Tres días después de la inducción de la colitis se observó una disminución significativa en la puntuación de lesiones macroscópicas en ratas que habían recibido gránulos revestidos con BMD:etilcelulosa y gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa comparados de forma preventiva con ratas no tratadas con colitis. Paralelamente a la inflamación macroscópica, el análisis histológico confirmó también diferencias principales entre animales tratados con: (i) TNBS por vía intrarrectal, (ii) TNBS por vía intrarrectal y gránulos de Pentasa® por vía oral, (iii) TNBS por vía intrarrectal y granulos de Asacol® por vía oral, (iv) TNBS por vía intrarrectal y gránulos revestidos con BMD:etilcelulosa por vía oral, y (v) TNBS por vía intrarrectal y gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa por vía oral (Figura 24). Esto quedó reflejado por una disminución significativa de la puntuación de inflamación según Ameho a los 3 d después de la administración de TNBS (Figura 23). Claramente, la administración de gránulos revestidos con BMD:etilcelulosa y de gránulos revestidos con almidón de guisantes:etilcelulosa redujo las lesiones inflamatorias que consistían en pequeños infiltrados inflamatorios polimórficos, edema limitado y pequeñas lesiones de necrosis focales (Figura 24). El engrosamiento de la pared del colon con un infiltrado inflamatorio predominante en la lámina propia, y la necrosis que se extienden profundamente en la capa muscular y serosal son evidentes en el caso del tratamiento con TNBS, TNBS y gránulos de Pentasa® y TNBS y gránulos de Asacol®.

Estos resultados demuestran claramente la eficacia de los nuevos revestimientos de película propuestos para la liberación dirigida en el colon in vivo.

25

Tabla 1:

	Sujetos sanos	Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa
Número	10	11	5
Edad media	40 +/- 15	32 +/- 12	36 +/- 20
Media de recuentos totales {log UFC/g}	9,88 +/- 0,48	9,15 +/- 1,30	9,88 +/- 0,57
Número de cepas	28	34	14
Media	2,8	3,1	2,8
Anaerobios			
Bacteroides	9	10	3
Prevotella	2	2	2
Fusobacterium	3	3	2
Veillonella	0	0	1
Costridium	0	5	1
Bifidobacterium	9	3	1
Otros bastones Gram +	3	2	2
Cocos Gram +	1	2	0
Aerobios			

ES 2 391 876 T3

	Sujetos sanos	Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa
Enterobacteria	1	3	2
Escherichia coli	1	2	1
Citrobacter freundii	0	2	1
Lactobacillus	0	2	0
Streptococcus	0	2	0
Media de recuentos agar McConkey	6,30 +/- 1,19	7,16 +/- 1,48	8,01 +/- 1,06
Número de cepas	10	14	8
Escherichia coli	10	6	4
E. coli lac-	0	1	0
Citrobacter freundii	0	3	1
Klebsiella pneumoniae	0	1	1
Klebsiella oxyloca	0	2	0
Enterobacter cloacae	0	1	0
Otros bastones Gram -	0	0	1

Tabla 2

	Relación de mezcla	Resistencia a la punción ± (s), MPa	Alargamiento a la rotura ± (s), %	Energía a la rotura ± (s), MJ/m ³
MD	1:2	0,34 ± (0,05)	0,43 ± (0,08)	0,012 ± (0,005)
	1:3	0,36 ± (0,09)	0,57 ± (0,05)	0,014 ± (0,006)
	1:4	0,43 ± (0,07)	0,53 ± (0,04)	0,011 ± (0,003)
	1:5	0,42 ± (0,11)	0,58 ± (0,07)	0,015 ± (0,009)
PS HP-PG	1:2	0,45 ± (0,04)	0,55 ± (0,09)	0,016 ± (0,008)
	1:3	0,40 ± (0,03)	0,53 ± (0,07)	0,012 ± (0,007)
	1:4	0,42 ± (0,09)	0,60 ± (0,09)	0,016 ± (0,008)
	1:5	0,50 ± (0,08)	0,60 ± (0,05)	0,020 ± (0,004)
MS7 A-PG	1:2	0,78 ± (0,09)	0,63 ± (0,02)	0,061 ± (0,005)
	1:3	0,84 ± (0,05)	0,67 ± (0,08)	0,065 ± (0,009)
	1:4	0,85 ± (0,04)	0,66 ± (0,07)	0,070 ± (0,011)
	1:5	0,87 ± (0,05)	0,75 ± (0,02)	0,073 ± (0,006)
MS6 A-PG	1:2	0,60 ± (0,01)	0,50 ± (0,07)	0,052 ± (0,002)
	1:3	0,52 ± (0,05)	0,75 ± (0,10)	0,068 ± (0,008)
	1:4	0,76 ± (0,02)	0,82 ± (0,04)	0,077 ± (0,006)
	1:5	0,77 ± (0,03)	0,81 ± (0,06)	0,075 ± (0,010)
MS6 HP-PG	1:2	0,53 ± (0,07)	0,72 ± (0,05)	0,053 ± (0,010)
	1:3	0,64 ± (0,03)	0,81 ± (0,07)	0,066 ± (0,009)
	1:4	0,63 ± (0,02)	0,82 ± (0,07)	0,062 ± (0,009)
	1:5	0,87 ± (0,03)	0,77 ± (0,05)	0,070 ± (0,010)

Tabla 3:

Segmento GI simulado	Tiempo de exposición	Medio de liberación	pH
Estómago	2 h	HCl 0,1 M	1,2
Duodeno	0,5 h	Tampón fosfato (Farm. Eu. 5)	5,5
Yeyuno-íleon	9 h	Tampón fosfato (Farm. USP 30)	6,8
Intestino ciego	0,5 h	Tampón fosfato (Farm. USP. 30)	6,0
Colón proximal	6 h	Tampón fosfato (Farm. USP. 30)	7,0
Colon distal	18 h	Tampón fosfato (Farm. USP. 30)	7,4

REIVINDICACIONES

- 1.- Una forma de dosificación de suministro de liberación controlada para la liberación controlada de un ingrediente activo, que comprende un ingrediente activo revestido en una mezcla polimérica de:
- al menos un polímero insoluble en agua y
- 5 ○ una composición de almidón que comprende al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en un almidón que tiene un contenido en amilosa de entre 25 y 45%, teniendo un almidón modificado un contenido en amilosa de entre 50 y 80% y un almidón de legumbres.
- 2.- La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un núcleo, estando el ingrediente activo dispersado o disuelto en el núcleo.
- 10 3.- La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde la relación composición de almidón:polímero insoluble en agua oscila entre 1:2 y 1:8.
- 4.- La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición de almidón exhibe un contenido en amilosa entre 25 y 45%, expresándose este porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de almidón presente en dicha composición.
- 15 5.- La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición de almidón comprende al menos un almidón de legumbres o cereales.
- 6.- La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición de almidón comprende al menos un almidón modificado, estando estabilizado dicho almidón modificado.
- 20 7.- La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 6, en donde el núcleo tiene un nivel de revestimiento de 5% a 30%.
- 8.- La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el núcleo tiene un nivel de revestimiento de 10% a 20%.
- 25 9.- La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la mezcla polimérica comprende un plastificante, preferiblemente en un contenido entre 25% y 30% p/p referido al contenido en polímero insoluble en agua.
- 10.- La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el polímero insoluble en agua se selecciona del grupo que consiste en polímeros de
- 30 ésteres acrílicos y/o metacrílicos, polímeros o copolímeros de acrilato o metacrilato, poli(ésteres vinílicos), poli(acetatos de vinilo), ésteres de ácido poliacrílico, copolímeros de butadieno-estireno, copolímeros de metacrilato-éster, etilcelulosa, acetato-ftalato de celulosa, poli(acetato-ftalato de vinilo), goma laca, copolímeros de ácido metacrílico, acetato-trimelitato de celulosa, ftalato de hidroxipropil-metilcelulosa, zeína, acetato de almidón.
- 11.- La forma de dosificación del suministro de liberación controlada de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde el plastificante es un plastificante soluble en agua, seleccionándose preferiblemente el plastificante del grupo que consiste en polioles, ésteres orgánicos, aceites o glicéridos, lecitina de soja, solos o como una mezcla de uno con otro.
- 35 12.- La forma de dosificación del suministro de liberación controlada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha forma de dosificación de suministro de liberación controlada es una forma de dosificación en multipartículas.
- 40 13.- Un método para preparar una forma de dosificación de suministro de liberación controlada para la liberación controlada de un ingrediente activo en el colon de pacientes con un desequilibrio en la microflora del colon o en el colon de sujetos sanos, según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo dicho método:
- formar una mezcla polimérica de:
 - al menos un polímero insoluble en agua y
 - una composición de almidón que comprende al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en un almidón que tiene un contenido en amilosa de entre 25 y 45%, teniendo un almidón modificado un contenido en amilosa de entre 50 y 80% y un almidón de legumbres,

- revestir dicho ingrediente activo en la mezcla polimérica.

