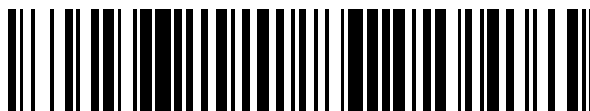


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 095**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2006 E 06743150 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1883396**

54 Título: **Aporte colónico de adsorbentes**

30 Prioridad:

18.05.2005 US 682074 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2013

73 Titular/es:

**DA VOLTERRA (20.0%)
Le Dorian-Bâtiment B1, 172, Rue de Charonne
75011 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (20.0%);
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS
(20.0%);
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (20.0%) y
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11 (20.0%)**

72 Inventor/es:

**HUGUET, HÉLÈNE-CÉLINE;
FATTAL, ELIAS;
ANDREMONT, ANTOINE y
TSAPIS, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 429 095 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

Aporte colónico de adsorbentes.

Campo de la invención

5 Esta solicitud está dentro del campo del aporte colónico de agentes terapéuticos, y especialmente trata del aporte específico de materiales adsorbentes al colon.

Antecedentes de la invención

10 La resistencia bacteriana a antibióticos surgió poco después del comienzo de la utilización de los antibióticos y ha aumentado continuamente desde entonces, pero la magnitud del problema estuvo oculta de un modo u otro hasta los primeros noventa debido al descubrimiento y la distribución continuos de nuevos agentes antibacterianos. Sin embargo, hoy en día nos enfrentamos a una importante crisis de salud pública global debido a que la industria farmacéutica está escasa de nuevos agentes antibacterianos. La utilización global de los disponibles todavía es creciente y, en consecuencia, el índice de bacterias resistentes en seres humanos está alcanzando un nivel alarmante en todo el mundo.

15 Aunque la resistencia bacteriana puede surgir por la selección directa de patógenos resistentes en la zona de la infección, la resistencia incrementada de patógenos bacterianos es en la mayoría de los casos un proceso en dos etapas, en el que la resistencia de produce en primer lugar en la flora comensal y está seguida por transferencia horizontal de resistencia a especies patógenas.

20 Sin embargo, la resistencia incrementada oculta en la flora intestinal comensal es un efecto secundario casi constante de todas las utilizaciones de antibióticos. Los investigadores han mostrado que la administración buco-gástrica de β -lactamasas en ratones reducía las alteraciones asociadas a β -lactamasas de la microflora indígena y el sobrecrecimiento de patógenos. La transposición de este principio a seres humanos para reducir la aparición de resistencia intestinal durante los tratamientos con antibióticos requiere el aporte específico de enzimas hidrolizantes de antibióticos al colon. Un ejemplo de este enfoque se describe en el documento PCT WO 2004/016248, presentado el 6 de agosto de 2003. Sin embargo, todavía hay un gran número de antibióticos que inducen resistencia bacteriana, pero no se pueden eliminar mediante enzimas específicas. Además, muchas bacterias producen toxinas, que provocan efectos secundarios tales como diarrea cuando las toxinas alcanzan el colon.

30 La patente de EE. UU. 5.929.051 divulga pectinas de aloe que forman un gel en presencia de calcio y su utilización como una matriz para almacenar sustancias farmacológicas y también para una reacción de precipitación de antígenos y anticuerpos.

La patente de EE. UU. 5.484.773 divulga un tratamiento de la diarrea asociada a antibióticos y más específicamente se dirige a la neutralización de toxina A de *C. difficile*. No divulga un adsorbente encapsulado en polímeros tal como los mencionados en las reivindicaciones.

35 La solicitud internacional WO 2004/016248 divulga formas galénicas multiparticuladas para la administración oral y diseñadas para el aporte dirigido al colon de principios activos seleccionados del grupo que comprende enzimas capaces de desactivar macrólidos y similares, enzimas capaces de desactivar quinolonas y β -lactamasas.

Gardiner et al. (Gut; 1993; 34; 51-55) divulgan la utilización de adsorbentes como agentes contra endotoxinas en la colitis experimental. Los adsorbentes se administran en una forma no formulada a través de instilación intragástrica.

40 Wakerly et al. (J. Pharm. Pharmacol. 1997; 49; 622-625) han presentado un estudio sobre la utilización de pectinas amidadas como vehículos potenciales en sistemas de aporte colónico. No enseñan que el adsorbente se pueda formular de un modo que los aporte en el colon.

45 Se sabe que los adsorbentes adsorben una variedad de productos químicos orgánicos, tales como antibióticos. Sin embargo, la administración de adsorbentes típicamente está contraindicada con la prescripción de antibióticos, debido a que los adsorbentes pueden adsorber y por lo tanto desactivar una gran cantidad de estos antibióticos antes de que puedan alcanzar el flujo sanguíneo [Referencias 3-5].

50 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema que dirija los agentes desactivantes al colon, utilizando sistemas de aporte particulados específicos para una zona, así como métodos para desactivar antibióticos y otros agentes activos, y métodos para adsorber productos perjudiciales o peligrosos tales como, pero no limitados a, toxinas, productos químicos, alérgenos, etc. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un sistema tal en el que el sistema libere específicamente su contenido en el colon, y no interfiera con la zona normal de absorción de un antibiótico, es decir el tracto gastrointestinal ("GI") superior. La presente invención proporciona tales sistemas y métodos.

Compendio de la invención

5 La presente invención se dirige a un sistema de aporte particulado oralmente administrable específico para una zona (colónico) según la reivindicación 12. Cuando los sistemas se aportan específicamente al colon, son capaces de eliminar diversas sustancias presentes en, o a medida que alcanzan, el colon. La invención también se dirige a métodos de tratamiento que utilizan los sistemas de aporte, y a métodos para preparar los sistemas de aporte.

10 Los sistemas de aporte particulados se basan en matrices adsorbentes encapsuladas en y/o sobre partículas, que aportan selectivamente los adsorbentes al colon. Sistemas de aporte de fármacos representativos incluyen microesferas basadas en pectina, en las que la pectina puede estar entrecruzada opcionalmente con iones metálicos tales como iones cinc y/o calcio, y las microesferas de pectina entrecruzadas opcionalmente pueden estar reticuladas con un polímero policationico tal como polietilenimina, quitosano o polilisina. Además de o en lugar de la pectina, otros polímeros, tales como quitosano, alginatos, xantano, curdlano, goma guar y Eudragit® (polímeros de poli(metacrilato de metilo)), también se pueden utilizar para reticular las partículas.

15 El papel del sistema de aporte particulado es proteger al adsorbente y evitar su efecto adsorbente en el tracto gastrointestinal (GI) superior. Cuando las partículas están hechas de pectina, y las microesferas alcanzan el colon, enzimas pectinolíticas específicas degradan la pectina, permitiendo que el adsorbente se libere y sea completamente activo. Antibióticos, productos químicos, toxinas y otras sustancias adsorbibles presentes en el colon serán desactivadas mediante la adsorción en o sobre el adsorbente.

20 Debido a que los sistemas de aporte particulados específicos para una zona liberan específicamente los adsorbentes en el colon, no interfieren hasta un punto significativo con la cinética de absorción normal del antibiótico o cualquier otra sustancia activa mientras están en el tracto GI superior o cualquier otra parte del cuerpo humano.

25 En una realización, los adsorbentes se utilizan para adsorber antibióticos residuales, tales como, pero no restringidos a, β -lactamas, ciclinas, quinolonas, macrólidos y aminoglicósidos, cuando los antibióticos se administran junto con (es decir, antes, durante o después de la administración de) el sistema. En esta realización, las microesferas también pueden incluir opcionalmente enzimas capaces de desactivar los antibióticos. Ejemplos de estas enzimas incluyen enzimas que desactivan β -lactamas, quinolonas y/o macrólidos, tales como β -lactamasas. Se cree que el adsorbente puede ayudar a poner en contacto el antibiótico con la enzima, ayudando además a la eliminación del antibiótico del colon del paciente.

30 En otra realización, los adsorbentes se utilizan para adsorber productos perjudiciales o peligrosos tales como, pero no limitados a, toxinas, productos químicos, alérgenos y similares absorbidos o producidos por bacterias y/u hongos y que pueden producir efectos adversos graves en el colon.

En otra realización más, los adsorbentes se utilizan para adsorber agentes farmacéuticos que se administran sistémicamente, y que dan como resultado efectos beneficiosos cuando interactúan con receptores fuera del colon, pero dan como resultado efectos secundarios adversos, tales como diarrea y/o estreñimiento, cuando interactúan con receptores en el colon.

35 Las partículas que contienen adsorbente se pueden preparar utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. En una realización, las partículas se preparan mezclando el adsorbente en una solución de pectina, entrecruzando la pectina con un catión metálico tal como cinc o calcio para formar microesferas de pectina que encapsulan el adsorbente, y a continuación opcionalmente reticulando las microesferas de pectina entrecruzadas con una solución de polietilenimina o cualquier otro polímero policationico adecuado. Las microesferas de pectina resultantes se pueden incluir en cualquier sistema de aporte de fármacos adecuado, tal como un comprimido o una cápsula.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa una vista esquemática de un método que se puede utilizar para preparar las microesferas de pectinato de Zn o pectinato de Ca descritas en la presente memoria.

45 La Figura 2 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) de una microesfera de pectinato de Ca típica (izquierda) y su superficie relativamente lisa (derecha).

La Figura 3 muestra microesferas de pectinato de calcio que encapsulan carbón vegetal activado (relación de pectina a carbón vegetal = 5/3 p/p).

50 La Figura 4 muestra microesferas de pectinato de calcio que encapsulan atapulgita (relación de atapulgita a pectina = 1/1 p/p).

La Figura 5 muestra microesferas de pectinato de calcio que encapsulan caolín (relación de caolín a pectina = 5/3 p/p). En la imagen de la derecha la estructura estratificada del caolín es visible sobre la superficie de las microesferas.

La Figura 6 muestra imágenes de SEM de microesferas de pectinato de calcio que encapsulan bien sílice coloidal (izquierda, relación de sílice a pectina = 80/12 p/p) o bien laponita (derecha, relación de laponita a pectina = 16/6 p/p).

5 Las Figuras 7 y 8 presentan el porcentaje de amoxicilina eliminado por adsorción (%) (0,5 y 1 mg/ml) frente al tiempo de contacto (min.) de incubación con cada adsorbente probado, en medio colónico simulado (MCS) sin enzimas pectinolíticas. En la Figura 7, los rombos representan carbón vegetal activado en una concentración de 10 mg/ml, los triángulos representan atapulgita en una concentración de 200 mg/ml y los cuadrados representan caolín en una concentración de 200 mg/ml. En la Figura 8, los triángulos representan carbón vegetal activado en una concentración de 10 mg/ml, los rombos representan carbón vegetal activado en una concentración de 5 mg/ml y los círculos representan carbón vegetal activado en una concentración de 1 mg/ml.

10 La Figura 9 representa el porcentaje de ciprofloxacina eliminado por adsorción (%) (la concentración inicial es 100 µg/ml) frente al tiempo (min.) de incubación con matrices adsorbentes en MCS sin actividad pectinolítica. Los triángulos representan carbón vegetal activado en una concentración de 1 mg/ml, los rombos representan atapulgita en una concentración de 1 mg/ml y los cuadrados representan caolín en una concentración de 1 mg/ml.

15 La Figura 10 representa el porcentaje de ciprofloxacina eliminado por adsorción (%) (la concentración inicial es 500 µg/ml) frente al tiempo (min.) de incubación con matrices adsorbentes que incluyen carbón vegetal activado en una concentración de 1 mg/ml en MCS sin actividad pectinolítica.

20 La Figura 11a representa el porcentaje de ciprofloxacina eliminado por adsorción (%) (la concentración inicial es 100 µg/ml) frente al tiempo (min.) de incubación con microesferas de pectinato de calcio cargadas con carbón vegetal activado (1 microesfera/ml) en medio colónico simulado que contiene enzimas pectinolíticas.

La Figura 11b representa el porcentaje de ciprofloxacina eliminado por adsorción (%) (la concentración inicial es 500 µg/ml) frente al tiempo (min.) de incubación con microesferas de pectinato de calcio cargadas con carbón vegetal activado (1 microesfera/ml) en medio colónico simulado que contiene enzimas pectinolíticas.

25 La Figura 12 representa la dosis de ciprofloxacina eliminada por adsorción suministrada en 20 µg/mg de carbón vegetal activado frente al tiempo (min.) de incubación; comparación entre microesferas de pectinato de calcio (cuadrados azules) y de pectinato de cinc (círculos rojos) cargadas con carbón vegetal activado (6% p/v de iones conjugados). Las microesferas de incuban en medio colónico simulado que contiene 500 µg/ml de ciprofloxacina (n = 2).

30 La Figura 13 representa el porcentaje de ciprofloxacina eliminado por adsorción frente al tiempo (min.) de incubación con microesferas de pectinato de cinc cargadas con carbón vegetal activado (6% p/v de acetato de cinc) en medio colónico simulado. La concentración inicial de ciprofloxacina es 500 µg/ml.

35 La Figura 14 representa el porcentaje de ciprofloxacina eliminado por adsorción frente al tiempo (min.) de incubación con microesferas de pectinato de cinc cargadas con carbón vegetal activado (10% p/v de acetato de cinc) en el medio colónico simulado. Las microesferas (2 mg/ml (círculos rellenos azules) o 5 mg/ml (círculos negros vacíos)) se incuban en medio colónico simulado que contiene una concentración inicial de ciprofloxacina de 100 µg/ml.

La Figura 15 representa el porcentaje de ciprofloxacina eliminado por adsorción frente al tiempo (min.) de incubación con microesferas de pectinato de cinc cargadas con carbón vegetal activado y 10% (p/v) de Tween 80 (10% p/v de acetato de cinc) en el medio colónico simulado. Las microesferas (2 mg/ml (círculos azules) se incuban en medio colónico simulado que contiene una concentración inicial de ciprofloxacina de 100 µg/ml.

40 Figura 16 representa el porcentaje de ciprofloxacina eliminado por adsorción frente al tiempo (min.) de incubación con microesferas de pectinato de cinc cargadas con carbón vegetal activado y 5% (p/v) de Lutrol® F68 (10% p/v de acetato de cinc). Las microesferas (2 mg/ml (círculos rellenos azules) o 5 mg/ml (círculos negros vacíos)) se incuban en MCS que contiene una concentración inicial de ciprofloxacina de 100 µg/ml.

Descripción detallada de la invención

45 Los sistemas de aporte particulados que incluyen los adsorbentes encapsulados, y sus métodos de preparación y utilización, se describen con más detalle posteriormente. Según se utilizan en la presente memoria, los términos "encapsulado" y "encapsulación" se refieren a adsorbentes que están presentes en las microesferas y/o sobre la superficie de las microesferas.

