

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 235**

51 Int. Cl.:

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/28 (2006.01)

A61K 36/9066 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2013 PCT/EP2013/060059**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO2013171270**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2013 E 13723129 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2849731**

54 Título: **Formulación para sustancias de baja biodisponibilidad, que contiene una sal de N-acetilcisteína-quitosano**

30 Prioridad:

16.05.2012 IT MI20120847

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

03.07.2017

73 Titular/es:

**LABOMAR S.R.L. (100.0%)
Via Nazario Sauro 35/I
31036 Istrana (TV), IT**

72 Inventor/es:

FRATTER, ANDREA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 621 235 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

Formulación para sustancias de baja biodisponibilidad, que contiene una sal de N-acetilcisteína-quitosano

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende: un núcleo que comprende al menos un principio activo con baja biodisponibilidad, un polisorbato y una sal de N-acetilcisteína-quitosano, en donde este núcleo está encerrado en una capa de recubrimiento entérico, a un método para su producción, a dicha composición para su uso como medicamento, a un suplemento alimenticio o a una composición nutracéutica que comprende dicha composición.

10 Un gran número de sustancias que se utilizan en formulaciones farmacéuticas y/o en suplementos nutracéuticos y alimenticios muestran una biodisponibilidad reducida o escasa debido al fallo de la absorción y la metabolización entéricas o a la desnaturalización química que se puede producir en el lumen gastrointestinal como en los citocromos hepáticos. Debido a estos fenómenos fisiológicos, los suplementos alimenticios y las formulaciones farmacéuticas y nutracéuticas son a menudo totalmente ineficaces o marcadamente menos eficaces de lo esperado basándose en los datos *in vitro*. Los ejemplos generales y no limitantes de tales sustancias con baja biodisponibilidad son las vitaminas, los polifenoles, los terpenos esteroideos, los terpenos no esteroideos, los ácidos grasos y las coenzimas.

15 La absorción de sustancias hidrófilas a través de la mucosa entérica está gravemente limitada por factores biofísicos y bioquímicos que dan como resultado una biodisponibilidad reducida.

20 Las sustancias débilmente ácidas, lipófilas y de bajo peso molecular (<1000 Dalton) (p. ej., ácido acetilsalicílico) se absorben a través de la mucosa gástrica a través de mecanismos de transporte transcelulares activos o mediante difusión facilitada. En cambio, las sustancias débilmente alcalinas son ionizadas en el estómago donde el pH es de aproximadamente 1,5, por lo tanto no pueden ser absorbidas a través de la mucosa gástrica. Tales sustancias ligeramente alcalinas alcanzan el íleon y el duodeno donde son absorbidas en virtud de la gran área de contacto superficial con la mucosa intestinal y de la mayor permeabilidad de las membranas celulares. Las sustancias con un marcado carácter lipófilo, tales como las vitaminas liposolubles (A, D, E, K, F), son asimiladas sólo después de su emulsificación por sales biliares, lo que permite la formación de micelas que facilitan el contacto entre las sustancias lipófilas y la superficie de las vellosidades intestinales. En el área de la mucosa gastrointestinal, los principales mecanismos que ralentizan o alteran la penetración trans-mural de las sustancias introducidas por vía oral son:

- 30
- el espesor de las secreciones mucosas, que puede atrapar el principio activo y hacer que no esté disponible para la penetración;
 - el metabolismo por la enzima CYP3A (presente en los enterocitos villosos);
 - la extrusión por P-glicoproteína (presente en los enterocitos villosos);
 - la naturaleza peptídica de las sustancias (hidrólisis proteolítica por ácido-gástrico);
 - el flujo trans-mural reducido debido a las uniones estrechas entéricas.

35 De hecho, la presencia de la barrera anatómica representada por "uniones estrechas" es extremadamente importante para comprender los mecanismos de absorción entérica de los principios activos. Las uniones estrechas son estructuras proteicas de la placa que mantienen el contacto entre las células epiteliales, favoreciendo una continuidad anatómica del epitelio y un flujo trans-mural reducido de sustancias exógenas a través de él.

40 Una posibilidad para la administración a un sujeto de sustancias que son escasamente absorbidas en el intestino es formularlas utilizando nanoemulsiones (p. ej., Solicitud de patente IT2008VE00055) o la absorción trans-lingual (p. ej., Solicitud de Patente WO2011161501).

Sin embargo, para algunas sustancias y algunas indicaciones terapéuticas, sería preferible conseguir la liberación y absorción entéricas.

45 Las sustancias de particular interés son la curcumina, un extracto de compuesto polifenólico de la raíz de *Curcuma longa*, y la berberina, un alcaloide extraído de plantas del género *Berberis* con un sistema anular de isoquinolina, que han demostrado propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias interesantes y bien documentadas en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias inflamatorias, como la artritis y la colitis.

