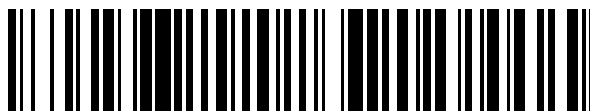


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 762**

51 Int. Cl.:

A61K 9/28 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2008 E 08305740 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 2179727**

54 Título: **Polímero insoluble en agua: revestimientos de película a base de derivados de almidón modificado para la liberación dirigida al colon**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2013

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 2 425 762 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

Polímero insoluble en agua: revestimientos de película a base de derivados de almidón modificado para la liberación dirigida al 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 también se refiere al uso y método para producir la misma.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La liberación dirigida al colon puede ser de gran ayuda para muchas terapias con fármacos, incluyendo el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino, tales como la enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerosa (UC)¹.

15 Si un fármaco de acción local se administra por vía oral utilizando una forma de dosificación farmacéutica convencional, esta última se disuelve rápidamente en los contenidos 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^{2,3}. 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 oral⁴.

20 Para permitir la liberación dirigida al colon, el fármaco puede ser embebido, por ejemplo, dentro de un formador de la matriz polimérica, o comprimidos o peletes cargados con fármaco tales como perlas, de aproximadamente 0,5-1 mm de diámetro, o se puede revestir con una película polimérica^{5,6,7}. En el aparato digestivo (GIT) 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 de los contenidos del GIT, (ii) un cambio en la calidad y/o cantidad de enzimas a lo largo del GIT^{8,9,10,11}, 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 patrones pulsátiles de liberación de fármacos)^{12,13,14,15}. 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.

35 Un intento por resolver el problema de la liberación dirigida al 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 el que la relación de amilosa a etilcelulosa es de (1:3,5) a (1:4,5), y en el que 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 al colon, la forma de dosificación debe hacerse 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 tubo digestivo superior. Esta degradación específica para el sitio puede basarse en diferencias significativas en la calidad y cantidad de enzimas presentes en el tubo digestivo superior frente al colon. El compuesto no debería ser degradado en el tubo digestivo superior (e impedir la liberación de fármacos), sino que se debería degradar 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 tubo digestivo. 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 da a conocer, 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.

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 la composición resultante se seca. 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 preparados utilizando un disolvente orgánico. Este no es el caso en la presente invención. El uso de disolventes orgánicos implica varios problemas, incluidos 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 purificación. Este proceso es complejo y es utilizable con dificultad a 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 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 segregadas 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.

SUMARIO DE LA INVENCION

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.

Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar nuevos revestimientos de película poliméricos que permitan la liberación dirigida al 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 cizallamiento cuando se exponen al GIT superior (debido a la movilidad gastrointestinal) y para resistir la presión hidrostática potencialmente significativa desarrollada 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 accidental de una fisura puede dar como resultado una liberación prematura del fármaco a través de canales llenos de agua^{16,17}.

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 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 embebido en una mezcla polimérica de:

- o al menos un polímero insoluble en agua y
- o una composición de derivado de almidón de al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en oligosacáridos indigestibles, almidones modificados y almidones de legumbres,

en la que la mezcla polimérica proporciona la liberación de dicho ingrediente activo en el colon de pacientes que tienen disbiosis y en el colon de sujetos sanos.

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 una partícula central, estando el ingrediente activo dispersado o disuelto en la partícula central y/o en la mezcla del revestimiento.

En una realización adicional de la presente invención, la relación composición de derivado 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.

Típicamente, la composición de derivado de almidón muestra un contenido de amilosa de entre 25 y 45%, preferiblemente un contenido de amilosa de entre 30 y 44%, más preferiblemente de entre 35 y 40%, expresándose este porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de almidón presente en dicha composición.

En una realización adicional de la invención, la composición de derivado de almidón comprende al menos un almidón de legumbres o de 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). Ventajosamente, la legumbre es guisantes.

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

10 De acuerdo con la invención, el almidón modificado está estabilizado. De hecho, de acuerdo con una realización preferida de la invención, los tratamientos químicos, que son particularmente muy adecuados para la preparación de una composición formadora de película, son los tratamientos "estabilizantes". Preferiblemente, dicho almidón modificado está hidroxipropilado y/o acetilado, siendo posible que estos tratamientos estén opcionalmente suplementados mediante una fluidización, esto es, dicho almidón modificado está tratado por fluidización, por ejemplo mediante tratamiento con ácidos. La composición del derivado de 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) de a lo sumo 0,2. El término "DS" se entiende que significa, en la presente invención, el número medio de grupos hidroxipropilo por 10 unidades de anhidroglucosa. Este número medio se determina por los métodos analíticos convencionales bien conocidos por una persona experta en la técnica.

15 En una realización adicional de la invención, la composición de derivado de almidón comprende al menos un oligosacárido indigestible seleccionado del grupo que consiste en xilo-oligosacáridos, inulina, oligofruktosas, fructo-oligosacáridos (FOS), lactulosa, galactomanano e hidrolizados adecuados de los mismos, povidona indigestible, dextrina indigestible 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 indigestible e hidrolizados parciales de la misma, preferiblemente una dextrina indigestible o una maltodextrina indigestible.

20 De acuerdo con la invención, una maltodextrina indigestible o dextrina indigestible que tiene entre 15 y 35% de enlaces 1->6 glucósido, un contenido de azúcar reductor menor que 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 indigestibles están hidrogenadas.

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

30 Preferiblemente, el polímero insoluble en agua se selecciona del grupo que consiste en etilcelulosa, derivados de 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 éster de metacrilato, 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.

35 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 como una mezcla de uno con otro.

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

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 una disbiosis y en el colon de sujetos sanos, comprendiendo dicho método:

45 o formar una mezcla polimérica de:

- al menos un polímero insoluble en agua y
- una composición de derivado de almidón de al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en oligosacáridos indigestibles, almidones modificados y almidones de legumbres,

o embeber dicho ingrediente activo en la mezcla polimérica.

50 En una realización adicional, la etapa de embeber el ingrediente activo es una etapa de revestimiento de una partícula central, estando el ingrediente activo dispersado o disuelto en la partícula central, y/o la etapa de embeber el ingrediente activo es una etapa de dispersar o disolver el ingrediente activo en la mezcla polimérica.

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 que tienen una disbiosis y en el colon de sujetos sanos, teniendo dicha forma de dosificación de liberación controlada un efecto prebiótico, en el que el método comprende:

- 5 o formar una mezcla polimérica de:
- al menos un polímero insoluble en agua y
 - una composición de derivado de almidón que comprende oligosacáridos indigestibles,
- o embeber dicho ingrediente activo en la mezcla polimérica.

10 En una realización adicional, la etapa de embeber el ingrediente activo es una etapa de revestimiento de una partícula central, estando el ingrediente activo dispersado o disuelto en la partícula central, y/o la etapa de embeber el ingrediente activo es una etapa de dispersar o disolver el ingrediente activo en la mezcla polimérica.

15 Las condiciones en el tubo digestivo 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 de los contenidos 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^{18,19}. Sin embargo, en el estado patológico su concentración puede verse significativamente reducida^{20,21}. Por ejemplo, se demostró que la actividad de la glucosidasa fecal (especialmente la de β -D-galactosidasa) disminuye en pacientes que padecen enfermedad de Crohn, y que la actividad metabólica de la flora del colon se ve fuertemente perturbada en el estado activo de la enfermedad^{22,23}. Así, el impacto de la patofisiología puede ser crucial y puede conducir al fracaso del tratamiento con fármacos²⁴.

20

25 Para evitar fracasos de 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.

30 De este modo, la presente invención también proporciona el uso de una preparación de revestimiento polimérica que comprende un polímero insoluble en agua y un derivado de almidón seleccionado del grupo que consiste en oligosacáridos indigestibles, almidones modificados y almidones de legumbres en la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de pacientes que sufren enfermedades inflamatorias del intestino.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

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

45 Fig. 4: Contenido en agua y masa seca de películas delgadas que consisten en diferentes tipos de polisacáridos mezclados con etilcelulosa tras la 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.

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.

50 Fig. 6: Absorción de agua de películas delgadas que consisten en mezclas de maltodextrina ramificada:etilcelulosa (la relación se indica en las figuras) tras la exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón de fosfato pH 6,8 (contenido de TEC, referido a la masa de etilcelulosa: 25% p/p).

- Fig. 7: Pérdida de masa seca de películas delgadas que consisten en maltodextrina ramificada:etilcelulosa (la relación se indica en las figuras) tras la exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón de fosfato pH 6,8 (contenido de TEC, referido a la masa de etilcelulosa: 25% p/p).
- 5 Fig. 8: Efectos de la relación de mezclado de maltodextrina ramificada:etilcelulosa y contenido de plastificante inicial sobre la energía requerida para romper películas poliméricas, delgadas, en el estado seco a temperatura ambiente.
- Fig. 9: Cambios en la energía requerida para romper películas delgadas de maltodextrina ramificada:etilcelulosa (la relación de mezclado se indica en las figuras) tras la exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón de fosfato pH 6,8 a 37°C (contenido de TEC, referido a la masa de etilcelulosa: 25% p/p).
- 10 Fig. 10: Cambios en la energía requerida para romper películas delgadas que consisten en maltodextrina ramificada:etilcelulosa (la relación de mezclado se indica en la parte superior de las figuras) plastificada con diferentes cantidades de TEC (los porcentajes se refieren a la masa de etilcelulosa) tras la exposición a HCl 0,1 M durante 2 h (curvas continuas) y tampón de fosfato pH 6,8 durante 8 h a 37°C (curvas de puntos).
- 15 Fig. 11: Efectos del contenido de plastificante (indicado en las figuras, referido a la masa de etilcelulosa) sobre la absorción de agua y pérdida de masa seca de películas delgadas de maltodextrina ramificada:etilcelulosa tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8, respectivamente. Las curvas continuas y de puntos representan los resultados obtenidos en las relaciones de mezclado 1:2 y 1:3.
- 20 Fig. 12: Absorción de agua y pérdida de masa seca de películas delgadas que consisten en mezclas de maltodextrina:etilcelulosa tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8, respectivamente. La relación de mezclado polimérico se indica en las figuras. Por motivos de comparación, también se muestra el comportamiento de películas de etilcelulosa (plastificada) pura.
- 25 Fig. 13: Cambios en la energía en la ruptura de películas delgadas de maltodextrina: etilcelulosa tras la exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón de fosfato pH 6,8. La relación de mezclado polimérico se indica en las figuras. Por motivos de comparación, también se muestran los resultados obtenidos con películas de etilcelulosa (plastificada) pura.
- 30 Fig. 14: Absorción de agua y pérdida de masa seca de películas delgadas de mezclas de PS HP-PG:etilcelulosa tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8, respectivamente. La relación de mezclado polimérico se indica en las figuras. Por motivos de comparación, también se muestra el comportamiento de películas de etilcelulosa (plastificada) pura.
- 35 Fig. 15: Cambios en la energía en la ruptura de películas delgadas de PS HP-PG:etilcelulosa tras la exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón de fosfato pH 6,8. La relación de mezclado polimérico se indica en las figuras. Por motivos de comparación, también se muestran los resultados obtenidos con películas de etilcelulosa (plastificada) pura.
- 40 Fig. 16: Absorción de agua y pérdida de masa seca de películas delgadas que consisten en mezclas de EURYLON® 7 A-PG:etilcelulosa tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8, respectivamente. En las figuras se indica la relación de mezclado polimérico. Por motivos de comparación, también se muestra el comportamiento de películas de etilcelulosa (plastificada) pura.
- 45 Fig. 17: Cambios en la energía en la ruptura de películas delgadas de EURYLON® 7 A-PG:etilcelulosa tras la exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón de fosfato pH 6,8. La relación de mezclado polimérico se indica en las figuras. Por motivos de comparación, también se muestran los resultados obtenidos con películas de etilcelulosa (plastificada) pura.
- 50 Fig. 18: Absorción de agua y pérdida de masa seca de películas delgadas que consisten en mezclas de EURYLON® 6 A-PG:etilcelulosa tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8, respectivamente. En las figuras se indica la relación de mezclado polimérico. Por motivos de comparación, también se muestra el comportamiento de películas de etilcelulosa (plastificada) pura.
- Fig. 19: Cambios en la energía en la ruptura de películas delgadas de EURYLON® 6 A-PG:etilcelulosa tras la exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón de fosfato pH 6,8. La relación de mezclado polimérico se indica en las figuras. Por motivos de comparación, también se muestran los resultados obtenidos con películas de etilcelulosa (plastificada) pura.
- Fig. 20: Absorción de agua y pérdida de masa seca de películas delgadas que consisten en mezclas de EURYLON® 6 HP-PG:etilcelulosa tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8, respectivamente. En las figuras se indica la relación de mezclado polimérico. Por motivos de comparación, también se muestra el comportamiento de películas de etilcelulosa (plastificada) pura.

Fig. 21: Cambios en la energía en la ruptura de películas delgadas de EURYLON® 6 HP-PG:etilcelulosa tras la exposición a: (a) HCl 0,1 M y (b) tampón de fosfato pH 6,8. La relación de mezclamiento polimérico se indica en las figuras. Por motivos de comparación, también se muestran los resultados obtenidos con películas de etilcelulosa (plastificada) pura.

5 Fig. 22: Liberación in vitro de 5-ASA a partir de peletes revestidos con mezclas de maltodextrina ramificada:etilcelulosa (1:2) en condiciones que simulan el tránsito por el GIT superior. El nivel de revestimiento se indica en la figura, así como la presencia (líneas de puntos) y ausencia (líneas continuas) de enzimas.

10 Fig. 23: Efectos de la relación de mezclamiento de maltodextrina ramificada:etilcelulosa y nivel de revestimiento (indicado en las figuras) en la liberación in vitro de 5-ASA a partir de los peletes investigados en condiciones que simulan el tránsito por el GIT superior. Las líneas continuas/de puntos indican la ausencia/presencia de enzimas.

15 Fig. 24: La liberación de fármaco a partir de peletes revestidos con mezclas de maltodextrina ramificada:etilcelulosa (la relación se indica en las figuras) a nivel de revestimiento del 20% en condiciones que simulan el tránsito por todo el GIT (sin muestras fecales). Velocidad de inmersión elevada: 30 dpm durante 11,5 h, después 20 dpm. Velocidad de inmersión media: 20 dpm durante 11,5 h, después 10 dpm. Velocidad de inmersión baja: 10 dpm durante 11,5 h, después 5 dpm (Aparato 3 USP).

20 Fig. 25: Liberación de 5-ASA a partir de peletes revestidos con mezclas de maltodextrina ramificada:etilcelulosa (la relación se indica en la figura) a nivel de revestimiento del 15 ó 20% en condiciones que simulan el tránsito por todo el GIT, con muestras fecales procedentes de pacientes con la enfermedad inflamatoria del intestino. La velocidad de inmersión fue 10 dpm. Por motivos de comparación, también se muestra la liberación de fármaco en medio de cultivo sin muestras fecales (líneas de puntos). El dibujo ilustra el principio del enfoque investigado de liberación dirigida al colon.

25 Fig. 26: Liberación de 5-ASA a partir de peletes revestidos con mezclas de maltodextrina ramificada:etilcelulosa (la relación se indica en las figuras) a nivel de revestimiento del 15 ó 20% en condiciones que simulan el tránsito por todo el GIT, con: (a) una mezcla de bifidobacterias, bacteroides y Escherichia coli o (b) Bifidobacterium. La velocidad de inmersión fue 10 dpm.

Fig. 27: Liberación de 5-ASA a partir de diferentes productos comercialmente disponibles en condiciones que simulan el tránsito por todo el GIT, con muestras fecales procedentes de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino. La velocidad de inmersión fue 10 dpm. Por motivos de comparación, también se muestra la liberación de fármaco en medio de cultivo sin muestras fecales (líneas de puntos).

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

Tabla 2: Efectos del tipo de derivado de almidón mezclado con etilcelulosa y de la relación de mezclamiento de derivado de almidón:etilcelulosa en las propiedades mecánicas de películas delgadas en el estado seco a temperatura ambiente.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

40 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "ingrediente activo", "fármaco" o "ingrediente farmacológicamente activo" o cualquier otro término 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) tener un efecto profiláctico sobre el organismo y que previene un efecto biológico indeseado tal como prevenir una infección, (2) aliviar un estado provocado por una enfermedad, por ejemplo aliviar el dolor o la inflamación provocado como un resultado de la enfermedad, y/o (3) ya sea aliviar, reducir o eliminar por completo la enfermedad del organismo. El efecto puede ser local, tal como proporcionar un efecto anestésico local, o puede ser sistémico.

45 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "disbiosis", también denominado disbacteriosis, pretende dar a entender, en la presente invención, los desequilibrios microbianos tal como en calidad y en cantidad en el tubo digestivo. 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).

50 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "suministro de liberación controlada" o "liberación controlada" significa que la liberación del ingrediente activo desde la forma de dosificación está controlada 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 de esterificación.

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

- 5 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.

10 La expresión “polisacáridos indigestibles”, 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 tubo digestivo superior humano (intestino delgado y estómago), pero que al menos son parcialmente fermentados por la flora intestinal humana. Oligosacáridos indigestibles que se pueden emplear en realizaciones preferidas de la invención son xilo-oligosacáridos, inulina, oligofruktosas, fructo-oligosacáridos (FOS), lactulosa, galactomanano e hidrolizados adecuados del mismo, povidexrosa indigestible, dextrinas indigestibles 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 indigestibles e hidrolizados parciales de las mismas.

15 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 proteoglucano 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 de glucopiranososa. El análisis estructural demostró que PSK tiene una configuración de 1,4-glucano como la porción glucosídica principal con ramificaciones en las posiciones 3 y 6 a una frecuencia de una ramificación por cada varios grupos residuales de enlaces 1 - 4.

20 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.

30 El término “legumbre” pretende dar a entender, en la presente invención, cualquier planta perteneciente a las familias Caesalpinaceae, 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.

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” se considera en este caso en su sentido más amplio, e incluye en particular:

- 35
- todas las variedades salvajes de guisante liso y
 - 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 (alimento para el hombre, nutrición para animales y/u otros usos).

40 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.

45 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 de almidón mayor que 40%, preferiblemente mayor que 50%, y todavía más preferiblemente mayor que 75%, expresándose estos porcentajes en peso seco con respecto al peso seco de dicha composición.

50 Además, es posible utilizar almidones que exhiben de forma natural un contenido de 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 25 y 45%, preferiblemente entre 30 y 44% y todavía más preferiblemente entre 35 y 40%.

Para los fines de la invención, la expresión “maltodextrina ingestible” significa maltodextrina que contiene enlaces glucosídicos indigestibles 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 ingestibles descritas en la patente EP 1 006 128, de las que la compañía solicitante es titular.

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

- 5 Las maltodextrinas ramificadas tienen un contenido total de fibras mayor 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 al colon que están adaptados al estado patológico de los pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del intestino.

- 10 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 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 ilustrará por medio de los siguientes ejemplos así como las figuras.

15 **Ejemplo 1:**

A. Materiales y métodos

A.1. Materiales

- 20 Maltodextrina ramificada (BMD) [una maltodextrina ramificada con enlaces glucosídicos no digestibles: α -1,2 y α -1,3, NUTRIOSE® FB 06 Roquette Frères], almidón de guisantes (almidón de guisante N-735), 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 Freres, Lestrem, Francia)), EURYLON® 6 A-PG (un almidón de maíz acetilado y pre-gelatinizado con alto contenido en amilosa (60% de amilosa) (Roquette Freres, Lestrem, Francia) y EURYLON® 6 HP-PG (un almidón de maíz hidroxipropilado y pregelatinizado con alto contenido en amilosa (60% de amilosa) (Roquette Freres, Lestrem, Francia); dispersión acuosa de etilcelulosa (Aquacoat® ECD 30; FMC Biopolymer, Philadelphia, USA); citrato de trietilo (TEC; Morflex®, Greensboro, USA); 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, sacarasa, 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, USA); hidrocioruro de L-cisteína hidratado (Acros Organics, Geel, Bélgica); agar McConkey (BioMerieux, Balme-les-Grottes, Francia); disolución de Ringer cisteinada (Merck, Darmstadt, Alemania).

A.2. Preparación de la película

- 35 Se prepararon películas poliméricas delgadas moldeando mezclas de diferentes tipos de derivados de almidón acuosos y dispersión acuosa de etilcelulosa en moldes de Teflon y secando subsiguientemente durante 1 d a 60°C. El derivado de almidón soluble en agua se disolvió en agua purificada (5% p/p) y se mezcló con dispersión de etilcelulosa plastificada (TEC al 25%, agitación durante toda la 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 de moldearla.