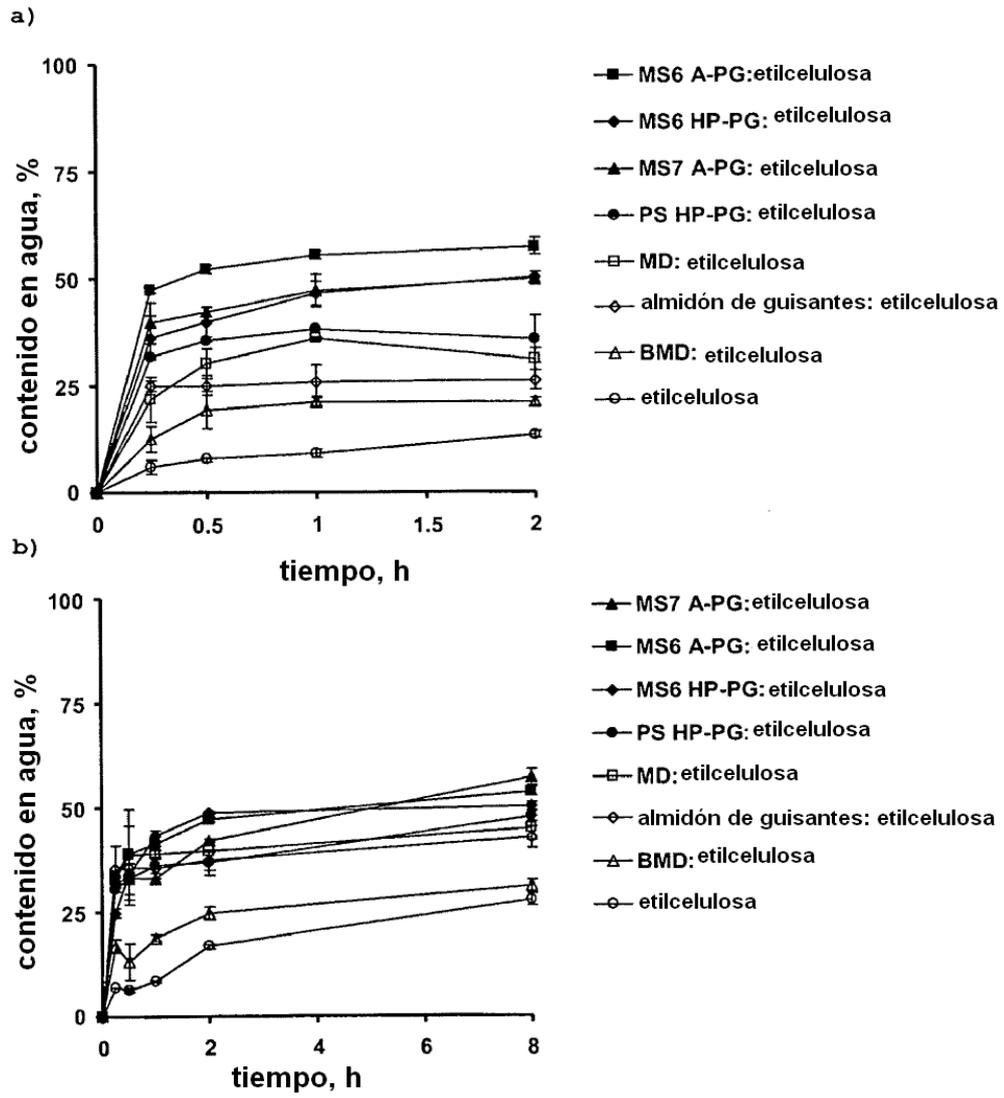


Figura 1

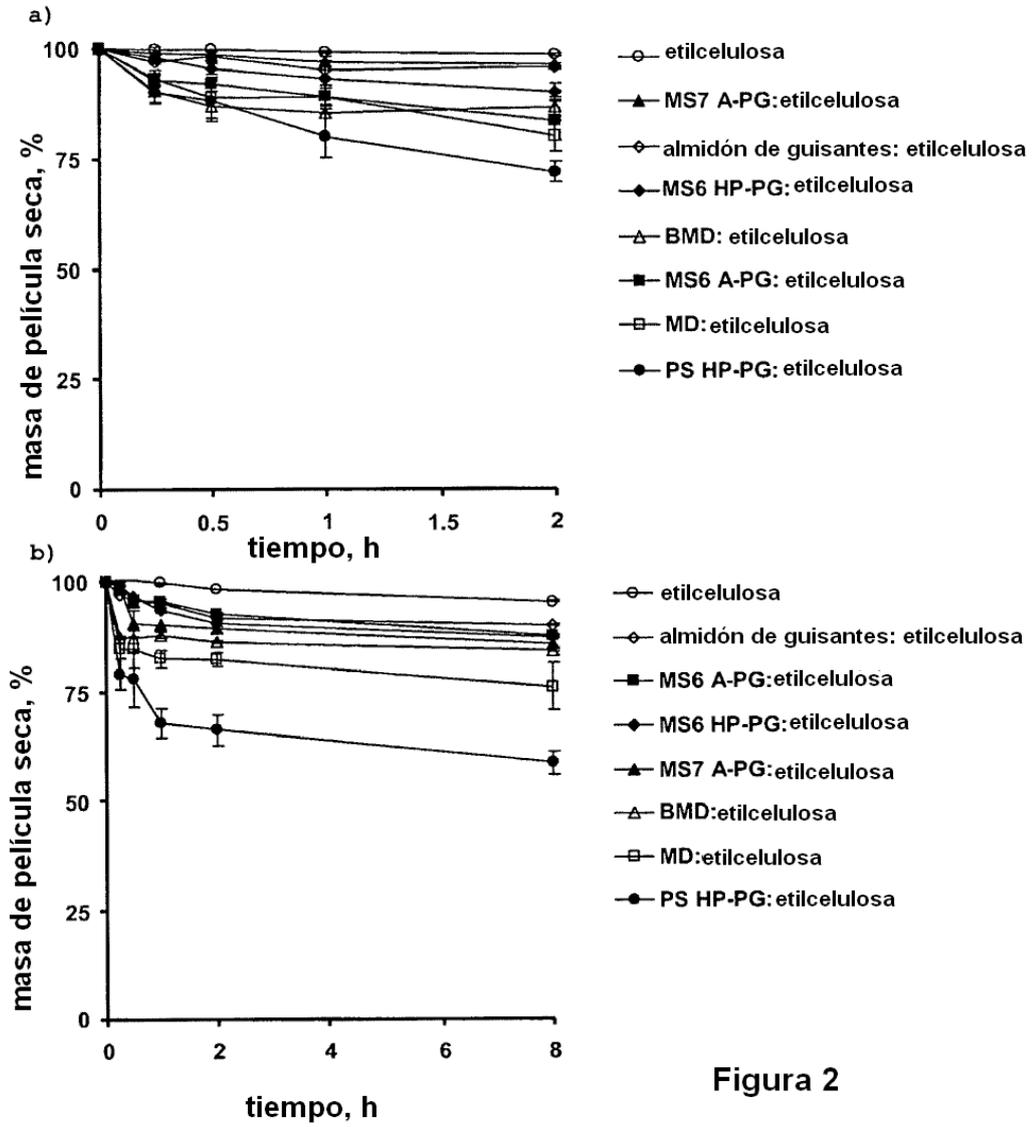


Figura 2

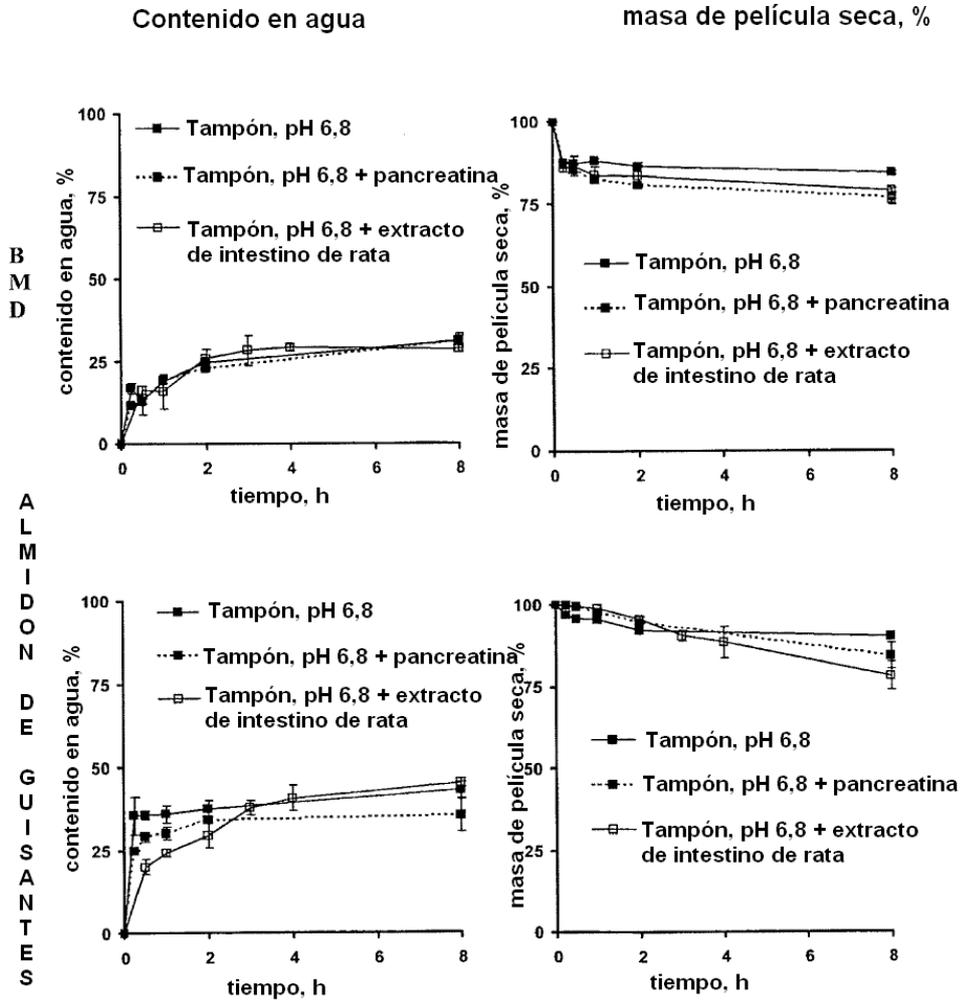


Figura 3

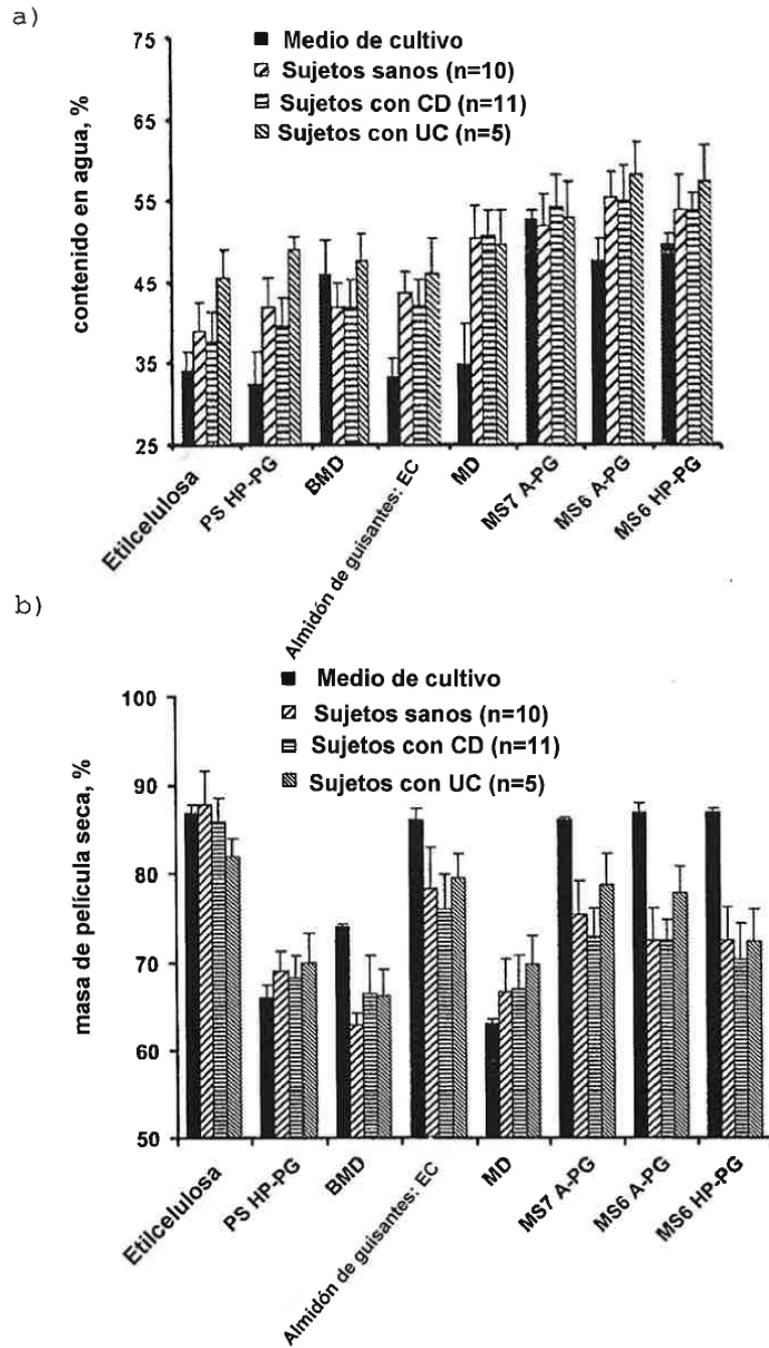
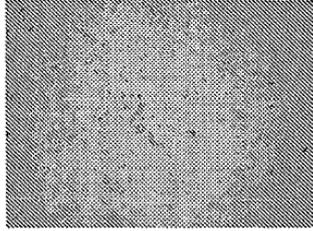
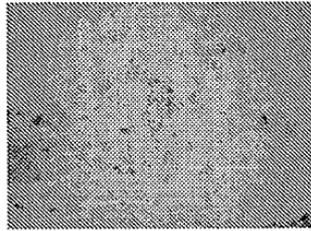


Figura 4

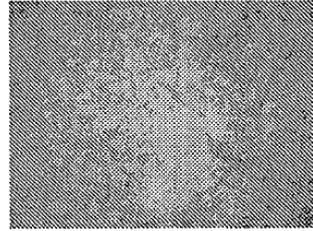
Sin película



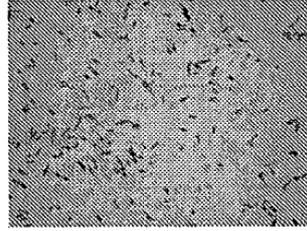
etilcelulosa



BMB : etilcelulosa