50 Estas sustancias, a pesar de sus potenciales farmacológicos y terapéuticos inequívocos, tienen en la actualidad una aplicación clínica limitada, porque, en estudios *in vitro* (CACO-2) e *in vivo* (en voluntarios humanos sanos), muestran una muy baja biodisponibilidad después de la ingesta oral, lo que da como resultado un pico en plasma muy bajo y una C_{max} y un AUC bajos.

Las principales razones comunes para la muy baja biodisponibilidad de la curcumina y la berberina se deben al menos a lo siguiente:

- extrusión de la sustancia por la acción de la bomba p-gp de enterocitos;
- biotransformación de las sustancias por los citocromos de enterocitos (CYP3A);

- 5 • reducción del flujo trans-mural relacionado con las "uniones estrechas".

El documento KR100750727 describe formulaciones que comprenden una mezcla binaria de quitosano y N-acetilcisteína, producida por condensación de N-acetilcisteína con quitosano por formación de enlaces covalentes. Dicha mezcla binaria demuestra excelentes propiedades de disolución, así como la capacidad para reducir la eficacia de las especies de oxígeno activo y para absorber los lípidos del intestino, reduciendo su absorción sistémica, disminuyendo así la concentración de colesterol en la sangre.

10

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición para la ingesta oral que permita la liberación y absorción en el tracto entérico de sustancias normalmente con poca o ninguna biodisponibilidad, en particular de curcumina y berberina.

15

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición que permita la absorción de sustancias a nivel entérico, modulando los principales mecanismos biofísicos y bioquímicos que degradan estas sustancias, o que impiden su paso a través del epitelio intestinal.

Otra tarea de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la producción de una formulación farmacéutica o nutracéutica, o de un suplemento dietético, que permitan la liberación y absorción en el tracto entérico de sustancias, que normalmente tienen poca o ninguna biodisponibilidad.

20

De acuerdo con la presente invención, estos objetivos, y otros que serán más evidentes más adelante, se consiguen mediante una composición que comprende:

a) un núcleo que comprende al menos un principio activo con baja biodisponibilidad, un polisorbato y una sal de N-acetilcisteína-quitosano y

25

b) una capa de recubrimiento entérico que incluye el núcleo a) en donde dicha sal de N-acetilcisteína-quitosano comprendida en el apartado a) se obtiene mediante la protonación del grupo amino libre del quitosano por medio de N-acetilcisteína, comportándose como un ácido.

Estos objetos también se han conseguido a través de dicha composición para su uso como medicamento. De acuerdo con la presente invención, estos fines también se han conseguido a través de un suplemento dietético o composición nutracéutica que comprenden dicha composición.

30

Estos objetivos se alcanzaron también mediante un método para la formación de dicha composición que comprende las etapas de:

i. preparación de una solución o una dispersión acuosa que comprenden al menos un polisorbato a una concentración entre 1 y 30% en peso/peso total de la solución y una sal de N-acetilcisteína-quitosano en donde la N-acetilcisteína y el quitosano están a una concentración entre 0,01 y 3% en peso/peso total de la solución;

35

ii. granulación en húmedo de una composición que comprende al menos el principio activo con baja biodisponibilidad con la solución o dispersión acuosa obtenidas en la etapa i.;

iii. secado hasta una peso constante y tamizado del producto granulado obtenido en la etapa ii;

iv. formación del núcleo a) de la composición por compresión del sólido obtenido en la etapa iii; y

v. recubrimiento del núcleo a) obtenido en la etapa iv con una capa entérica gastro-resistente.

40

En otro aspecto, a continuación se describe una sal de quitosano salificada con N-acetilcisteína, es decir una sal de N-acetilcisteína-quitosano.

En el contexto de la presente invención, una biodisponibilidad baja significa una biodisponibilidad por debajo de 30%, o 20%, o 10% o 5%.

45

En el contexto de la presente invención, el término quitosano significa un polisacárido de origen natural o semisintético, y sus formas ionizadas, con un peso molecular superior a 5000 D (Dalton o unidades de masa molecular) y un grado de desacetilación superior a 90%. Preferiblemente, el peso molecular de quitosano en la composición de la presente invención es de 100.000 Dalton, o superior.

En el contexto de la presente invención, la expresión "aceites esenciales" se refiere a productos obtenidos por extracción de las "esencias" de material vegetal adecuado.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "capa de recubrimiento entérico" significa una capa que forma una barrera continua, que consiste en, o está recubierta con sustancias que son resistentes a los jugos gástricos ácidos y se disuelven en el tracto intestinal superior. Dicha capa de recubrimiento entérico puede aplicarse directamente sobre el núcleo (p. ej., para obtener un comprimido o gránulo con película) o puede estar en forma de una envuelta (p. ej., una cubierta de cápsula dura o blanda con recubrimiento entérico que comprende el núcleo a) que incluye dicho núcleo en forma de polvo o de uno o más comprimidos, gránulos o microgránulos.

En el contexto de la presente invención, "película entérica" significa una película que se aplica directamente sobre el núcleo, es decir, se adhiere al núcleo, y es capaz de proteger la composición de la acción de los jugos gástricos en el estómago y de liberar el principio activo en el intestino superior.