I. Componentes de las partículas que contienen adsorbente

50 Las partículas que contienen adsorbente incluyen un adsorbente y un componente polimérico que no libera una cantidad significativa del adsorbente hasta que las partículas alcanzan el colon.

A. Tipos de adsorbentes

Los adsorbentes utilizados para preparar las partículas deben tener una superficie específica elevada, y pueden ser

de calidad farmacéutica o no. Ejemplos de adsorbentes adecuados incluyen carbón vegetal activado, arcillas, incluyendo bentonita, caolín, montmorillonita, atapulgita, haloisita, laponita y similares, sílice, incluyendo sílice coloidal (Ludox® AS-40, por ejemplo), sílice mesoporosa (MCM41), sílice de pirólisis, zeolitas y similares y talco. Entre estos adsorbentes, se puede preferir utilizar los de calidad farmacéutica, tales como carbón vegetal activado que cumple los estándares de la farmacopea (de Merck, Francia), caolín (de VWR, Francia), atapulgita (de Lavollee, Francia), bentonita (de Acros Organics, Francia), Talc USP (de VWR, Francia).

B. Microesferas de pectina

La pectina es un ejemplo de un polímero adecuado para preparar las partículas, los iones cinc y calcio son ejemplos de iones adecuados para entrecruzar iónicamente la pectina en las partículas (microesferas), y la polietilenimina es un ejemplo de un polímero adecuado para reticular microesferas de pectina iónicamente entrecruzadas, en las realizaciones en las que es deseable la reticulación. Se pueden formar microesferas de pectina adecuadas a partir de pectina, un ion metálico polivalente (es decir, divalente o trivalente) y opcionalmente un polímero catiónico, y las microesferas de pectina pueden encapsular uno o más adsorbentes.

Pectina

La pectina es un polisacárido aislado de las paredes celulares de vegetales superiores, utilizado ampliamente en la industria alimentaria agrícola (como un coagulante o espesante de mermeladas, helados y similares) y los productos farmacéuticos. Es polimolecular y polidispersa. Su composición varía según la fuente, las condiciones de extracción y los factores ambientales.

Las pectinas están compuestas principalmente por cadenas lineales de ácidos β-1,4-(D)-galacturónicos, a veces intercaladas por unidades de ramnosa. Los grupos carboxílicos de los ácidos galacturónicos pueden estar parcialmente esterificados para dar pectinas metiladas. Se distinguen dos clases de pectina según su grado de metilación (GM: número de grupos metoxi por 100 unidades de ácido galacturónico):

- pectina altamente metilada (AM: alto contenido de metoxi) en la que el grado de metilación varía entre 50 y 80%. Es ligeramente soluble en agua y forma geles en medio ácido (pH < 3,6) o en presencia de azúcares;

- pectina débilmente metilada (BM: bajo contenido de metoxi), con un grado de metilación que varía de 25 a 50%. Más soluble en agua que la pectina AM, da geles en presencia de cationes divalentes tales como iones Zn^{2+} y Ca^{2+} . En efecto, los iones, Zn^{2+} y Ca^{2+} forman "puentes" entre los grupos carboxilados libres de ácidos galacturónicos. La red así formada ha sido descrita por Grant et al. bajo el nombre de "modelo de caja de huevos" (Grant G.T. et al. (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model, *FEBS Letters*, 32, 195).

También hay pectinas amidadas. Utilizando un tratamiento de pectina mediante amoníaco, ciertos grupos metilcarboxilato (-COOCH₃) se pueden transformar en grupos carboxamida (-CONH₂). Esta amidación confiere nuevas propiedades a las pectinas, especialmente mejor resistencia a las variaciones en el pH. Las pectinas amidadas tienden a ser más tolerantes a las variaciones en el pH, y también se han estudiado para la elaboración de comprimidos matriciales de aporte colónico (Wakerly Z. et al. (1997) Studies on amidated pectins as potential carriers in colonic drug delivery, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 49, 622).

La pectina es degradada por enzimas que se originan a partir de vegetales superiores y diversos microorganismos (es decir, hongos y bacterias) entre los cuales se encuentran bacterias de origen colónico humano. Las enzimas producidas por la microflora están compuestas por un grupo de polisacáridos, glicosidasas y esterases.

Otros polímeros, tales como quitosano, alginatos, xantano, curdlano, goma guar y otros polisacáridos (particularmente polisacáridos iónicamente entrecruzables) y Eudragit® (polímeros de poli(metacrilato de metilo)), también se pueden utilizar para preparar las partículas.

Cationes metálicos

En algunas realizaciones, la pectina está iónicamente entrecruzada con un catión metálico. Cualquier catión metálico polivalente (es decir, divalente, trivalente y similares) se puede utilizar para entrecruzar la pectina. Ejemplos incluyen calcio, cinc, aluminio, magnesio, hierro y similares. El cinc y el calcio son cationes metálicos preferidos.

Polímero catiónico

En aquellas realizaciones en las que la pectina está iónicamente entrecruzada con un catión metálico, opcionalmente se puede reticular además con un polímero catiónico, tal como polietilenimina, quitosano o polilisina. Se ha observado que cuando la pectina se entrecruza con iones cinc, tales como los procedentes de acetato de cinc, la reticulación es menos importante que cuando se utilizan iones calcio.

De estos polímeros catiónicos, se puede preferir la polietilenimina.

La polietilenimina es un polímero fuertemente catiónico que se une a ciertas proteínas, y a menudo se utiliza como

un marcador en inmunología, para precipitar y purificar enzimas y lípidos. También se conoce como polímero de aziridina; epamina; epomina; polímero de etilenimina; Montrek; PEI y polimina. El peso molecular de la polietilenimina está entre 10.000 y 100.000 daltons, preferiblemente entre 20.000 y 50.000 daltons.

5 La cantidad de polietilenimina utilizada se puede optimizar, dependiendo del peso molecular y el tipo de pectina utilizado. Ventajosamente, la concentración óptima para la polietilenimina (cuando está presente) es la que proporciona microesferas de pectina reticuladas que son suficientemente estables para sobrevivir en el tracto gastrointestinal, y sin embargo suficientemente inestables para que se degraden suficientemente en el colon a fin de liberar una cantidad eficaz del adsorbente y/o el agente activo. En algunas realizaciones, tales como en las que se utilizan iones calcio para entrecruzar la pectina, se cree que entre 0 y 1% es el intervalo óptimo de concentraciones de polietilenimina para conseguir estos objetivos.

10 Por ejemplo, cuando las microesferas de pectina se preparan a partir de una solución de pectina al 1-10% (p/v), ventajosamente de 2 a 6% (p/v), y una solución de cloruro cálcico al 2-10% (p/v), es óptima una concentración de 0 a 1% (p/v) de polietilenimina (PEI).

15 Los expertos en la técnica, utilizando las enseñanzas descritas en la presente memoria, pueden optimizar fácilmente la cantidad de polietilenimina, o evitar totalmente su utilización, si hay variaciones en la concentración de pectina, el tipo de pectina o la concentración o el tipo de catión metálico utilizado, con relación al utilizado en los ejemplos de trabajo descritos en la presente memoria. Además, en lugar de polietilenimina, se pueden utilizar otros polímeros catiónicos, tales como quitosano o polilisina, con la condición de que permitan que las microesferas de pectina aporten específicamente el adsorbente encapsulado al colon.

20 Agentes desintegrantes

Se pueden añadir agentes desintegrantes a la solución de pectina antes de la gelificación ionotrópica. Estos agentes desintegrantes pueden acelerar la desintegración de las microesferas en el medio colónico cuando sea necesario. Agentes desintegrantes representativos incluyen D-lactosa, tensioactivos de polisorbato tales como Tween® 80, poloxámeros tales como Lutrol® F68 (BASF) o polímeros tales como povidona Kollidon® K17, aunque se pueden utilizar otros agentes desintegrantes conocidos en la técnica.

Componentes adicionales opcionales

30 Las microesferas de pectina pueden incluir opcionalmente uno o más componentes adicionales. Idealmente, estos son componentes que no son adsorbidos por el adsorbente, e incluyen excipientes y enzimas que desactivan antibióticos u otras sustancias adsorbidas. Por ejemplo, las enzimas pueden ser enzimas que desactivan β -lactamas, quinolonas y/o macrólidos, tales como β -lactamasas. Sin querer limitarse a una teoría particular, se cree que el adsorbente puede ayudar a poner en contacto el antibiótico con la enzima, contribuyendo además a la retirada del antibiótico del colon del paciente.

II. Preparación de los sistemas de aporte particulados

35 Las partículas se pueden preparar por medios conocidos por los expertos en la técnica. Cuando las partículas son microesferas de pectina iónicamente entrecruzadas, típicamente se pueden preparar mezclando el adsorbente y/o los agentes activos en una solución de pectina, entrecruzando la pectina con un catión metálico tal como cinc o calcio para formar microesferas de pectina que encapsulan el adsorbente y/o los agentes activos y a continuación opcionalmente reticulando las microesferas con una solución de polietilenimina.

40 Típicamente, las microesferas que no contienen el adsorbente se preparan añadiendo gota a gota una solución acuosa de pectina en una concentración de 1 a 10% (p/v) a una solución de una sal de cinc tal como acetato de cinc, o una sal de calcio tal como cloruro de calcio, para formar microesferas de pectinato de cinc o calcio, que a continuación se recuperan. Opcionalmente las microesferas de pectinato iónicamente entrecruzadas se pueden introducir en una solución acuosa de polietilenimina u otro polímero catiónico para reticular las microesferas de pectina iónicamente entrecruzadas.

45 Se utiliza un procedimiento ligeramente diferente para preparar microesferas que incluyan los adsorbentes. Los adsorbentes se mezclan con suficiente agua para hidratarlos y se remueven durante suficiente tiempo para proporcionar una suspensión homogénea (típicamente 12 horas), y se añade pectina (o una solución de pectina), con calentamiento según sea necesario para mantener la viscosidad de la solución. A continuación, el procedimiento avanza de un modo sustancialmente similar a aquel para preparar microesferas simples (es decir, microesferas que no encapsulan un adsorbente).

55 Ventajosamente, la solución de pectina es de 1 a 10% (p/v), preferiblemente de 2 a 6%, la solución de iones cinc o calcio es ventajosamente de 2 a 15% (p/v) y la solución de polietilenimina, cuando se utiliza, es ventajosamente de 0,5 a 2% (p/v). Más preferiblemente, la solución de pectina es aproximadamente 3% (p/v), la solución de cinc es aproximadamente 10% (p/v) o la solución de iones calcio es aproximadamente 6% (p/v) y la solución de polietilenimina, cuando se utiliza, es de aproximadamente 0,5 a 1% (p/v), preferiblemente aproximadamente 0,8% (p/v), aunque en cualquier caso, la cantidad de polietilenimina (si está presente) se selecciona ventajosamente para

proporcionar microesferas de pectina reticuladas que sobrevivan en el tracto gastrointestinal hasta que alcanzan el colon, y que se degradan suficientemente en el colon para proporcionar una liberación eficaz del agente activo.

5 Las microesferas de pectina se remueven ventajosamente en la solución de iones cinc o calcio bajo agitación lenta durante entre 10 minutos y 1 hora, preferiblemente durante de aproximadamente 20 a 30 minutos. Aproximadamente 200 microesferas se lavan tres veces en 50 ml de agua Milli-Q bajo agitación lenta durante entre 0,5 y 10 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 1 minuto. Opcionalmente, el número de lavados se puede modificar. Opcionalmente, las microesferas se reticulan con polietilenimina bajo agitación lenta durante de 15 a 40 minutos, preferiblemente durante 20 minutos, y a continuación se lavan según el procedimiento descrito anteriormente. Después de recuperar las microesferas de pectina, se secan a una temperatura de entre 20 y 40°C durante de 30 min. a 10 horas, preferiblemente a 37°C durante 2 horas, o se liofilizan. El diámetro de las partículas está entre aproximadamente 0,5 mm y 5 mm, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y 2 mm. El diámetro de las partículas se puede ajustar finamente usando diferentes tamaño de aguja y flujo de pectina a través de la aguja.

15 En una realización, los sistemas de aporte basados en pectina se preparan según el siguiente procedimiento, que se basa en la gelificación ionotrópica de gotículas de solución de pectina cuando se ponen en una solución de un ion metálico divalente o polivalente tal como acetato de cinc o cloruro de calcio. El principio del método se presenta en la Figura 1.

20 En esta realización, una pectina tal como pectina metoxilada y pectina amidada (Unipeptina OG175C, Degussa Texturant System, Francia) se disuelve en agua Milli-Q utilizando un agitador magnético. La solución se puede calentar alrededor de 50°C para facilitar la disolución. La concentración de pectina final está típicamente entre 1% y 10% (p/v), aunque se pueden utilizar concentraciones fuera de este intervalo. A continuación, la solución de pectina se conduce con una bomba peristáltica o una bomba de jeringa a través de una aguja (diámetro interno: 0,5 mm) y cae gota a gota en una solución de un ion metálico divalente o polivalente, tal como acetato de cinc o cloruro de calcio (con una concentración de sal típica entre aproximadamente 1 y 12% p/v) a una velocidad típica de 60 a 80 microesferas por minuto (aunque se pueden utilizar velocidades superiores e inferiores, y la velocidad puede variar dependiendo de la escala del procedimiento).

30 Para reducir su viscosidad, la solución se puede calentar hasta alrededor de unos 50°C mientras se bombea. Los iones metálicos, tales como cinc o calcio, interactúan con los grupos COO⁻ disponibles en las moléculas de pectina según el modelo de la caja de huevos [Referencia 6]. Las gotas de pectina se dejan remover durante de unos 20 a 30 minutos en el baño de sal para permitir la difusión de la sal con la matriz de pectina y la formación completa de la red de pectinato de ion metálico (tal como pectinato de Zn o Ca). Idealmente, a continuación, las microesferas se filtran, se enjuagan y se lavan al menos tres veces con agua Milli-Q para eliminar la sal en exceso según se describió previamente, y a continuación se secan. El secado se puede conseguir utilizando cualquier medio apropiado, típicamente bien dejando simplemente las microesferas en el horno a alrededor de 37°C durante al menos 2 horas o bien liofilizándolas.

35 Después del secado, las microesferas simples (es decir que no encapsulan nada) tienen un tamaño alrededor del milímetro. Se puede variar el tamaño de las microesferas, por ejemplo, variando el caudal de la solución de pectina, el tamaño de la aguja, la concentración de pectina o la cantidad del material encapsulado. Una microesfera simple secada típica se presenta en la Figura 2. Las microesferas simples tienen una superficie bastante lisa.