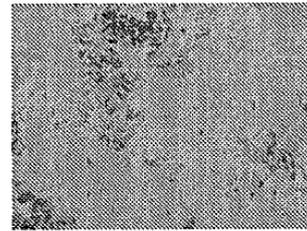
almidón de guisantes: etilcelulosa



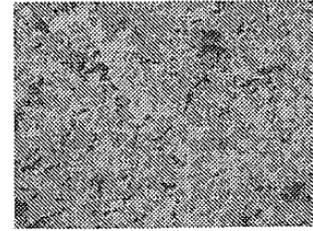
PS HP-PG:etilcelulosa



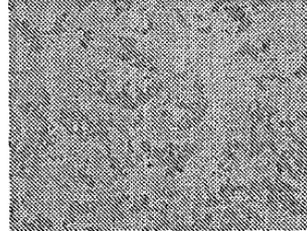
MD: etilcelulosa



MS7 A-PG: etilcelulosa



MS6 A-PG: etilcelulosa



MS6 HP-PG: etilcelulosa

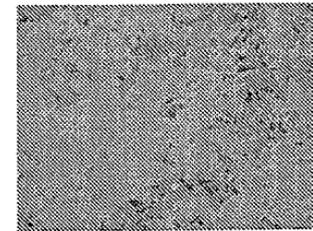


Figura 5

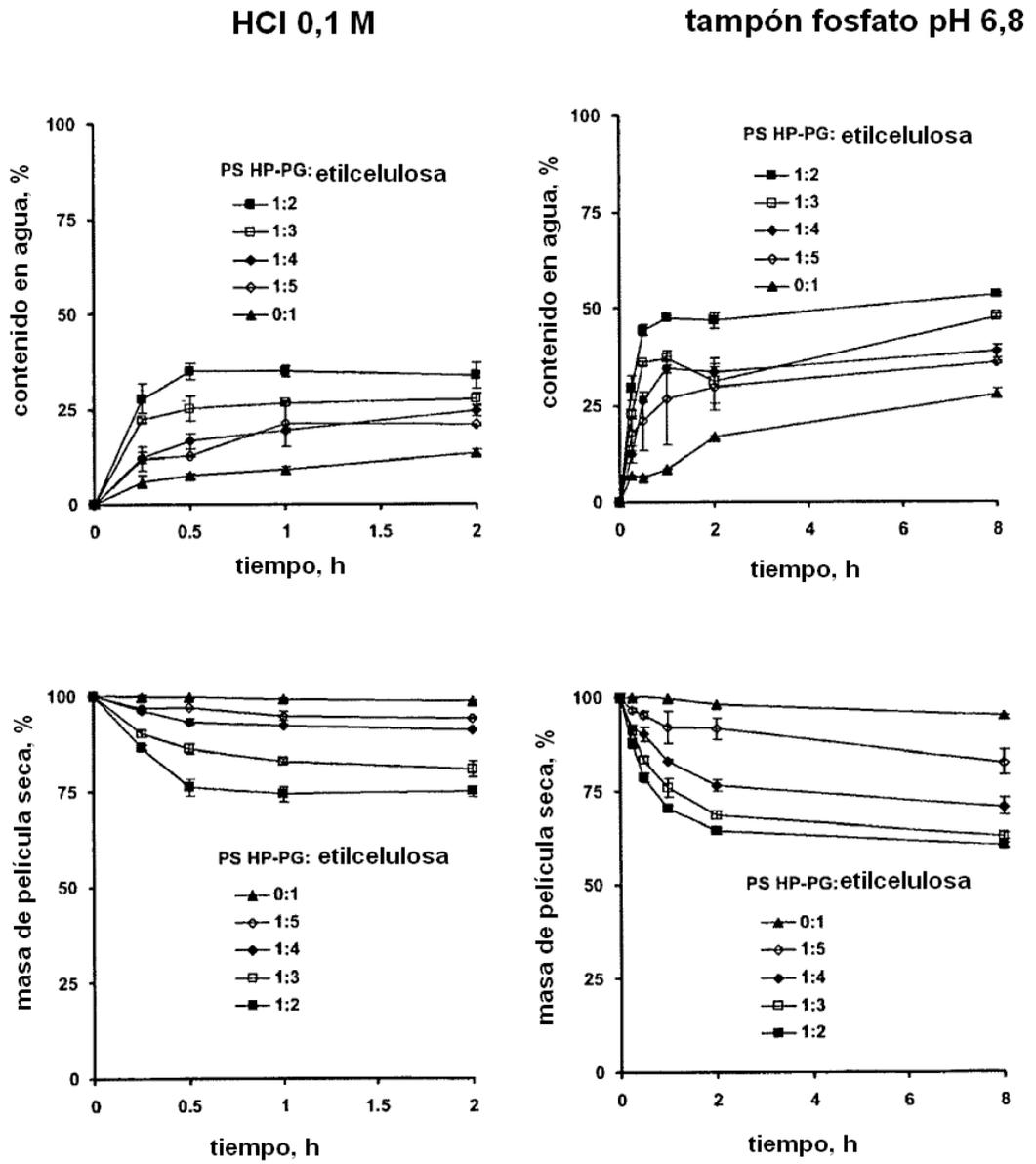
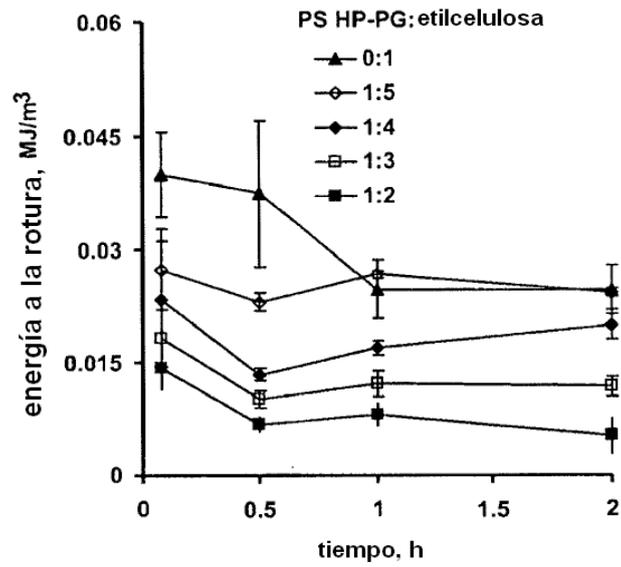


Figura 6

a)



b)