En el contexto de la presente invención, "extracto titulado" significa un extracto de una planta que contiene una cantidad normalizada de una sustancia particular, medida mediante uno de los métodos analíticos convencionales conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., referentes a Farmacopeas de los Estados Unidos, Reino Unido o Europea).

A menos que se especifique lo contrario, en el contexto de la presente invención, los porcentajes de los componentes de una mezcla se refieren al peso del componente sobre el peso total de la mezcla (p/p).

Según se utiliza en la presente memoria, se entiende que el término "comprende", referido a un componente de una composición, abarca también la posibilidad de que dicho componente constituya el 100% de la composición, es decir, una mezcla "que comprende" el componente A también puede consistir en 100% de A.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende:

a) un núcleo que comprende al menos un principio activo con una baja biodisponibilidad, un polisorbato y una sal de N-acetilcisteína-quitosano;

b) una capa de recubrimiento entérico que incluye el núcleo a) en donde dicha sal de N-acetilcisteína-quitosano comprendida en a) se obtiene mediante la protonación del grupo amino libre del quitosano por medio de N-acetilcisteína, comportándose como un ácido.

Se encontró sorprendentemente que la composición de acuerdo con la invención permite la liberación y absorción por las paredes intestinales de principios activos normalmente poco biodisponibles.

Sin pretender estar limitado por la teoría, se cree que las ventajas de la composición de la presente invención están, al menos parcialmente, relacionadas con la presencia de la sal de quitosano, que ejerce por su parte una modulación de las uniones estrechas del epitelio entérico, con una sustancia que tiene una acción mucolítica, es decir la N-acetilcisteína (NAC).

El quitosano es un polisacárido compuesto de unidades repetitivas de N-acetilglucosamina y D-glucosamina. El quitosano puede formar geles macrocoloidales acuosos después de la acidificación. Dicha gelificación se produce después de la protonación de los grupos amino libres de la N-acetilglucosamina, que sigue a la formación de una sal de poliacidificación de amonio. Precisamente este proceso de poliacidificación determina la solubilidad en agua del quitosano y su relativa capacidad de gelificación.

La NAC, que se comporta como un ácido, protona el grupo amino libre del quitosano que forma la sal. Según se utiliza en la presente memoria, el término "sal de N-acetilcisteína-quitosano" se refiere al producto de esta reacción ácido-base formadora de sal. Este proceso implica solamente la formación de enlaces iónicos (es decir entre una especie cargada positivamente y una cargada negativamente), en ausencia de enlaces covalentes. Se encontró que la forma ionizada del quitosano ejerce una interacción con las uniones estrechas que es muy superior a la ejercida por la forma no iónica.

El quitosano tiolado o conjugado, definido como moléculas producidas por condensación de NAC con quitosano por formación de enlaces covalentes (promovidos por agentes de condensación tales como las carbodiimidas) ya han sido descritos en la técnica anterior como potenciadores de la absorción intestinal (Schmitz, T. et al. *Drug Deliv.* **2008**, *15*, 245; Chen, H. et al., *J. Liposome Res.* **2011**, publicación electrónica antes de impresión; Sakloesakun, D. et al. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2011**, *37*, 648; Schmitz, T. et al. *Int. J. Pharm.* **2008**, *347*, 79).

La sal iónica en la composición de la invención es diferente de los compuestos descritos en la técnica anterior, p. ej. que derivan de la unión covalente de NAC a quitosano, por formación de enlaces amida entre el grupo amino primario del polímero y el grupo ácido carboxílico de NAC (Hombach, J. et al. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *33*, 1-8).

Una de las ventajas de la sal en las composiciones de la presente invención consiste en proporcionar quitosano en la forma catiónica, que es soluble en agua y puede actuar como agente mucolítico sobre la secreción intestinal, con una eficacia superior en comparación con los compuestos conjugados (con enlaces covalentes entre NAC y quitosano) de la técnica anterior.

En la sal de N-acetilcisteína-quitosano en la composición de acuerdo con la presente invención, la razón en peso de

quitosano y NAC puede ser de 1:1 a 3:1, en particular de 2 a 1. Preferiblemente, en la sal de N-acetilcisteína-quitosano en la composición de la invención, la N-acetilcisteína está en una cantidad tal que una solución acuosa obtenida disolviendo dicha sal en agua y que contiene 1% p/p de quitosano tiene un pH entre 3,5 y 4,0.

5 La presencia de al menos un polisorbato facilita adicionalmente la penetración en la circulación de sustancias tomadas por vía oral. Los tensioactivos de polisorbato son líquidos oleosos, derivados de sorbitán (un derivado de sorbitol) PEGilado por esterificación con ácidos grasos, que se utilizan ampliamente en la formulación de emulsión de aceite/agua, de detergentes a base de tensioactivos y de formas tópicas. Los polisorbatos actúan como promotores de la absorción que ejercen una acción de formación de micelas de los ingredientes activos insolubles o poco solubles en agua y que actúan como "tensioactivos celulares", alterando realmente la permeabilidad de la
10 membrana. En la composición de la presente invención, los polisorbatos contribuyen de este modo a hacer que el ingrediente activo esté disponible más libremente para la absorción intestinal.