Encapsulación de los adsorbentes dentro de microesferas de pectinato de Zn o Ca

40 La encapsulación de los adsorbentes se llevó a cabo simplemente preparando separadamente una suspensión del adsorbente en agua y una solución de pectina. La suspensión de adsorbente se preparó como sigue: el adsorbente seco se pesó y se añadió al agua (concentración entre 1 y 10% p/v) utilizando un agitador magnético. La suspensión se dejó remover durante la noche para asegurar que el adsorbente se hidrata totalmente (o se exfoliaba en el caso de las arcillas). Esta remoción prolongada también parece ser importante para el carbón vegetal activado: si el adsorbente no se deja remover durante la noche, la suspensión no es homogénea y la encapsulación no es fácil. La solución de pectina se calienta (máximo 50°C) y la suspensión de adsorbente se mezcló con él utilizando una herramienta propulsora de tres álabes durante al menos 30 min. La mezcla de la solución de pectina con la suspensión de adsorbente es crucial para una encapsulación adecuada y homogénea del adsorbente dentro de la matriz de pectina. Por ejemplo, si la suspensión de adsorbente no se deja remover durante la noche, se observa una separación de fases cuando se añade la solución de pectina: una fase rica en pectina y una fase rica en adsorbente. La heterogeneidad desaparece cuando la suspensión se hidrata bien durante la noche. Además de adsorbentes de calidad farmacéutica, también se encapsulaban Laponite XLG (Rockwood, R.U.) y sílice coloidal (Ludox® AS-40, Sigma, Francia). La laponita se hidrata del mismo modo que las arcillas naturales. En el caso de la sílice coloidal (40% p/v), puesto que este adsorbente ya es una suspensión, se mezclaba directamente con la solución de pectina utilizando una herramienta propulsora de tres álabes.

Las microesferas que contienen adsorbente se pueden preparar utilizando el mismo método que se describió para las microesferas simples. Se presentan imágenes de SEM de microesferas secadas en las Figuras 3, 4, 5 y 6.

Todas las microesferas tienen una superficie bastante rugosa en comparación con las microesferas simples. La

rugosidad surge de la encapsulación de los adsorbentes. Una confirmación de que la encapsulación era homogénea dentro de las microesferas se puede obtener cortando las microesferas antes de secar y obteniendo imágenes del interior mediante microscopía electrónica de barrido (no mostradas aquí). Los adsorbentes parecen estar homogéneamente distribuidos dentro de la matriz de pectinato. Estos resultados mostraban que a pesar de las dificultades de formulación debidas a la gran viscosidad de las soluciones de pectina, y los problemas de separación de fases, es posible incorporar importantes cantidades de adsorbentes dentro de soluciones de pectina y a continuación formar microesferas de pectinato de Zn o pectinato de Ca que encapsulan una gran cantidad de estos adsorbentes.

La estabilidad y las propiedades adsorptivas de microesferas preparadas según los métodos descritos en la presente memoria se evaluaron en los Ejemplos presentados posteriormente.

III. Sistemas de aporte de fármacos que incluyen las microesferas de pectina

Las microesferas de pectina pueden recogerse y combinarse con excipientes apropiados y formularse en una variedad de dispositivos de aporte oral de fármacos. Por ejemplo, las microesferas pueden combinarse con un excipiente sólido y formarse como comprimidos o incluirse en una cápsula.

Las microesferas de pectina también se pueden combinar con excipientes líquidos/en gel que no degradan las microesferas de pectina, y la mezcla/dispersión se puede incorporar en una cápsula, tal como una cápsula de gelatina.

Los comprimidos o las cápsulas hechos de las microesferas de pectina se pueden revestir, si se desea, con un revestimiento entérico adecuado para proporcionar una estabilidad mejorada mientras están en el estómago sin degradación. El pH en el estómago es del orden de 1 a 3 pero se incrementa en el intestino delgado y el colon para alcanzar valores cercanos a 7 (Hovgaard L. et al. (1996) *Current Applications of Polysaccharides in Colon Targeting, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 13, 185). Los dispositivos de aporte de fármacos, en forma de comprimidos, cápsulas de gelatina, esferoides y similares que contienen las microesferas de pectina, pueden alcanzar el colon, sin estar expuestos a estas variaciones en el pH, revistiéndolos con un polímero dependiente del pH, insoluble a pH ácido pero soluble a pH neutro o alcalino (Kinget et al. op. cit.). Los polímeros más habituales utilizados con este propósito son derivados de ácido metacrílico, Eudragit® L y S (Ashford M. et al. (1993), *An in vivo investigation into the suitability of pH-dependent polymers for colonic targeting, International Journal of Pharmaceutics*, 95, 193 y 95, 241; y David A. et al. (1997) *Acrylic polymers for colon-specific drug delivery, S.T.P. Pharma Sciences*, 7,546).

Los dispositivos de aporte de fármacos se administran en una cantidad elegida adecuada para proporcionar el tratamiento o la prevención eficaces de los trastornos para los que se administran los adsorbentes. Idealmente, la dosis eficaz de los adsorbentes descritos en la presente memoria es suficiente para proporcionar los efectos adsorptivos deseados en el colon, que pueden variar dependiendo de la naturaleza de la sustancia que va a ser adsorbida.

Típicamente, la dosis eficaz de los adsorbentes está en una cantidad menor de 100 mg/kg de peso corporal, a menudo menor de aproximadamente 1 mg/kg del peso del paciente y habitualmente, pero frecuentemente, entre aproximadamente 10 mg y menos de 100 mg/kg de peso del paciente. Las dosis eficaces precedentes representan típicamente la cantidad administrada como una sola dosis, o como una o más dosis administradas a lo largo de un período de 24 horas.

IV. Métodos de tratamiento que utilizan los dispositivos de aporte de fármacos que contienen adsorbente-microesferas de pectina

Los dispositivos de aporte de fármacos se pueden utilizar para tratar aquellos tipos de estados y trastornos para los que es apropiado el aporte colónico de adsorbentes. En una realización, los trastornos son los que resultan de la exposición del colon a antibióticos, tales como diarrea. En esta realización, los adsorbentes desactivan antibióticos, y los dispositivos se pueden administrar en una dosificación terapéuticamente eficaz a un paciente que ha recibido, está recibiendo o va a recibir un antibiótico. Se puede desactivar cualquier antibiótico que pueda ser adsorbido en/sobre el adsorbente. Ejemplos representativos de clases de antibióticos que pueden ser adsorbidas incluyen β -lactamas, ciclinas, macrólidos, quinolonas, aminoglicósidos, glicopéptidos, sulfamidas, fenicoles, sulfamidas, furanos, polipéptidos, oxazolidonas y antibióticos tales como fosfomicina, rifampina y similares.

En otra realización, los dispositivos de aporte de fármacos se pueden administrar a un paciente que sufra los efectos de toxinas bacterianas o fúngicas presentes en el colon. Ejemplos de tales toxinas incluyen micotoxinas, endotoxinas o enterotoxinas, tales como las producidas por *Clostridium difficile* (se cree que es una causa principal de diarrea posantibiótica en todo el mundo). En esta realización, los adsorbentes se administran en una dosificación terapéuticamente eficaz para adsorber las toxinas.

En otra realización, el dispositivo de aporte de fármacos se puede administrar a un paciente que sufra un trastorno tratado con agentes farmacéuticamente activos que se unen a receptores pertinentes en el cuerpo del paciente excepto en el colon para tratar el trastorno, pero que, cuando se unen a receptores en el colon, dan como resultado

5 efectos secundarios. Por ejemplo, el colon incluye receptores colinérgicos (<http://www.med-associates.com/gimm/gimmDrugScreen.htm>) y de serotonina, que también están presentes en el sistema nervioso central. El tratamiento con agentes que se unen a receptores colinérgicos puede dar como resultado efectos secundarios si los compuestos se unen a receptores en el colon. La coadministración de las partículas de adsorbente descrita en la presente memoria y los agentes que se unen a tales receptores pueden minimizar o eliminar estos efectos secundarios.

10 Se sabe que los problemas gastrointestinales son reacciones adversas a los fármacos comúnmente referidas con medicaciones para la presión sanguínea (bloqueadores de canales del calcio), medicaciones para el dolor (especialmente narcóticos), antidepresivos, antiácidos que contienen aluminio y calcio, fármacos antiparkinsonianos, antiespasmódicos, diuréticos y anticonvulsivos, y que muchas clases de fármacos están asociadas con el estreñimiento. A menudo, el estreñimiento persiste, y los pacientes interrumpen el tratamiento debido a que el efecto secundario es grave (<http://www.med-associates.com/gimm/gimmDrugScreen.htm>). Fármacos tales como la risperidona se pueden asociar con trastornos colónicos, tales como megacolon (<http://www.sma.org.sg/smj/4310/4310cr2.pdf>).

15 La presente invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Estabilidad de microesferas cargadas en medio gastrointestinal simulado

20 El tiempo de disolución de formulaciones seleccionadas, preparadas utilizando los métodos descritos anteriormente, se evaluó en medio gástrico simulado (MGS) (USP XXIV) (Tabla 1), medio intestinal simulado (MIS) (USP XXIV) (Tabla 2) y medio colónico simulado que contiene enzimas pectinolíticas (MCS) (Tabla 3), bajo remoción tangencial suave a 37°C.

Estabilidad en MGS (pH = 1,2)		
Ion conjugado		
	Cloruro cálcico	Acetato de cinc
Pectina (3% p/v) +	Sin desintegración después de 6 h	No probada
Atapulgita (3% p/v)		
Pectina (3% p/v) +	Sin desintegración después de 6 h	No probada
Caolín (5% p/v)		
Pectina (3% p/v) +	La desintegración empieza después de 6 h	Sin desintegración después de 6 h
Carbón vegetal activado (5% p/v)		

25 Tabla 1: Tiempo de desintegración en el medio gástrico simulado cuando el cloruro cálcico (6% p/v) se reemplaza por acetato de cinc (6% p/v) para la gelificación ionotrópica. Las microesferas solo se lavaron una vez para este grupo de experimento.

Estabilidad en MIS (pH = 6,8)		
Ion conjugado		
	Cloruro cálcico	Acetato de cinc
Pectina (3% p/v) + Atapulgita (3% p/v)	Sin desintegración después de 4 h	No probada
Pectina (3% p/v) + Caolín (5% p/v)	Sin desintegración después de 2 h 30	No probada
Pectina (3% p/v) + Carbón vegetal activado (5% p/v)	La desintegración empieza después de 2 h 30	Sin desintegración después de 6 h

5 Tabla 2: Tiempo de desintegración en el medio intestinal simulado cuando el cloruro cálcico (6% p/v) se reemplaza por acetato de cinc (6% p/v) para la gelificación ionotrópica. Las microesferas se lavaron una sola vez para este grupo de experimento.

Se observa una mejora de la estabilidad en el medio intestinal y colónico simulado cuando el cloruro cálcico se reemplaza por acetato de cinc para la gelificación ionotrópica.

	Ion conjugado Acetato de cinc (% p/v)	Estabilidad en MIS (pH 6,8)	Estabilidad en MCS (pH 6) con enzimas pectinolíticas (5.200 PG/ml) Después de 5 h en MIS
Pectina (3% p/v) + Carbón vegetal activado (5% p/v)	4 a 6	Desintegración antes de 5 h	No probada
	8	Sin desintegración después de 5 h	La desintegración comienza después de 3 h
	10		
	12		

10 Tabla 3: Estabilidad de microesferas de pectinato de Zn preparadas con diferentes concentraciones de solución de acetato de cinc, en MIS y en MCS después de 5 h en MIS. El procedimiento de lavado de las microesferas consistía en tres enjuagues de 1 minuto en 50 ml de agua Milli-Q para aproximadamente 200 microesferas.

Cuanto mayor es la concentración de cinc utilizada para la gelificación ionotrópica, más estables son las microesferas en medio intestinal simulado (Tabla 3).

		Ion conjugado	
		Acetato de cinc (% p/v)	Estabilidad en MCS (pH 6) con enzimas pectinolíticas (5.200 PG/ml)
Pectina (3% p/v) + Carbón vegetal activado (5% p/v)	8		La desintegración empieza después de 1 h Desintegración total después de 3 h
	10		La desintegración empieza después de 1h Desintegración total después de 2 h 30
	12		La desintegración empieza después de 1 h Desintegración total después de 3 h

5 Tabla 4: Estabilidad de microesferas de pectinato de Zn preparadas con diferentes concentraciones de acetato de cinc, en MCS sin preincubación en MIS. El procedimiento de lavado de las microesferas consistía en tres enjuagues de 1 minuto en 50 ml de agua Milli-Q para aproximadamente 200 microesferas.

Sin preincubación en medio intestinal simulado, para concentraciones de cinc mayores de 8% (p/v), el tiempo de desintegración en medio colónico simulado está comprendido entre 1 y 3 horas (Tabla 4).

	Mezcla de iones conjugados		Estabilidad en SIM (pH 6,8)	Estabilidad en MCS (pH 6) con enzimas pectinolíticas (5.200 PG/ml) Después de 5 h en MIS
	Acetato de cinc (% p/v)	Cloruro cálcico (% p/v)		
Pectina (3% p/v) + Carbón vegetal activado (5% p/v)	6	3	Sin desintegración después de 5 h	La desintegración empieza después de 3 h
		6		
	12	3	Sin desintegración después de 5 h	La desintegración empieza después de 3 h
		6		

10 Tabla 5: Estabilidad de microesferas de pectinato de Zn-Ca preparadas con diferentes concentraciones de mezclas de acetato de cinc y cloruro cálcico, en MIS y en MCS después de 5 h en MIS. El procedimiento de lavado de las microesferas consistía en tres enjuagues de 1 minuto en 50 ml de agua Milli-Q para aproximadamente 200 microesferas.

15 La adición de cloruro cálcico a la solución de acetato de cinc al 6% utilizada para la gelificación ionotrópica mejora la estabilidad de las microesferas en MIS en comparación con microesferas preparadas sin calcio (Tabla 5). Sin embargo, no se observa diferencia cuando se añade CaCl₂ a la solución de acetato de cinc al 12%.