A.3. Caracterización de la película

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

- (i) fluido gástrico simulado (HCl 0,1 M)
- 45 (ii) fluido intestinal simulado [tampón de fosfato pH 6,8 (Farmacopea 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
- (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.

- 50 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 hidrocioruro de L-cisteína hidratado en 1 l de agua destilada (pH 7,0 \pm 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 1:200 con disolución de Ringer cisteínada; 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 la agitación 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). Se tomaron muestras a intervalos de tiempo predeterminados, se eliminó 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 de agua (%) y la masa de película seca (%) en el instante t se calcularon como sigue:

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

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

A.4. Análisis bacteriológico

Para el análisis bacteriológico de muestras fecales, estas últimas se diluyeron en la relación 1:10 con disolución de Ringer cisteínada. Se prepararon ocho diluciones décuplas adicionales en disolución de Ringer cisteínada 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 en condiciones anaerobias. (5% de CO₂, 10% de H₂, 85% de N₂). Las colonias fueron superadas en número; las colonias predominantes se sub-cultivaron e identificaron en base a criterios de identificación fenotípicos. Se incubaron 25 placas de agar McConkey durante 48 h a 37°C al aire. Las colonias fueron superadas en número y se identificaron utilizando el sistema API 20E (BioMerieux, Balmeles-Grottes, Francia). Los recuentos se expresaron como log de CFU/g (unidades formadoras de colonia por gramo) de heces recientes.

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) en condiciones anaerobias.

B. Resultados y discusión

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

La permeabilidad de un sistema polimérico para un fármaco depende enormemente de su contenido en agua y masa seca, que determinan la densidad y movilidad de las macromoléculas. Por ejemplo, en comprimidos de matriz a base de hidroxipropil-metilcelulosa (HP-MC) seca, el coeficiente de difusión aparente de un fármaco se aproxima a 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. Al aumentar el contenido de agua, la movilidad macromolecular aumenta significativamente y, de este modo, el volumen libre disponible para la difusión. En algunos sistemas, el polímero se ve sometido a una transición de fase vítrea a cauchoides 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, el contenido de 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 derivado de almidón:etilcelulosa en HCl 0,1 N y tampón de fosfato pH 6,8, respectivamente. La presencia de etilcelulosa en todas las películas permite evitar una disolución prematura en el GIT superior. Los derivados de almidón investigados son todos solubles en agua y pretenden proporcionar la sensibilidad de la permeabilidad del fármaco de los revestimientos al entorno circundante. Una vez que se alcanza el colon, los derivados de almidón han de ser degradados enzimáticamente y ha de iniciarse la liberación del fármaco. La relación de mezclado derivado de almidón:etilcelulosa en la Figura 1 es constante: 1:3. Claramente, las tasas y medidas de absorción de agua dependen significativamente del tipo de derivado de almidón. El revestimiento de película ideal que permite una liberación dirigida al 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, por lo tanto, 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 peso molecular bajo tal como ácido 5-aminosalicílico (5-ASA, 153,1 Da). Las Figuras 2a y 2b ilustran la pérdida de masa seca determinada experimentalmente de películas delgadas que consisten en diversas mezclas de derivado de almidón:etilcelulosa (relación constante = 1:3) tras la exposición a HCl 0,1 N y tampón de 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 en estas condiciones. Como se puede observar, la pérdida de masa seca de películas con contenido 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 derivado de almidón soluble en agua pueden desprenderse por lixiviación de las películas. Películas de etilcelulosa plastificadas sin polisacárido soluble en agua pierden sólo cantidades muy pequeñas 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 mucho más pronunciada en películas que contienen 25% (p/p) de polisacáridos solubles en agua en comparación con películas de etilcelulosa (plastificada) pura, ya que las velocidades y tasas de absorción de agua incrementadas (Figura 1) de los sistemas mezclados conducen a una movilidad de la cadena polimera 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. 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 en 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, sacarasa, isomaltasa y glucosidasa) en tampón de fosfato pH 6,8 (Figura 3). Claramente, la adición de estas enzimas no afectó significativamente a la cinética de la absorción de agua ni de la 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 inflamatorias del intestino 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* negativa a lactosa, *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 al colon en condiciones fisiológicas en un voluntario sano podrían caer en las condiciones patofisiológicas en el estado patológico de un paciente. Para acometer este punto muy crucial, que se descuida a menudo, se determinaron la absorción de agua y la pérdida de masa seca de películas delgadas que consistían en diversos tipos de mezclas de derivado de almidón:etilcelulosa tras la 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 pérdida de masa seca significativa tras la

5 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 los contenidos del GIT superior) muestran una absorción de agua y una
 10 pérdida de masa seca significativas tras la 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 la 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).

15 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 en condiciones anaerobias a 37°C (Figura 5). Claramente, tipos específicos de bacterias proliferaron 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 adicionalmente del efecto de liberación dirigida del fármaco. Muestras biológicas incubadas sin películas poliméricas alguna o con películas de etilcelulosa (plastificada) pura mostraban un
 20 crecimiento bacteriano mucho menor (Figura 5).

Los nuevos revestimientos de película polimérica identificados para la liberación dirigida al colon están constituidos por mezclas insolubles en agua de polímero:derivado de almidón, particularmente etilcelulosa:BMD, etilcelulosa:almidón de guisantes, etilcelulosa:MD, etilcelulosa:EURYLON® 6 A-PG, etilcelulosa:EURYLON® 6 HP-PG y etilcelulosa:EURYLON® 7 A-PG, que están adaptadas al estado patológico de los pacientes. De manera
 25 importante, una absorción de agua y velocidades y grados de pérdida de masa seca bajos en medios que simulan los contenidos 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 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, de este modo, 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 en el sitio diana en el estado patológico.

Ejemplo 2:

A. Materiales y métodos

35 A.1. Materiales

Maltodextrina ramificada (BMD) (una maltodextrina ramificada soluble en agua, con contenidos elevados de fibra obtenida de almidón de trigo; NUTRIOSE® FB 06, Roquette Freres, Lestrem, Francia); un almidón de guisantes hidroxipropilado y pre-gelatinizado (PS HP-PG) (LYCOAT® RS 780, Roquette Freres), una maltodextrina (GLUCIDEX® 1, Roquette Frères); EURYLON® 7 A-PG (un almidón de maíz acetilado y pre-gelatinizado, con alto contenido de amilosa (70% de amilosa) (Roquette Freres, Lestrem, Francia)), EURYLON® 6 A-PG (un almidón de maíz acetilado y pre-gelatinizado con alto contenido de amilosa (60% de amilosa) (Roquette Freres, Lestrem, Francia) y EURYLON® 6 HP-PG (un almidón de maíz hidroxipropilado y pregelatinizado con alto contenido de amilosa (60% de amilosa) (Roquette Freres, Lestrem, Francia); dispersión acuosa de etilcelulosa (Aquacoat ECD 30; FMC Biopolymer, Filadelfia, USA); citrato de trietilo (TEC; Morflex, Greensboro, EE.UU.).

45 A.2. Preparación de películas poliméricas delgadas

Películas poliméricas delgadas se prepararon moldeando mezclas de diferentes tipos de polisacáridos y dispersión acuosa de etilcelulosa en moldes de Teflon y secando subsiguiente 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 de etilcelulosa, agitando toda la noche; contenido de polímero 15% p/p) a una relación de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 (polímero:polímero p:p), como se indica. Las mezclas se agitaron durante 6 h antes de moldear.

A.3. Caracterización de la película

El grosor de las películas se midió utilizando un medidor del grosor (Minitest 600; Erichsen, Herner, Alemania). El grosor medio de todas las películas se encontraba en el intervalo de 300-340 µm. La cinética de absorción de agua y de pérdida de masa seca se midieron gravimátricamente tras la exposición a: HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8 (Farmacopea USP 30) según lo siguiente: trozos de película de 1,5 x 5 cm se colocaron en recipientes de plástico de 120 ml llenos de 100 ml de medio pre-calentado, seguido de agitación horizontal a 37°C (80 rpm; GFL 3033, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Alemania). A instantes predeterminados se tomaron muestras, se eliminó

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:

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

5

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

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 orificio 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 según lo siguiente:

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

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

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

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

$$\text{Energía en la ruptura por unidad de volumen} = \frac{AUC}{V} \quad (5)$$

20 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 BMD:etilcelulosa

a) Absorción de agua y pérdida de masa seca de películas delgadas

25 La permeabilidad de un revestimiento de película polimérica depende enormemente de su contenido de agua. En un sistema seco, los coeficientes de difusión se aproximan a cero. Al aumentar el contenido de agua, la movilidad de las macromoléculas aumenta y, así, también la movilidad de las moléculas de fármaco incorporadas. Las Figuras 6a y 6b muestran la absorción de agua medida de manera gravimétrica de películas poliméricas, delgadas, basadas en diferentes mezclas de BMD:etilcelulosa tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8 a 37°C.

30 Claramente, la relación de mezclamiento polimérico afecta de manera significativa a las velocidades y grados de penetración del agua resultantes. Al aumentar el contenido de BMD, la cantidad de absorción de agua así como la velocidad de esta etapa de transporte de masa aumentan. Este fenómeno se puede atribuir a la naturaleza más hidrófoba de la etilcelulosa en comparación con el derivado de almidón BMD soluble en agua. Así, se puede esperar que la movilidad de un fármaco dentro de este tipo de películas poliméricas aumente de manera significativa al

35 aumentar los contenidos de BMD. Notablemente, las velocidades y grados de absorción de agua de las películas investigadas fueron mayores en tampón de fosfato pH 6,8 que en HCl 0,1 N (Figura 6b frente a Figura 6a). Esto se puede atribuir a la presencia del emulsionante dodecilsulfato de sodio (SDS) en la dispersión acuosa de etilcelulosa

Aquacoat ECD. A pH bajo, el SDS está protonado y neutro, mientras que a pH 6,8 está desprotonado y cargado de manera negativa. Así, la capacidad para disminuir las tensiones superficiales interfaciales es más pronunciada a pH 6,8, dando como resultado la penetración facilitada de agua en el sistema. De forma importante, incluso las velocidades y grados de absorción de agua más elevadas de los sistemas investigados (hasta una relación de mezclado de BMD:etilcelulosa 1:2) son relativamente bajos (Figura 6). Así, se puede esperar que la liberación prematura del fármaco dentro del GIT superior esté limitada con este tipo de películas poliméricas, con independencia de la relación de mezclado de polímero:polímero en el intervalo investigado.

Además de la cinética de absorción de agua, también el comportamiento de pérdida de masa seca de películas poliméricas delgadas ofrece un conocimiento importante en la capacidad de la última para suprimir o permitir la liberación de fármaco. Los efectos de la relación de mezclado BMD:etilcelulosa sobre la pérdida de masa seca resultante de películas delgadas tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8 se ilustran en la Figuras 7a y 7b, respectivamente. Claramente, ambas, la velocidad y el grado de la pérdida de masa seca aumentaron al aumentar el contenido de BMD. Esto se puede atribuir al menos parcialmente a la lixiviación de este compuesto soluble en agua en los fluidos volumétricos. Sin embargo, se puede esperar que también la difusión del plastificante TEC soluble en agua (que se usa para facilitar la fusión de las nanopartículas de etilcelulosa durante la formación de la película) en el medio de liberación se facilite de manera significativa: Debido a los contenidos crecientes de agua de los sistemas (Figura 6), la movilidad de las cadenas poliméricas aumenta y, así, también la movilidad del plastificante de bajo peso molecular. Obsérvese que la pérdida de masa seca de películas de etilcelulosa (plastificadas) pura se puede atribuir principalmente a dicha lixiviación de TEC y que se observa una (ligera) dependencia del pH de este fenómeno (debido al efecto de SDS discutido anteriormente). De forma importante, la pérdida de masa seca está limitada en todos los casos, y la presencia de la etilcelulosa insoluble en agua en las películas impide eficazmente la lixiviación del derivado de almidón soluble en agua en los fluidos a granel. De nuevo, es probable que la liberación prematura de fármaco en las partes superiores del GIT esté limitada, con independencia de la relación de mezclado polímero:polímero en el intervalo investigado (hasta BMD:etilcelulosa 1:2).

b) Propiedades mecánicas de películas delgadas

Además de absorción de agua y pérdida de masa seca limitadas en el GIT superior, un revestimiento de película polimérica que proporciona suministro de fármaco al colon específico del sitio debe ser suficientemente estable (de manera mecánica) para evitar la formación accidental de fisuras debido al esfuerzo de cizallamiento encontrado en el estómago e intestino delgado in vivo. Además, se podría acumular presión hidrostática significativa en una forma farmacéutica revestida debido a la penetración de agua en el sistema al entrar en contacto con fluidos corporales acuosos. La presencia/ausencia de fármacos y/o excipientes osmóticamente activos en la formulación del núcleo puede afectar enormemente a la importancia de este fenómeno. Es probable que los revestimientos de película frágiles se rompan debido a tales fuerzas de cizallamiento desde fuera (causadas por la movilidad del GIT) y a presiones hidrostáticas del interior (causadas por penetración de agua) a las que se exponen. Para poder estimar el riesgo de dicha formación accidental de fisuras, se midió la energía requerida para romper las películas de BMD:etilcelulosa investigadas, usando un analizador de textura y el ensayo de punción antes y tras la exposición a HCl 0,1 N y tampón de fosfato pH 6,8, respectivamente. Las barras blancas en la Figura 8 indican la estabilidad mecánica de las películas delgadas de BMD:etilcelulosa (plastificadas con 25% p/p de TEC, referido al contenido de etilcelulosa) en el estado seco a temperatura ambiente como una función de la relación de mezclado polimérico. Claramente, la energía en la ruptura de las películas aumentó de manera significativa al aumentar el contenido de etilcelulosa, indicando que este compuesto contribuye principalmente a la estabilidad mecánica del sistema en estas condiciones. De forma importante, todas las películas investigadas muestran una estabilidad mecánica que es susceptible de ser suficiente para resistir el esfuerzo de cizallamiento y la presión hidrostática a que están expuestas dentro del GIT superior a niveles de revestimiento apropiados. Esto se confirmó por la resistencia a la perforación determinada experimentalmente y el % de alargamiento en la ruptura de las películas (datos no mostrados). Sin embargo, se debe señalar que la penetración de agua en los sistemas poliméricos cambia de manera significativa la composición de las películas (Figuras 6 y 7) y, de este modo, sus propiedades mecánicas. En particular, el hecho de que el agua actúe como un plastificante para muchos polímeros y de que el TEC y el derivado de almidón solubles en agua lixivien (al menos parcialmente) de las redes poliméricas, se puede esperar que conduzcan a cambios dependientes del tiempo en la estabilidad mecánica de las películas. Además, los resultados mostrados en la Figura 8 fueron obtenidos a temperatura ambiente y no a temperatura corporal de 37°C. Es bien sabido que la temperatura de una red polimérica puede afectar enormemente a sus propiedades mecánicas, por ej. debido a transiciones de fase vítrea a caucoide.

Por estas razones, la energía requerida para romper las películas de Nurtiose:etilcelulosa investigadas también se midió tras la exposición a HCl 0,1 N durante hasta 2 h y tras la exposición a un tampón de fosfato pH 6,8 durante hasta 8 h a 37°C (Figura 9). Como se puede ver, la estabilidad mecánica de las redes poliméricas disminuyó con el tiempo, con independencia de la relación de mezclado polimérico y del tipo de medio de liberación. Esto se puede atribuir al menos parcialmente a la lixiviación del plastificante soluble en agua TEC y del derivado de almidón en los fluidos a granel. De forma importante, incluso los valores más bajos observados indican que es improbable la formación accidental de fisuras debido a esfuerzo de cizallamiento externo y/o a presión hidrostática interna encontrados in vivo (a niveles de revestimiento apropiados). De nuevo, esto fue consistente con la resistencia a la perforación determinada de manera experimental y el % de alargamiento de las películas, con independencia de la

relación de mezclado polimérico, del tiempo de exposición y del tipo de medio de liberación (datos no mostrados).

c) Efectos del contenido en plastificante

Es bien sabido que el contenido en plastificante puede afectar de manera significativa a las propiedades mecánicas de las películas poliméricas. Para evaluar la importancia de este fenómeno para las mezclas de BMD:etilcelulosa investigadas, se aumentó el porcentaje de TEC incorporado de 25 a 30% p/p (referido al contenido de etilcelulosa). Los contenidos de TEC por debajo de 25% p/p harían difícil la fusión de las nanopartículas de etilcelulosa durante la formación de la película, siendo crucial para esta etapa la movilidad de las cadenas poliméricas. Los contenidos de TEC mayores que 30% p/p aumentan de manera significativa la tendencia a la pegajosidad durante el revestimiento y curado, y de este modo se deberían evitar. Como se puede ver en la Figura 8, la estabilidad mecánica de las películas de BMD:etilcelulosa aumentó de manera significativa al aumentar el contenido de TEC, con independencia de la relación de mezclado polimérico. Esto fue consistente con la resistencia a la perforación y el % de alargamiento de las películas determinados de manera experimental (datos no mostrados). Así, en caso de formulaciones de núcleo osmóticamente muy activas (que dan como resultado formación de presión hidrostática significativa en las formas farmacéuticas al penetrar el agua), los niveles de revestimiento requeridos (que evitan la formación accidental de fisuras) se pueden disminuir al aumentar el contenido de TEC. De nuevo, fue importante vigilar los efectos de los cambios dependientes del tiempo en la composición de las redes poliméricas tras la exposición a HCl 0,1 N y tampón de fosfato pH 6,8, así como del aumento en la temperatura hasta 37°C. Como se puede ver en la Figura 10, la energía requerida para romper las películas disminuyó tras la exposición al medio de liberación por las razones discutidas anteriormente, con independencia de la relación de mezclado polimérico, del contenido inicial de plastificante y del tipo de medio de liberación. De forma importante, en todos los casos, un incremento en el contenido inicial de TEC de 25 a 30% p/p (referido al contenido de etilcelulosa) condujo a estabilidad mecánica aumentada en todos los instantes de tiempo.

Sin embargo, cuando se aumenta el porcentaje del plastificante soluble en agua TEC en las películas poliméricas, también se puede esperar que aumenten las velocidades y grado de la absorción de agua y pérdida de masa seca de los sistemas tras la exposición a medios acuosos. Esto puede conducir de manera potencial a aumentar de manera significativa la permeabilidad al fármaco de las películas poliméricas, dando como resultado la potencial liberación prematura del fármaco dentro del GIT superior. Para estimar la importancia de estos fenómenos, se monitorizó la cinética de absorción de agua y de pérdida de masa seca de las películas investigadas tras la exposición a HCl 0,1 N durante 2 h y tras la exposición a tampón de fosfato pH 6,8 durante 8 h. Se seleccionó el contenido de TEC más elevado (30%) así como las dos relaciones de mezclado de BMD: etilcelulosa más críticas: 1:2 y 1:3 (Figura 11). De forma importante, los cambios que resultan en la cinética de absorción de agua y de pérdida de masa seca se monitorizaron sólo al aumentar el contenido inicial de TEC de 25 a 30%, con independencia de la relación de mezclado polimérico y del tipo de medio de liberación. Así, la estabilidad mecánica de películas de Nurtiose:etilcelulosa se puede mejorar eficazmente al aumentar el nivel de plastificante, sin pérdida de la capacidad de los sistemas para suprimir la liberación de fármaco dentro del GIT superior.

Las mezclas de BMD:etilcelulosa son materiales de revestimiento de películas para sistemas de suministro de fármacos avanzados que permiten la liberación dirigida al colon. De forma importante, las propiedades deseadas del sistema, que se adaptan a las necesidades específicas de un tratamiento particular (por ej., actividad osmótica y dosis del fármaco) se pueden ajustar fácilmente por variación de la relación de mezclado polímero:polímero hasta 1:2, preferentemente entre 1:2 y 1:8, adicionalmente de forma preferente 1:3 a 1:6, véase 1:4 a 1:5, así como el contenido de plastificante entre 25% y 30% p/p, referido al contenido de polímero insoluble en agua.

B.2. Mezclas MD: etilcelulosa

Se ha mostrado en ejemplos previos que las mezclas de etilcelulosa y diferentes tipos de derivados de almidón (en particular MD, PS HP-PG, EURYLON® 7 A-PG, EURYLON® 6 A-PG y EURYLON® 6 HP-PG) permiten suministro de fármaco al colon específico del sitio para mejorar el tratamiento local de enfermedades inflamatorias del intestino. De forma importante, dichas películas sirven como sustratos para la microflora en el estado patológico de pacientes que padecen enfermedades de Crohn y colitis ulcerosa. Sin embargo, aún no está claro cuánto puede afectar la relación de mezclado polímero:polímero a las propiedades de los sistemas resultantes, en particular su cinética de absorción de agua y de pérdida de masa seca así como su resistencia mecánica a esfuerzo interno y externo presentada in vivo.