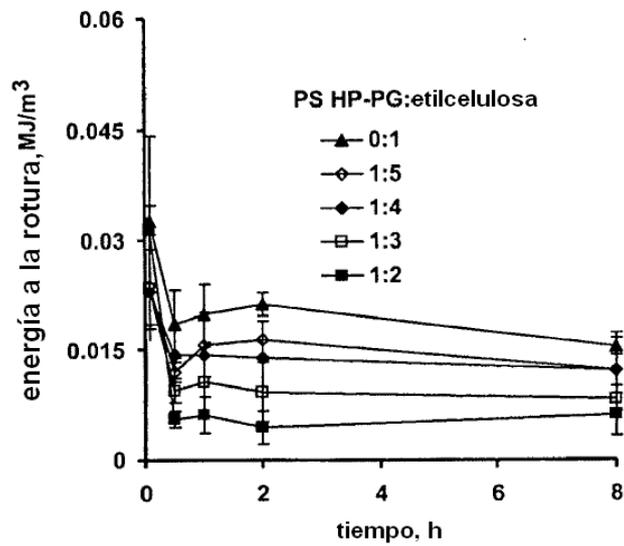


Figura 7

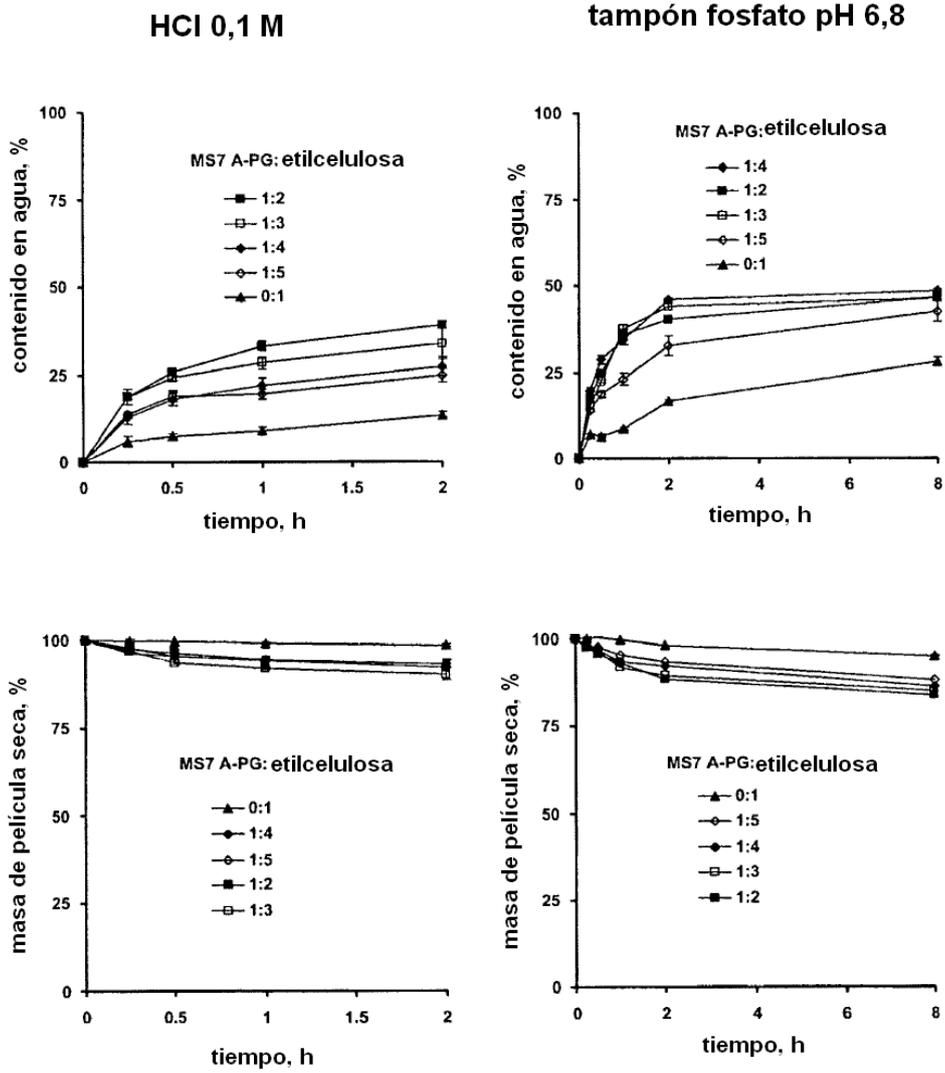
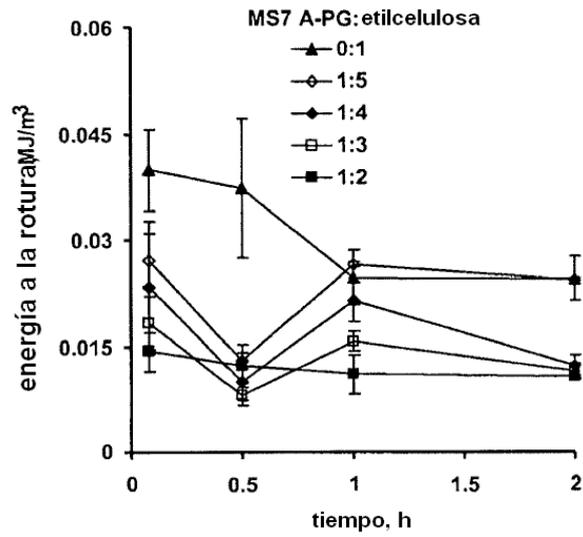


Figura 8

a)



b)

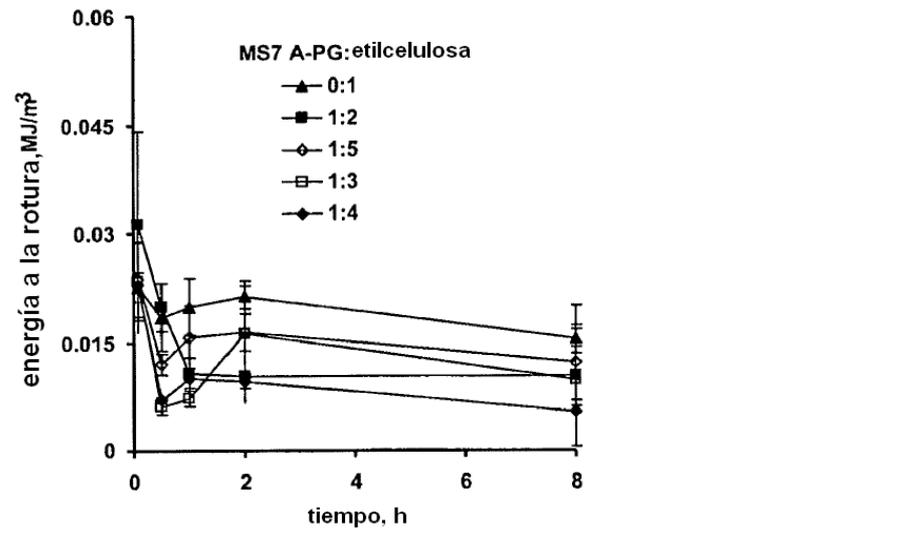


Figura 9

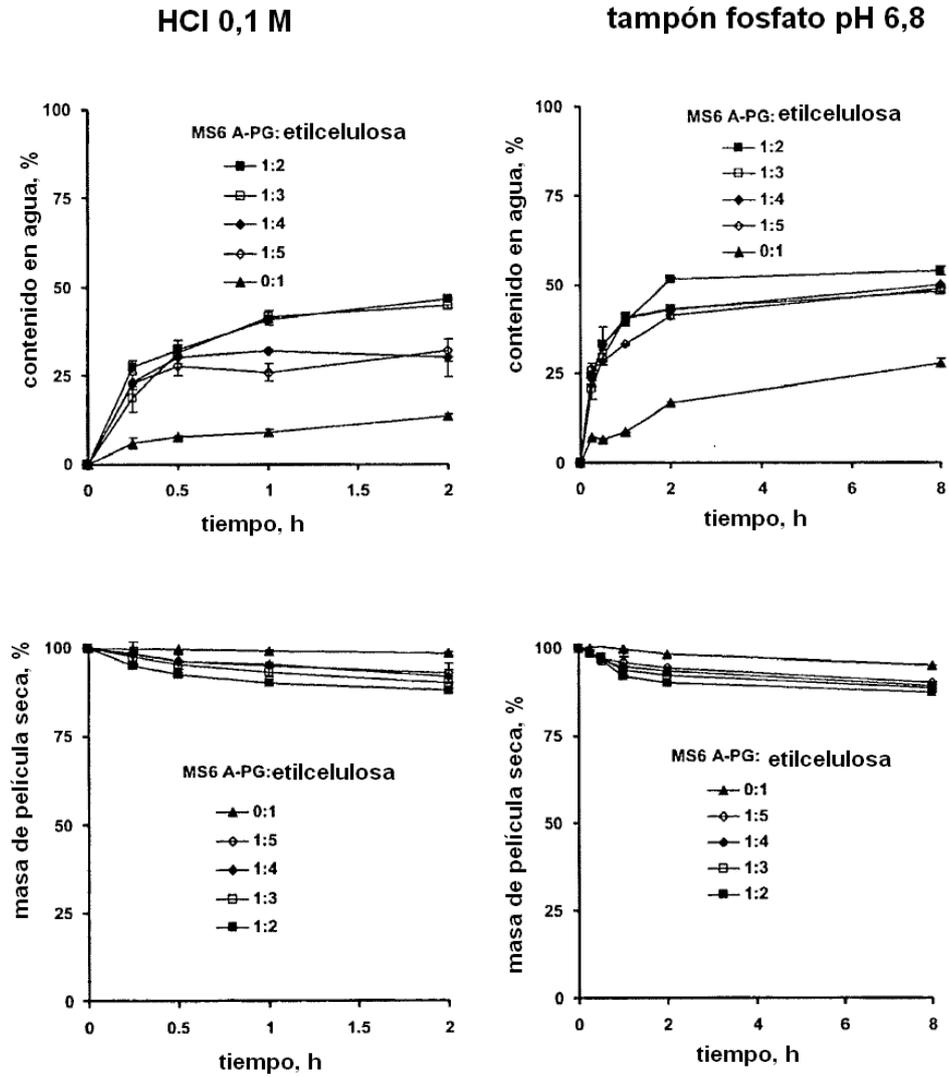
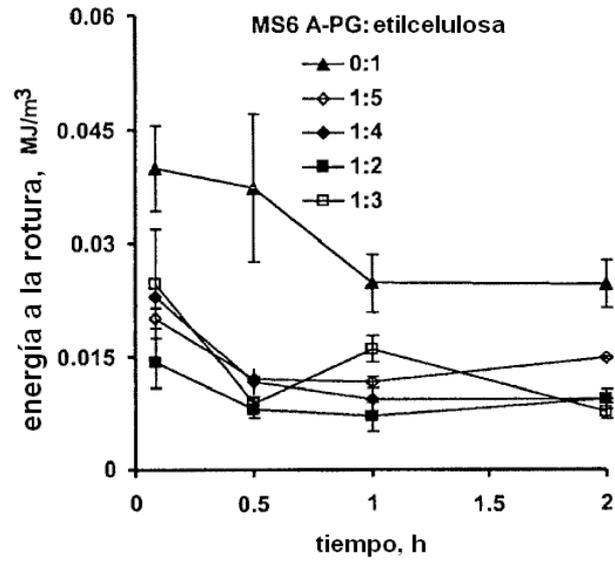


Figura 10

a)



b)