	Mezcla de iones conjugados		Estabilidad en MCS (pH 6) con enzimas pectinolíticas (5.200 PG/ml)
	Acetato de cinc (% p/v)	Cloruro cálcico (% p/v)	
Pectina (3% p/v)	6	3	La desintegración empieza después de 1 h
		6	Desintegración total después de 2 h 30
+ Carbón vegetal activado (5% p/v)	12	3	La desintegración empieza después de 1 h
		6	Desintegración total después de 3 h

5 Tabla 6: Estabilidad de microesferas de pectinato de Zn-Ca preparadas con diferentes concentraciones de mezclas de acetato de cinc y cloruro cálcico, en MCS sin preincubación en MIS. El procedimiento de lavado de las microesferas consistía en tres enjuagues de 1 minuto en 50 ml de agua Milli-Q para aproximadamente 200 microesferas.

Sin preincubación en MIS, la estabilidad de las microesferas en MCS es aproximadamente la misma para las diferentes concentraciones de cinc y calcio que se han evaluado. El tiempo de desintegración en medio colónico simulado está comprendido entre 1 y 3 horas (Tabla 6).

	Ion conjugado	Revestimiento	Estabilidad en MIS (pH 6,8)	Estabilidad en MCS (pH 6) con enzimas pectinolíticas (5.200 PG/ml)
	Cloruro cálcico (% p/v)	PEI (% p/v)		Después de 5 h en MIS
Pectina (3% p/v)	2	0,6	Sin desintegración después de 5 h	La desintegración empieza después de 5 h
		0,8		
		1		
+ Carbón vegetal activado (5% p/v)	6	0,6	Sin desintegración después de 5 h	La desintegración empieza después de 5 h
		0,8		
		1		

10 Tabla 7: Estabilidad de microesferas de pectinato de Ca preparadas con diferentes concentraciones de cloruro cálcico y revestidas con polietilenimina, en MIS y en MCS después de 5 h en MIS. El procedimiento de lavado de las microesferas consistía en tres enjuagues de 1 minuto en 50 ml de agua Milli-Q para aproximadamente 200 microesferas.

15 El revestimiento de PEI mejora considerablemente la estabilidad de las microesferas tanto en el medio intestinal simulado como en el medio colónico simulado en comparación con microesferas de pectinato de Ca no revestidas (Tabla 7).

	Ion conjugado	Revestimiento	Estabilidad en MCS (pH 6) con enzimas pectinolíticas (5200 PG/ml)
	Cloruro cálcico (% p/v)	PEI (% p/v)	
Pectina (3% p/v)	2	0,6	La desintegración empieza después de 5 h
		0,8	
		1	
+ Carbón vegetal activado (5% p/v)	6	0,6	La desintegración empieza después de 5 h
		0,8	
		1	

5 Tabla 8: Estabilidad de microesferas de pectinato de Ca preparadas con diferentes concentraciones de cloruro cálcico y revestidas con polietilenimina, en MCS sin preincubación en MIS. El procedimiento de lavado de las microesferas consistía en tres enjuagues de 1 minuto en 50 ml de agua Milli-Q para aproximadamente 200 microesferas.

Sin preincubación en MIS, el revestimiento de PEI mejora considerablemente la estabilidad de las microesferas en el medio colónico simulado en comparación con microesferas de pectinato de Ca no revestidas (Tabla 8).

			Ion conjugado		Estabilidad en MCS (pH 6) con enzimas pectinolíticas (5.200 PG/ml)
			Acetato de cinc	Estabilidad en MIS (pH 6,8)	Después de 5 h en MIS
			(% p/v)		
Pectina (3% p/v) + Carbón vegetal activado (5% p/v) + agente desintegrante	d-lactosa USP	10	10	Sin desintegración después de 5 h	La desintegración empieza después de 3 h
			12		
		20	10	Sin desintegración después de 5 h	La desintegración empieza después de 3 h
	PVP Kollidon® K17 PF	0,5	10	Sin desintegración después de 5 h	La desintegración empieza después de 3 h
		1		Sin desintegración después de 5 h	La desintegración empieza después de 4 h
		5			
		10			
	Monooleato de POE-sorbitán	1	10	Sin desintegración después de 5 h	La desintegración empieza después de 3 h
		5			
		10		Sin desintegración después de 5 h	La desintegración empieza después de 1 h 30 Desintegración total después de 3 h
	Poloxámero 188	0,1	10	Sin desintegración después de 5 h	La desintegración empieza después de 3 h
		0,5			
		1		Sin desintegración después de 5 h	La desintegración empieza después de 2 h Desintegración total después de 3 h 15
		5			
		10			

Tabla 9: Estabilidad de microesferas de pectinato de cinc que incluyen un agente desintegrante, en MIS y en MCS después de 5 h en MIS. El procedimiento de lavado de las microesferas consistía en tres enjuagues de 1 minuto en 50 ml de agua Milli-Q para aproximadamente 200 microesferas.

5

Los diferentes agentes desintegrantes probados no influyen en la estabilidad de las microesferas en el MIS: todas las formulaciones son estables durante al menos 5 horas (Tabla 9). La inclusión de d-lactosa o Kollidon® K 17 no

5 modifica el tiempo de desintegración de las microesferas en el MCS después de la incubación en el MIS, en comparación con las microesferas de pectinato de Zn sin agente desintegrante. Por otra parte, las concentraciones grandes de Tween® 80 (c = 10% (p/v)) y las concentraciones medias de Lutrol® F68 (c = 5% (p/v)) disminuyen la estabilidad de las microesferas en el MCS después de la incubación en el MIS. Para Tween® 80 (c = 10% (p/v)), la desintegración empieza después de 1,5 horas de incubación en MCS y se acaba después de 3 horas. Para Lutrol® F68 (c = 5% (p/v)), la desintegración empieza después de 2 horas of incubación en MCS y se acaba después de 3 horas y 15 minutos.

		Ion conjugado	Acetato de cinc	(% p/v)	Estabilidad en MCS (pH 6) con enzimas pectinolíticas (5.200 PG/ml)	
Pectina (3% p/v) + Carbón vegetal activado (5% p/v) + agente desintegrante	d-lactosa USP (% p/v)	10	10	10	La desintegración empieza después de 1 h Desintegración total después de 2 h 30	
				12	10	La desintegración empieza después de 1 h Desintegración total después de 4 h
			20	10	10	La desintegración empieza después de 1 h Desintegración total después de 3 h
		PVP Kollidon® K17 PF (% p/v)	0,5	10	10	No probada
			1			La desintegración empieza después de 45 min
			5			Desintegración total después de 1 h 15
			10			
		Monooleato de POE sorbitán Tween® 80 (% p/v)	1	10	10	La desintegración empieza después de 2 h Desintegración total después de 3 h 30
			5			La desintegración empieza después de 30 min
			10			Desintegración total después de 1 h 15
		Poloxámero 188 Lutrol® F68 (% p/v)	0,1	10	10	La desintegración empieza después de 1 h Desintegración total después de 1 h 30
			0,5			La desintegración empieza después de 1 h Desintegración total después de 1 h 30
			1			La desintegración empieza después de 30 min
			5			La desintegración empieza después de 30 min
			10			La desintegración empieza después de 2 h 30

10 Tabla 10: Estabilidad de microesferas de pectinato de Zn que incluyen un agente desintegrante, en MCS sin preincubación en MIS. El procedimiento de lavado de las microesferas consistía en tres enjuagues de 1 minuto en 50 ml de agua Milli-Q para aproximadamente 200 microesferas.

Como ya se observó con la preincubación en MIS, son de interés dos formulaciones cuando se necesita una desintegración rápida: Tween® 80 (c = 10% (p/v) y Lutrol® F68 (c = 5% (p/v)) (Tabla 10).

Ejemplo 2. Eficacia de adsorción en condiciones colónicas simuladas con adsorbentes simples

5 Se probó la adsorción de tres adsorbentes de calidad farmacéutica para amoxicilina y ciprofloxacina bajo condiciones colónicas simuladas determinando la concentración residual de antibióticos, utilizando HPLC. El medio colónico simulado (MCS) utilizado para estos experimentos era el siguiente: solución de HEPES (2,383 g/l) y NaCl (8,474 g/l) (pH 6). Los adsorbentes se incubaron en el medio colónico descrito anteriormente a 37°C bajo remoción tangencial suave. En momentos deseados, las suspensiones se recogieron y se centrifugaron a 10.000 RPM
10 utilizando una microcentrífuga. El sobrenadante se filtró en una unidad filtrante accionada por jeringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm; Millipore, Francia) y se ensayó su concentración de antibiótico utilizando HPLC. Muestras de control del MCS probado se incubaron con las mismas condiciones experimentales. El porcentaje de antibióticos que permanecía en el MCS después de la incubación con adsorbentes se determinó mediante comparación con controles incubados.

Cinética de adsorción de amoxicilina

15 Se estudió la capacidad de la atapulgita, el carbón vegetal activado y el caolín para adsorber amoxicilina en condiciones colónicas simuladas. La concentración de amoxicilina antes y después de la exposición a los adsorbentes se determinó utilizando HPLC acoplada con detección UV ($\lambda = 230$ nm). La separación se alcanzaba utilizando Ypersphere® 5µm (250 x 4,6 mm, Interchim, Francia), una columna de fase inversa C18, a temperatura ambiente. La fase móvil consistía en una mezcla de solución de fosfato al 95% (KH₂PO₄, 0,01 M, acidificada a pH 3
20 con ácido ortofosfórico) y acetonitrilo al 5%. El caudal se fijó a 1,3 ml/min. Las condiciones experimentales y los resultados de los experimentos de unión con amoxicilina se muestran en la Tabla 11.

25

[Atapulgita] (mg/ml)	[Amoxicilina] (mg/ml)	Tiempo de incubación (min.)	Adsorción	Estabilidad (min.)	Amox. Eliminada (%)
0,5	2	0, 30, 60, 180	-		
5	2	0, 30, 60, 180	-		
20	1	0, 30, 60, 180	-		
*200	0,5	0, 30, 60, 120, 180, 360	+	>360	≈45
200	1	0, 180, 900	+	>360	≈25

30

[Caolín] (mg/ml)	[Amoxicilina] (mg/ml)	Tiempo de incubación (min.)	Adsorción	Estabilidad (min.)	Amox. Eliminada (%)
0,5	2	0, 30, 60, 180	-		
5	2	0, 30, 60, 180	-		
20	1	0, 30, 60, 180	-		
*200	0,5	0, 30, 60, 120, 180, 360	+	>360	≈25
200	1	0, 180, 900	+	>180	≈30

[Carbón vegetal activado] (mg/ml)	[Amoxicilina] (mg/ml)	Tiempo de incubación (min.)	Adsorción	Estabilidad (min.)	Amox. Eliminada (%)
**1	1	0,5, 15,30, 60, 120, 180, 360	++	15-30	≈25
**5	1	0,5, 15,30, 45,60	++	15	75
*10	0,5	0,5, 15,30, 60, 120, 180, 360	++	15	>95
**	1	0,5, 15,30, 45,60	++	15	>95

*Figura 7.

**Figura 8.

5 Tabla 11: Condiciones experimentales y características de la eliminación de amoxicilina mediante adsorción sobre adsorbentes puros.

10 Las Figuras 7 y 8 presentan el porcentaje de amoxicilina eliminada (0,5 y 1 mg/ml) frente al tiempo de contacto con cada adsorbente probado, en SCM sin enzimas pectinolíticas. Según se muestra en estas figuras, la adsorción de amoxicilina es muy eficaz con carbón vegetal activado mientras que se observa en un grado menor con atapulgita y caolín. Después de 6 horas de incubación, el porcentaje de amoxicilina eliminada de los diferentes adsorbentes variaba de alrededor de 25% hasta 95% con mayor reducción para el carbón vegetal activado. Estos resultados presentan que el máximo de adsorción siempre se alcanza después de un tiempo de contacto relativamente corto con carbón vegetal activado. La estabilidad aparece después de 15 a 30 min. de incubación independientemente de la concentración de amoxicilina probada (0,5 y 1 mg/ml) y la cantidad de carbón vegetal (1, 5 y 10 mg/ml). La 15 atapulgita y el caolín reducen la concentración de amoxicilina, pero para la concentración superior (200 mg/ml) y el estado estacionario se alcanza solo después de 6 horas.

Por otra parte, los resultados presentados en la Figura 8 demuestran que la velocidad de adsorción no está relacionada con la concentración de carbón vegetal. Sin embargo, la cantidad de amoxicilina adsorbida en la saturación es muy dependiente de la dosis.

20 Los resultados obtenidos para el carbón vegetal activado eran muy prometedores. Evidencian que cantidades bastante pequeñas de este adsorbente (de 1 mg/ml a 10 mg/ml) permitían eliminar amoxicilina en una concentración comprendida entre 0,250 mg/ml y 1 mg/ml de heces. A partir de lo que se sabe acerca de la farmacología de la amoxicilina, la concentración residual esperada de amoxicilina en las heces (alrededor de 5 a 10% de dosis orales estándar (de 1 a 2 g/día)) corresponde a de 0,08 a 0,33 mg/ml de heces. Este intervalo de concentración está de acuerdo con el intervalo de concentración que las partículas descritas en la presente memoria son capaces de 25 desactivar.

Cinética de adsorción de la ciprofloxacina

30 La concentración de ciprofloxacina después del contacto con adsorbentes puros se determinó utilizando HPLC acoplado con detección UV a 278 nm. Se prepararon muestras de control como se mencionó anteriormente. La separación se alcanzaba a 25°C, utilizando una columna C18 Symmetry® (5 µm, 150 x 4,6 mm; Waters, Francia). La fase móvil era acetonitrilo al 10% en solución de NaH₂PO₄ 0,02 M (acidificada a pH 3 con ácido ortofosfórico). El caudal era 1 ml/min.

La Tabla 12 presenta las condiciones experimentales y los resultados de la cinética de adsorción con ciprofloxacina.

[Atapulgita] (mg/ml)	[Ciprofloxacina] (µg/ml)	Tiempo de incubación (min.)	Adsorción	Estabilidad (min.)	Cipro. Eliminada (%)
*1	100	0, 15, 60, 180	+	15-30	≈45
[Caolín] (mg/ml)	[Ciprofloxacina] (µg/ml)	Tiempo de incubación (min.)	Adsorción	Estabilidad (min.)	Cipro. Eliminada (%)
*1	100	0, 15, 60 180	+	15	≈10
10	100	0, 15, 60, 180	++	15-30	≈80
[Carbón vegetal activado] (mg/ml)	[Ciprofloxacina] (µg/ml)	Tiempo de incubación (min.)	Adsorción	Estabilidad (min.)	Cipro. Eliminada (%)
*1	100	0, 15, 60, 180	++	15	> 95
**1	500	0, 15, 60, 180	+	15-30	≈45

*Figura 9.