La Figura 12 muestra los efectos de la composición de películas de MD:etilcelulosa sobre la cinética de absorción de agua y el comportamiento de pérdida de masa seca resultantes tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8, respectivamente. Por motivos de comparación, también se muestran los resultados obtenidos con películas de etilcelulosa pura (plastificada). Claramente, las velocidades y grados de absorción de agua aumentaron de manera significativa cuando aumentó la relación de mezclado MD:etilcelulosa de 1:5 a 1:2. Esto se puede atribuir al hecho de que MD es una maltodextrina y mucho más hidrófila que la etilcelulosa. A contenidos iniciales elevados de MD, el contenido de agua llega a ser significativo, por ejemplo aproximadamente la mitad de las películas consistió en agua en el caso de mezclas 1:2 después de 1 h de exposición a tampón de fosfato pH 6,8. Se puede esperar que esto provoque una supresión eficaz de la liberación de fármacos de bajo peso molecular,

libremente solubles en agua en la exposición del GIT superior, debido a que la movilidad de las macromoléculas aumenta de manera significativa al aumentar el contenido de agua, dando como resultado una movilidad del fármaco creciente. Es probable que se requieran niveles elevados de revestimiento. Sin embargo, la permeabilidad para moléculas de fármaco más grandes (por ejemplo, proteínas) puede ser baja en redes poliméricas, incluso a contenidos elevados de agua. En este caso, la movilidad del fármaco depende esencialmente de la relación "tamaño de molécula de fármaco:tamaño medio de malla de red macromolecular". Los sistemas de suministro de fármacos avanzados con suministro al colon específico del sitio pueden ser atractivos por ejemplo para permitir el suministro sistémico de proteínas tras la administración oral: Si las proteínas están protegidas eficazmente contra el pH bajo y la degradación enzimática en el GIT superior, se podían absorber tras la liberación en el colon. Además, la velocidad de liberación relativa de un fármaco deficientemente soluble en agua puede ser muy baja, incluso si el revestimiento de película contiene cantidades significativas de agua, siempre que la forma farmacéutica permanezca intacta.

De forma interesante, ambas, las velocidades y los grados de absorción de agua fueron mayores en tampón de fosfato pH 6,8 que en HCl 0,1 M, con independencia de la relación de mezclado polimérico (Figura 12, fila superior). Esto se puede atribuir a la presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) en la dispersión acuosa de etilcelulosa (que actúa como un estabilizante) usada para la preparación de la película. A pH bajo, este emulsionante está protonado y es neutro, mientras que a pH 6,8 está desprotonado y cargado de manera negativa. Así, su capacidad para disminuir las tensiones interfaciales aumenta, facilitando la penetración de agua en las redes poliméricas.

Además, las velocidades y grados de pérdida de masa de las películas secas aumentaron de manera significativa al aumentar el contenido de MD (Figura 12, fila inferior). Esto se puede explicar al menos parcialmente por la lixiviación de esta maltodextrina soluble en agua en los fluidos a granel. Sin embargo, también la lixiviación (parcial) del plastificante soluble en agua TEC en los medios de liberación es responsable de este fenómeno. Se requiere TEC para la plastificación de las nanopartículas de etilcelulosa para permitir la formación de películas a partir de dispersiones acuosas. Incluso las películas sin MD pierden alguna masa seca, en particular a pH 6,8. Es de esperar que los contenidos considerables de agua de los sistemas poliméricos que contienen un contenido inicial elevado de MD faciliten la lixiviación del plastificante soluble en agua de bajo peso molecular TEC. De nuevo, los efectos observados fueron más pronunciados tras la exposición a tampón de fosfato pH 6,8 que a HCl 0,1 M (Figura 12), debido a la presencia de SDS.

Además de la cinética de absorción de agua y de pérdida de masa seca apropiadas, los revestimientos de película poliméricos que se destinan a permitir el suministro de fármaco al colon específico del sitio también deben proporcionar estabilidad mecánica suficiente para resistir los diversos esfuerzos mecánicos encontrados in vivo. Esto afecta en particular a: (i) las fuerzas de cizallamiento que resultan de la movilidad del GIT superior y (ii) la presión hidrostática que actúa frente al revestimiento de la película del núcleo de la forma farmacéutica, causada por la entrada de agua conducida de manera osmótica al sistema tras el contacto con fluidos corporales acuosos. Para estimar la capacidad de las mezclas de MD:etilcelulosa investigadas para resistir tales esfuerzos externos e internos, se midieron las propiedades mecánicas de películas delgadas con un analizador de textura y el ensayo de punción. La resistencia a la perforación, el % de alargamiento en la ruptura así como la energía requerida para romper las películas en el estado seco a temperatura ambiente se muestran en la Tabla 2. Claramente, la estabilidad mecánica de los sistemas aumentó al aumentar el contenido de etilcelulosa. Así, el último compuesto es el agente de estabilización en estas redes poliméricas.

Se tiene que señalar que las propiedades mecánicas mostradas en la Tabla 2 se obtuvieron con películas secas a temperatura ambiente. Es bien sabido que el agua actúa como un plastificante para muchos polímeros y, como se puede ver en la Figura 12, cantidades significativas de agua penetran en las películas tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8. Además, la composición de los sistemas poliméricos cambia de manera significativa tras el contacto con los medios de liberación, debido a lixiviación (parcial) de MD y TEC. Además, la resistencia mecánica de las películas poliméricas puede depender significativamente de la temperatura. Los polímeros pueden experimentar, por ejemplo, transiciones de fase vítrea a caudoide cuando aumenta la temperatura hasta 37°C. Por estas razones, las propiedades mecánicas de las mezclas de MD:etilcelulosa investigadas también se determinaron con una exposición de hasta 2 h a HCl 0,1 M y durante una exposición de hasta 8 h a tampón de fosfato pH 6,8. Como se puede ver en la Figura 13, la estabilidad mecánica de las películas poliméricas disminuyó con el tiempo debido a lixiviación parcial de MD y TEC, con independencia de la relación de mezclado polimérico y del tipo de medio de liberación. De forma importante, las estabilidades mecánicas apropiadas se pueden ajustar eficazmente variando la relación de mezclado polímero:polímero (y eventualmente variando el grosor del revestimiento).

B.3-. Mezclas de PS HP-PG:etilcelulosa

La Figura 14 muestra la cinética de absorción de agua y de pérdida de masa seca determinada gravimétricamente de películas delgadas que consisten en diferentes tipos de mezclas de PS HP-PG:etilcelulosa tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de 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 aumentó significativamente cuando se incrementa la relación de derivado de almidón:etilcelulosa de 1:5 a 1:2 (Figura 12, fila superior). Esto se puede atribuir de nuevo al mayor carácter hidrófilo del derivado de almidón 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 aumentó significativamente al aumentar contenidos de PS HP-PG debido a la lixiviación parcial de TEC y derivado de almidón. En todos los casos, las velocidades y grados de la penetración de agua y pérdida de masa seca fueron mayores en tampón de 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 de etilcelulosa. Esto fue cierto para la resistencia a la punción, % del alargamiento en la ruptura y energía en la ruptura en el estado seco a la temperatura ambiente (Tabla 2), así como para la resistencia mecánica en el estado mojado tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8 (Figura 15). La disminución en la energía en la ruptura con el tiempo puede ser atribuida de nuevo a un plastificante parcial y a derivado de almidón que se lixivian en los fluidos a granel, independientemente del tipo de medio de liberación.

B. 4. Mezclas de EURYLON® 7 A-PG:etilcelulosa

En la Figura 16 se muestra la cinética de absorción de agua y 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 de fosfato pH 6,8. EURYLON® 7 A-PG es un almidón de maíz acetilado y pre-gelatinizado con alto contenido de amilosa (70% de amilosa) (Roquette Freres, 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 aumentaron al disminuir los contenidos de etilcelulosa, (ii) las velocidades y grados de pérdida de masa seca aumentaron al aumentar los contenidos de derivado de almidón, (iii) estos efectos fueron más pronunciados en tampón de fosfato pH 6,8 que en HCl 0,1 M. De manera importante, el contenido de agua de las películas tras la exposición durante 2 h a fosfato eran considerables: aproximadamente 50% p/p. Así, también a contenidos iniciales elevados de EURYLON® 7 A-PG es probable que se requieran niveles elevados 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 a base de EURYLON® 7 A-PG:etilcelulosa fue 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 se expusieron a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8, independientemente del tipo de medio de liberación (Figura 17). De manera importante, la variación de la relación de mezclamiento polimérico permitió de nuevo un ajuste eficaz de la estabilidad mecánica de las películas.

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

EURYLON® 6 A-PG es un almidón de maíz acetilado y pre-gelatinizado, con alto contenido de amilosa (60% de amilosa) (Roquette Freres, Lestrem, Francia), y EURYLON® 6 HP-PG es un almidón de maíz hidroxipropilado y pre-gelatinizado con alto contenido de amilosa (60% de amilosa) (Roquette Freres, 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 fue mucho menos pronunciada que la de otras mezclas polímeras investigadas tras la exposición a HCl 0,1 M y tampón de fosfato pH 6,8, respectivamente (Figuras 18 y 20, filas inferiores). Esto fue cierto para ambos, las velocidades y grados de la pérdida de masa seca y para todas las relaciones de mezclamiento polimérico investigadas. En contraposición, las velocidades y grados de absorción de agua de estas películas tras la exposición a los diferentes medios de liberación fueron similares a los de las otras mezclas de derivado de almidón:etilcelulosa, alcanzando contenidos de agua de aproximadamente 50% p/p después de 1-2 h de exposición a tampón de fosfato pH 6,8 en el caso de contenidos iniciales elevados de derivado de almidón (Figuras 18 y 20, filas superiores). Así, también para mezclas de EURYLON® 6 A-PG:etilcelulosa y EURYLON® 6 HP-PG:etilcelulosa es probable que se requieran niveles elevados de revestimiento para suprimir la 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 las de mezclas de EURYLON® 7 A-PG:etilcelulosa a las mismas relaciones de mezclamiento. Como en el caso de estas últimas mezclas, la exposición a HCl 0,1 M o tampón de fosfato pH 6,8 dio como resultado una disminución en la estabilidad mecánica de las redes macromoleculares, independientemente del tipo de medio de liberación y de la relación de mezclamiento polimérico (Figuras 19 y 21). De manera importante, las estabilidades del sistema deseadas pueden ajustarse de nuevo eficazmente variando la relación de mezclamiento polimérico.

Las propiedades clave de películas poliméricas delgadas que consisten en mezclas de derivado de almidón: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 pueden ajustar eficazmente variando la relación de mezclamiento polimérico y el tipo de derivado de almidón. Esto incluye la cinética de absorción de agua y de pérdida de masa seca, así como las propiedades mecánicas de las películas antes y tras la exposición a medios acuosos que simulan el contenido del GIT superior. Así, se pueden proporcionar fácilmente amplias gamas de propiedades de revestimiento de películas, que se adaptan a las necesidades del tratamiento con fármacos respectivo (por ejemplo, actividad osmótica de la formulación del núcleo y dosis administrada).

Ejemplo 3:

A. Materiales y métodos

A.1. Materiales

5 Maltodextrina ramificada (NUTRIOSE® FB 06; Roquette Freres, Lestrem, Francia); dispersión acuosa de etilcelulosa (Aquacoat ECD 30; FMC Biopolymer, Filadelfia, USA); citrato de trietilo (TEC; Morflex, Greensboro, USA); ácido 5-aminosalicílico (5-ASA; Sigma-Aldrich, Isle d'Abeau Chesnes, Francia); celulosa microcristalina (Avicel PH 101; FMC Biopolymer, Bruselas, Bélgica); bentonita y polivinilpirrolidona (PVP, Povidona K 30) (Cooperation Pharmaceutique Francaise, Melun, Francia); pancreatina (de páncreas de mamífero = mezcla de amilasa, proteasa y lipasa) y pepsina (Fisher Bioblock, Illkirch, Francia); extractos de ternera y levadura así como triptona (= producto de la digestión pancreática de caseína) (Becton Dickinson, Sparks, USA); hidrocloreuro de L-cisteína hidratado (Acros Organics, Geel, Bélgica); disolución de Ringer cisteinada (Merck, Darmstadt, Alemania). Pentasa, Asacol y Lialda son productos comercialmente disponibles producidos por Ferring, Meduna y Shire, respectivamente.

A.2. Preparación de núcleos de peletes cargados con fármaco

15 Se prepararon núcleos de peletes cargados con fármaco (diámetro: 710-1000 μm ; 60% de 5-ASA, 32% de celulosa microcristalina, 4% de bentonita, 4% de PVP) por extrusión y esferonización. Los polvos se mezclaron en una granuladora de alta velocidad (Gral 10; Collette, Antwerp, Bélgica) y se añadió agua purificada hasta que se consiguió una masa homogénea. La mezcla de polvo húmeda se hizo pasar por una extrusora de cilindro (SK M/R; Alexanderwerk, Remscheid, Alemania). Los extrusados se esferonizaron subsiguientemente a 520 rpm (Spheronizer Model 15; Calveva, Dorset, UK) y se secaron en un lecho fluidizado (ST 15; Aeromatic, Muttentz, Suiza) a 40°C durante 30 min.

A.3. Preparación de peletes revestidos

25 Se disolvió BMD en agua purificada (5% p/p), se mezcló con dispersión acuosa de etilcelulosa plastificada (25% de TEC, agitando durante toda la noche; 15% p/p de contenido de polímero) a una relación de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 (p/p), y se agitó durante 6 h previamente al revestimiento. Los núcleos de peletes cargados con fármaco se revistieron en una máquina de revestimiento de lecho fluidizado provista de un inserto Wurster (Strea 1; Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Suiza) hasta que se consiguió una ganancia de peso de 5, 10, 15 y 20% (p/p). Los parámetros del procedimiento fueron como sigue: temperatura de entrada = $39 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura del producto = $40 \pm 2^\circ\text{C}$, velocidad de pulverización = 1,5-3 g/min, presión de atomización = $1,2 \times 10^2$ kPa (1,2 bares), diámetro de la boquilla = 1,2 mm. Después de revestir, las perlas se fluidizaron adicionalmente durante 10 min y se curaron con posterioridad en una estufa durante 24 h a 60°C.

A.4. Liberación de fármaco in vitro

La liberación de fármaco de los peletes revestidos se midió usando 3 montajes experimentales diferentes, que simulaban las condiciones en el:

35 (i) GIT superior: Los peletes se pusieron en envases de plástico de 120 ml, cargados con 100 ml de medio de disolución: HCl 0,1 M (que contiene opcionalmente 0,32% de pepsina) durante las primeras 2 h, después cambio de medio completo a tampón de fosfato pH 6,8 (USP 30) (que contiene opcionalmente 1% de pancreatina). Los matraces se agitaron en un agitador horizontal (80 rpm; GFL 3033; Gesellschaft fuer Labortechnik, Burgwedel, Alemania). A instantes de tiempo predeterminados, se retiraron muestras de 3 ml y se analizaron de manera espectrofotométrica con luz ultravioleta ($\lambda = 302,6$ nm en HCl 0,1 M; $\lambda = 330,6$ nm en tampón de fosfato pH 6,8) (Shimadzu UV-1650, Champs sur Marne, Francia). En presencia de enzimas, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 11.000 rpm y se filtraron con posterioridad (0,2 μm) previo a las medidas con luz ultravioleta. Cada experimento se realizó por triplicado.

45 (ii) GIT completo, sin heces: Para simular el aumento gradual en el pH a lo largo del GIT, se midió la liberación de fármaco usando el Aparato 3 USP (Bio-Dis; Varian, París, Francia). Los peletes se pusieron en recipientes de 250 ml cargados con 200 ml de HCl 0,1 M. La velocidad de inmersión fue 10, 20 ó 30 dpm (como se indica). Después de 2 h, los peletes se transfirieron a tampón de fosfato pH 5,5 (Eur. Pharm). La Tabla 3 indica los cambios posteriores y los tiempos de exposición para los diferentes medios de liberación. A instantes de tiempo predeterminados, se retiraron muestras de 3 ml y se analizaron de manera espectrofotométrica con luz ultravioleta ($\lambda = 306,8/328,2/330,6/330,2$ a pH = 5,5/6,0/6,8/7,0/7,4) como se describió anteriormente.

50 (iii) GIT completo, con heces: para simular el tránsito por el GIT superior, los peletes se expusieron a HCl 0,1 M durante 2 h y con posterioridad a tampón de fosfato pH 6,8 ó 7,4 (USP 30) durante 9 h en un Aparato 3 USP (Bio- Dis). Después, los peletes se transfirieron a matraces de 120 ml cargados con 100 ml de medio de cultivo inoculado con heces de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino, medio de cultivo inoculado con un tipo específico de bifidobacterias, medio de cultivo inoculado con una mezcla de bifidobacterias, bacteroides y E. coli, o medio de cultivo exento de heces y bacterias por motivos de comparación. Las muestras se incubaron a 37°C en condiciones anaerobias (5% de CO₂, 10% de H₂, 85% de N₂) y agitación suave. El medio de cultivo se

preparó disolviendo 1,5 g de extracto de ternera, 3 g de extracto de levadura, 5 g de triptona, 2,5 g de NaCl y 0,3 g de hidrocloreto de L-cisteína hidratado en 1 l de agua destilada (pH 7,0 ± 0,2) y posterior esterilización en un autoclave. Heces de pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa así como heces de individuos sanos se diluyeron 1:200 con disolución de Ringer cisteinada; 2,5 ml de esta suspensión se diluyeron con medio de cultivo hasta 100 ml. A instantes de tiempo predeterminados, se retiraron muestras de 2 ml, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min, se filtraron (0,22 µm) y se analizaron para determinar el contenido de fármaco usando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC; ProStar 230; Varian, París, Francia). La fase móvil consistió en 10% de metanol y 90% de una disolución acuosa de ácido acético (1% p/v) [25]. Se inyectaron muestras en columnas Pursuit C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm), el caudal fue 1,5 ml/min. El fármaco se detectó de manera espectrofotométrica con luz ultravioleta a $\lambda=300$ nm.³

B Resultados y discusión

B. 1. Liberación de fármaco en el GIT superior

Un revestimiento de película ideal que permite el suministro de un fármaco al colon específico del sitio debería suprimir completamente la liberación de fármaco en el GIT superior. Sin embargo, una vez que se alcanza el colon, la liberación de fármaco debería ser controlada en el tiempo (esto puede incluir liberación rápida y completa). Mezclas del derivado de almidón BMD y etilcelulosa se han mostrado en el ejemplo precedente como nuevas películas poliméricas prometedoras, que muestran bajas velocidades y grados de absorción de agua y pérdida de masa seca tras la exposición a medios de liberación que simulan el tránsito por el estómago e intestino delgado. Sin embargo, una vez que se alcanza el colon, sirven como sustratos para la microflora en pacientes con la enfermedad inflamatoria del intestino y pierden una masa seca significativa y absorben considerables cantidades de agua. Aún, era desconocido si estas nuevas películas poliméricas pueden controlar de manera adecuada la liberación de fármaco a partir de formas farmacéuticas sólidas recubiertas.

La Figura 22 muestra la velocidad de liberación de fármaco in vitro de 5-ASA a partir de peletes revestidos con mezclas de BMD:etilcelulosa 1:2 a diferentes niveles de revestimiento tras la exposición a HCl 0,1 M durante 2 h y cambio posterior de medio completo a tampón de fosfato pH 6,8 (USP) en matraces agitados a 37°C (curvas continuas). Claramente, la velocidad de liberación de fármaco relativa disminuyó al aumentar el nivel de revestimiento, debido a la longitud creciente de las rutas de difusión. Sin embargo, incluso a 20% p/p de nivel de revestimiento, la liberación de fármaco fue aún significativa en estas condiciones, liberándose aproximadamente 20% del 5-ASA después de 11 h. Se tiene que señalar que estos resultados se obtuvieron en medios de liberación exentos de enzimas. Esto no refleja de manera apropiada las condiciones in vivo: La presencia de enzimas digestivas modifica de manera potencial las propiedades de revestimiento de las películas y puede dar como resultado una liberación de fármaco mucho más rápida. Para estimar la importancia de este fenómeno, se añadió 0,32% de pepsina al HCl 0,1 M y 1% de pancreatina al tampón de fosfato pH 6,8. Las curvas de puntos en la Figura 22 muestran la cinética de liberación de fármaco respectiva medida experimentalmente en estas condiciones. De forma importante, sólo hubo un ligero incremento/ningún efecto en todos los casos, indicando que las enzimas no pueden degradar este revestimiento de película polimérica en un grado considerable en estas condiciones (por ejemplo, en presencia de etilcelulosa). No obstante, las velocidades de liberación de fármaco observadas incluso a niveles de revestimiento superiores fueron demasiado elevadas.