Como ejemplos no limitantes, la composición de la presente invención puede presentarse en una de las siguientes formas: un comprimido con película, un gránulo con película, una cápsula que comprende gránulos o microgránulos con película entérica, o una cápsula dura o blanda con un recubrimiento gastro-resistente que comprende el núcleo
15 a) en forma de polvo, gránulos, microgránulos, solución o suspensión.

Preferiblemente, en la composición de acuerdo con la invención la capa b) es una película entérica que recubre directamente dicho núcleo a), es decir, una película que incluye el núcleo y se aplica en contacto directo con el mismo.

Preferiblemente, en la composición de acuerdo con la invención, el al menos un principio activo con baja disponibilidad se selecciona entre trans-resveratrol, melatonina, ácidos grasos omega-3, terpenos esteroideos como los ácidos boswelicos, terpenos no esteroideos, saponinas, aceites esenciales, polifenoles tales como curcumina, berberina y mezclas de los mismos, péptidos y oligopéptidos tales como glutatión. Más preferiblemente, en la composición de acuerdo con la invención al menos el principio activo con baja disponibilidad es la curcumina o la berberina. El contenido de ingrediente activo en la composición en forma de un comprimido de acuerdo con la
20 invención puede estar entre 0,01 y 1000,0 mg, preferiblemente entre 50 y 500 mg, más preferiblemente entre 100 y 300 mg por comprimido.

El polisorbato incluido en el núcleo a) de la composición de la presente invención puede ser uno de los polisorbatos disponibles comercialmente, tales como polisorbato 20, 40, 60, 65, 80 y mezclas de los mismos, en una cantidad entre 20 y 300 mg por comprimido individual. Preferiblemente, en la composición de acuerdo con la invención, el
30 polisorbato es polisorbato 80.

Preferiblemente, el núcleo a) de la composición de acuerdo con la invención comprende también un extracto de *Citrus x paradisi* titulado a al menos 40% en peso/peso total del extracto de *Citrus x paradisi* en bioflavonoides, y titulado específicamente en Naringina y Naringenina, y un extracto de *Piper nigrum* titulado a 95% en peso/peso total del extracto de *Piper nigrum* en piperina.

35 Los extractos de pomelo y pimienta negra modulan la actividad de varias enzimas responsables de la biotransformación de los xenobióticos y en particular del citocromo P450 hepático y CYP3A de tipo intestinal.

Estos extractos pueden estar en forma de fitocomplejos, es decir, de una mezcla que comprende todas las sustancias extraíbles de la planta que están dotadas de, y que contribuyen a conseguir, una actividad biológica específica.

40 De hecho, se sabe que algunas sustancias son capaces de interaccionar con la bomba de P-gp localizada en la membrana externa del enterocito inhibiéndola. Este efecto da como resultado un aumento del pase a la circulación entero-portal y una disminución del metabolismo por citocromo intestinal y hepático, lo que conduce a una mayor eficacia de los ingredientes activos tomados oralmente. Este mecanismo de acción es realizado en particular por algunos flavonoides del género Citrus.

45 Tales complejos de flavonoides son también capaces de inhibir la enzima CYP-3A de los enterocitos, y en algunos casos también la del hígado, reduciendo de este modo la biotransformación pre-sistémica.

Se encontró que también a través de este mecanismo, es posible inducir con las composiciones de acuerdo con la presente invención un aumento en las concentraciones en plasma de sustancias que de otro modo serían biotrasformadas masivamente antes de entrar en la circulación.

50 El núcleo a) de la composición de acuerdo con la presente invención se somete a un proceso de adición de película, por ejemplo en una bandeja de recubrimiento, con una dispersión de una sustancia capaz de formar una película resistente a los jugos digestivos, para obtener la gastro-protección. Las sustancias activas y las destinadas a actuar como promotores de la absorción entérica se liberan realmente sólo en los tractos entérico y gástrico. La liberación temprana de quitosano en el ambiente gástrico, de hecho, haría que el polímero se hinchara, debido al entorno
55 altamente ácido por el ácido clorhídrico, e induciría la formación de un gel. Los principios activos y otras sustancias podrían ser liberados en el estómago y ser degradados. Preferiblemente, el recubrimiento entérico (b) comprende al