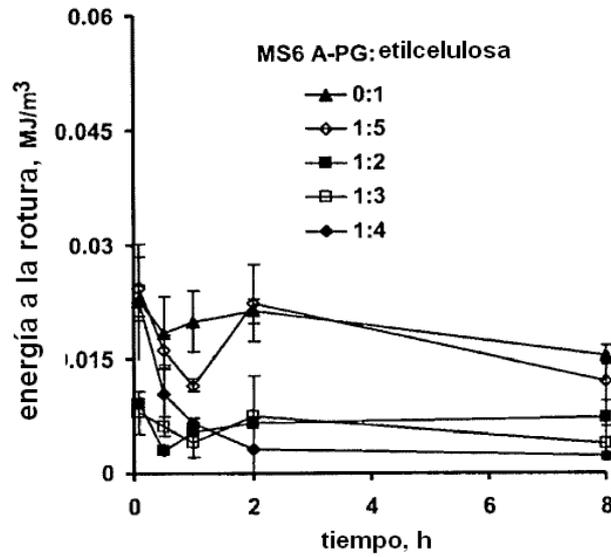


Figura 11

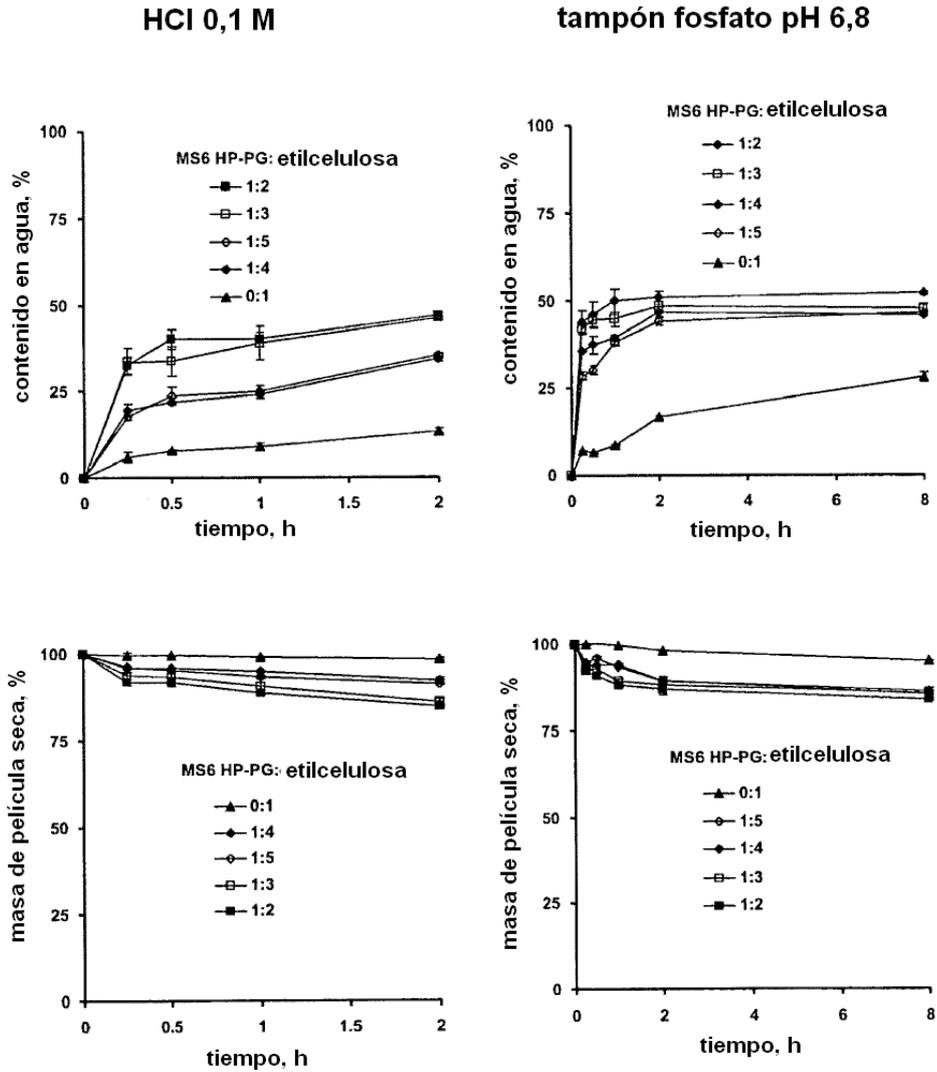


Figura 12

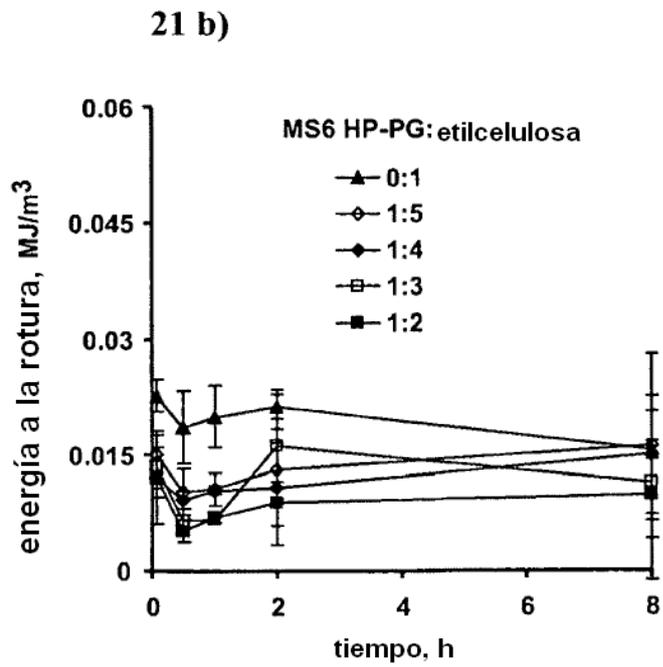
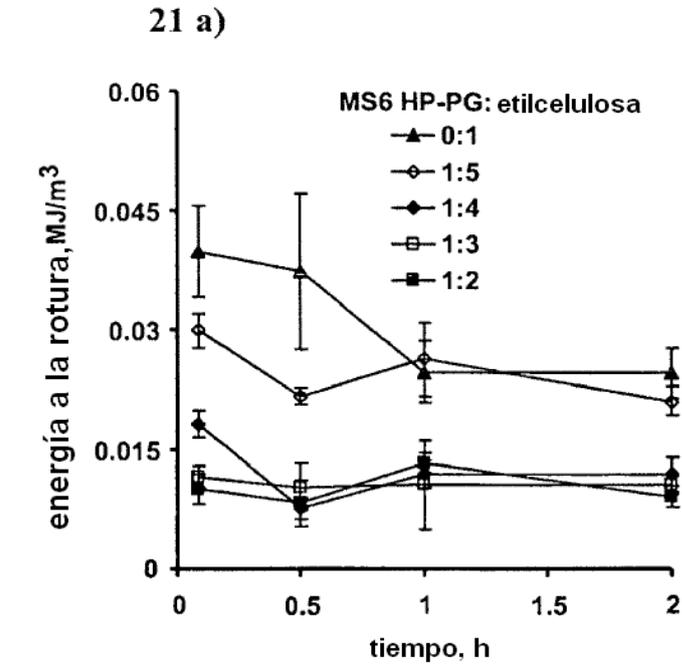