Para disminuir la velocidad de liberación de 5-ASA a partir de los peletes investigados, se aumentó el contenido inicial de etilcelulosa en el revestimiento de la película. Como se mostró previamente, las velocidades y los grados de absorción de agua, así como las velocidades y grados de pérdida de masa de película seca, disminuyeron al disminuir el contenido inicial de BMD, si las películas libres se exponían a HCl 0,1 N y tampón de fosfato pH 6,8, respectivamente. La Figura 23 muestra los efectos de la relación de mezclado de BMD:etilcelulosa sobre la cinética de liberación de 5-ASA resultante de los peletes investigados. Claramente, la velocidad de liberación de fármaco relativa disminuyó de manera significativa cuando disminuía la relación de mezclado polímero:polímero de 1:2 a 1:5. Además, en todos los casos, la velocidad de liberación disminuyó al aumentar el nivel de revestimiento. Como se puede ver en la Figura 23, un nivel de revestimiento de 15-20% a una relación de mezclado de BMD:etilcelulosa de 1:4 ó 1:5 es suficiente para suprimir casi completamente la liberación de fármaco en estas condiciones, que simulan el tránsito por el GIT superior. Obsérvese que todos los tiempos de tránsito se eligieron de tal manera que se puede esperar que estén por encima del tiempo de tránsito real in vivo (las peores condiciones del caso) [26,27]. Así, se puede esperar que el comportamiento in vivo de los peletes sea incluso mejor. De forma importante, se observó poco a ningún efecto cuando se añadió 0,32% de pepsina y 1% de pancreatina a los medios de liberación, con independencia del nivel de revestimiento y la relación de mezclado polimérico (curvas de puntos en la Figura 23). Sin embargo, en estos experimentos, el aumento gradual en el pH del medio de liberación por todo el GIT superior fue mucho más simplificado. Además, el esfuerzo mecánico a que se expusieron los peletes no fue muy importante (agitación horizontal en matraces a 80 rpm). In vivo, fuerzas de cizallamiento mecánicas significativas (causadas por la movilidad del GIT superior) pueden inducir la formación de fisuras en los revestimientos de la película polimérica, dando como resultado velocidades de liberación de fármaco mucho mayores. Para simular mejor estos dos aspectos importantes, los peletes revestidos con 20% de BMD:etilcelulosa a una relación de mezclado de 1:4 y 1:5 también se liberaron en un aparato 3 USP usando los medios de liberación y los tiempos de tránsito indicados en la Tabla 3. Se estudiaron tres velocidades de inmersión diferentes: (i) elevada: 30 dpm durante 11,5 h, después 20 dpm, (ii) media: 20 dpm durante 11,5 h, después 10 dpm y (iii) baja:

10 dpm durante 11,5 h, después 5 dpm. Claramente, la liberación de 5-ASA se suprimió eficazmente también en estas condiciones más rigurosas, en particular a la relación de mezclamiento BMD:etilcelulosa 1:5 (Figura 24). De nuevo, obsérvese que los periodos de liberación elegidos son condiciones no fisiológicas y representan condiciones extremas (el peor caso). Se puede esperar que la realización in vivo de estas mezclas poliméricas sea mejor. Así, la estabilidad mecánica de estos revestimientos de película es suficiente incluso tras la exposición a unas fuerzas de cizallamiento considerables durante periodos de tiempo prolongados.

B.2. Liberación de fármaco en el colon

Una vez que se alcanza el colon, el revestimiento de la película polimérica (que suprime de manera eficaz la liberación de fármaco en el GIT superior) debería llegar a ser permeable para el fármaco. La Figura 25 muestra la liberación de 5-ASA a partir de los peletes investigados revestidos con 15% y 20% p/p de BMD:etilcelulosa a las siguientes tres relaciones de mezclamientos: 1:3, 1:4 ó 1:5. El medio de liberación fue HCl 0,1 M durante las primeras 2 h, que con posterioridad se reemplazaron completamente por tampón de fosfato pH 6,8 durante 9 h. Durante las últimas 10 h, los peletes se expusieron a heces de pacientes con la enfermedad inflamatoria del intestino y se incubaron en condiciones anaerobias (curvas continuas). Claramente, la liberación de 5-ASA en los medios que simulan el tránsito por el GIT superior se suprimió de manera eficaz, mientras que se observó un aumento significativo en la velocidad de liberación una vez que los peletes se expusieron a las heces de los pacientes. Este aumento repentino en la permeabilidad del fármaco se puede atribuir al hecho de que la BMD:etilcelulosa sirve como sustrato para las enzimas segregadas por la microflora en pacientes que padecen enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (dibujo en la Figura 25). Obsérvese que la viabilidad de esta microflora está limitada in vitro. Así, es probable que la actividad enzimática esté subestimada en las condiciones experimentales determinadas. Las bacterias in vivo producen de manera continua las enzimas respectivas, que pueden degradar el derivado de almidón en los revestimientos de la película. Así, es improbable que tenga lugar in vivo la igualación de los efectos de la liberación de fármaco por debajo de 100% como se observa en este estudio.

Por motivos de comparación, la liberación de 5-ASA también se midió tras la exposición a los medios de liberación que simulan las condiciones en el GIT superior seguido de la exposición a un medio de cultivo sin heces del paciente en condiciones anaerobias (curvas de puntos en la Figura 25). De forma importante, no se observó aumento repentino en la velocidad de liberación de fármaco después de 12 h. Esto confirma la hipótesis de que el aumento significativo en la permeabilidad de los revestimientos de películas está causado por la degradación enzimática (parcial) de este tipo de sistemas poliméricos por las enzimas presentes en las heces de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino.

Se tiene que señalar que sólo se pueden usar muestras fecales recientes para las medidas de liberación de fármaco in vitro (debido a la viabilidad limitada de la microflora compleja). Puesto que es probable que la disponibilidad de dichas muestras esté restringida en la práctica, en particular para aplicaciones en el uso rutinario, las bacterias más importantes en las muestras fecales se tuvieron que identificar y se tuvieron que desarrollar dos medios de liberación alternativos que simulaban las condiciones en el colon de un sujeto. La Figura 26 muestra las velocidades de liberación de 5-ASA determinadas experimentalmente a partir de peletes revestidos con 15 ó 20% de BMD:etilcelulosa a una relación de mezclamiento de 1:3, 1:4 ó 1:5, respectivamente. Los peletes se expusieron a HCl 0,1 M durante las primeras 2 h, subsiguientemente a tampón de fosfato pH 6,8 durante 9 h, y finalmente a cualquier medio de cultivo que contenía una mezcla de bifidobacterias, bacteroides y *Escherichia coli* (Figura 26a) o a un medio de cultivo que contenía *Bifidobacterium* (Figura 26b). Claramente, el aumento repentino en la velocidad de liberación relativa tras la exposición a estos medios de liberación de fármaco "alternativos" que simulan las condiciones del colon fue similar al observado en heces de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (Figura 26 frente a Figura 25). Así, estos medios pueden ser buenos sustitutos para muestras fecales reales.

La Figura 27 ilustra la cinética de liberación de 5-ASA determinada de manera experimental de tres productos comercialmente disponibles: peletes de Pentasa, cápsulas Asacol llenas de gránulos recubiertos, y comprimidos Lialda. Los peletes Pentasa consisten en núcleos de iniciadores cargados con 5-ASA revestidos con etilcelulosa. Como se puede ver, la liberación de fármaco ya empieza en el GIT superior, que es consistente con informes en la bibliografía [28]. Las cápsulas Asacol se llenan de gránulos cargados con 5-ASA, que se revisten con Eudragit S: un poli(metacrilato de acrílico), que es insoluble a pH bajo, pero llega a ser soluble a pH > 7. Para poder proporcionar condiciones de inmersión usando el aparato de liberación Bio-Dis y el programa de tiempo seleccionado para cambios de medios, se abrieron cápsulas de gelatina dura y se colocaron 0,05 g de gránulos en cada recipiente. Como se puede ver en la Figura 27, la liberación de 5-ASA ya es significativa en el GIT superior en las condiciones investigadas. Obsérvese que el comportamiento de este tipo de sistema de suministro de fármacos depende esencialmente del pH del entorno la que se exponen los gránulos. Los comprimidos Lialda son matrices que constan de compuestos hidrófilos y lipófilos [carmelosa de sodio, carboximetilalmidón sódico (tipo A), talco, ácido esteárico y cera de carnauba], en las que se incorpora el fármaco. Estos comprimidos de matriz de liberación controlada están revestidos con una mezcla de Eudragit L y Eudragit S: dos poli(metacrilatos de acrílico). Como se puede ver en la Figura 27, la liberación de 5-ASA se suprime de manera eficaz en los medios de liberación que simulan el contenido del GIT superior en las condiciones investigadas. Una vez que los sistemas se exponen a los medios del colon, empieza la liberación de fármaco. Notablemente, la presencia/ausencia de muestras fecales en estas condiciones no mostró un efecto muy pronunciado en ninguna de las formulaciones investigadas.

5 Los peletes revestidos de BMD: etilcelulosa recién desarrollados proporcionan la principal ventaja: (i) ser una forma farmacéutica de múltiples unidades, permitiendo menos variabilidad en los tiempos de tránsito gástrico, una distribución más homogénea por todo los contenidos de la GIT, y evitar el efecto “todo o nada” de las formas farmacéuticas de una sola unidad, (ii) suprimir con eficacia la liberación de fármaco en el GIT superior, (iii) proporcionar liberación de fármaco controlada en el tiempo en el colon, cuyo comienzo es inducido por enzimas que están presentes en el colon de enfermedades inflamatorias del intestino, (iv) contener el derivado de almidón BMD, cuya actividad prebiótica no se inhibe de manera sorprendente cuando se mezcla con la etilcelulosa, normalizándose la microflora en el colon de los pacientes.

10 Las mezclas de BMD:etilcelulosa de los nuevos revestimientos poliméricos de las películas permiten según la invención el suministro de fármacos al colon específico del sitio (por ejemplo, 5-ASA). De manera importante, estas nuevas barreras poliméricas se adaptan a las condiciones en el sitio diana, especialmente con respecto a la microflora del estado patológico y el pH del entorno. Además, el segundo efecto de este nuevo revestimiento de películas poliméricas son los efectos prebióticos significativos del BMD, normalizando la microflora en el colon, que es particularmente beneficioso para pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del intestino.

15 Tabla 1

	Sujetos sanos	Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa
Número	10	11	5
Edad media	40+/-15	32+/-12	36+/-20
Recuentos medios 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			
<i>Bacteroides</i>	9	10	3
<i>Prevotella</i>	2	2	2
<i>Fusobacterium</i>	3	3	2
<i>Veillonella</i>	0	0	1
<i>Clostridium</i>	0	5	1
<i>Bifidobacterium</i>	9	3	1
Otros bacilos Gram +	3	2	2
Cocos Gram +	1	2	0
Aerobios			
<i>Enterobacteria</i>	1	3	2
<i>Escherichia coli</i>	1	2	1
<i>Citrobacter freundii</i>	0	2	1
<i>Lactobacillus</i>	0	2	0
<i>Streptococcus</i>	0	2	0

ES 2 425 762 T3

	Sujetos sanos	Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa
Recuentos medios agar McConkey	6,30+/-1,19	7,16+/-1,48	8,01+/-1,06
Número de cepas	10	14	8
<i>Escherichia coli</i>	10	6	4
<i>E. coli lac-</i>	0	1	0
<i>Citrobacter freundii</i>	0	3	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	2	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	1	0
Otros bacilos Gram -	0	0	1

Tabla 2:

	Relación de mezclamiento	Resistencia a la perforación ± (s), MPa	Alargamiento en la ruptura ± (s), %	Energía en la ruptura ± (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)

	Relación de mezclamiento	Resistencia a la perforación ± (s), MPa	Alargamiento en la ruptura ± (s), %	Energía en la ruptura ± (s), MJ/m ³
	1:5	0,87 ± (0,03)	0,77 ± (0,05)	0,070 ± (0,010)

Tabla 3.

Segmento de GI simulado	Tiempo de exposición	Medio de liberación	pH
Estómago	2h	HCl 0,1 M	1,2
Duodeno	0,5h	Tampón de fosfato (Eur. Pharm. 5)	5,5
Yeyuno-Íleon	9h	Tampón de fosfato (USP 30)	6,8
Ciego	0,5h	Tampón de fosfato (USP 30)	6,0
Colon proximal	6h	Tampón de fosfato (USP 30)	7,0
Colon distal	18h	Tampón de fosfato (USP 30)	7,4

Referencias

- 5 ¹ Y. Meissner, A. Lamprecht, Alternative drug delivery approaches for the therapy of inflammatory bowel disease, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2878-2891.
- ² S. Bondesen, Intestinal fate of 5-aminosalicylic acid: regional and systemic kinetic studies in relation to inflammatory bowel disease, *Pharmacol. Toxicol.* 81 (Suppl 2) (1997) 1-28.
- 10 ³ A. Lamprecht, A. Stallmach, Y. Kawashima, C.M. Lehr, Carrier systems for the treatment of inflammatory bowel disease, *Drugs Fut.* 27 (2002) 961-971.
- ⁴ S. Haupt, A. Rubinstein, The colon as a possible target for orally administered peptides and proteins, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 19 (2002) 499-545.
- 15 ⁵ J.H. Cummings, S. Milojevic, M. Harding, W.A. Coward, G.R. Gibson, R.L. Botham, S.G. Ring, E.P. Wraight, M.A. Stockham, M.C. Allwood, J.M. Newton, *In vivo* studies of amylose- and ethylcellulose-coated [¹³C] glucose microspheres as a model for drug delivery to the colon, *J. Control. Release* 40 (1996) 123-131.
- ⁶ S. Milojevic, J.M. Newton, J.H. Cummings, G.R. Gibson, R.L. Botham, S.G. Ring, M. Stockham, M.C. Allwood, Amylose as a coating for drug delivery to the colon: Preparation and *in vitro* evaluation using 5-aminosalicylic acid pellets, *J. Control. Release* 38 (1996) 75-84.
- 20 ⁷ S. Milojevic, J.M. Newton, J.H. Cummings, G.R. Gibson, R.L. Botham, S.G. Ring, M. Stockham, M.C. Allwood, Amylose as a coating for drug delivery to the colon: Preparation and *in vitro* evaluation using glucose pellets, *J. Control. Release* 38 (1996) 85-94.
- ⁸ L. Yang, J.S. Chu, J.A. Fix, Colon-specific drug delivery: new approaches and *in vitro/in vivo* evaluation, *Int. J. Pharm.* 235 (2002) 1-15.
- 25 ⁹ C.W. Leong, J.M. Newton, A.W. Basit, F. Podczeczek, J.H. Cummings, S.G. Ring, The formation of colonic digestible films of amylose and ethylcellulose from aqueous dispersions at temperatures below 37°C, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54 (2002) 291-297.
- ¹⁰ L.F. Siew, S.M. Man, A.W. Basit, J.M. Newton, Amylose formulations for drug delivery to the colon: a comparison of two fermentation models to assess colonic targeting performance *in vitro*, *Int. J. Pharm.* 273 (2004) 129-134.
- 30 ¹¹ L.F. Siew, A.W. Basit, J.M. Newton, The Properties of amylase-ethylcellulose films cast from organic-based solvents as potential coatings for colonic drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (2000) 133-139.
- ¹² A. Gazzaniga, P. Iamartino, G. Maffione, M.E. Sangalli, Oral delayed-release system for colonic specific delivery, *Int. J. Pharm.* 108 (1994) 77-83.

- ¹³ A. Gazzaniga, M.E. Sangalli, F. Giordano, Oral Chronotropic drug delivery systems: Achievement of time and/or site specificity, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40 (1994) 246-250.
- ¹⁴ M.E. Sangalli, A. Maroni, L. Zema, C. Buseti, F. Giordano, A. Gazzaniga, *In vitro* and *in vivo* evaluation of an oral system for time and/or site-specific drug delivery, *J. Control. Release* 73 (2001) 103-110.
- 5 ¹⁵ A. Gazzaniga, A. Maroni, M.E. Sangalli, L. Zema, Time-controlled oral delivery systems for colon targeting, *Expert Opinion on Drug Delivery* 3 (5) (2006) 583-597.
- ¹⁶ F. Lecomte, J. Siepmann, M. Walther, R.J. MacRae, R. Bodmeier, 2004a. Polymers blends used for the aqueous coating of solid dosage forms: importance of the type of plasticizer. *J. Control. Release* 99, 1-13.
- 10 ¹⁷ F. Lecomte, J. Siepmann, M. Walther, R.J. MacRae, R. Bodmeier, 2004b. Polymer blends used for the coating of multiparticulates: Comparison of aqueous and organic coating techniques. *Pharm. Res.* 21 (5), 882-890.
- ¹⁸ V.R. Sinha, R. Kumria, Microbially triggered drug delivery to the colon, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18 (2003) 3-18.
- ¹⁹ V. R. Sinha, R. Kumria, Polysaccharides in colon-specific drug delivery, *Int. J. Pharm.* 224 (2001) 19-38.
- ²⁰ D.R. Friend, New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 247-265.
- 15 ²¹ J. El Yamani, C. Mizon, C. Capon, J.F. Colombel, B. Fournet, A. Cortot, J. Mizon, Decreased fecal exoglycosidase activities identify a subset of patients with active Crohn's Disease, *Clin. Sci.* 83 (1992) 409-415.
- ²² O. Carrette, C. Favier, C. Mizon, C. Neut, A. Cortot, J.F. Colombel, J. Mizon, Bacterial enzymes used for colon-specific drug delivery are decreased in active Crohn's Diseases, *Digestive Diseases and Sciences* 40 (1995) 2641-2646.
- 20 ²³ C. Favier, C. Neut, C. Mizon, A. Cortot, J.F. Colombel, J. Mizon, Fecal β -D-galactosidase production and bifidobacteria are decreased in Crohn's Disease, *Digestive Diseases and Sciences* 42 (1997) 817-822.
- ²⁴ D. Siccardi, J.R. Turner, J. Mrsny, Regulation of intestinal epithelial function: a link between opportunities for macromolecular drug delivery and inflammatory bowel disease, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 219-235.
- 25 ²⁵ L.F. Siew, A.W. Basit, J.M. Newton, The potential of organic-based amylose-ethylcellulose film coatings as oral colon-specific drug delivery systems, *AAPS PharmSciTech* 1 (3) (2000) article 22.
- ²⁶ P.J. Watts, L. Illum, Colonic drug delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23 (9) (1997) 893-913.
- ²⁷ S.S. Davis, J.G. Hardy, J.G. Fara, Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine, *Gut* 27 (1986) 886-892.
- 30 ²⁸ I.R., Wilding, C.J., Kenyon, G., Hooper, Gastrointestinal spread of oral prolonged-release mesalazine microgranules (Pentasa) dosed as either tablets or sachet, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14 (1999) 163-169.