- 5 menos uno o una combinación de derivados de ácido metacrílico y metacrilato de metilo (como ejemplos no limitantes: Eudragit™ L100, Eudragit™ L12,5, Eudragit™ S100, Eudragit™ S12,5), goma laca (Shellac™) o metil celulosa y sus derivados. Preferiblemente, el recubrimiento b) comprende o consiste en goma laca (Shellac™). Dicho recubrimiento se puede conseguir recubriendo con película el núcleo a) con una dispersión de goma laca en agua.
- Preferiblemente, la composición de acuerdo con la invención se encuentra en forma de un gránulo entérico, en donde el núcleo a) está incluido en la película entérica b), o de una cápsula gastro-resistente en donde dicho núcleo a) está incluido en una envuelta (capa b) dura o blanda que está recubierta entéricamente).
- 10 En otra realización preferida, la composición de la presente invención se encuentra en forma de comprimido y comprende una capa c), externa al recubrimiento b), que comprende al menos un excipiente adecuado para la compresión. Preferiblemente, dicho excipiente de la capa externa se selecciona entre almidón, celulosa microcristalina, estearato de magnesio, fosfato cálcico, talco, sílice y mezclas de los mismos.
- En la composición de acuerdo con la presente invención, el núcleo a), el recubrimiento b) y la capa exterior c) pueden comprender excipientes y/o ingredientes activos adicionales además de los enumerados anteriormente.
- 15 Los ejemplos no limitantes de ingredientes adicionales son: fosfato de calcio dibásico anhidro, sílice coloidal, sílice amorfa, sorbitol y almidón.
- En otra realización, la presente invención proporciona dicha composición que comprende el núcleo a) y el recubrimiento b) como se ha descrito anteriormente para su uso como medicamento.
- 20 En otra realización, la presente invención proporciona un suplemento dietético o una composición nutracéutica que comprende la composición que comprende el núcleo a) y el recubrimiento b) como se ha descrito anteriormente.
- La administración de dicha composición o suplemento dietético a un sujeto da como resultado ventajosamente un grado de absorción entérica de sustancias escasamente biodisponibles que es más alto comparado con el conseguido a través de las formulaciones de la técnica anterior.
- 25 En otra realización, la presente invención proporciona un método para la preparación de dicha composición que comprende las etapas de:
- i. preparar una solución o dispersión acuosa que comprende al menos un polisorbato a una concentración entre 1 y 30% en peso/peso total de la solución y una sal de N-acetilcisteína-quitosano, en donde la N-acetilcisteína y el quitosano se encuentran a una concentración entre 0,01 y 3% en peso/peso total de la solución;
 - 30 ii. granular en húmedo una composición que comprende al menos un principio activo con baja biodisponibilidad con la solución o dispersión acuosa obtenidas en la etapa i;
 - iii. secar hasta un peso constante y tamizar el producto granulado obtenido en la etapa ii;
 - iv. formar el núcleo a) de la composición por compresión del sólido obtenido en la etapa iii;
 - v. recubrir el núcleo a) obtenido en la etapa iv con una capa entérica gastro-resistente.
- 35 En la sal de N-acetilcisteína-quitosano de la etapa i, la cantidad de N-acetilcisteína es tal que una solución acuosa obtenida disolviendo dicha sal en agua y con un contenido de 1% p/p de quitosano tiene un pH entre 3,5 y 4,0.
- Preferiblemente, en el método de acuerdo con la invención, la granulación de la etapa ii se realiza combinando la solución o dispersión acuosa obtenidas en la etapa i y una composición que comprende la sustancia activa con baja biodisponibilidad, un extracto de *Citrus x paradisi* titulado a al menos 40% en peso/peso total del extracto de *Citrus x paradisi* en bioflavonoides, y titulado específicamente en Naringina y Naringenina, y/de un extracto de *Piper nigrum* titulado a 95% de piperina en peso/peso total del extracto de *Piper nigrum* y, en caso necesario, N-acetilcisteína y quitosano en cantidades tales que se obtiene en una única unidad de dosificación una cantidad de quitosano entre 1 y 150 mg, una cantidad de N-acetilcisteína entre 1 y 75 mg, una cantidad de extracto de pomelo (*Citrus x paradisi*) entre 1 y 300 mg, y una cantidad de extracto de *Piper nigrum* entre 1 y 30 mg.
- 40 Preferiblemente, dicha composición que comprende los extractos activos de baja biodisponibilidad de pomelo y pimienta y opcionalmente quitosano y N-acetilcisteína comprende además al menos un excipiente para productos farmacéuticos, nutracéuticos y/o alimenticios.
- 45 El recubrimiento del núcleo a) de la etapa iv del método de acuerdo con la presente invención se puede realizar, por ejemplo, en una bandeja de recubrimiento con una solución o dispersión en agua de un agente capaz de formar una película entérica, preferiblemente con una dispersión acuosa al 25% p/p de goma laca (SHELLAC™).
- 50 Preferiblemente, en el método de la invención, la etapa de granulación en húmedo ii se lleva a cabo mediante un procedimiento de lecho fluido.

La composición en forma de gránulos se puede obtener directamente mediante un método que comprende las etapas i-v como se describió anteriormente.