**Figura 10.

5 Tabla 12: Condiciones experimentales y características de la eliminación de ciprofloxacina mediante adsorción sobre adsorbentes puros.

La Figura 9 presenta el porcentaje de ciprofloxacina eliminada mediante adsorción frente al tiempo de incubación con matrices adsorbentes. En comparación con la amoxicilina, se observaba que la velocidad de adsorción es más rápida para los tres adsorbentes probados. La estabilidad se alcanza entre 15 y 30 minutos independientemente del adsorbente utilizado. Como ya se observaba con la amoxicilina, el carbón vegetal activado exhibe una capacidad de adsorción superior que la atapulgita, que es más eficaz que el caolín. Como se muestra en la Figura 10, cuando la concentración de ciprofloxacina se incrementa cinco veces, el equilibrio de adsorción sobre carbón vegetal todavía se produce después de 15 a 30 min. de incubación. Es más, el carbón vegetal activado en 1 mg/ml todavía era eficaz para eliminar el antibiótico mediante adsorción (45% de 0,5 mg/ml), que se eliminaba en de 15 a 30 minutos. Aunque solo se desactivara 45% de la concentración inicial, todavía representaba cuantitativamente una cantidad superior de antibiótico eliminado mediante adsorción: alrededor de 0,225 mg/ml. Estos resultados están de acuerdo con la concentración residual esperada de ciprofloxacina en las heces, lo que significa un máximo de 25% de las dosis orales (de 1 a 1,5 g/día), es decir alrededor de 0,420 mg/ml a 0,625 mg/ml.

Ejemplo 3: Eficacia de adsorción en condiciones colónicas simuladas con adsorbentes encapsulados

20 Experimento 1: Se utilizaron para este experimento microesferas de pectinato de Ca que encapsulan carbón vegetal activado. La relación de carbón vegetal activado a pectina era 5/3 (p/p). Las microesferas se lavaron una sola vez para este experimento. La eficacia del adsorbente para reducir la concentración de ciprofloxacina después de la liberación de la pectina se determinó bajo condiciones colónicas simuladas. El MCS utilizado para este estudio era el siguiente: solución de HEPES (2,383 g/l) y NaCl (8,474 g/l) (pH 6) que contenía una solución de enzimas pectinolíticas (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, Francia) (1/20; v/v).

25 Las microesferas se incubaron en el MCS descrito anteriormente que contenía ciprofloxacina a 37°C bajo remoción tangencial suave. En momentos deseados las muestras se centrifugaron a 10.000 RPM utilizando una microcentrífuga. El sobrenadante se filtró en una unidad filtrante accionada por jeringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) y se analizó utilizando HPLC.

Cinética de adsorción de la ciprofloxacina

30 La Tabla 13 presenta condiciones experimentales y porcentajes de ciprofloxacina eliminados mediante adsorción de carbón vegetal activado después de su liberación de microesferas de pectinato de Ca.

Microesfera de pectinato de Ca cargada con carbón vegetal activado	[Ciprofloxacina] (µg/ml)	Tiempo de incubación (min.)	Adsorción	Estabilidad (min.)	Ciprofloxacina Eliminada (%)	
1 microesfera/ml	100	0, 15, 60, 180	++	60-90	>95	
	100	0, 15, 60, 180	++	60-90		
	100	0, 15, 60, 80	++	60-90		
	100	0, 15	+		59	
	500	0, 15, 60	+	>60	≈40	
	500	0, 15, 60, 180	+	60-90	≈45	
	500	0, 15, 60, 180	+	60-90	≈45	

Tabla 13: Condiciones experimentales de los experimentos de unión y parámetros de eliminación de ciprofloxacina mediante adsorción sobre carbón vegetal activado liberado de microesferas de pectinato de Ca, bajo condiciones colónicas simuladas.

5 Utilizando un MCS que contenía pectinasas en 1/20, las microesferas de pectinato de Ca se desintegraban completamente después de alrededor de 30 minutos. Las Figuras 11 a y b muestran que la ciprofloxacina se eliminaba mediante adsorción cuando se incubaba como microesferas cargadas con carbón vegetal en MCS. El estado estacionario se retrasaba en comparación con los experimentos de unión con adsorbentes simples. Las diferencias observadas en la velocidad de adsorción podrían resultar del tiempo empleado para que la matriz de pectinato de Ca se desintegre. En el equilibrio de adsorción, la cantidad de ciprofloxacina eliminada por adsorción era cuantitativamente igual que la cantidad adsorbida sobre el carbón vegetal no encapsulado. Esto significa que el carbón vegetal activado se liberaba en efecto de las microesferas cuando se incubaba en MCS que contenía pectinasas y que su capacidad de adsorción no estaba afectada por la encapsulación.

15 Experimento 2: Se utilizaron para este experimento microesferas de pectinato de Ca y pectinato de Zn que encapsulaban carbón vegetal activado. La relación de carbón vegetal activado a pectina era 5/3 (p/p). La concentración de calcio utilizada para la gelificación ionotrópica era 6% (p/v) y la concentración de Zn utilizada para la gelificación ionotrópica era 6% (p/v). Se realizó una remoción suave; las microesferas se lavaron una sola vez para este experimento. La eficacia del adsorbente para reducir la concentración de ciprofloxacina después de la liberación desde la pectina se determinó bajo condiciones colónicas simuladas. El MCS utilizado para este estudio era el siguiente: solución de HEPES (2,383 g/l) y NaCl (8,474 g/l) (pH 6) que contenía una solución de enzimas pectinolíticas (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, Francia) (1/20; v/v).

25 Las microesferas se incubaron en el MCS descrito anteriormente que contenía ciprofloxacina a 37°C bajo remoción tangencial suave. En momentos deseados las muestras se centrifugaron a 10.000 RPM utilizando una microcentrífuga. El sobrenadante se filtró en una unidad filtrante accionada por jeringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) y se analizó utilizando HPLC. Típicamente, una microesfera se incubaba con 1,5 ml de MCS.

30 La Figura 12 muestra que ambos tipos de microesferas (Ca y Zn) eran capaces de adsorber ciprofloxacina. La cinética de adsorción es más prolongada para las microesferas de pectinato de Zn, probablemente debido a su tiempo de desintegración más lento en el MCS. La capacidad de adsorción de carbón vegetal activado liberado de microesferas de pectinato de Ca tiende a alcanzar la saturación después de 3 horas de incubación, mientras que la eliminación de ciprofloxacina mediante adsorción sobre carbón vegetal activado liberado desde microesferas de pectinato de Zn todavía se incrementa después de 4 horas de contacto.

Según se muestra en la Figura 13, aproximadamente 40% de la ciprofloxacina inicial se elimina mediante adsorción después de 4 horas de incubación en el MCS.

35 Experimento 3: Se utilizaron para este experimento microesferas de pectinato de Zn que encapsulaban carbón vegetal activado. La relación de carbón vegetal activado a pectina era 5/3 (p/p). La concentración de cinc utilizada para la gelificación ionotrópica era 10% (p/v). Para este experimento, las microesferas se lavaron tres veces durante 1 minuto. La eficacia del adsorbente para reducir la concentración de ciprofloxacina después de la liberación desde la pectina se determinó bajo condiciones colónicas simuladas. El MCS utilizado para este estudio era el siguiente: solución de HEPES (2,383 g/l) y NaCl (8,474 g/l) (pH 6) que contenía una solución de enzimas pectinolíticas

(Pectinex® SPL Ultra, Sigma, Francia) (1/5; v/v). Típicamente, una o dos microesferas se incubaban con MCS que contenía 100 µg/ml de ciprofloxacina (2 mg o 5 mg de microesferas/ml de MCS). Las microesferas se incubaron en el MCS descrito anteriormente que contenía ciprofloxacina a 37°C bajo remoción tangencial suave. En momentos deseados las muestras se centrifugaron a 10.000 RPM utilizando una microcentrífuga. El sobrenadante se filtró en una unidad filtrante accionada por jeringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) y se analizó utilizando HPLC.

Según se muestra en la Figura 14, la cinética de adsorción de ciprofloxacina mediante microesferas de pectinato de Zn cargadas con carbón vegetal activado es un procedimiento en dos etapas. Antes de que las microesferas se desintegren totalmente, la ciprofloxacina se adsorbe lentamente y débilmente (solo alrededor de 10% o 30% adsorbido durante la primera hora de incubación, para 2 mg o 5 mg de microesferas/ml de MCS, respectivamente). Después de una hora de incubación, las microesferas han liberado su contenido de carbón vegetal y la adsorción es más rápida y más fuerte. Después de 4 horas de incubación, hasta 70% de la ciprofloxacina inicial es eliminada por una concentración de carbón vegetal de 2 mg/ml de MCS. Un incremento en la cantidad de microesferas hasta 5 mg/ml de MCS conduce a un incremento de la velocidad de adsorción sobre la matriz; el proceso de adsorción tiende a una estabilidad después de 2 horas de incubación y después de 4 horas hasta 95% de la ciprofloxacina inicial se retira mediante adsorción.

Experimento 4: Se utilizaron para este experimento microesferas de pectinato de Zn que encapsulaban carbón vegetal activado. La relación de carbón vegetal activado a pectina era 5/3 (p/p). La concentración de cinc utilizada para la gelificación ionotrópica era 10% (p/v). Las microesferas se formularon con 10% (p/v) de Tween 80. Las microesferas se lavaron tres veces durante 1 minuto. La eficacia del adsorbente para reducir la concentración de ciprofloxacina después de la liberación desde la pectina se determinó bajo condiciones colónicas simuladas. El MCS utilizado para este estudio era el siguiente: solución de HEPES (2,383 g/l) y NaCl (8,474 g/l) (pH 6) que contenía una solución de enzimas pectinolíticas (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, Francia) (1/5; v/v). Típicamente, una microesfera se incubaba con MCS que contenía 100 µg/ml de ciprofloxacina (2 mg de microesferas/ml de MCS).

Las microesferas se incubaron en el MCS descrito anteriormente que contenía ciprofloxacina a 37°C bajo remoción tangencial suave. En momentos deseados las muestras se centrifugaron a 10.000 RPM utilizando una microcentrífuga. El sobrenadante se filtró en una unidad filtrante accionada por jeringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) y se analizó utilizando HPLC.

Según se muestra en la Figura 15, la ciprofloxacina se adsorbe lentamente y débilmente: solo 10% de la concentración inicial se ha adsorbido después de 3 horas de incubación aunque el carbón vegetal activado se haya liberado de las microesferas. La ciprofloxacina puede competir con Tween 80 con respecto a la adsorción sobre carbón vegetal activado.

Experimento 5: Se utilizaron para este experimento microesferas de pectinato de Zn que encapsulan carbón vegetal activado. La relación de carbón vegetal activado a pectina era 5/3 (p/p). La concentración de cinc utilizada para la gelificación ionotrópica era 10% (p/v). Las microesferas se formularon con 5% (p/v) de Lutrol® F68. Las microesferas se lavaron tres veces durante 1 minuto. La eficacia del adsorbente para reducir la concentración de ciprofloxacina después de la liberación desde la pectina se determinó bajo condiciones colónicas simuladas. El MCS utilizado para este estudio era el siguiente: solución de HEPES (2,383 g/l) y NaCl (8,474 g/l) (pH 6) que contenía una solución de enzimas pectinolíticas (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, Francia) (1/5; v/v). Típicamente, una o dos microesferas se incubaban con MCS que contenía 100 µg/ml de ciprofloxacina (2 mg o 5 mg de microesferas/ml de MCS).

Las microesferas se incubaron en el MCS descrito anteriormente que contenía ciprofloxacina a 37°C bajo remoción tangencial suave. En momentos deseados las muestras se centrifugaron a 10.000 RPM utilizando una microcentrífuga. El sobrenadante se filtró en una unidad filtrante accionada por jeringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) y se analizó utilizando HPLC.

Según se muestra en la Figura 16, la cantidad de ciprofloxacina eliminada mediante adsorción sobre carbón vegetal activado liberado de microesferas de pectinato de Zn preparadas con Lutrol® F68 se incrementa hasta que alcanza una estabilidad después de 2 a 3 horas de incubación, independientemente de la cantidad de microesferas utilizada. La ciprofloxacina eliminada es alrededor de 30% y 60% de la concentración inicial después de 3 horas de incubación, para una concentración de microesferas de 2 mg/ml y 5 mg/ml de MCS, respectivamente. La capacidad de adsorción de carbón vegetal activado parece estar afectada por la presencia de Lutrol® F68.

Experimento 6: Controles para la adsorción de ciprofloxacina sobre la eficacia de adsorción de microesferas cargadas con carbón vegetal: eficacia de adsorción en condiciones colónicas simuladas con "microesferas simples"

Para estos experimentos se utilizaron "microesferas simples". Se prepararon microesferas de pectinato de Ca y pectinato de Zn con una solución de pectina al 3% (p/v) y con solución de acetato de cinc al 6 y 10% p/v, respectivamente, según se menciona para las microesferas cargadas con adsorbente. La ciprofloxacina (100 µg/ml) se incubó con "microesferas simples" bajo las mismas condiciones experimentales que las pruebas de unión con microesferas cargadas. Basándose en el hecho de que una microesfera cargada con carbón vegetal incluía alrededor de 0,5 mg de pectina, se llevaron a cabo pruebas de control utilizando solución de ciprofloxacina en proporción 1 ml/0,5 mg de microesferas simples. La concentración residual de antibiótico se determinó utilizando

HPLC-UV mixtas, según se describió anteriormente. Después de 3 horas de incubación, el nivel de ciprofloxacina en las muestras probadas no difiere de los controles (Tabla 14 y 15). La cantidad de antibiótico permanecía constante, demostrando que la ciprofloxacina no era adsorbida por la pectina.

Tiempo de incubación (min.)	Concentración de ciprofloxacina (µg/ml)		
	15	60	180
Controles (sin microesferas) (n = 3)	95,6±0,1	95,7±0,1	95,9±0,4
Con microesferas simples de pectinato de Ca (n = 3)	95,50±.1 96,2±0,2	95,9:1:0,1 96,6±0,25	95,1±0,3 95,3±0,5

- 5 Tabla 14: Concentración residual de ciprofloxacina después de la incubación sin o con microesferas de pectinato de calcio simples, en MCS (enzimas pectinolíticas: 1/20).

Tiempo de incubación (min)	Concentración de ciprofloxacina (µg/ml)		
	30	60	180
Controles (sin microesferas) (n = 2)	106±0,1	106±0,1	107±0,1
Con microesferas de pectinato de Zn simples (n = 2)	105±0,1	104±0,1	104±0,1

Tabla 15: Concentración residual de ciprofloxacina después de la incubación sin o con microesferas de pectinato de cinc simples, en MCS (enzimas pectinolíticas: 1/20).