REIVINDICACIONES

1. Una forma de dosificación de suministro de liberación controlada para la liberación controlada de un ingrediente activo, que comprende
- una partícula central, en la que el ingrediente activo está dispersado o disuelto, y
- 5 - una mezcla polimérica de revestimiento de al menos un polímero insoluble en agua y: una composición de al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en almidones modificados y almidones de legumbres, mostrando dicha composición un contenido de amilosa de entre 25 y 45% en peso seco con respecto al peso seco de almidón, o al menos una dextrina indigestible o maltodextrina indigestible.
2. La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho almidón modificado está estabilizado.
3. La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, en la que la maltodextrina indigestible o dextrina indigestible tiene entre 15 y 35% de enlaces glucosídicos 1->6, un contenido de azúcar reductor menor que 20%, un índice de polimolecularidad menor que 5 y una masa molecular media numérica Mn a lo sumo igual a 4.500 g/mol.
- 15 4. La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la mezcla polimérica comprende un plastificante, preferiblemente en un contenido entre 25% y 30% p/p referido al contenido de polímero insoluble en agua.
5. La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polímero insoluble en agua se selecciona del grupo que consiste en polímeros de ésteres acrílicos y/o metacrílicos, polímeros o copolímeros de acrilato o metacrilato, poli(ésteres vinílicos), poli(acetatos de vinilo), ésteres de ácido poliacrílico, y copolímeros de butadieno-estireno, copolímeros de éster de metacrilato, 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.
- 20 6. La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con la reivindicación 4 o reivindicación 5, en la que 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.
7. La forma de dosificación de suministro de liberación controlada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha forma de dosificación de suministro de liberación controlada es una forma de dosificación de multipartículas.
- 30 8. Un método para preparar una forma de dosificación de suministro de liberación controlada según las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo dicho método:
- o formar una mezcla polimérica de:
 - al menos un polímero insoluble en agua y
 - una composición de al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en almidones modificados y almidones de legumbres, mostrando dicha composición un contenido de amilosa de entre 25 y 45% en peso seco con respecto al peso seco de almidón, o al menos una dextrina indigestible o maltodextrina indigestible,
 - o embeber dicho ingrediente activo en la mezcla polimérica, revistiendo una partícula central en la que está dispersado o disuelto el ingrediente activo.
- 40

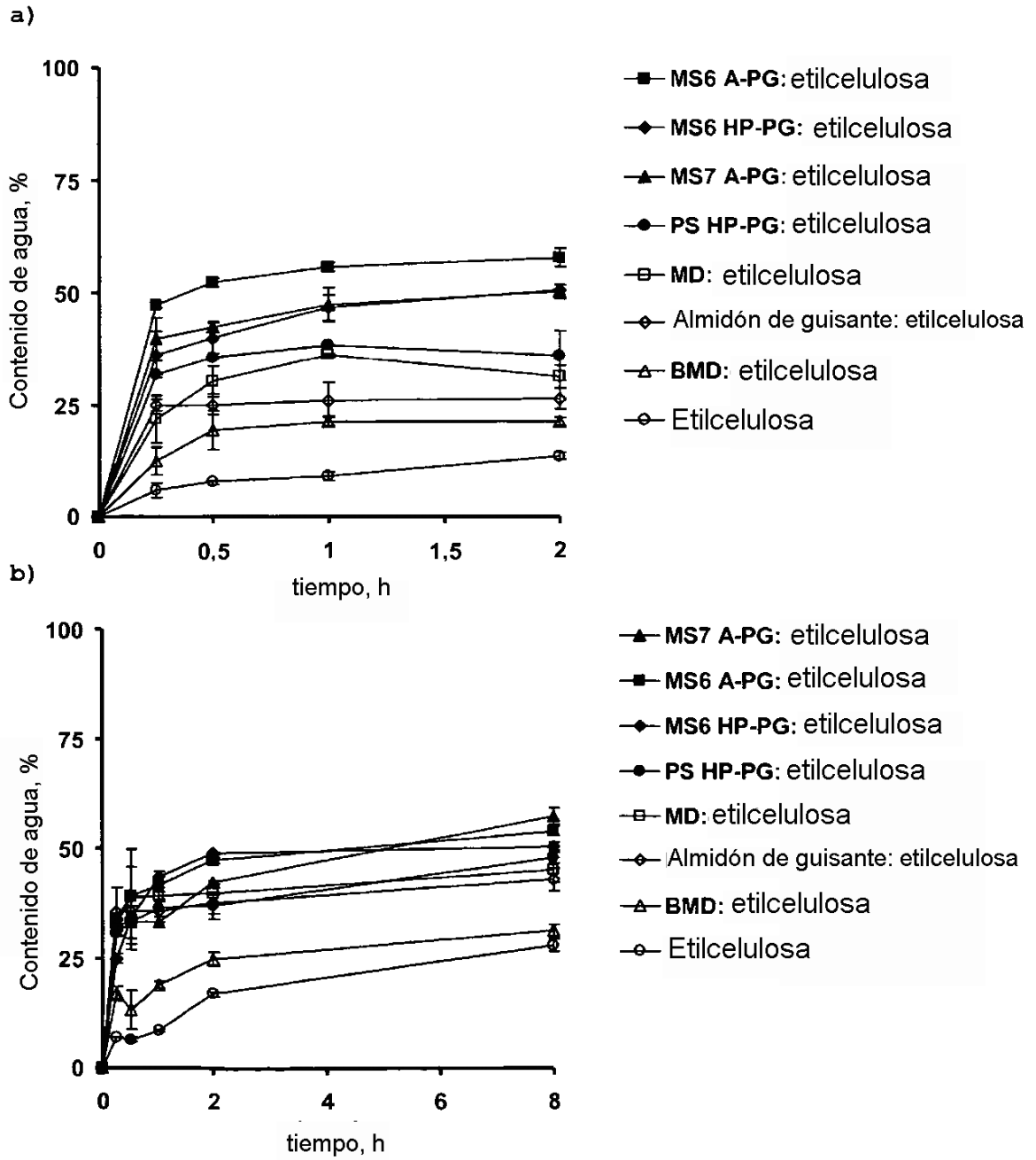


Figura 1

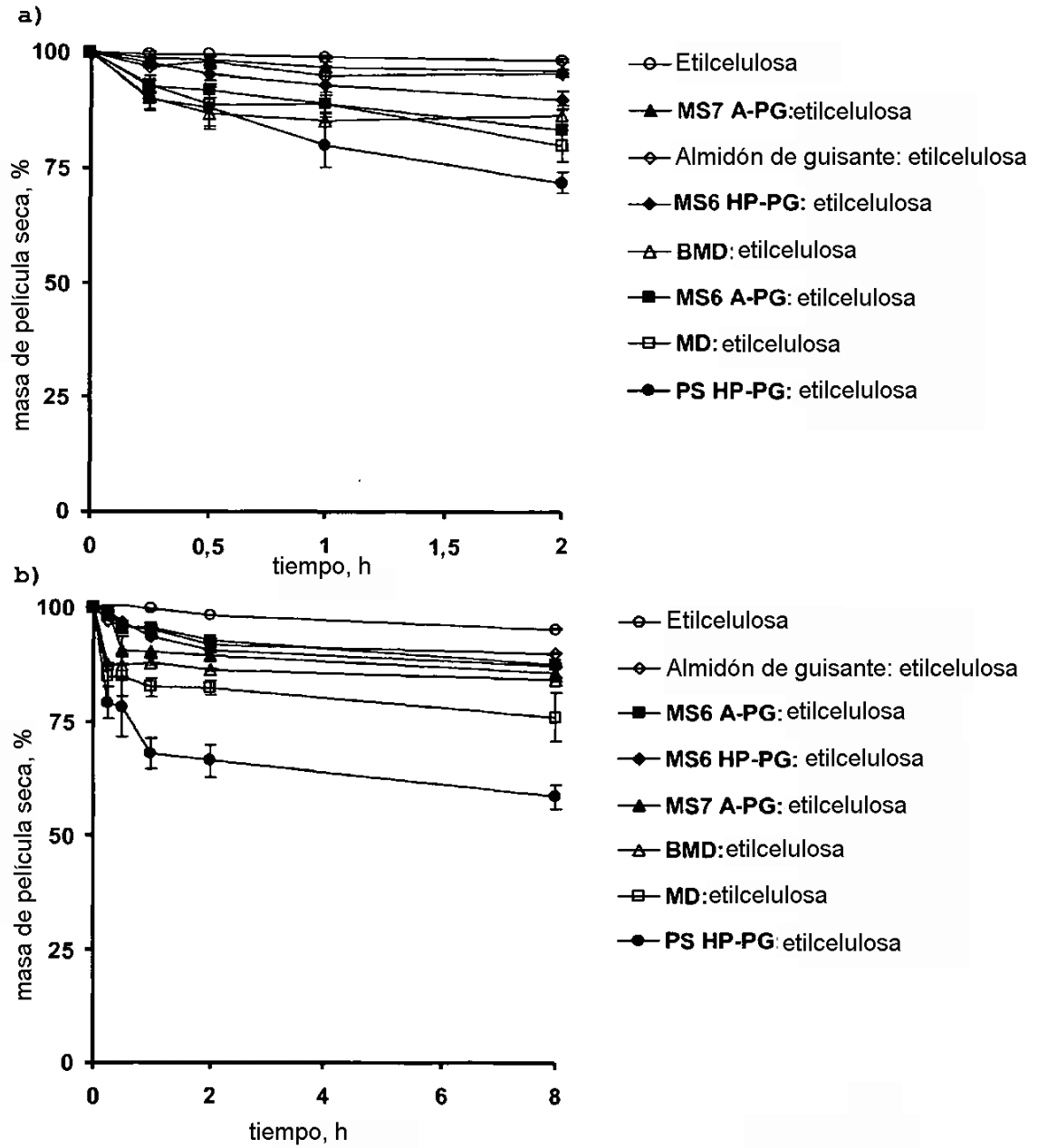


Figura 2

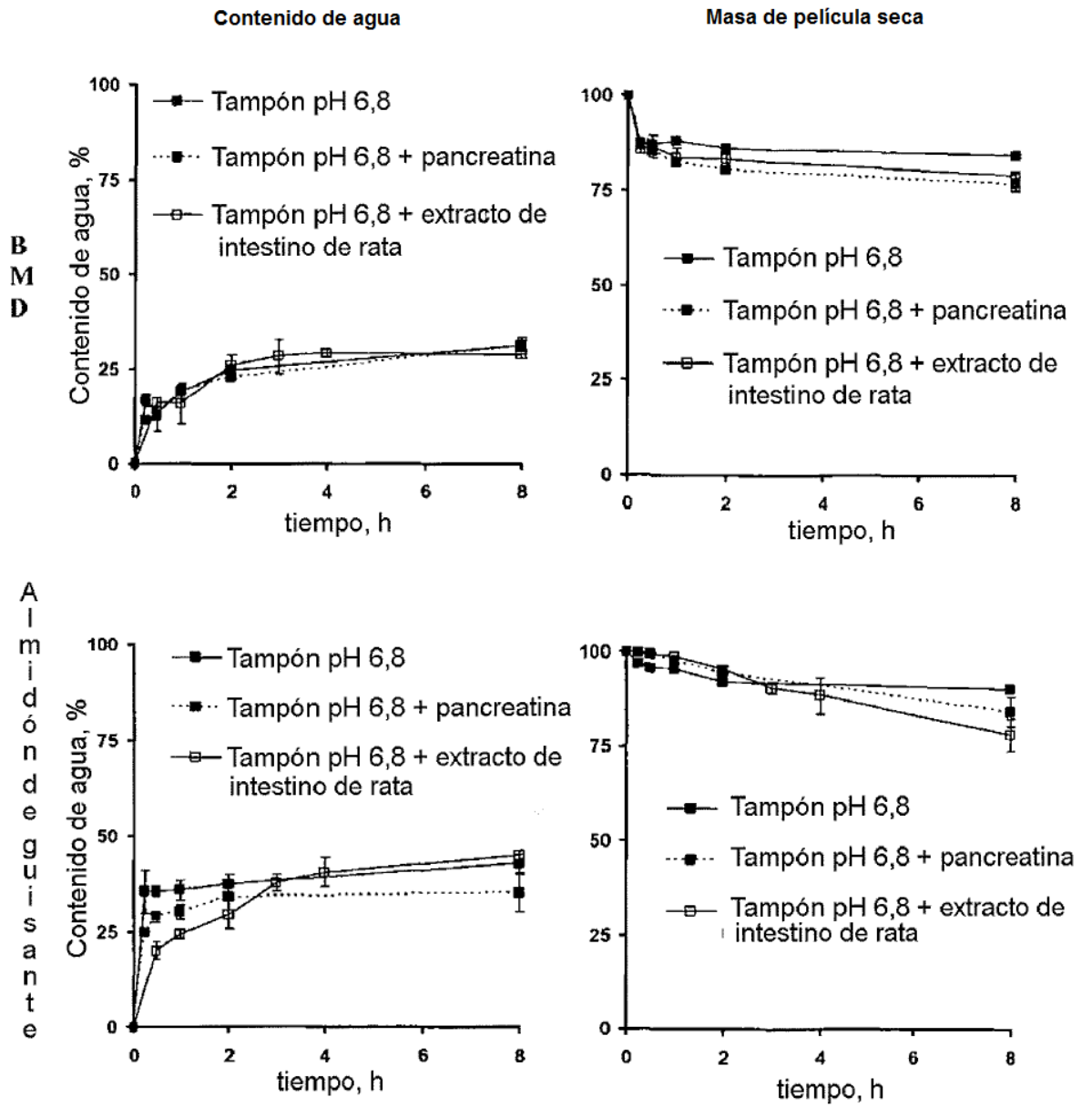


Figura 3

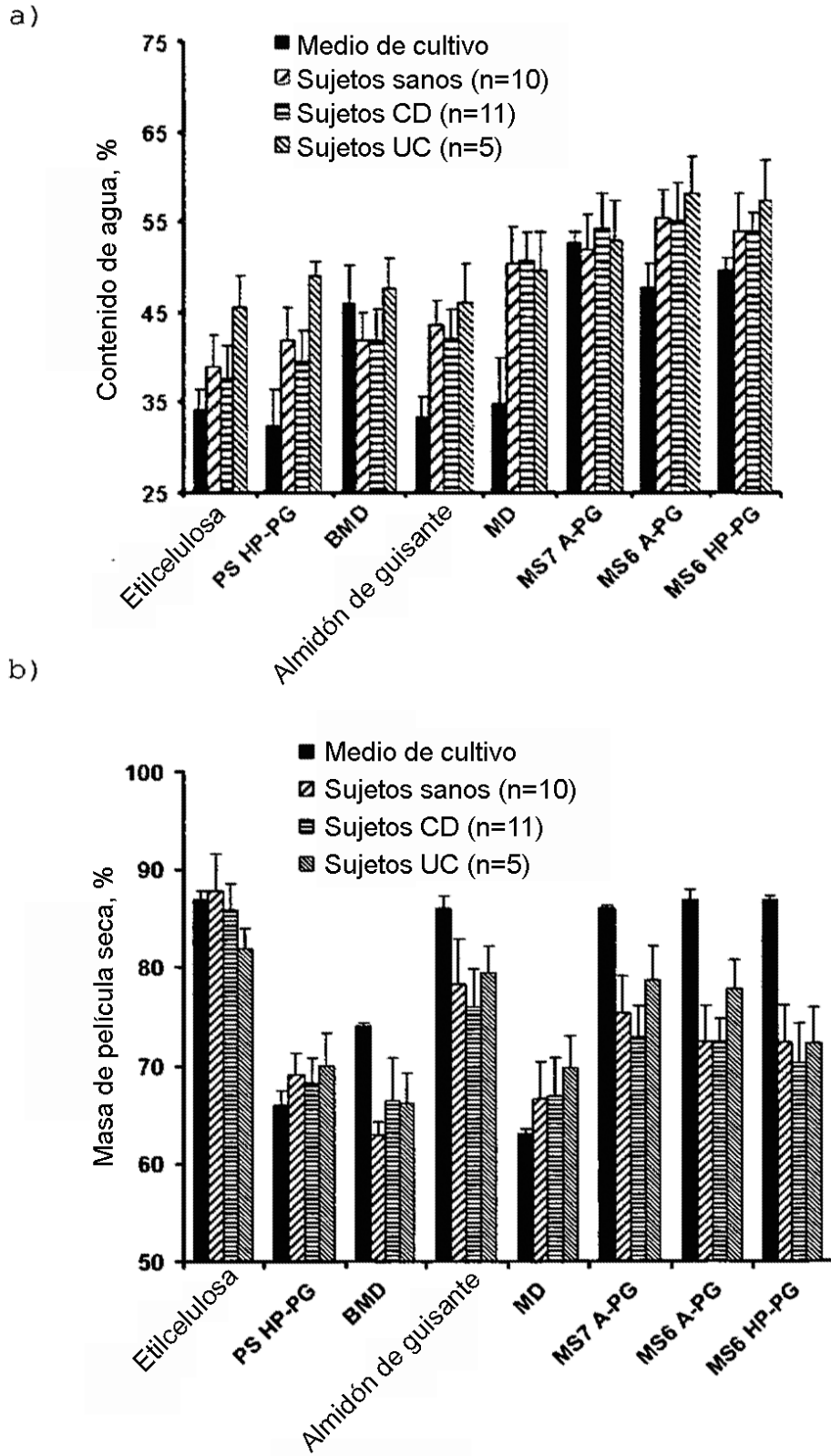
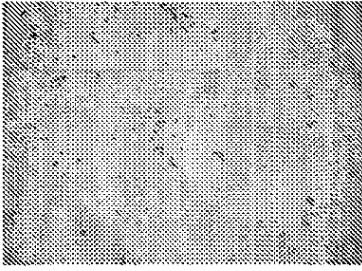
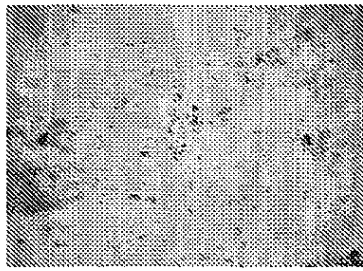


Figura 4

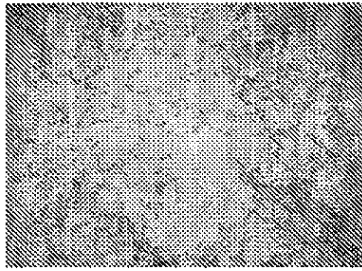
Sin película



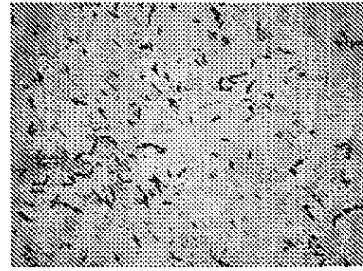
Etilcelulosa



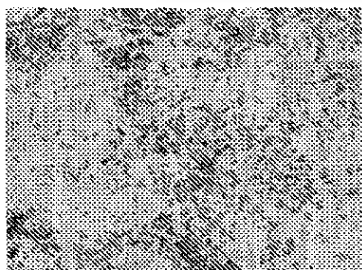
BMB : etilcelulosa



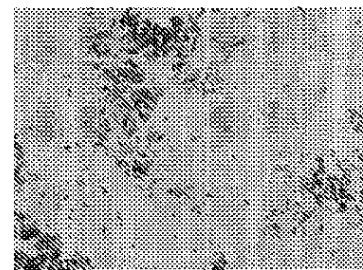
Almidón de guisante: etilcelulosa



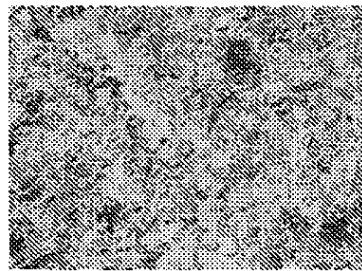
PS HP-PG : etilcelulosa



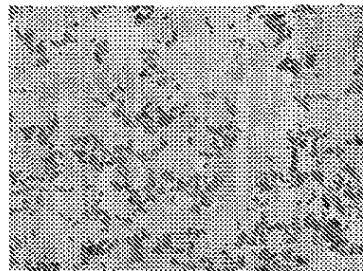
MD : etilcelulosa



MS7 A-PG : etilcelulosa



MS6 A-PG : etilcelulosa



MS6 HP-PG : etilcelulosa

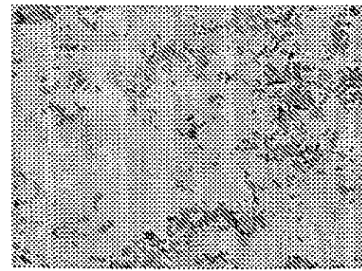


Figura 5

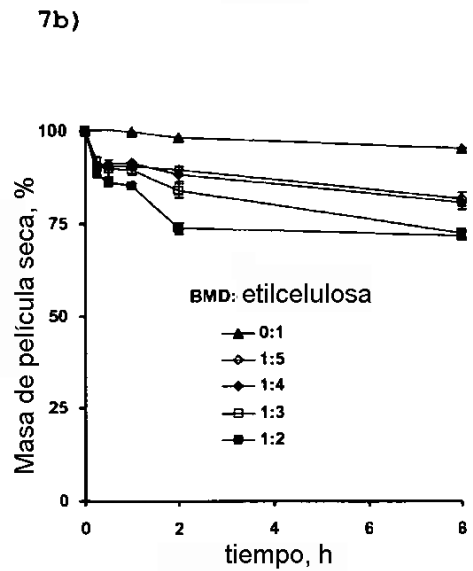
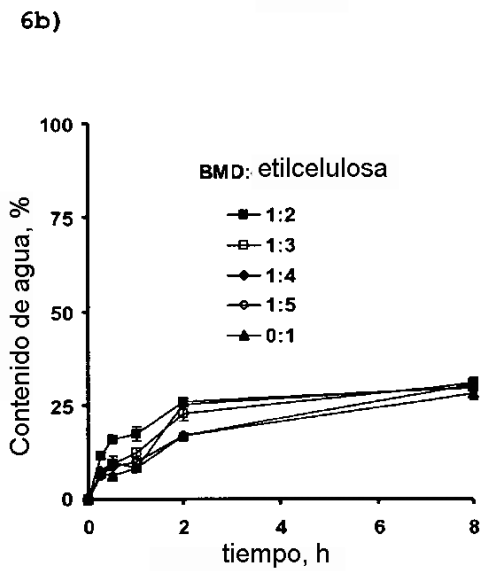
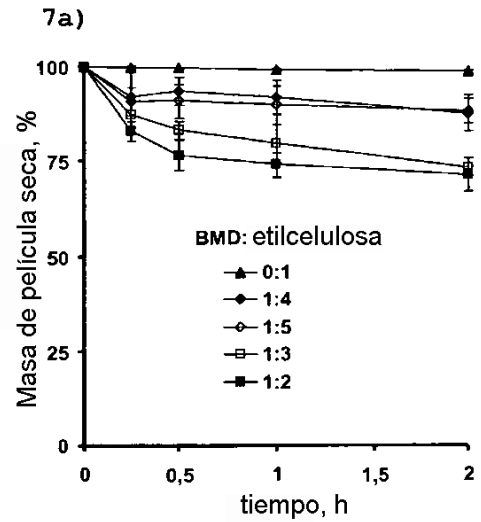
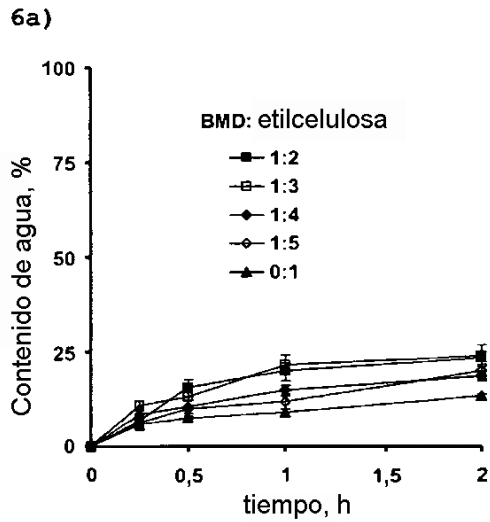