Preferiblemente, para la formación de la composición en forma de comprimido, el método de acuerdo con la invención comprende adicionalmente:

- 5 vi. añadir al núcleo recubierto con película obtenido en la etapa v al menos un excipiente adecuado para la formación de comprimidos;
- vii. comprimir la composición obtenida en la etapa vi para obtener la composición en forma de comprimido.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir realizaciones particulares de la presente invención, sin pretender limitar su alcance.

10 **Ejemplo 1**

Preparación del producto granulado que contiene el ingrediente activo.

Ingrediente activo:

Curcuma Longa (Extracto seco, 95% p/p de Curcumina) 200 mg por comprimido

Etapa 1

- 15 Núcleo del comprimido granular:

Se prepara una mezcla de polvos secos que contiene:

Extracto seco de *Curcuma Longa* (95% p/p de curcumina) 100 g.

Qitosano HD 100 Malla 75,0 g

N-acetilcisteína 25,0 g

- 20 Extracto seco de semilla de pomelo (50% p/p de bioflavonoides) 25,0 g (opcional).

Extracto seco de fruto de pimienta negra (95% p/p de Piperina) 2,50 g (opcional).

Almidón de maíz 75,0 g blanco.

Tot 302,5 g.

Etapa 2

- 25 La solución de granulación se obtiene como sigue:

Se introduce agua desionizada para ósmosis inversa (120 ml) en un matraz cónico de 250 ml y se dispersan bajo agitación con una placa magnética 2 g de quitosano (PM \geq 5000 D, grado de desacetilación > 90%); se añaden 1,0 gramos de NAC para obtener un pH entre 3,5 y 4,0, medido con un medidor de pH, verificando simultáneamente la solubilización del quitosano y la formación concomitante de un gel. Con la solución así obtenida se combinan 29,0

30 gramos de polisorbato 80 hasta que se obtiene una dispersión completa, obteniéndose un sistema translúcido de color amarillo claro. A continuación se añade agua desionizada (obtenida mediante ósmosis inversa) para obtener un volumen final de 200 ml.

Etapa 3

Granulación

- 35 La mezcla de polvos obtenida en la etapa 1 (302,5 g) se coloca en un vaso de precipitados de plástico y la solución de granulación obtenida en la Etapa 2 se añade bajo agitación mecánica constante en porciones subsiguientes, verificando el desencadenamiento progresivo del procedimiento de granulación (solución de granulación total añadida a la mezcla en polvo: 140 g). Después de obtener el núcleo granulado, éste se seca en un horno ventilado a 50°C hasta peso constante (anhidricación). El producto granulado seco se tamiza a continuación. Finalmente se
- 40 obtienen gránulos finos con un peso de 414,5 gr.

Etapa 4

Obtención de comprimidos

Los gránulos así obtenidos (248,7 g) se añaden a continuación a celulosa microcristalina (12,3 g), hidrogenofosfato de calcio anhidro (Fujicalin) (60,0 g), celulosa microcristalina (CEOLUS KG802) (30,0 g), estearato de magnesio (5,4

g) y talco (3,6 g). La mezcla en polvo así obtenida se mezcla en un mezclador en V de laboratorio adecuado durante 2 minutos. El polvo así obtenido (359,3 g) se prensa para proporcionar comprimidos, que se recubren con una solución al 25% p/p de goma laca (ShellaC™) en una bandeja de recubrimiento para un total de 0,06623 g para obtener 300 comprimidos con un peso neto final igual a 360,0 g (300 comprimidos).

5 Ejemplo 2

1. Introducción y objetivo

La absorción intestinal es un proceso complejo en el que se distinguen dos tipos de transporte: el llamado transporte transcelular y paracelular pasivo y el transporte activo o difusión facilitada, mediada por receptores específicos.

10 El proceso puede estar influenciado por el metabolismo intestinal, por la acción de los transportadores de eflujo, así como por algunas características del compuesto químico que debe ser absorbido, incluyendo el peso molecular, el tamaño y la conformación de la molécula, el grado de ionización, el carácter lipófilo, la solubilidad y la disolución en el contenido gástrico. Para predecir la absorción intestinal y el transporte a través de la mucosa, se propone un modelo de estudio in vitro utilizando la monocapa de células Caco-2, cuyos protocolos están siendo validados como una alternativa a los ensayos con animales en ECVAM (Le Ferrec E. et al., 2001 ECVAM workshop 46).

15 La buena correlación in vivo/in vitro para el transporte pasivo de fármacos caracteriza la relevancia y diseminación del modelo Caco-2 en el estudio de absorción intestinal.

20 La línea Caco-2 es ampliamente utilizada como un modelo in vitro de epitelio intestinal para estudios de toxicidad de la barrera y para el escrutinio cualitativo de la absorción intestinal, especialmente en la industria farmacéutica durante las etapas de investigación y desarrollo para la identificación y optimización de compuestos principales (Garate M.A. et al., *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 1671; Artursson, P, y Borchartd R.T. "Intestinal drug adsorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond". *Pharma. Res.* **1997**, 14, 1655-1658). Las células se hacen crecer sobre soportes porosos específicos alojados en pocillos para cultivos celulares, que permiten tener dos sectores distintos: un sector apical, correspondiente al lumen intestinal in vivo, y un sector basolateral correspondiente al segmento de la circulación sanguínea y linfática del organismo.