Figura 13

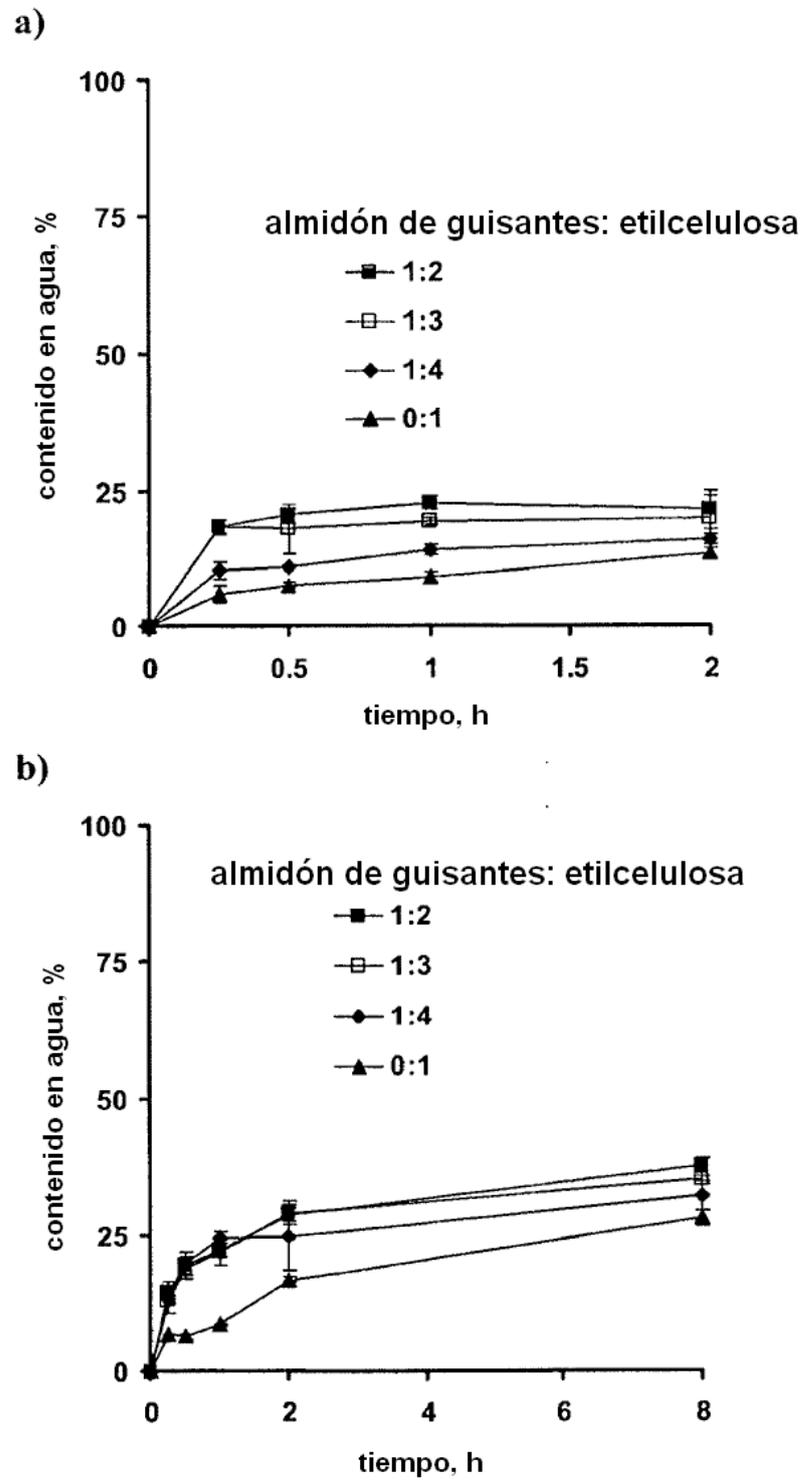


Figura 14

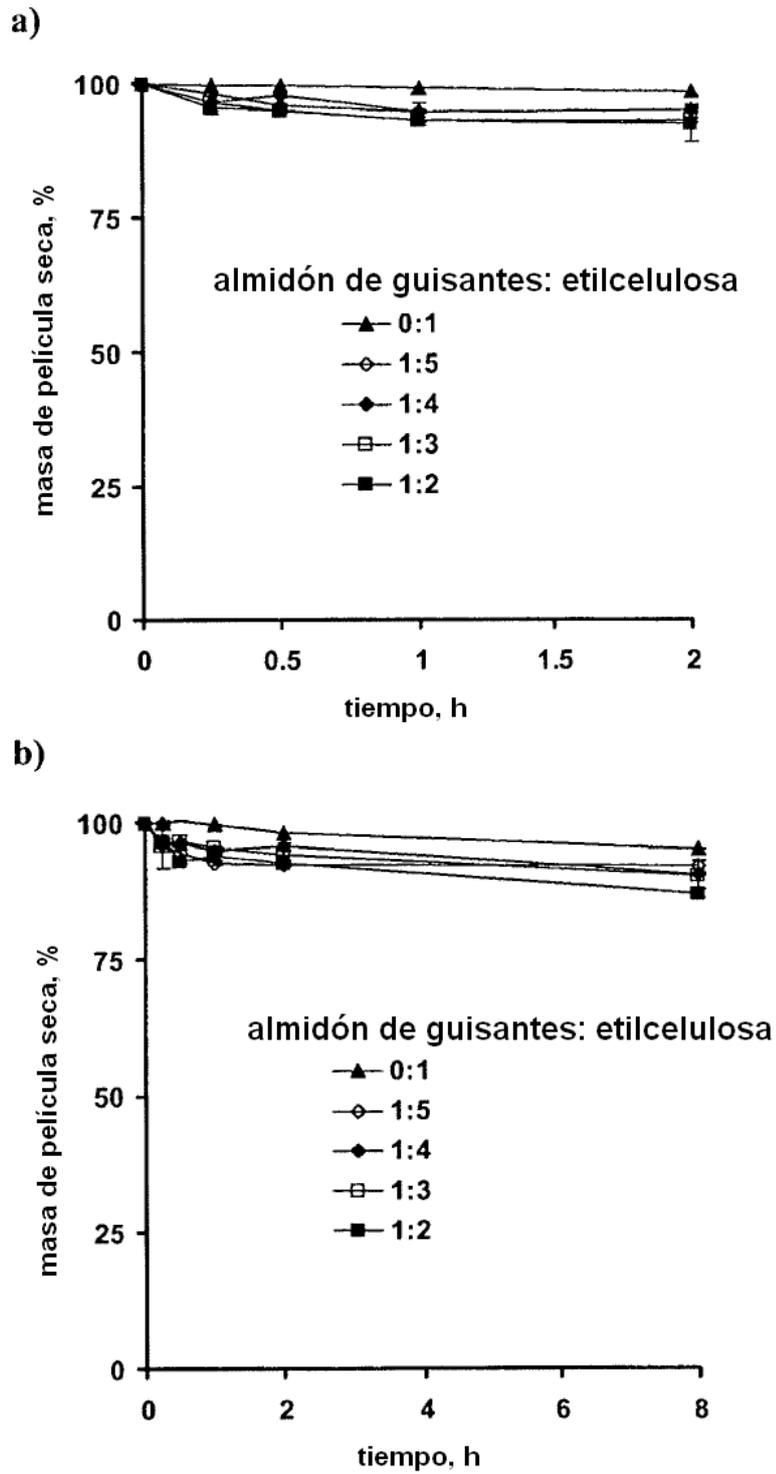


Figura 15

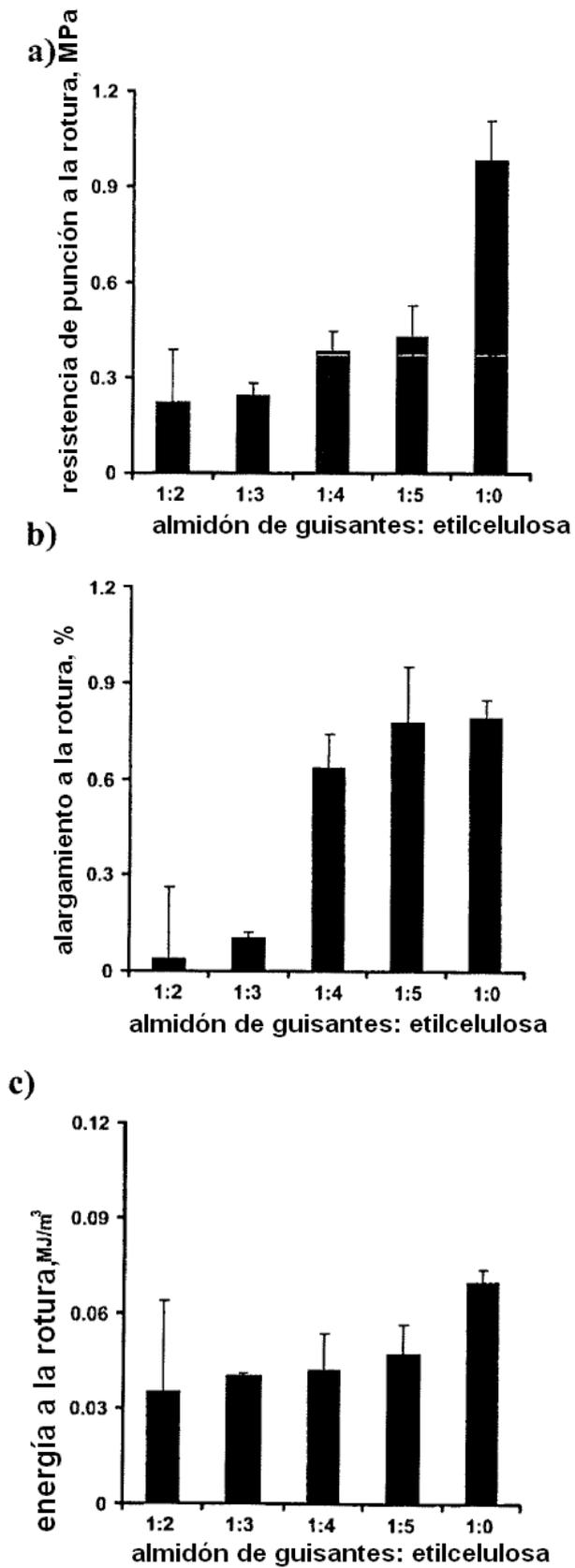


Figura 16

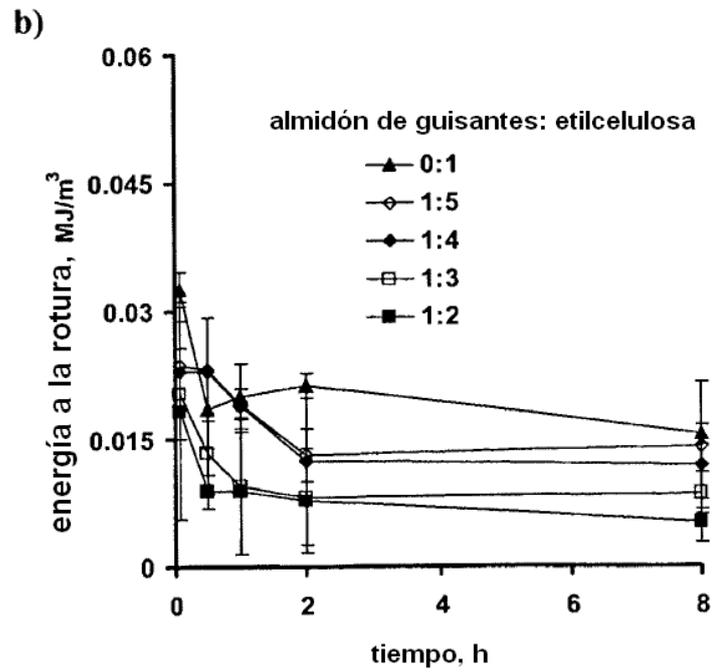
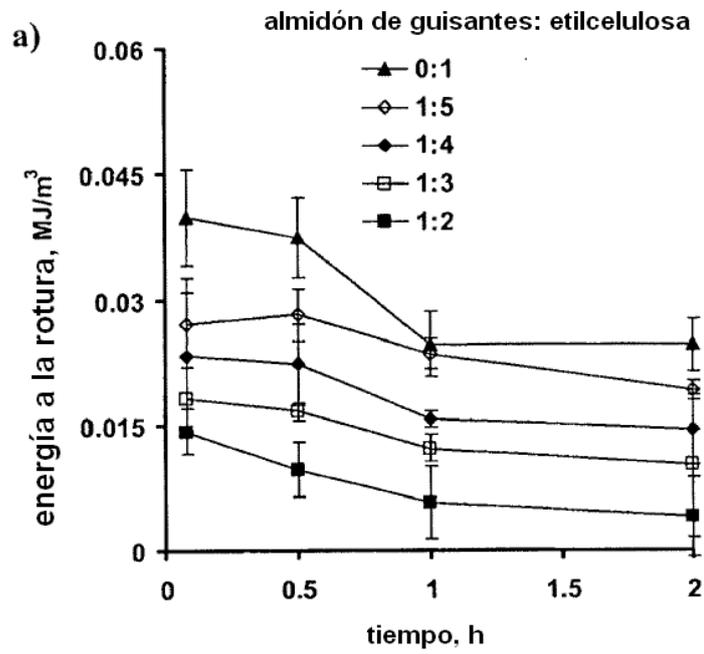