Figura 6

Figura 7

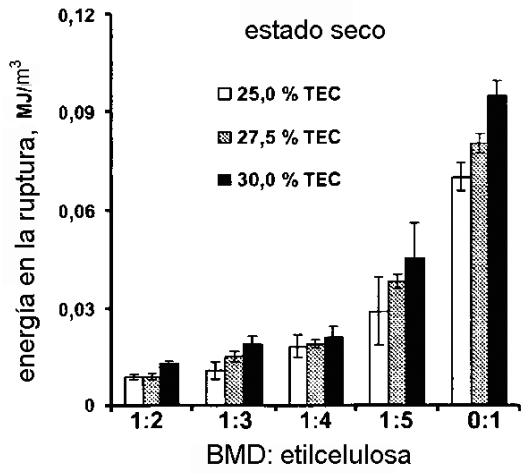
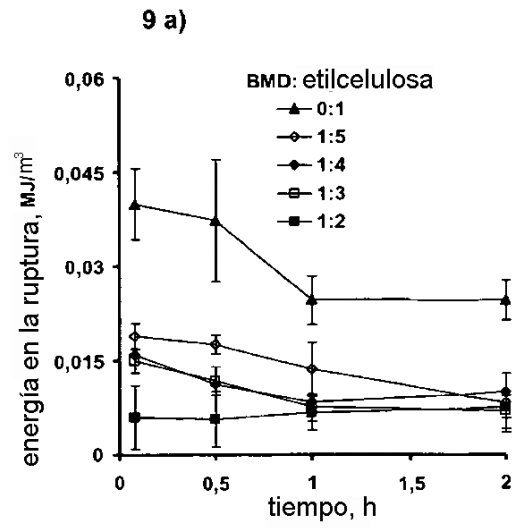


Figura 8



9 b):

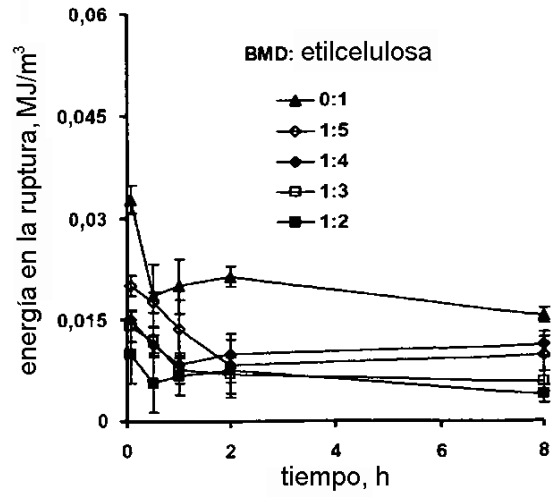


Figura 9

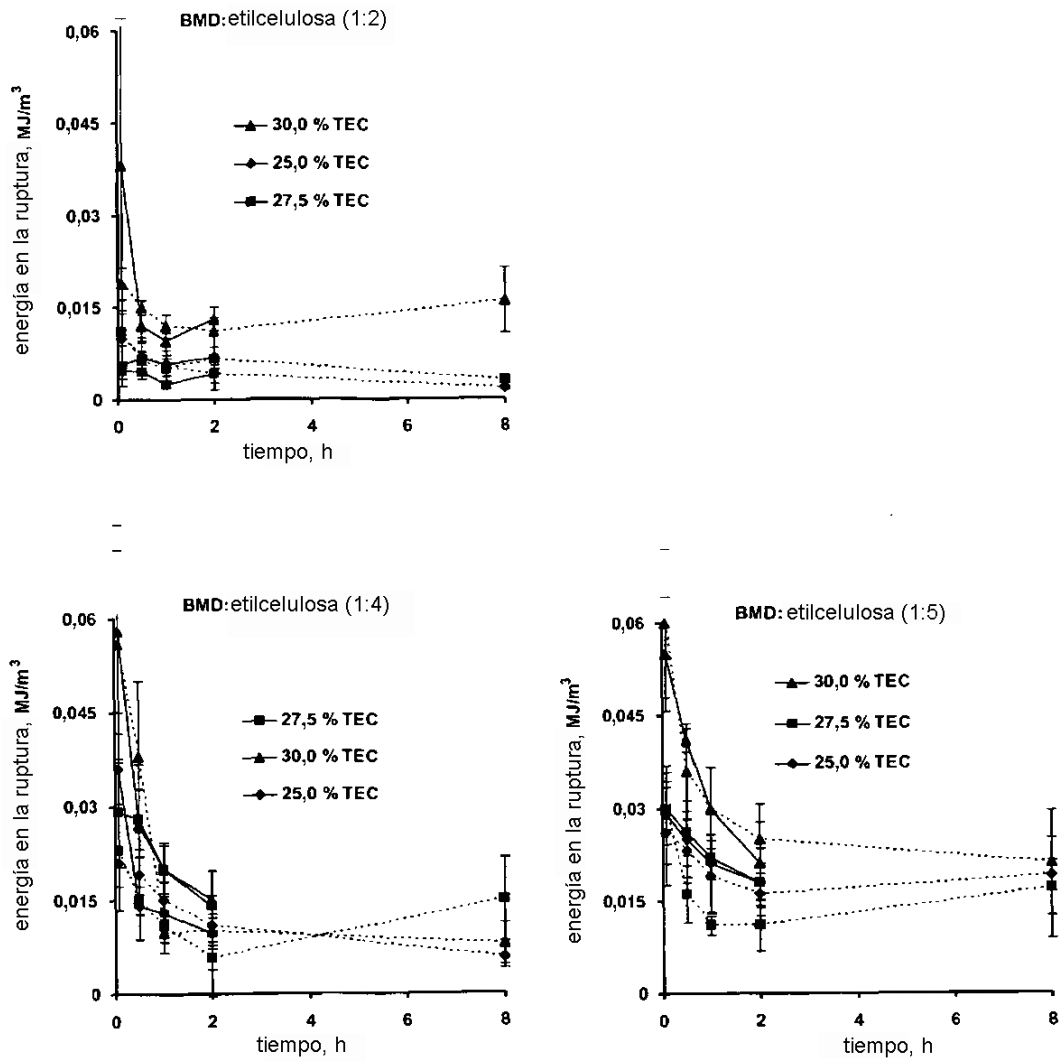


Figura 10

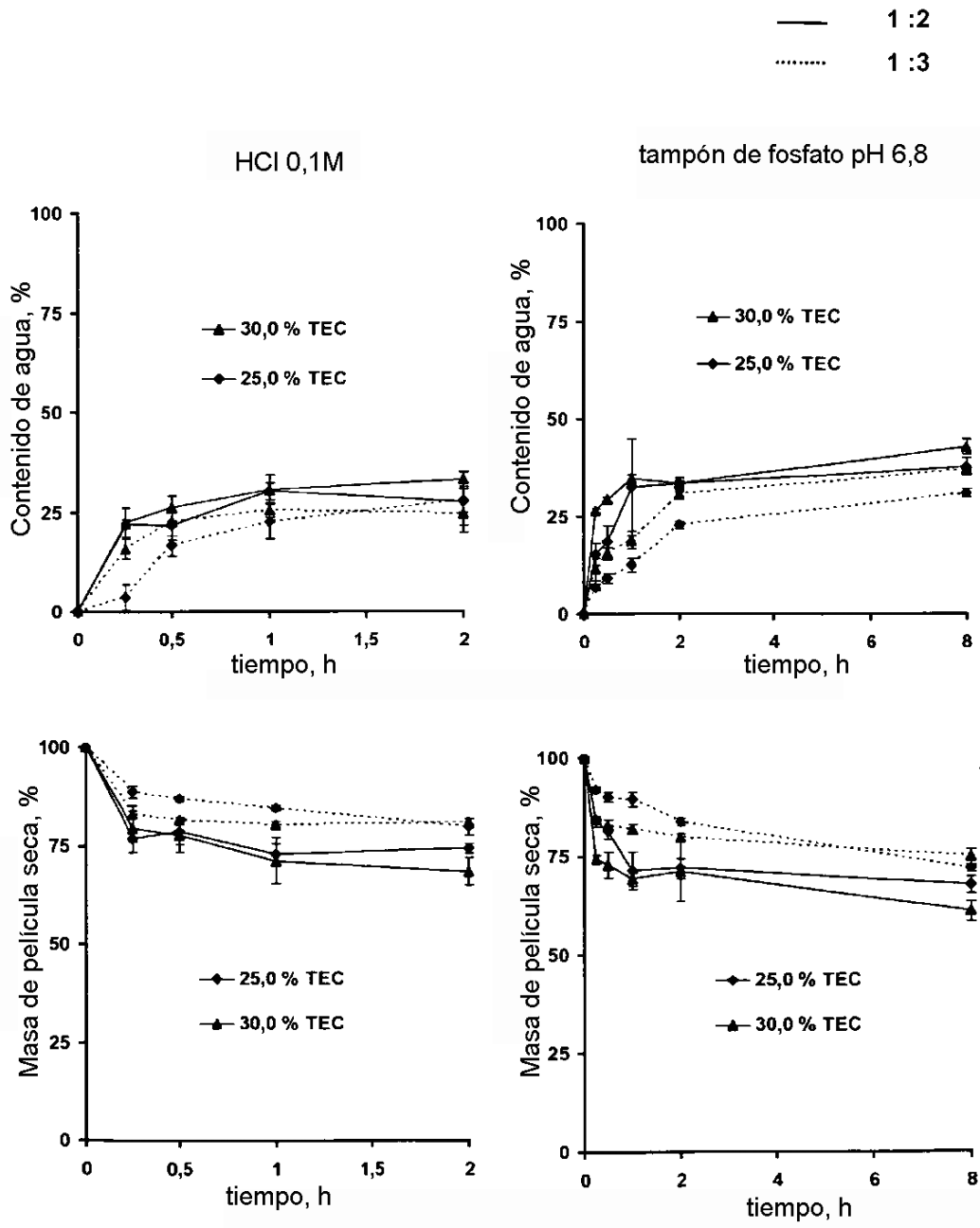


Figura 11

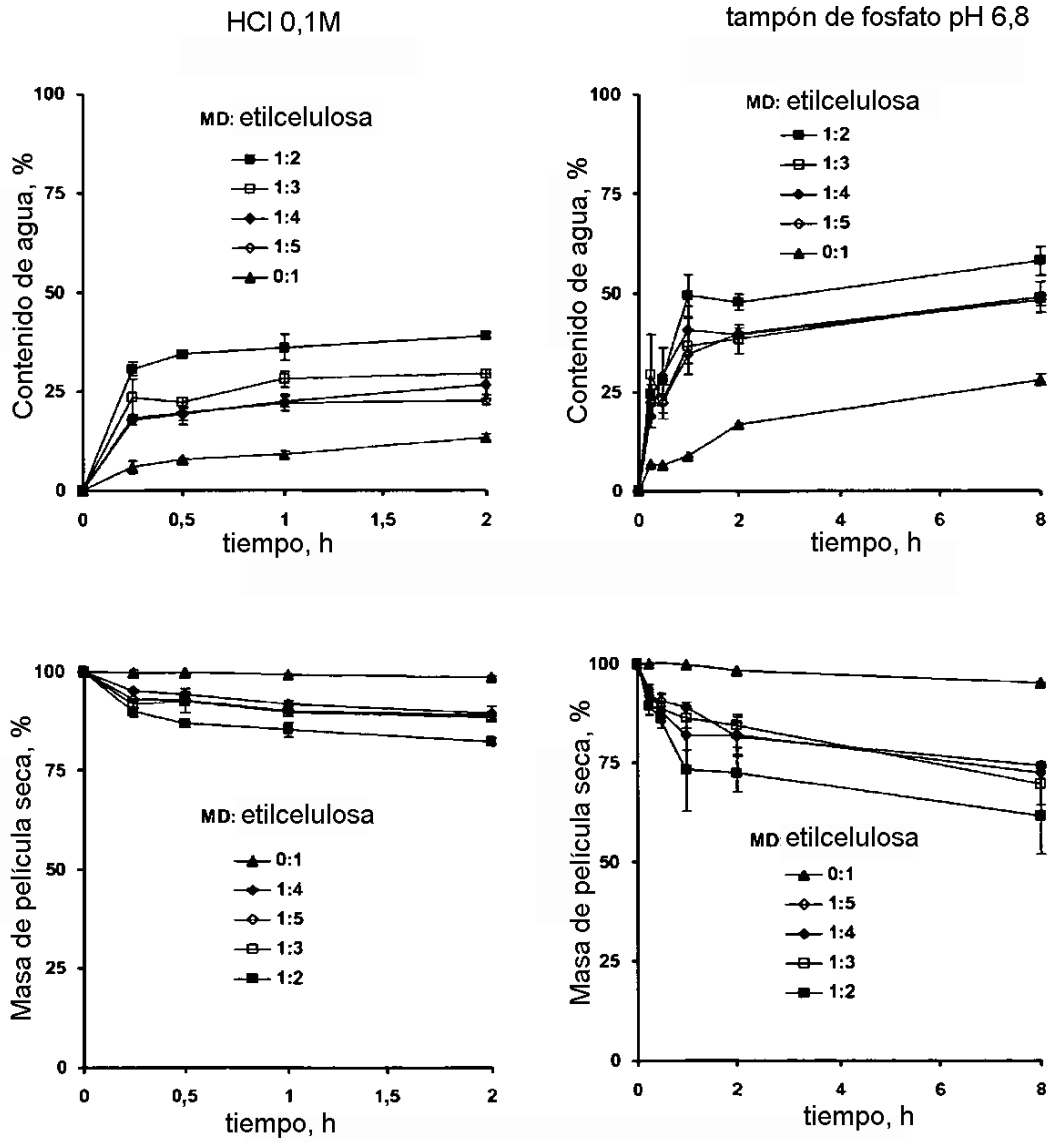
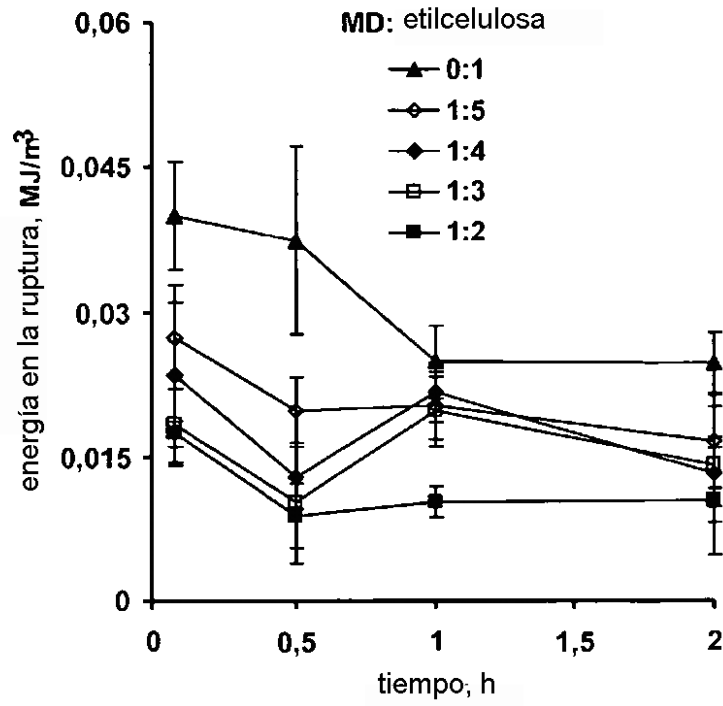


Figura 12

a)



b)