- 10 Ejemplo 4: Adsorción de toxinas de *Clostridium difficile*

Eficacia de adsorción en condiciones colónicas simuladas con adsorbentes encapsulados

- 15 Las toxinas de *Clostridium difficile* (A y 8) fueron proporcionadas por Sigma-Aldrich (EE. UU. de A.). Se utilizaron para este experimento microesferas de pectinato de Ca que encapsulan carbón vegetal activado, sustancialmente como se describió anteriormente. La relación de carbón vegetal activado a pectina era 5/3 (p/p). La eficacia del adsorbente para reducir la concentración de toxinas de *C. difficile* después de la liberación desde la pectina se determinó bajo condiciones colónicas simuladas.

El MCS utilizado para este estudio era el siguiente: solución de HEPES (2,383 g/l) y NaCl (8,474 g/l) (pH 6) que contenía una solución de enzimas pectinolíticas (Pectinex® SPL Ultra, Sigma, Francia) (1/20; v/v). Las microesferas

se incubaron en el SCM descrito anteriormente que contiene toxinas de *C. difficile* a 37°C bajo remoción tangencial suave. En momentos deseados las muestras se centrifugaron a 10.000 RPM utilizando una microcentrífuga. El sobrenadante se filtró en una unidad filtrante accionada por jeringa (Millex®-HV, 0,45 µm, PVDF, 4 mm) y se analizó utilizando un ensayo ELISA (estuche Premier Toxins A&B de meridian Bioscience, Inc. Cincinnati, Ohio).

- 5 Se observó una adsorción rápida de las toxinas incubadas en MCS, sugiriendo que los sistemas de aporte colónico particulados descritos en la presente memoria adsorberán toxinas bacterianas y fúngicas en el colon, y aliviarán los síntomas provocados por estas toxinas.

Referencias

1. Leonard, F., et al., *Use of beta-lactamase producing anaerobes to prevent ceftriaxone from degrading intestinal resistance to colonization*. J Infect Dis, 1989. **160**(2): p. 274-80.
2. Stiefel, U., et al., *Oral administration of beta-lactamase preserves colonization resistance of piperacillin-treated mice*. J Infect Dis, 2003. **188**(10): p. 1605- 9.
3. Alegakis, A.K., et al., *In vitro study of oxytetracycline adsorption on activated charcoal*. J Environ Sci Health B, 2000. **35**(5): p. 559-69.
4. Browne, J.E., et al., *Characterization and adsorptive properties of pharmaceutical grade clays*. J Pharm Sci, 1980. **69**(7): p. 816-23.
5. Khalil, S., L. Mortada, and M. El-Khawas, *The uptake of ampicillin and amoxycillin by some adsorbents*. Int. J. Pharm., 1984. **18**: p. 157-167.
6. Grant, G., et al., *Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model*. FEBS letter, 1973. **32**: p. 195-198.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un sistema de aporte específico para el colon, particulado, oralmente administrable, para la preparación de un medicamento para desactivar sustancias presentes en el colon, o a medida que alcanzan el colon, seleccionándose dichas sustancias de antibióticos, productos químicos, alérgenos, toxinas y agentes farmacéuticos que se sabe que provocan efectos secundarios cuando alcanzan el colon, caracterizada porque el sistema de aporte comprende un adsorbente encapsulado en un polímero seleccionado del grupo que consiste en quitosano, alginatos, xantano, curdlano, goma guar, pectina y un polímero de poli(metacrilato de metilo).
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho sistema de aporte comprende un adsorbente capaz de adsorber un antibiótico, una toxina bacteriana o fúngica o un agente farmacéuticamente activo que se sabe que provocan efectos adversos cuando alcanzan el colon.
3. Utilización según la reivindicación 1 o 2, en la que la pectina está entrecruzada con iones cinc o calcio.
4. Utilización según la reivindicación 3, en la que la pectina entrecruzada contiene un agente desintegrante.
5. Utilización según la reivindicación 3 o 4, en la que la pectina entrecruzada está reticulada con polietilenimina.
6. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el adsorbente se selecciona del grupo que consiste en carbón vegetal activado, arcillas, talco y sílice.
7. Utilización según la reivindicación 6, en la que la arcilla se selecciona del grupo que consiste en bentonita, caolín, montmorillonita, atapulgita, haloisita y laponita.
8. Utilización según la reivindicación 6, en la que la sílice se selecciona del grupo que consiste en sílice coloidal, sílice mesoporosa, sílice de pirólisis y zeolitas.
9. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la pectina es pectina amidada.
10. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en la que la microesfera de pectina se prepara a partir de una solución que comprende 1-10% (p/v) de pectina y 2-12% (p/v) de acetato de cinc o cloruro cálcico.
11. Utilización según la reivindicación 1, en la que el sistema de aporte comprende además una enzima que desactiva un antibiótico.
12. Un sistema de aporte particulado administrable oralmente que comprende un adsorbente encapsulado en un polímero seleccionado del grupo que consiste en quitosano, alginatos, xantano, curdlano, goma guar, pectina y un polímero de poli(metacrilato de metilo), en el que dicho adsorbente se selecciona del grupo que consiste en carbón vegetal activado, arcillas, talco y sílice; y en el que dicho polímero proporciona un aporte específico para el colon del adsorbente.
13. Un sistema de aporte según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la utilización en la desactivación de sustancias presentes en el colon, o a medida que alcanzan el colon, seleccionándose dichas sustancias de antibióticos, productos químicos, alérgenos, toxinas y agentes farmacéuticos que se sabe que provocan efectos secundarios cuando alcanzan el colon.
14. El sistema de aporte según la reivindicación 13, para la utilización en el tratamiento o la prevención de los efectos adversos de un antibiótico para la flora intestinal, administrándose dicho sistema de aporte a un paciente, bien antes, bien durante o bien después de la administración del antibiótico.
15. El sistema de aporte según la reivindicación 13, para la utilización en el tratamiento o la prevención de los efectos adversos de una toxina bacteriana o fúngica sobre la flora intestinal, administrándose dicho sistema de aporte a un paciente.
16. El sistema de aporte según la reivindicación 13, para la utilización en el tratamiento o la prevención de los efectos adversos de un agente farmacéuticamente activo que tiene efectos beneficiosos cuando interactúa con receptores fuera del colon, pero tiene efectos adversos cuando interactúa con receptores dentro del colon, administrándose dicho sistema de aporte a un paciente, bien antes, bien durante o bien después de la administración del agente farmacéuticamente activo.
17. Un procedimiento para preparar un sistema de aporte oral para el aporte de un adsorbente que desactiva un antibiótico al colon, que comprende:
 - a) añadir una solución acuosa de pectina que contiene un adsorbente disuelto, dispersado o suspendido, donde el adsorbente desactiva un antibiótico a través de adsorción, a una solución acuosa de una sal catiónica divalente, a fin de obtener microesferas de pectina en la forma de una sal catiónica que incluye el adsorbente, y
 - b) opcionalmente reticular las microesferas resultantes introduciéndolas en una solución acuosa de polietilenimina.

18. El procedimiento según la reivindicación 17, en el que la sal catiónica es un ion cinc o calcio.

19. El procedimiento según la reivindicación 17 o 18, en el que el adsorbente se selecciona del grupo que consiste en carbón vegetal activado, arcillas, talco, sílice y resinas para pruebas bacteriológicas.

5 20. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que la arcilla se selecciona del grupo que consiste en bentonita, caolín, montmorillonita, atapulgita, haloisita y laponita.

21. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que la sílice se selecciona del grupo que consiste en sílice coloidal y sílice mesoporosa, sílice de pirólisis y zeolitas.