Figura 17

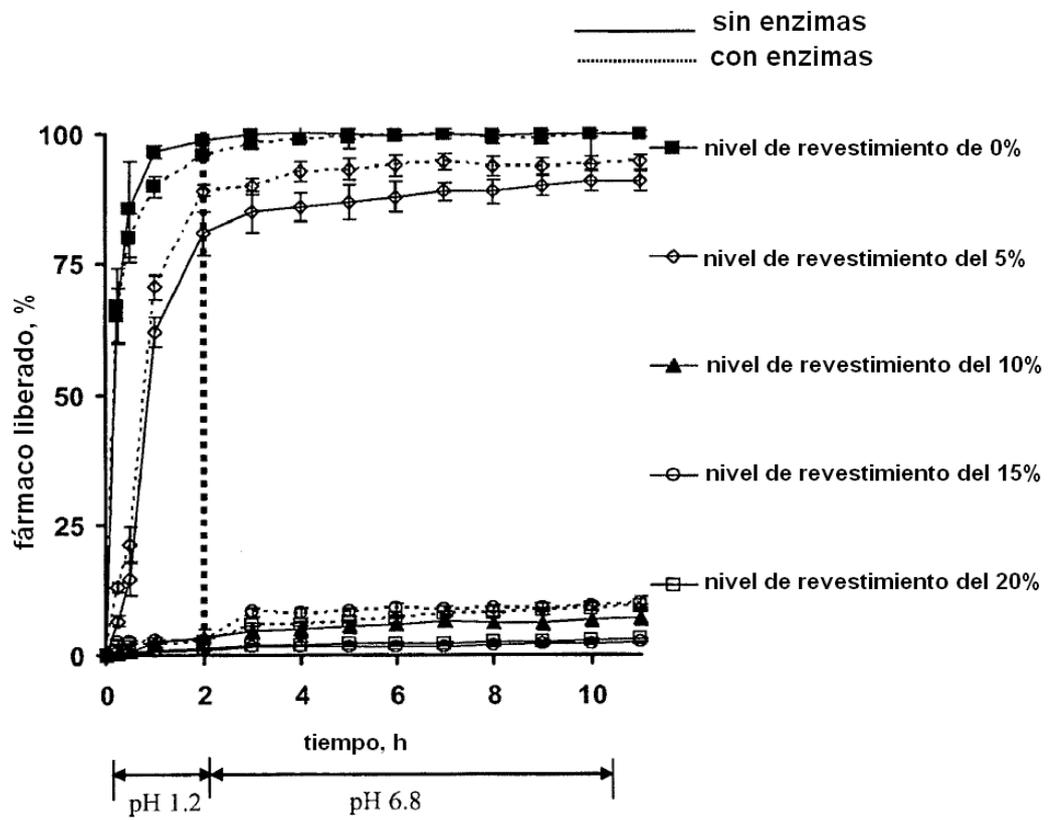
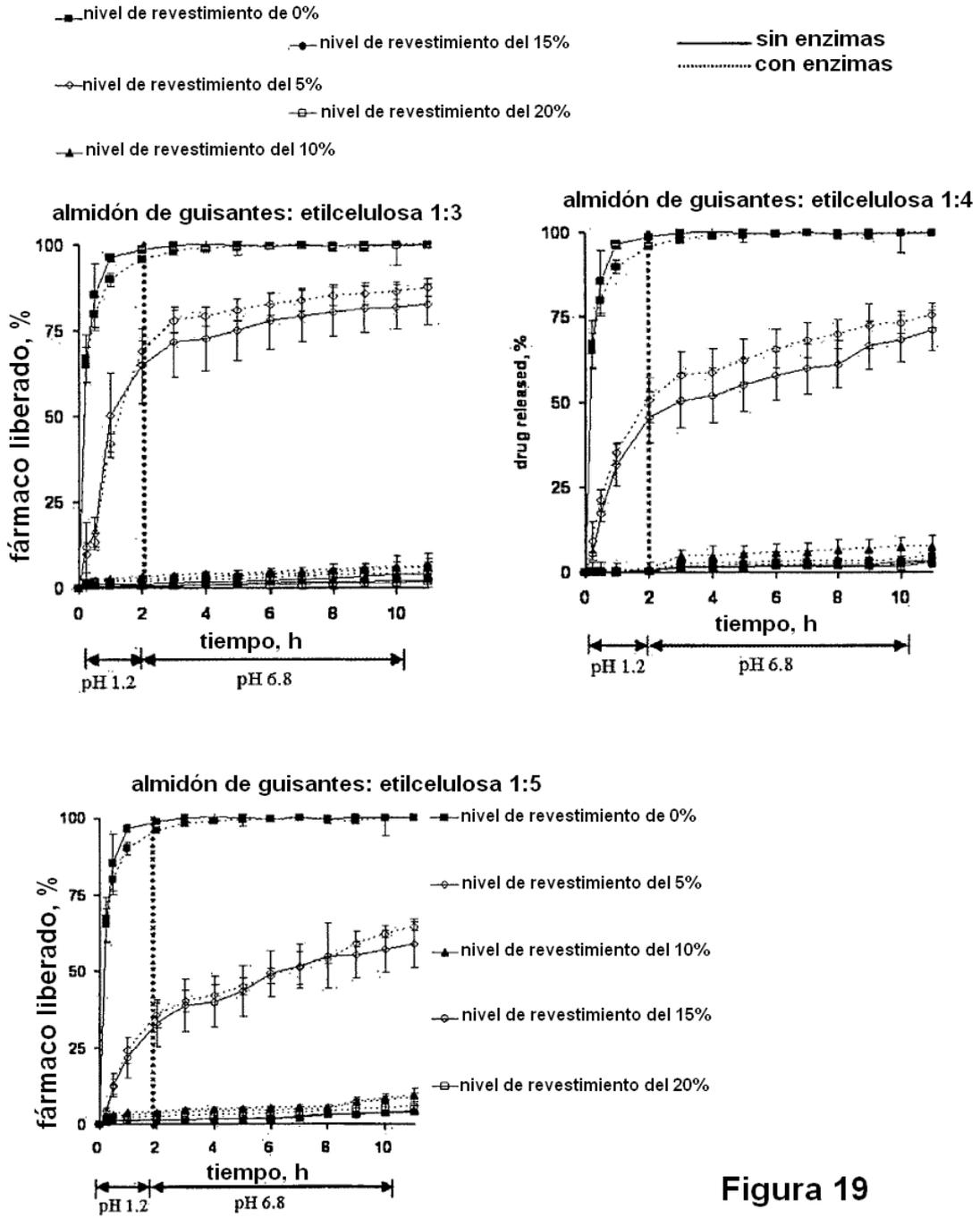


Figura 18



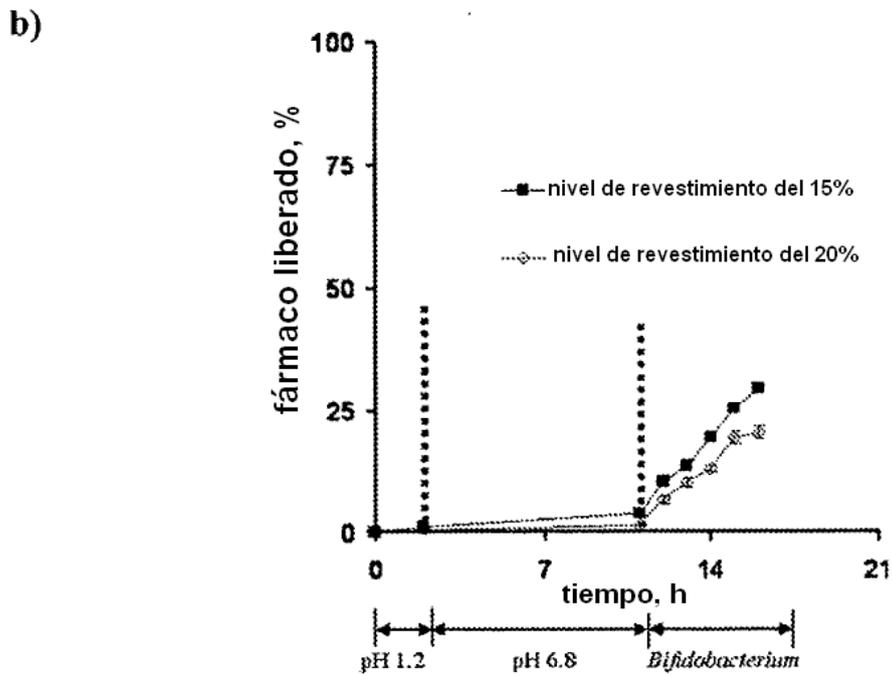
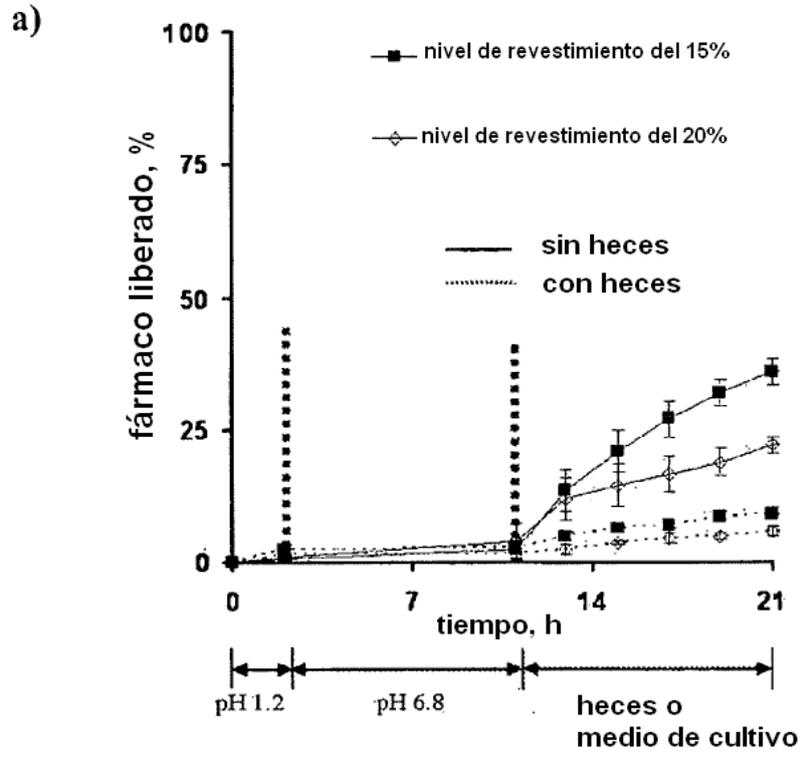