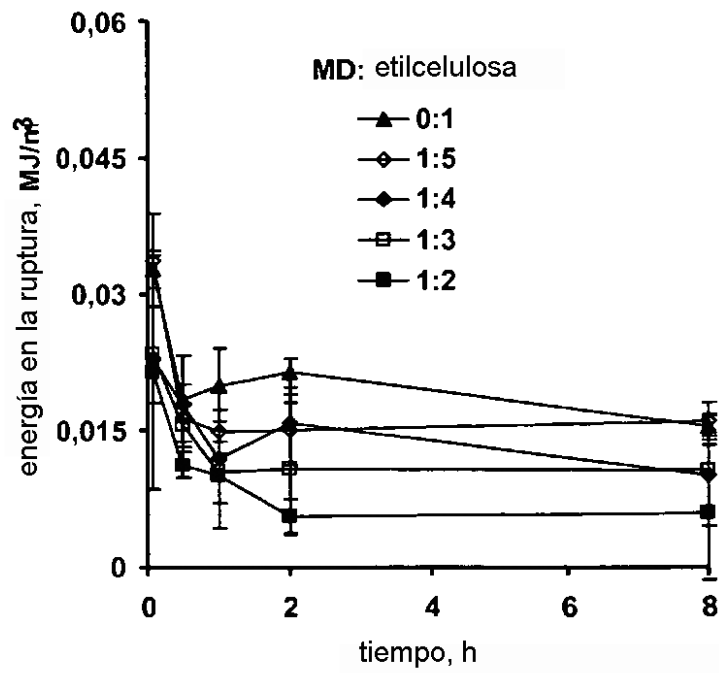


Figura 13

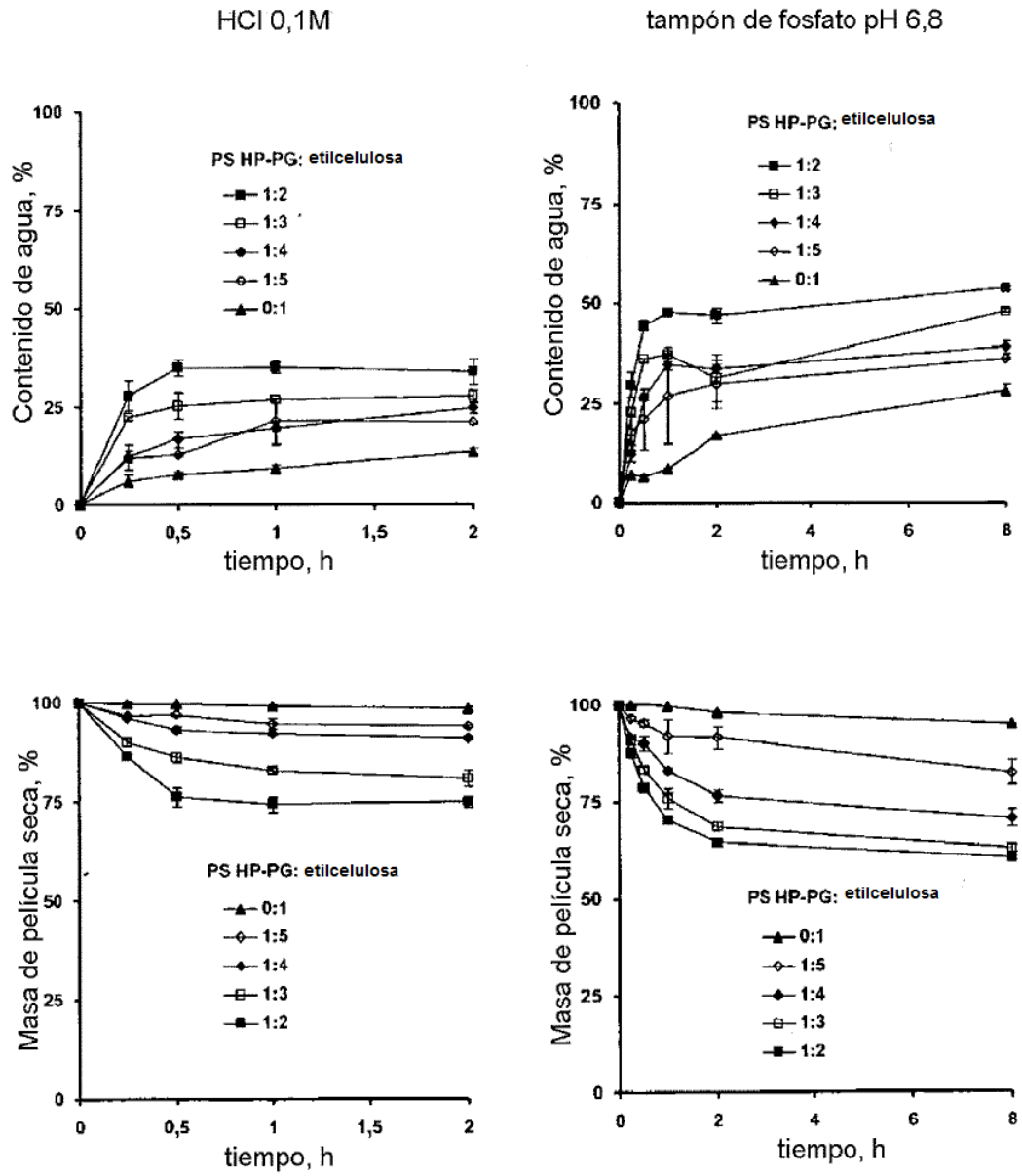
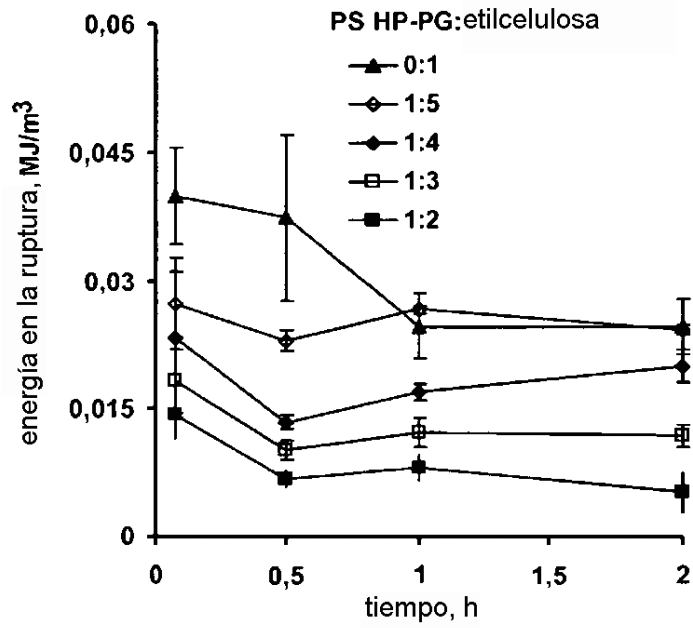


Figura 14

a)



b)

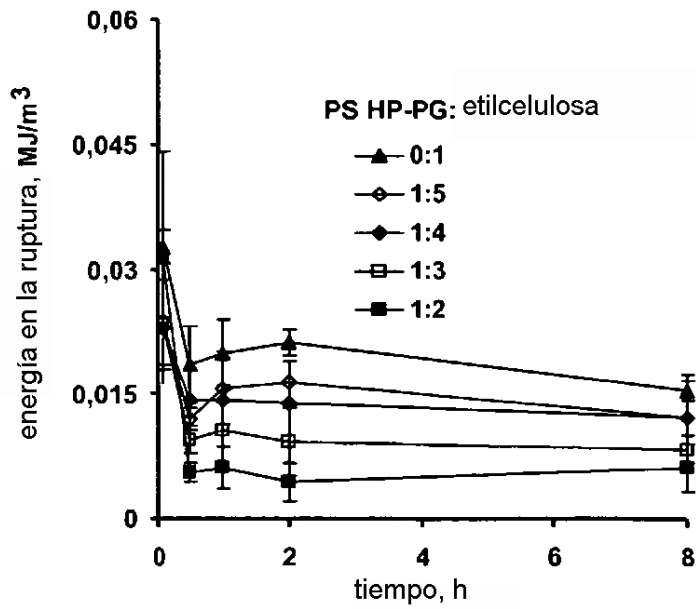


Figura 15

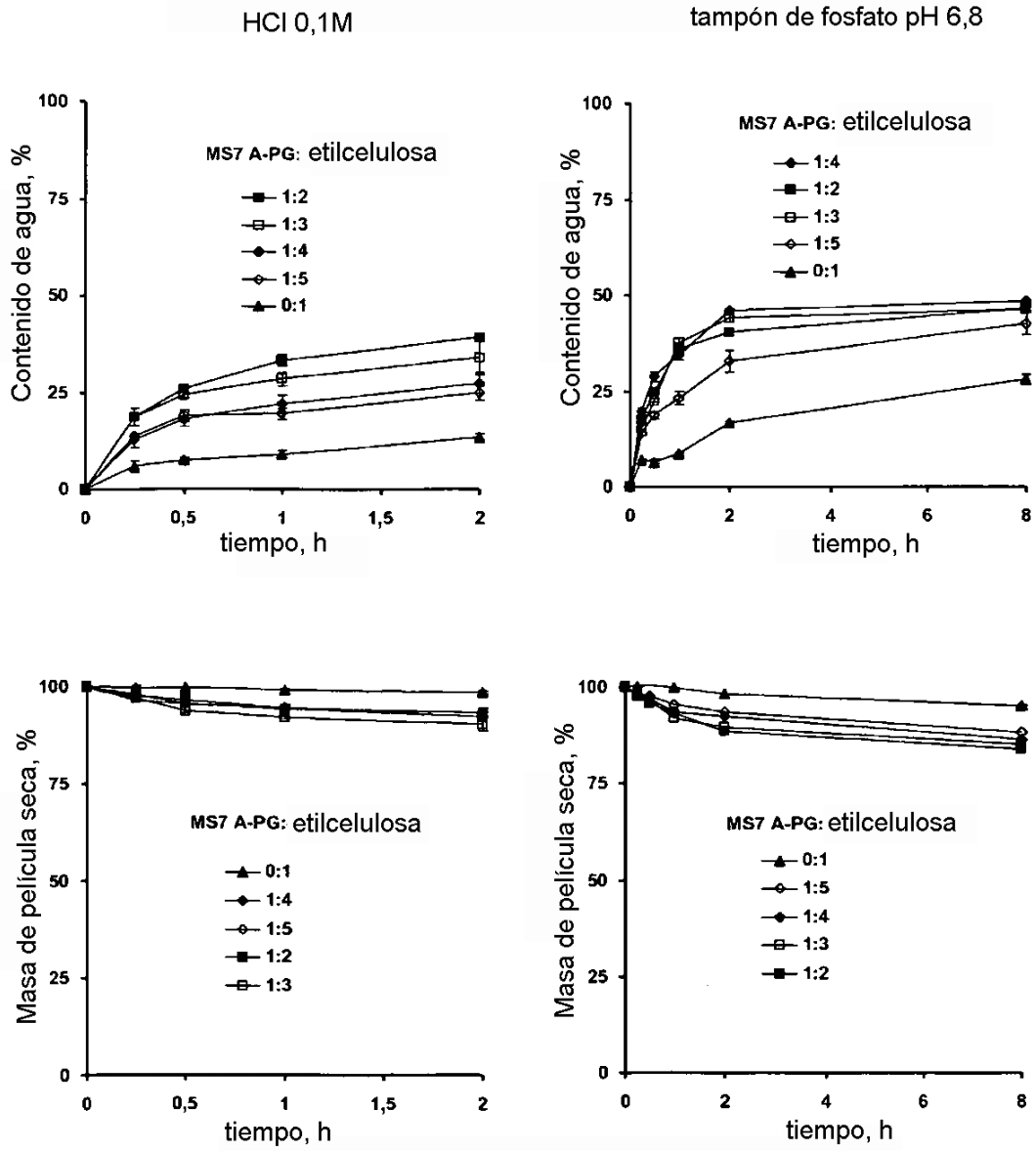
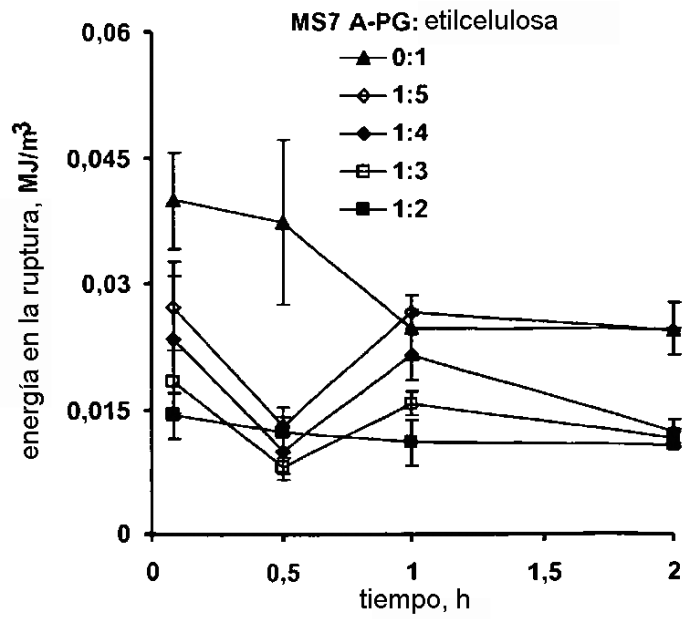


Figura 16

a)



b)

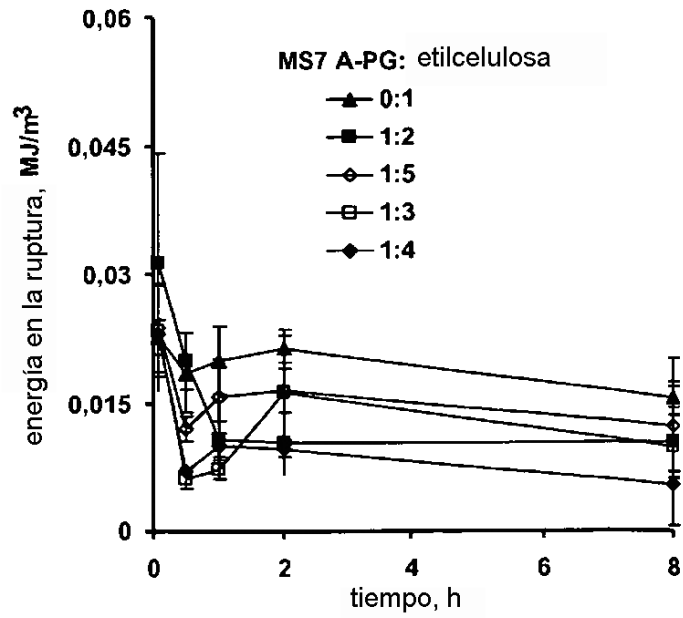


Figura 17

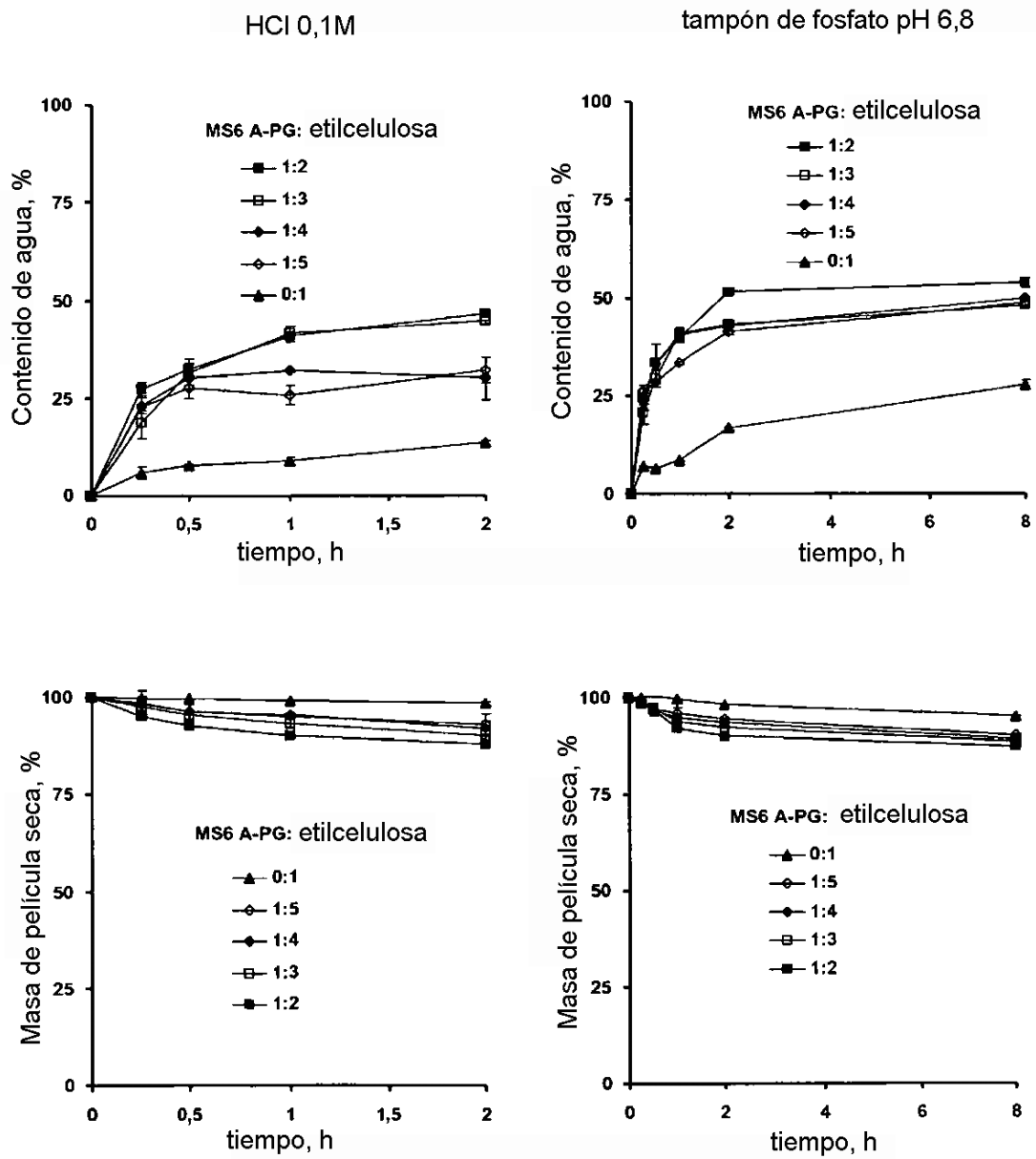
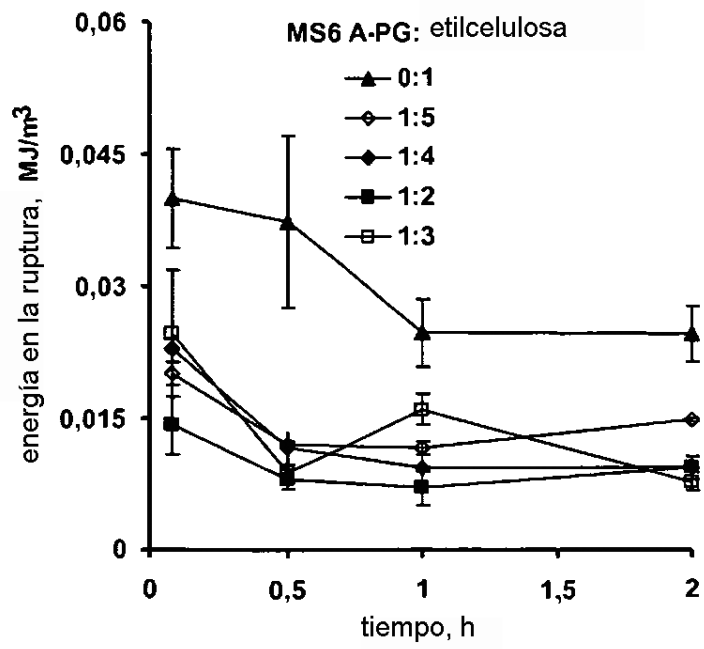


Figura 18

a)



b)