25 La diferenciación se lleva a cabo en 21 días: las células diferenciadas Caco-2 en este momento forman un epitelio continuo con uniones estrechas funcionales y microvellosidades.

30 El ensayo de absorción en el modelo Caco-2 se utiliza para la evaluación del pase intestinal pasivo de la composición núcleo de acuerdo con la invención en forma de un producto granulado que comprende Cúrcuma dispersado en agua (en lo sucesivo Composición A) a dosis que se definen basándose en un ensayo de citotoxicidad preliminar.

2. Diseño experimental

35 Antes de someter a ensayo la tasa de permeabilidad de la sustancia de ensayo, se evalúa la citotoxicidad sobre la monocapa de Caco-2 mediante el ensayo MTT (de acuerdo con los procedimientos internos, 2 ensayos realizados después de 2h y 1h de tratamiento respectivamente) a diferentes concentraciones por triplicado para la definición de la dosis no citotóxica:

1) PRIMERA RONDA: 0,25%/0,5%/1% > 2 h de tratamiento

2) SEGUNDA RONDA: 0,025%/0,05%/0,1%/0,25% > 1 h de tratamiento.

40 La concentración elegida para la absorción intestinal de curcumina es de 0,25% p/p de producto granulado que contiene 0,052% p/p de curcumina (1,404 mM), con 1 hora de tratamiento. El producto granulado que contiene cúrcuma (sin película) de la composición de acuerdo con la presente invención (como el obtenido en la etapa 3 del Ejemplo 1, en lo sucesivo indicado como Composición A) se somete a ensayo para el pase intestinal, después de la disolución/suspensión en tampón HBSS-MES al 1% (tampón a pH 6,5 utilizado en la parte apical).

45 El pase a través de una monocapa de células Caco-2 de la Composición A a una concentración no citotóxica se controla en momentos definidos (0 min, 15 min, 30 min y 60 min). El líquido del compartimento basolateral se recoge y se cuantifica la sustancia activa de interés (curcumina) por medio de HPLC.

Los siguientes parámetros se evalúan para verificar la integridad de la monocapa y para medir los cambios de permeabilidad que se producen después del pase intestinal:

- Ensayo de integridad de la barrera, midiendo la resistencia transepitelial (TEER);
- Pase paracelular con evaluación de la toxicidad de la sustancia de ensayo sobre la integridad de la función de la barrera mediante el uso de un marcador del pase paracelular (amarillo Lucifer) utilizando la concentración no citotóxica más alta de acuerdo con los resultados del análisis MTT.

3. Materiales

3.1. Sistema de ensayo

3.1.1 Línea celular CACO-2

5 La línea Caco-2 consiste en células derivadas de células intestinales (adenocarcinoma colorrectal humano) proporcionadas por la ATCC.

Las células Caco-2 crecen en monocapa en medio DMEM que contiene 4,5 g/l de glucosa con la adición de FBS al 10%, aminoácidos no esenciales al 1%, glutamina 4 mM, Hepes 10 mM y antibióticos (Pen/Estrep).

10 Las células alcanzan la confluencia en aproximadamente 6 días y alcanzan una fase estacionaria en 10 días. La diferenciación se completa en aproximadamente 21 días. Las células diferenciadas tienen altos niveles de fosfatasa alcalina, aminopeptidasa e isomaltasa.

La diferenciación estructural y funcional de las microvellosidades se asocia con la polarización de la monocapa después de la confluencia. La polaridad también es evidente para la presencia de uniones estrechas que se forman durante la diferenciación.

15 La integridad de la monocapa se confirma por la baja permeabilidad de la monocapa al manitol o al amarillo Lucifer (Hidalgo et. al. "Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model for intestinal epithelial permeability" *Gastroenterology* **1989**, 96, 736-749 y Le Ferrec E. "In vitro models of the intestinal barrier" ECVAM workshop 46, ATLA **2001**, 29,649-668).

3.1.2 Condiciones de cultivo y uso del sistema de ensayo

20 Las células (150.000/inserto, contadas utilizando una cámara Buerker) se cultivan en placa en insertos con filtro de PET (Millipore, 10 mm de diámetro con un tamaño de poro de 0,4 mm) para placas de 12 pocillos y se incuban a 37°C con CO₂ al 5% y se hacen crecer durante 21 días. Se añaden 0,5 ml adicionales de medio sobre el inserto y se añaden 1,5 ml de medio en la placa.

El medio se cambia en días alternos. A partir del día 21 el análisis morfológico revela una diferenciación completa de las células Caco-2.