Figura 20

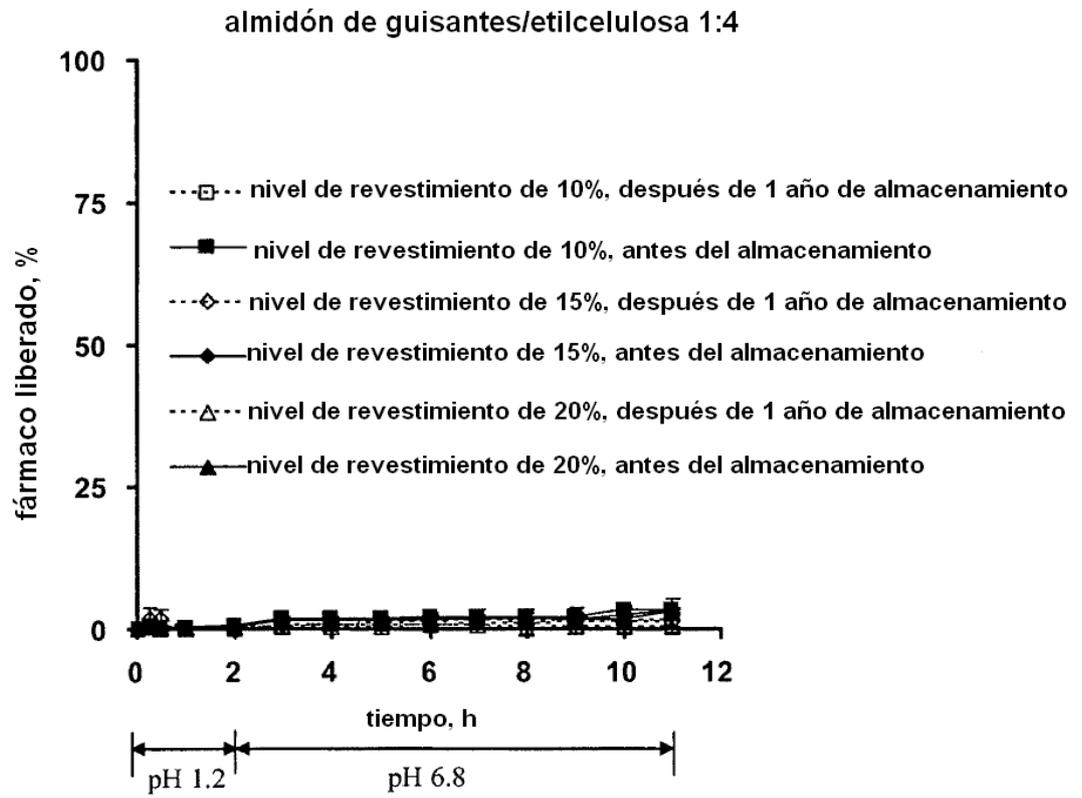


Figura 21

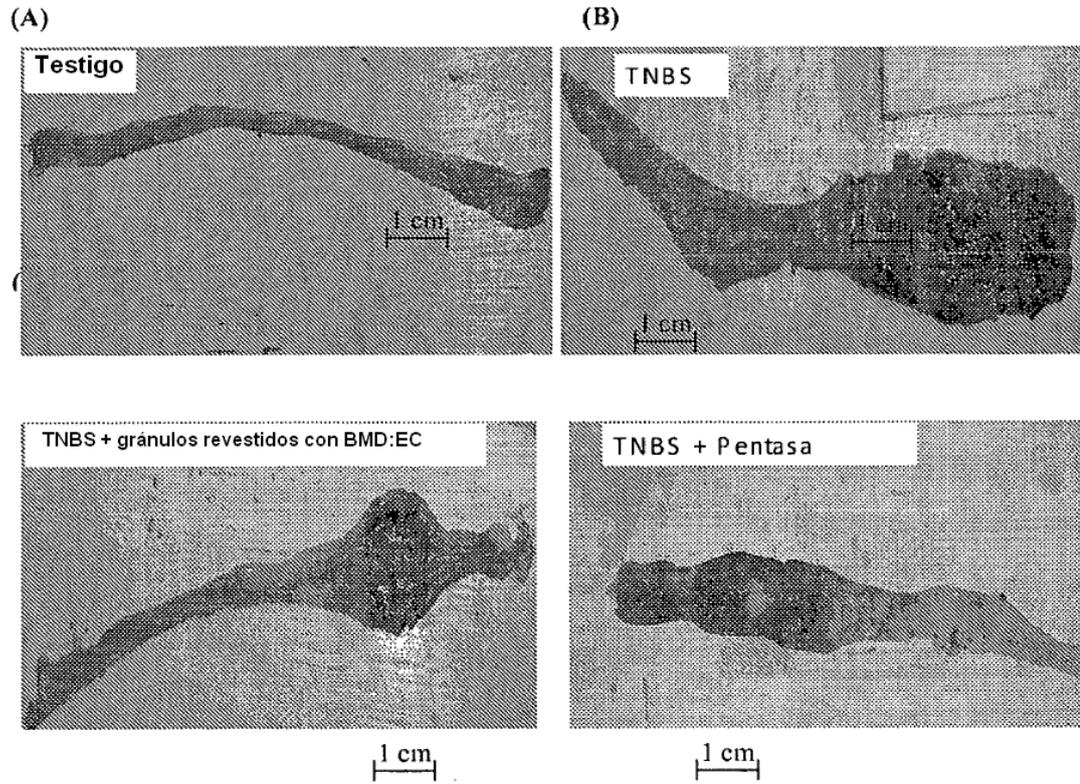


Figura 22

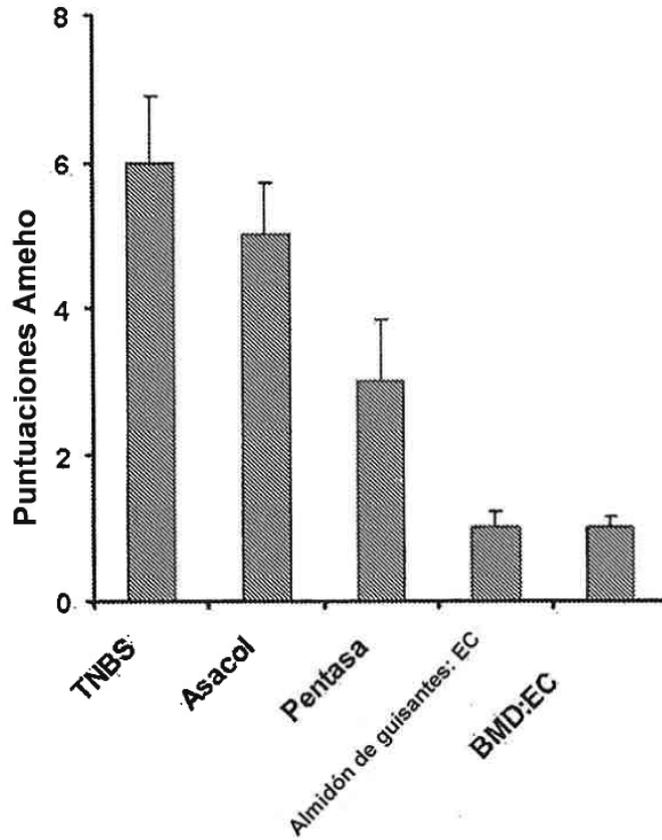


Figura 23

Puntuación Ameho

Designa una $p=1$ entre Asacol® y colitis inducida por TNBS

Designa una $p=0,57$ entre Pentasa® y colitis inducida por TNBS

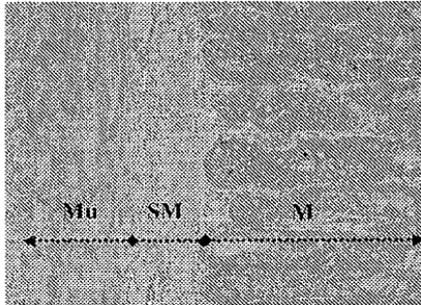
Designa una $p=0,0038$ entre gránulos revestidos con BMD:EC y colitis inducida por TNBS

Designa una $p=0,024$ entre gránulos revestidos con almidón de guisantes:EC y colitis inducida por TNBS

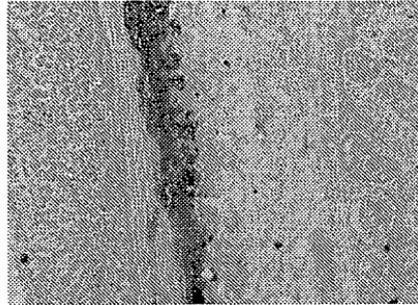
Designa una $p=0,006$ entre gránulos revestidos con BMD:EC y Pentasa®

Designa una $p=0,016$ entre gránulos revestidos con almidón de guisantes:EC y Pentasa®

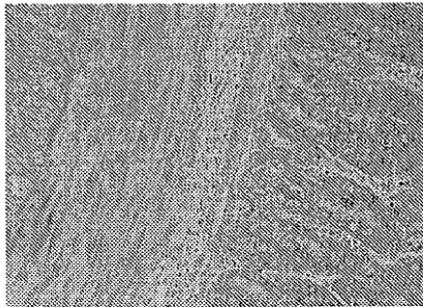
Testigo



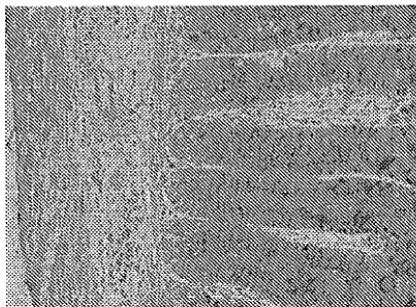
TNBS



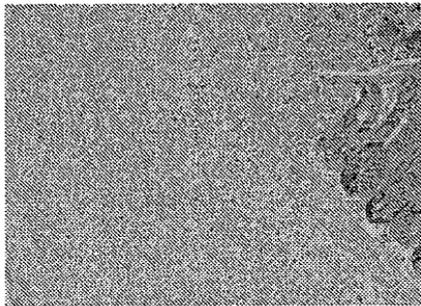
gránulos revestidos con BMD:EC



gránulos revestidos con almidón de guisantes:EC



Pentasa®



Asacol®

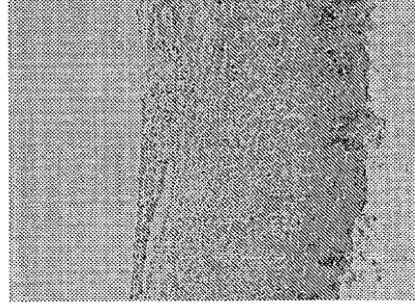


Figura 24