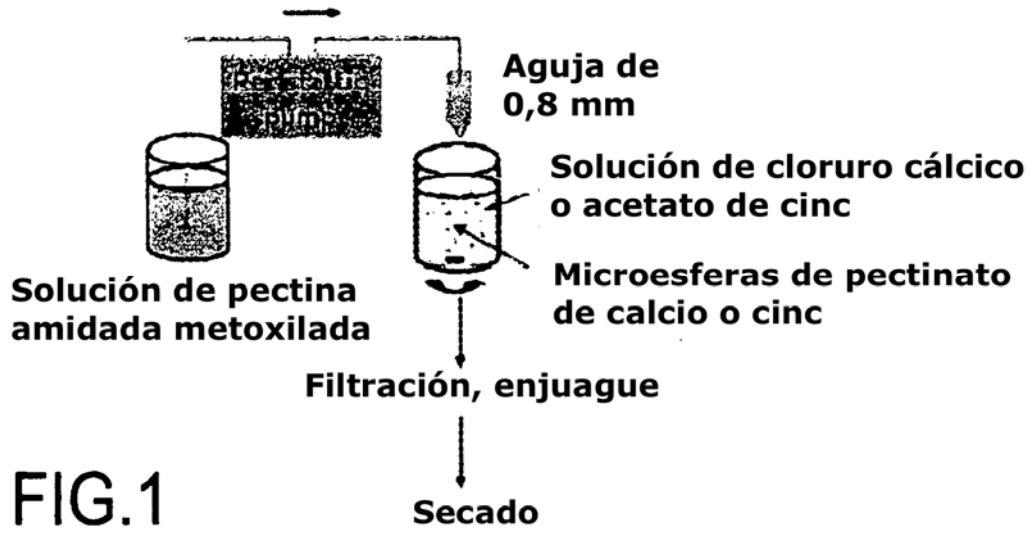


FIG.1

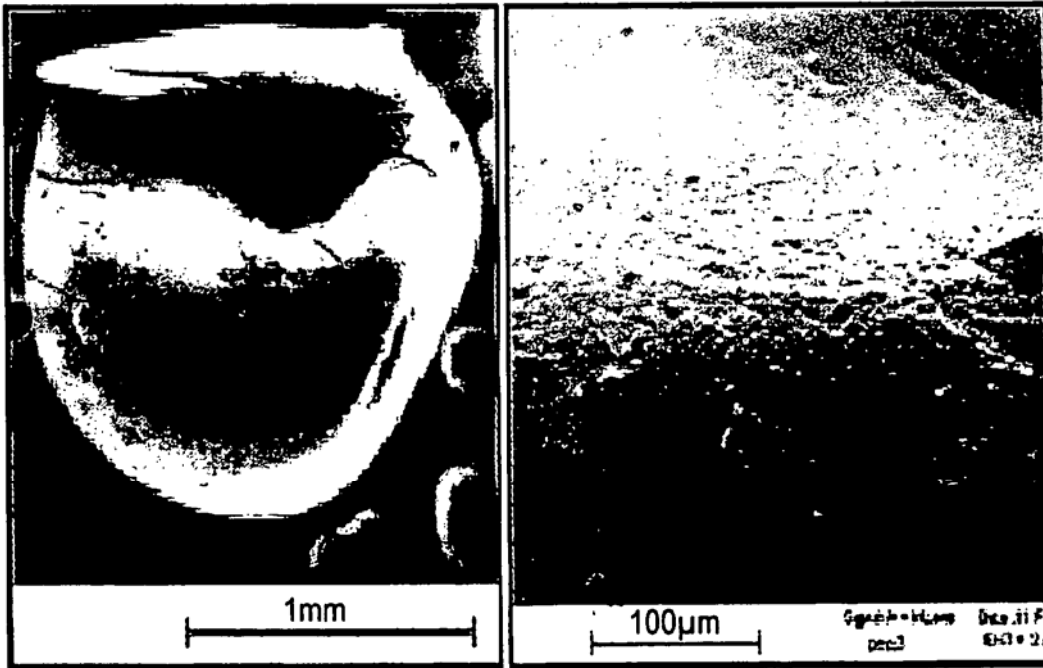


FIG.2

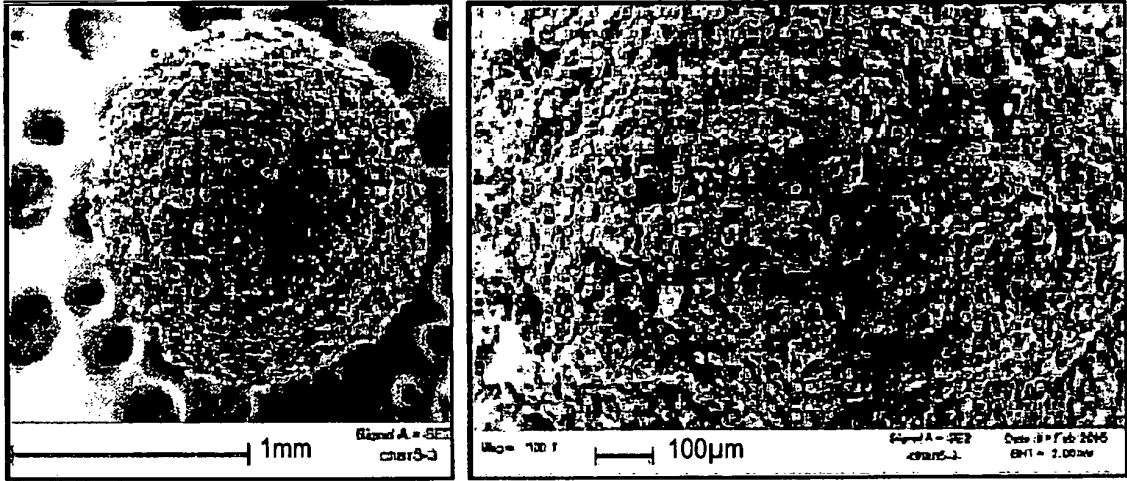


FIG.3

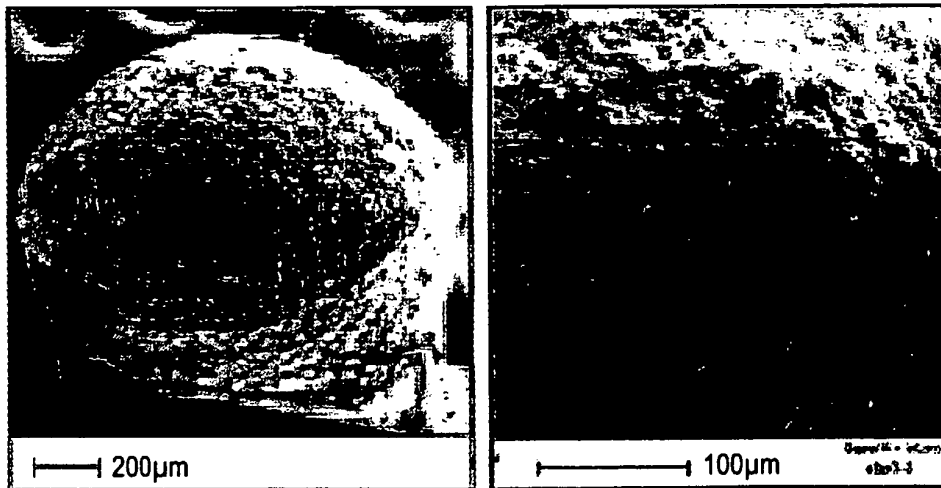


FIG.4



FIG.5

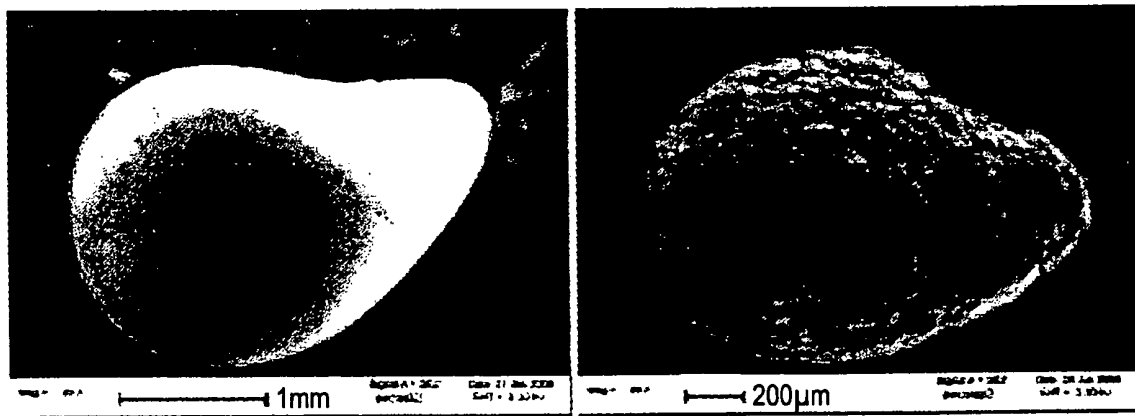


FIG.6

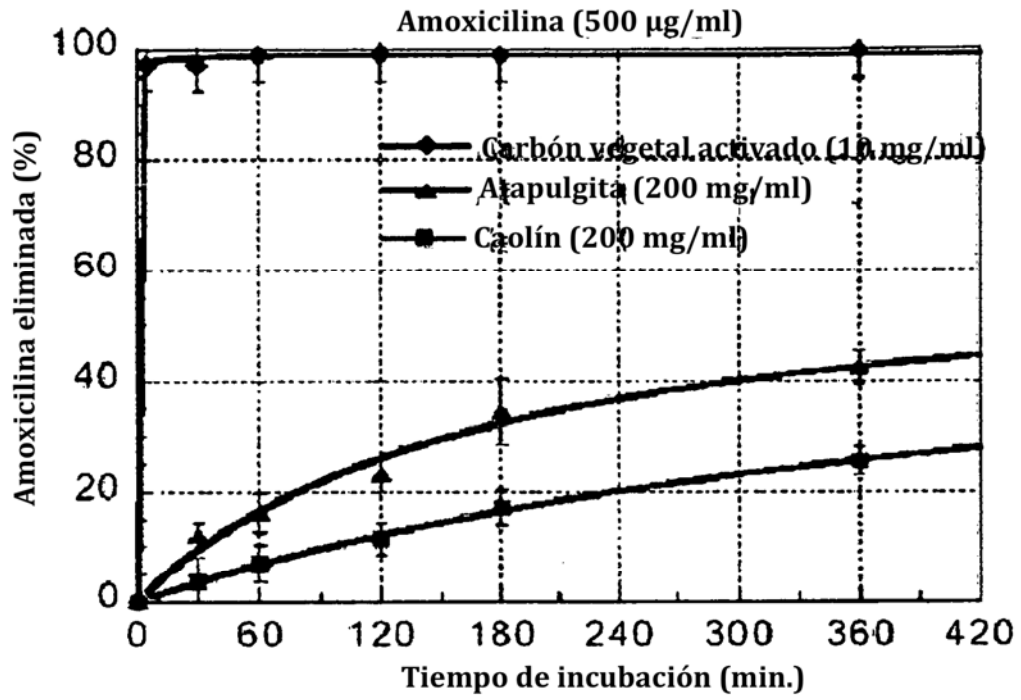


FIG.7

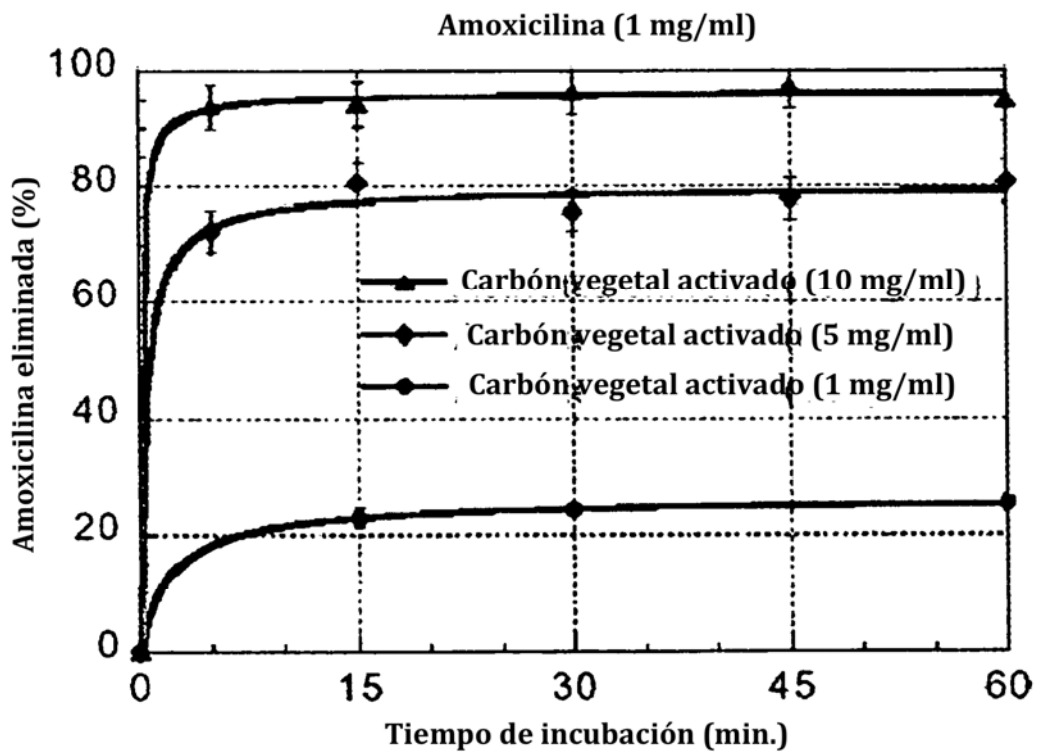


FIG.8

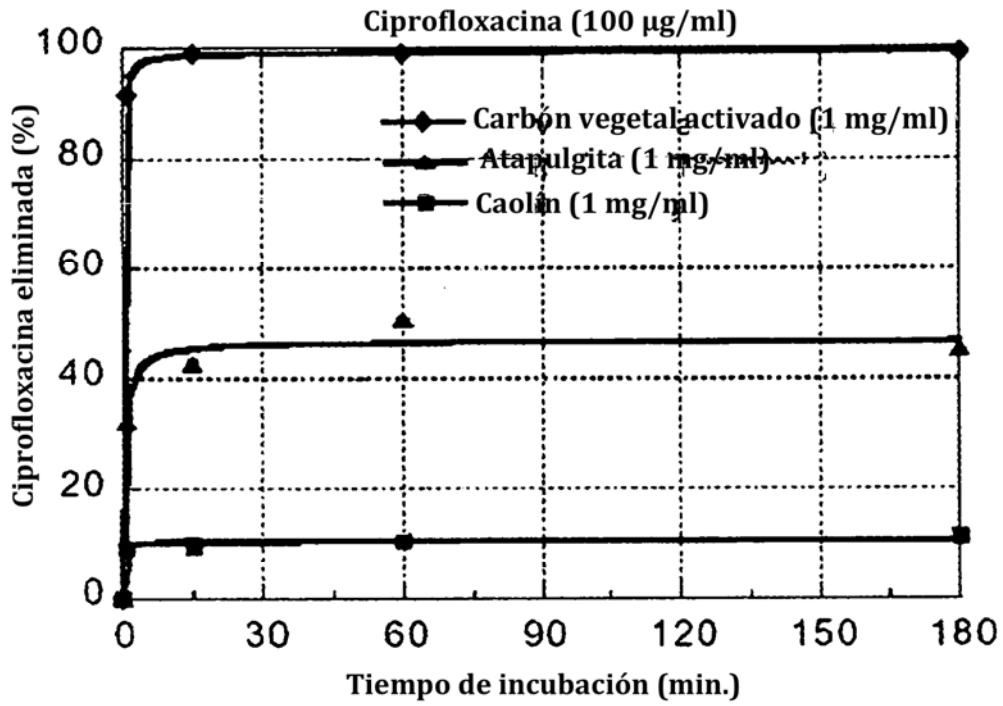


FIG.9