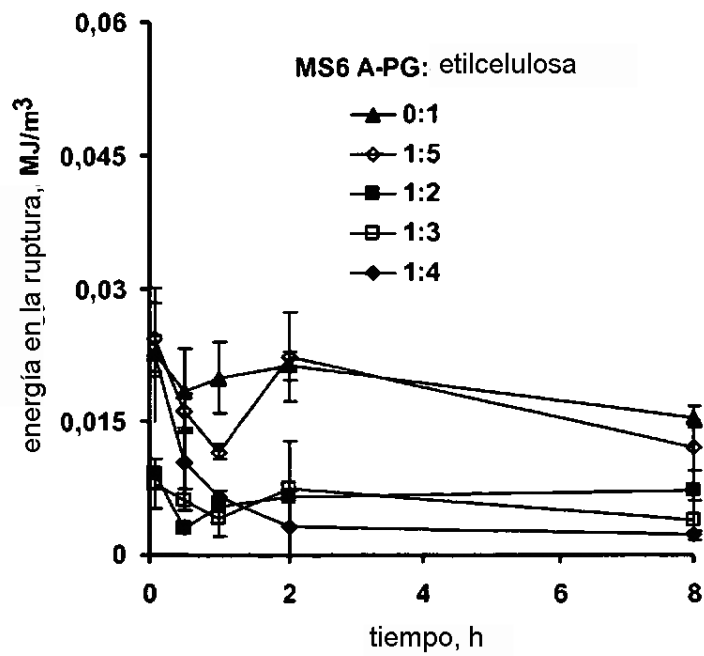


Figura 19

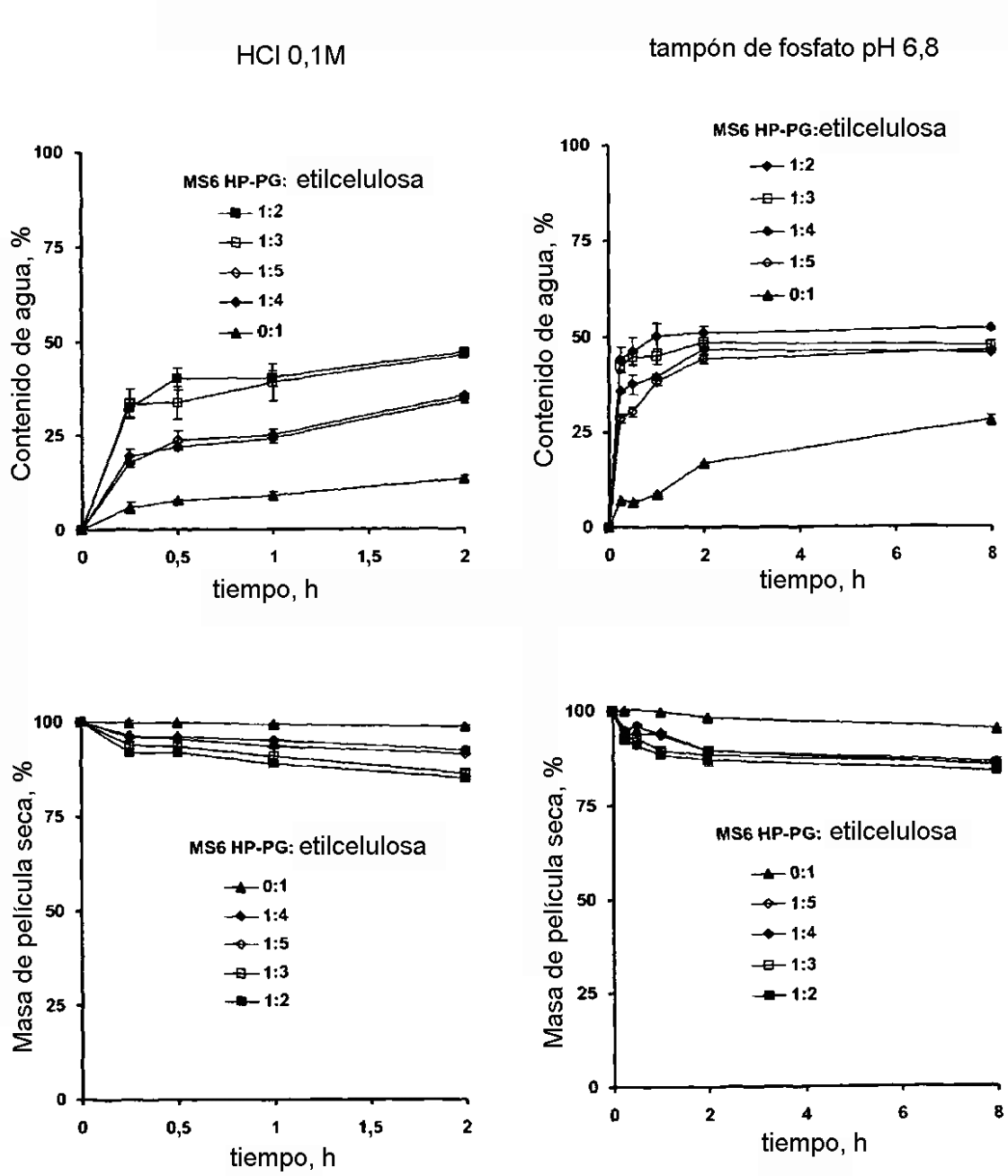
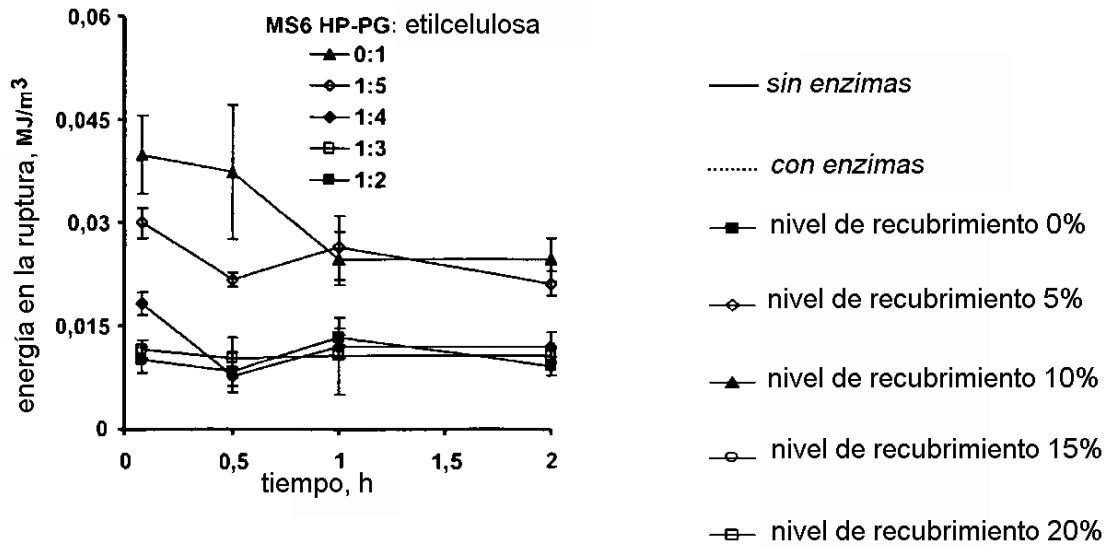


Figura 20

21 a)



21 b)

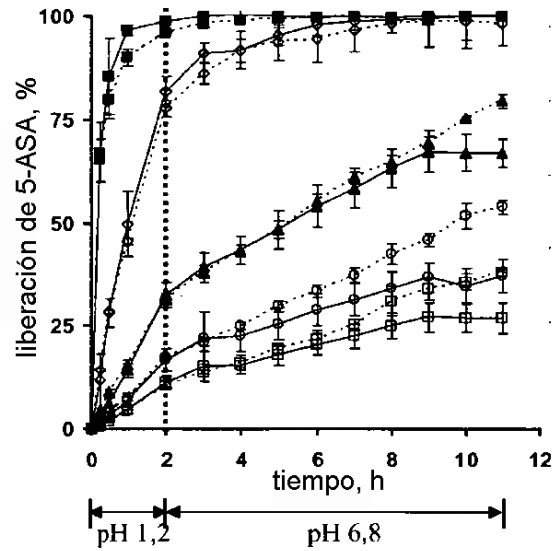
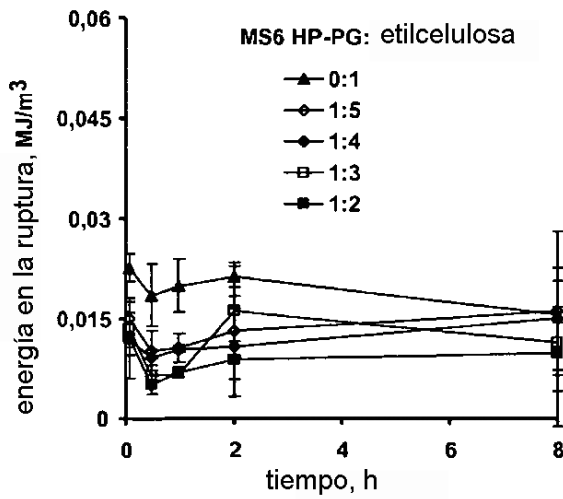


Figura 21

Figura 22

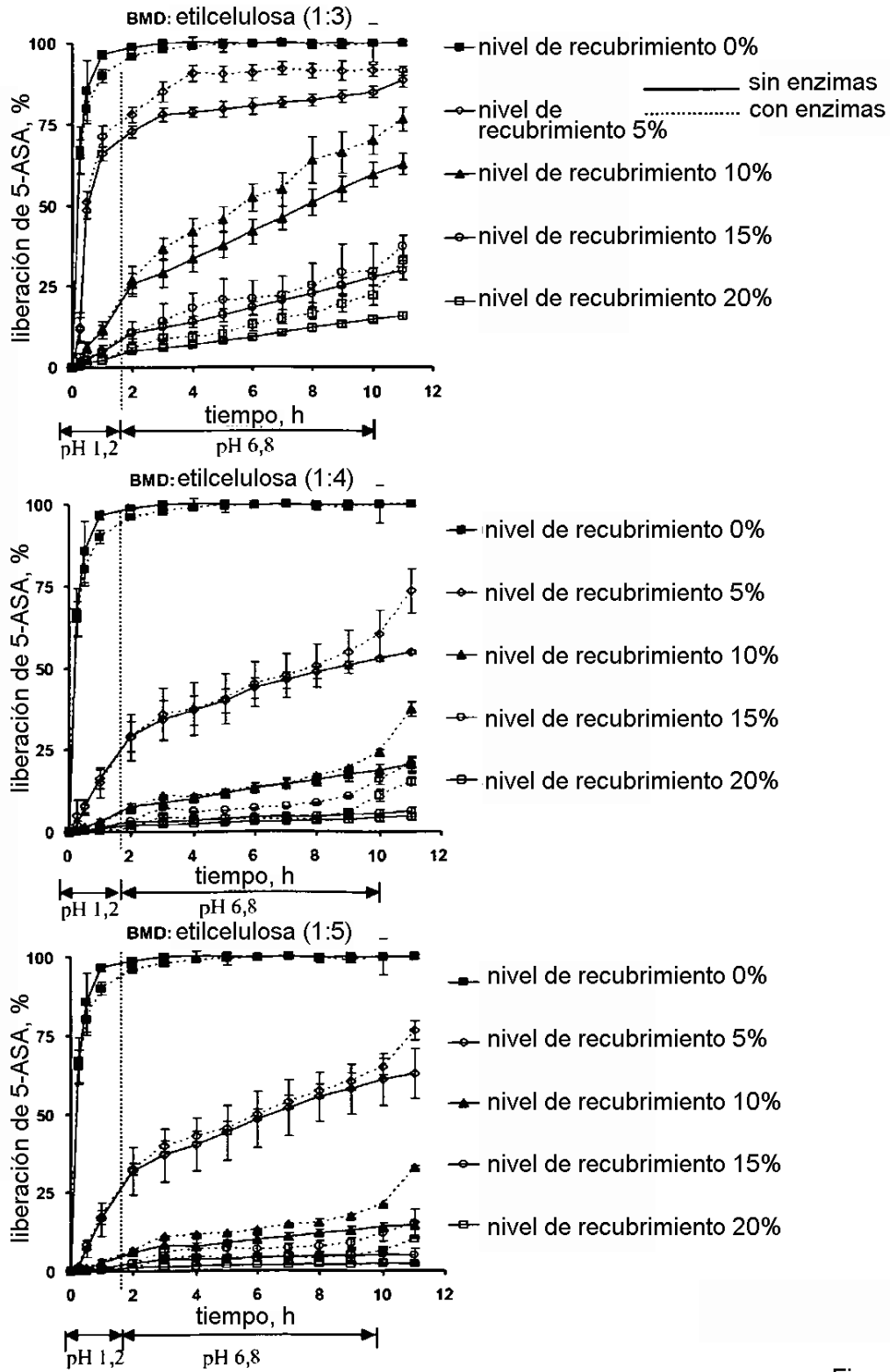


Figura 23

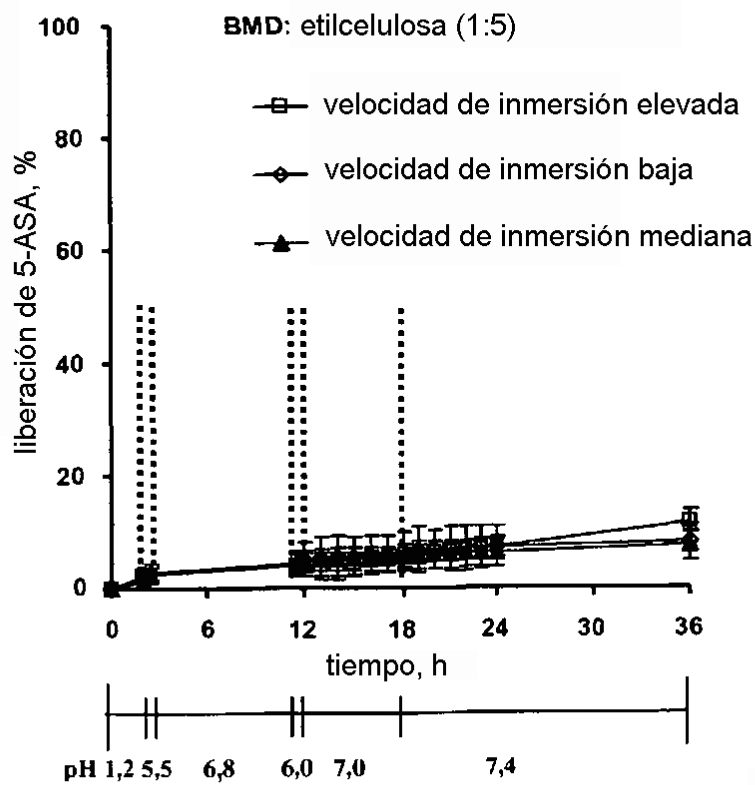
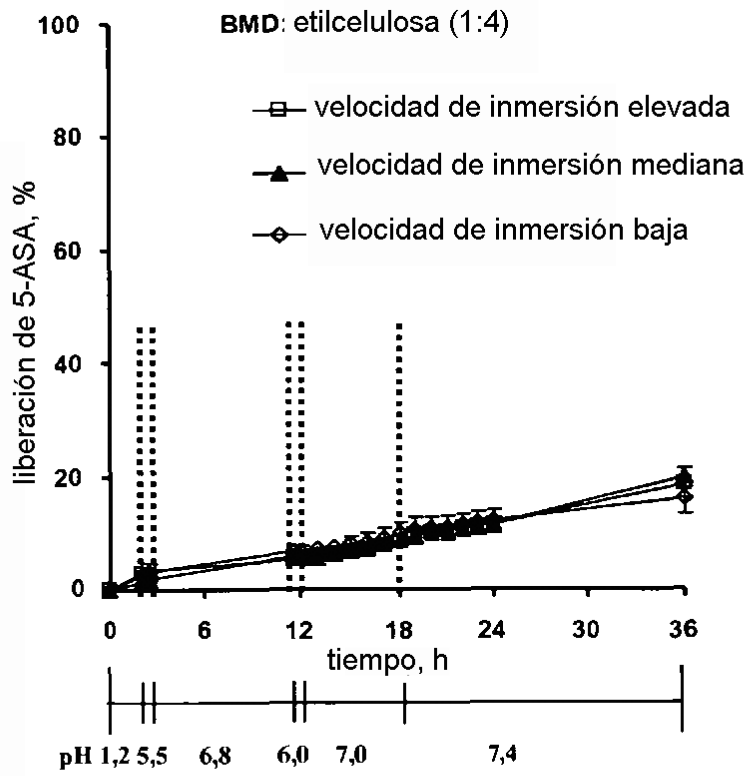
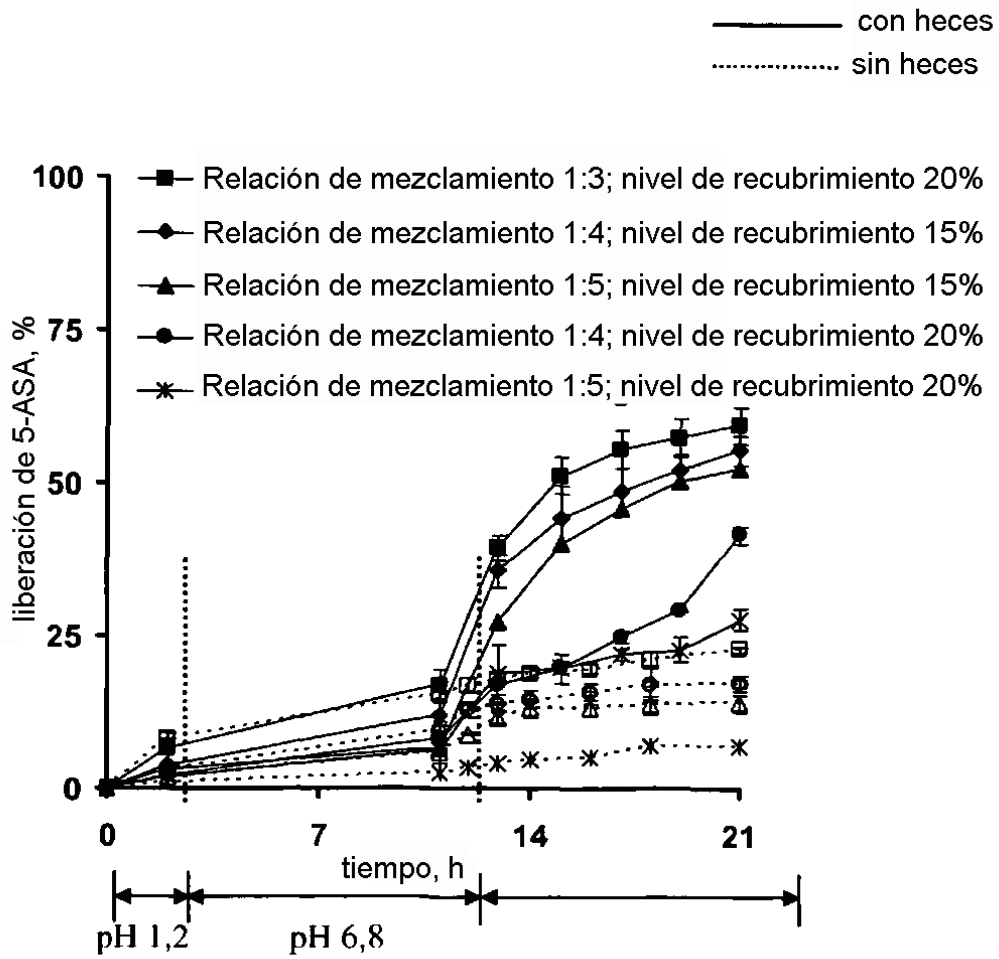


Figura 24



Enzimas bacterianas

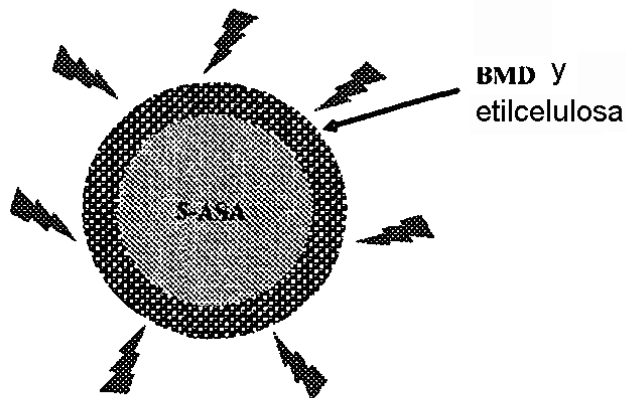


Figura 25

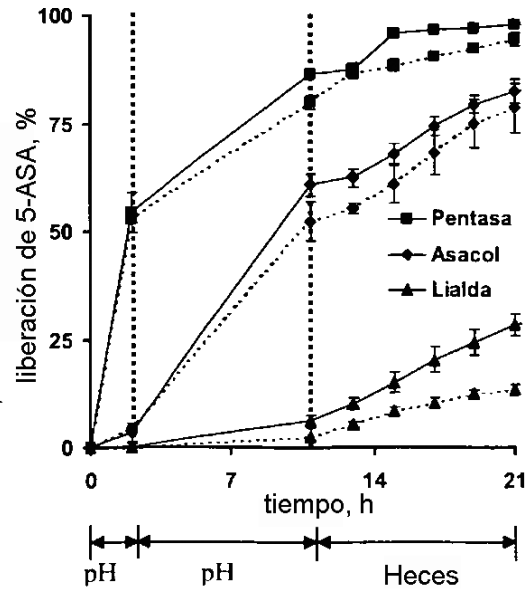
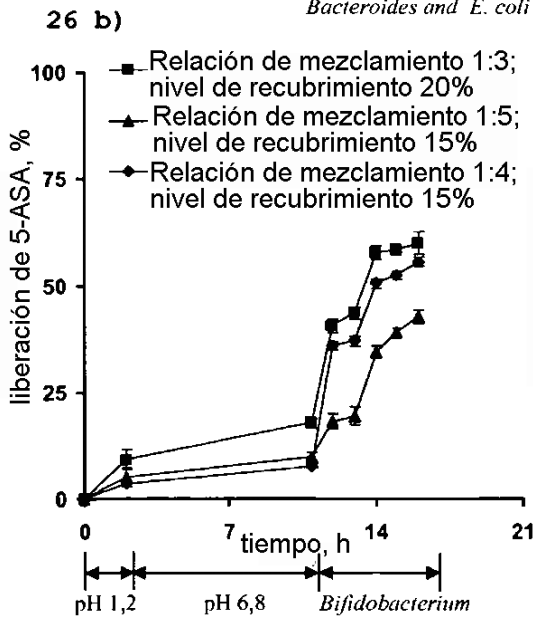
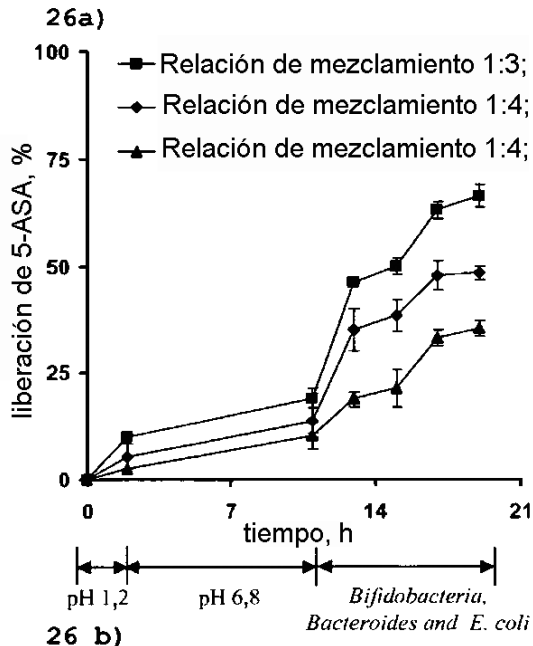


Figura 26

Figura 27