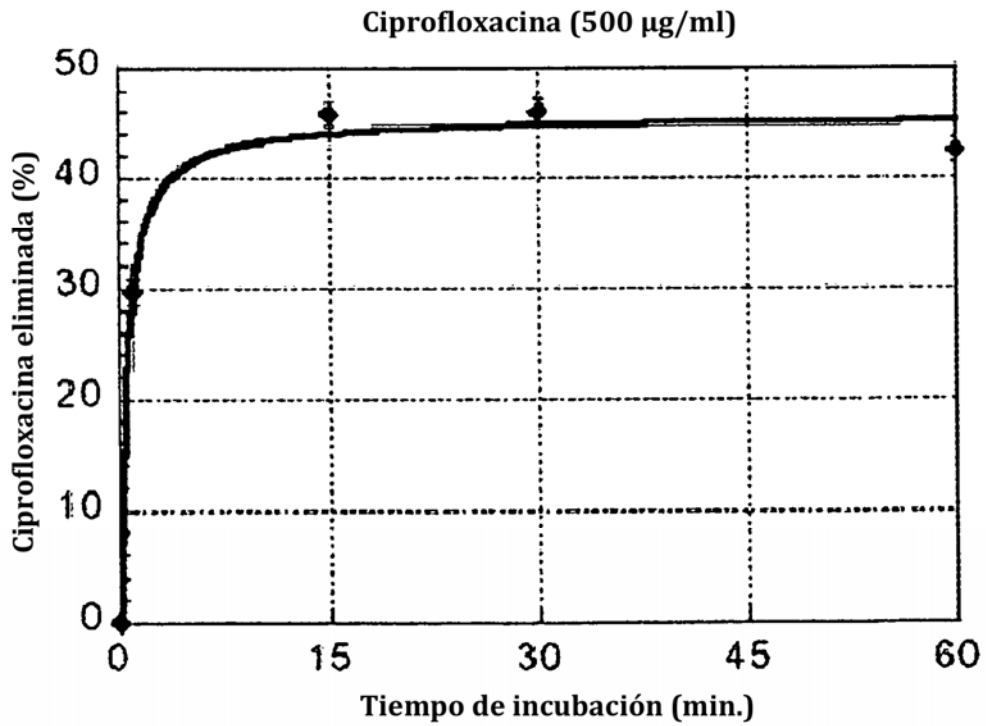


FIG.10

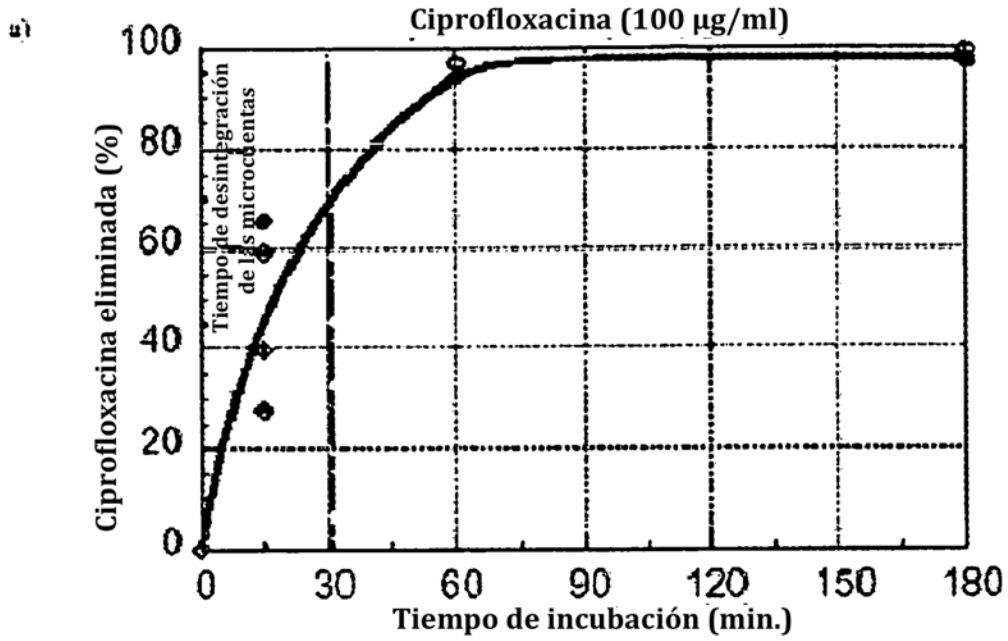


FIG.11A

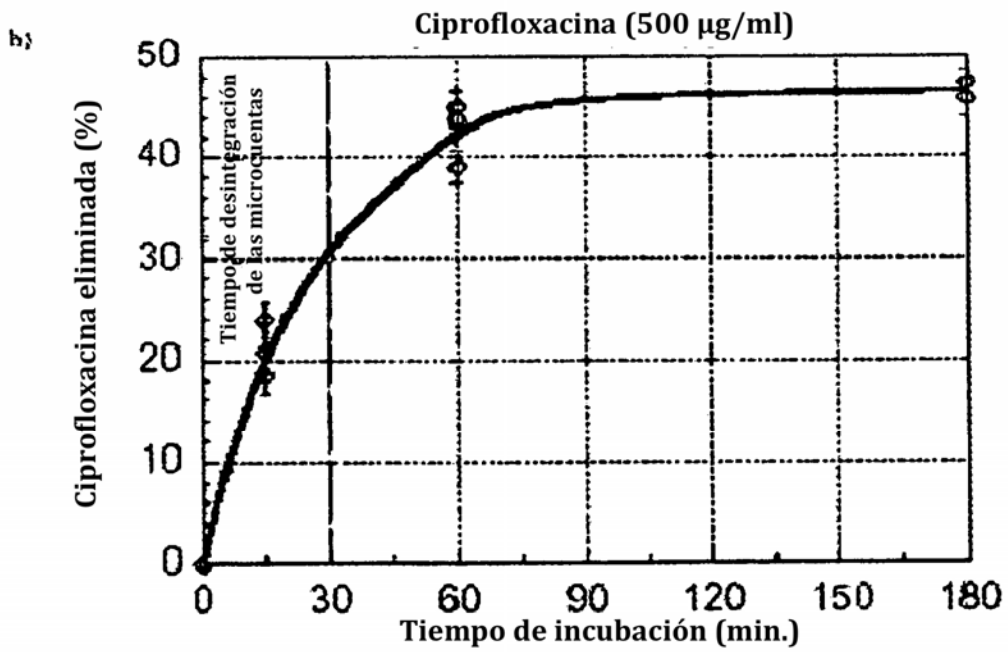


FIG.11B

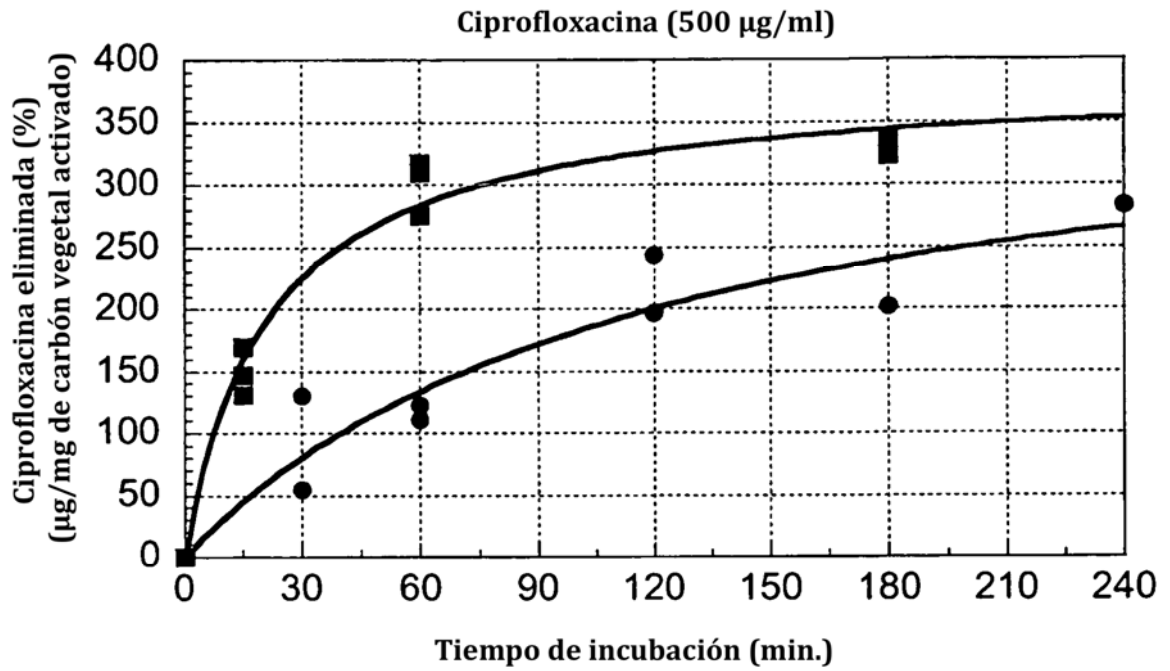


FIG.12

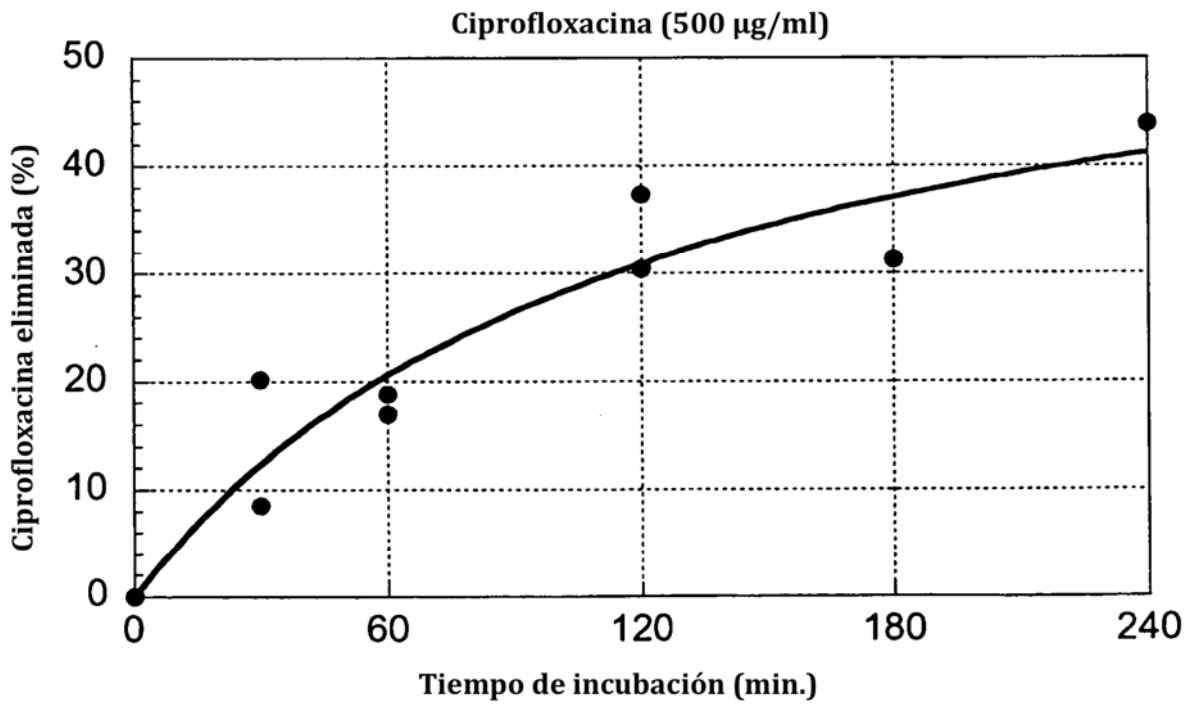


FIG.13

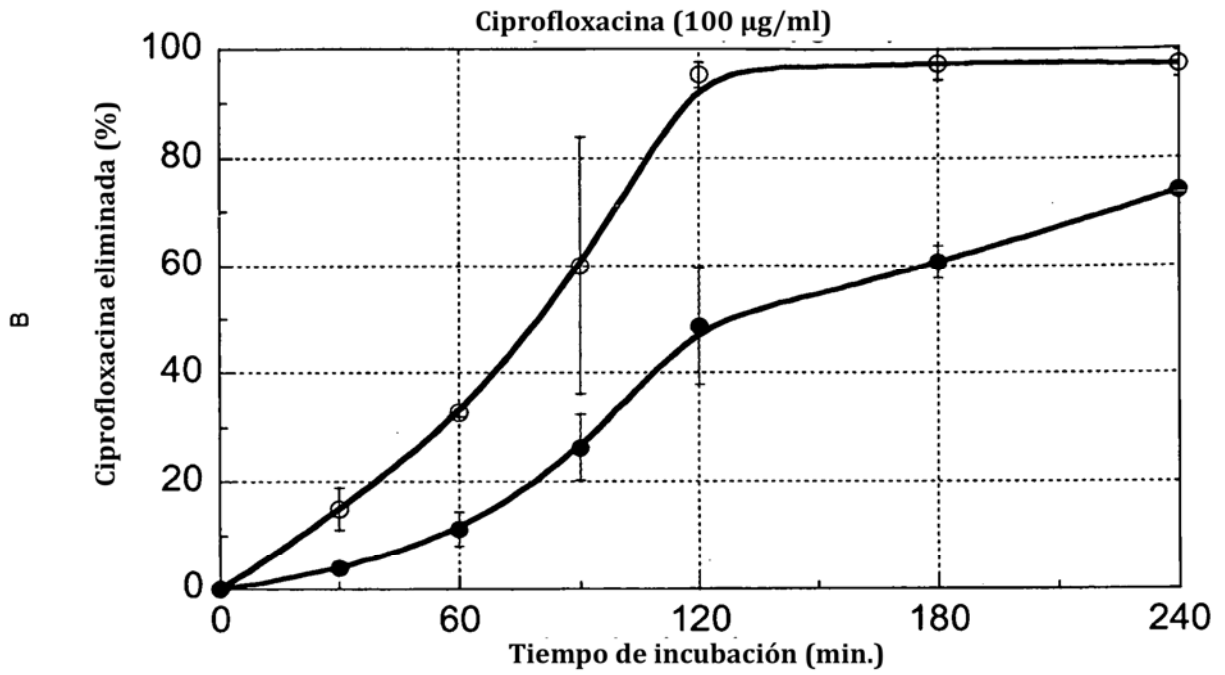


FIG.14

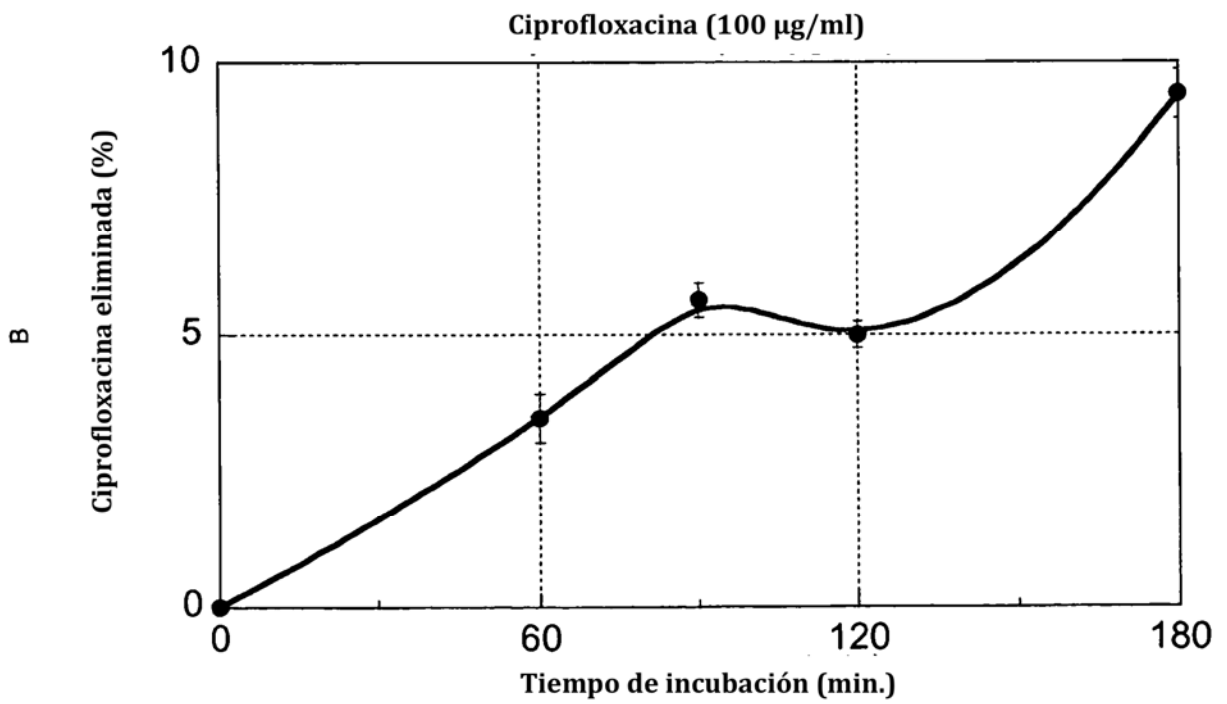


FIG.15

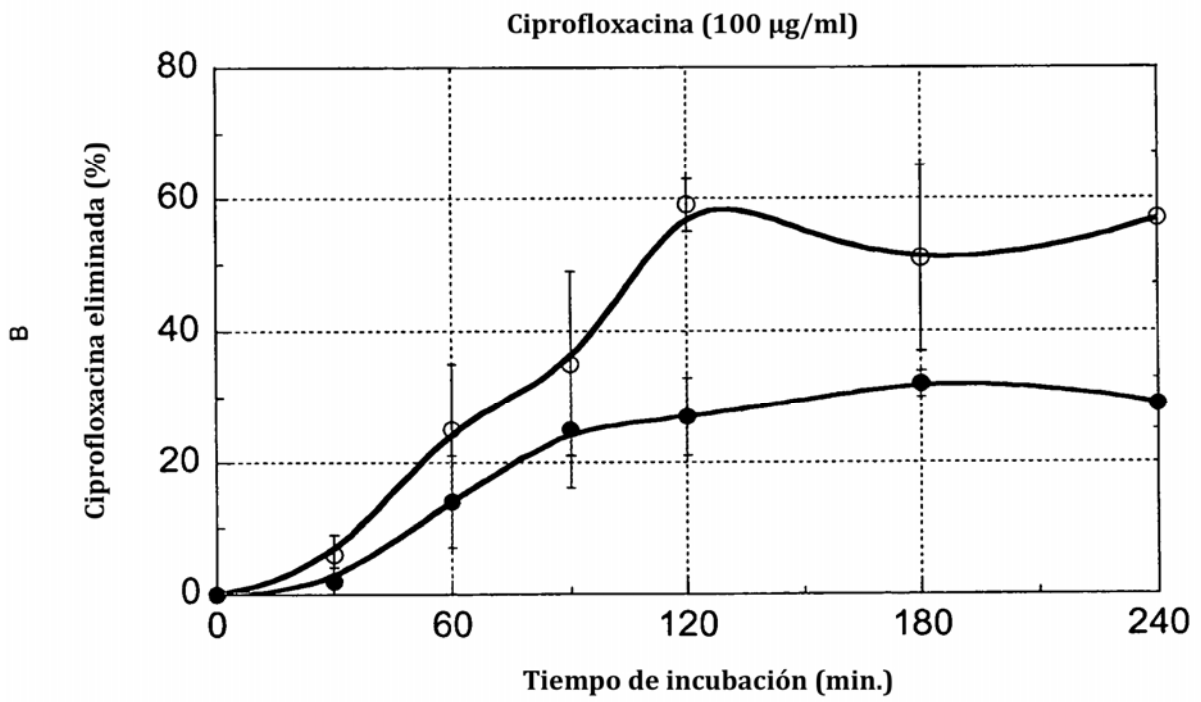


FIG.16