25 3.2.1 Instrumental

Escala Analítica XS 204 (Mettler-Toledo)

Incubadora con CO₂ Hera Cell (Heraeus)

Autolector de microplaca M200-Infinite (Tecan)

ERS-Millicell (Millipore)

30 Microscopio DM-IL (Leica)

Cámara de Buerker (Marienfeld)

3.2.2 Reactivos

DMEM 12-614F LONZA

GLUTAMINA BE17-605E LONZA

35 PEN/STREP DE17-602E LONZA

SOLUCIÓN NEAA 100X BE13-114E LONZA

FBS DE14-701F LONZA

HBSS BE10-527F LONZA

HEPES 1M 17-737F LONZA

40 MES M2933 SIGMA

AMARILLO LUCIFER L0144 SIGMA

HBSS - Solución APICAL MES 1% (Preparada en laboratorio y utilizada en el plazo de una semana)

Solución HBSS - Solución HEPES BASOLATERAL 1% (Preparada en laboratorio y utilizada en el plazo de una semana)

4. Métodos

Las ensayos se llevan a cabo en un centro de ensayo certificado por GLP.

5 4.1 Análisis MTT: Citotoxicidad de las sustancias de ensayo en la línea Caco-2

4.1.1 Principio del método

Se evalúa el efecto citotóxico potencial de las sustancias en células Caco-2 en fase proliferativa utilizando el análisis MTT.

10 El análisis MTT se considera un patrón internacional para la cuantificación de la citotoxicidad (ISO 10993-5). El método permite la cuantificación de un efecto citotóxico inducido por el producto a través de la medición de la viabilidad celular. La citotoxicidad se cuantifica midiendo la disminución en la viabilidad celular en comparación con un control negativo no tratado. Se basa en la reacción metabólica que se produce entre la sal de tetrazolio (MTT) y las enzimas mitocondriales (succinato deshidrogenasa) después de que se produzca el contacto con el producto para diferentes tiempos de tratamiento: solamente la célula viva puede transformar la sal de tetrazolio en el derivado insoluble (formazano). La reacción se revela mediante la formación de una coloración púrpura en la base del inserto.

15 El derivado de color púrpura se extrae en isopropanol y se lleva a cabo la cuantificación a través de una espectrofotometría a 570 nm.

4.1.2 Procedimiento

Se evalúan las siguientes concentraciones:

20 3) 0,25% / 0,5% / 1% (PRIMERA RONDA MTT): 2 horas de tratamiento

4) 0,025% / 0,05% / 0,1% / 0,25% (SEGUNDO ENSAYO MTT): 1 h de tratamiento Las células Caco-2 se cultivan en placa en una placa MultiWall de 96 pocillos (por triplicado) a una densidad celular de 120.000 células por pocillo (cámara de recuento celular por Buerker).

25 Después de la incubación durante 1 h o 2 h con la sustancia que se iba a someter a ensayo, se evalúa el contenido en formazano para cada pocillo por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm (λ).

Después de realizar la sustracción del blanco, se obtiene el % de vitalidad con respecto al control no tratado de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ VITALIDAD} = (\text{D.O. TRATADO} / \text{OR CONTROL NO TRATADO}) * 100$$

30 4.2 Análisis para la resistencia eléctrica transepitelial (TEER): verificación de la integridad de la función de la barrera.

4.2.1 Principio del método

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER) es una medida directa de la funcionalidad de la barrera cutánea: refleja la resistencia global del tejido debido tanto a su espesor como a su estructura. La TEER mide la integridad de la barrera a nivel de las uniones estrechas.

35 El valor de la resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER) de la monocapa, que consiste en células Caco-2 diferenciadas, representa una indicación del nivel de integridad de la monocapa, por lo tanto de la misma formación de las uniones estrechas entre los enterocitos. La medición del valor de la resistencia transepitelial (expresada en Ω * cm^2) se realiza utilizando un voltímetro-ohmiómetro (Millicell ERS) (rango 0-2000 Ω). Los valores de TEER de la monocapa diferenciada varían en función de la línea celular y son aceptables por encima de 150-200 Ω * cm^2 .

40 4.2.2 Procedimiento

En una monocapa diferenciada de células Caco-2, después de 21 días de cultivo, se evalúa TEER realizando una medición de inserto a través de un electrodo especial, colocando el extremo corto del electrodo dentro del inserto en 0,5 mL de medio. La parte larga del electrodo se sumerge en 1,5 mL de medio en el pocillo que contiene el inserto.

45 4.3 Análisis con amarillo Lucifer: verificación de la integridad de las uniones celulares en presencia de la sustancia que se va a evaluar.

4.3.1 Principio del método

El amarillo Lucifer es un marcador fluorescente impermeable a la membrana celular.

Se utiliza para estudiar la permeabilidad de una sustancia a nivel paracelular.

Cuando las uniones no están dañadas, el amarillo Lucifer tiene una permeabilidad muy baja.

4.3.2 Procedimiento

5 Los experimentos de transporte se realizan sobre una monocapa de células Caco-2 aplicando a nivel del compartimento apical del inserto 100 $\mu\text{moles/L}$ de amarillo Lucifer (LY) junto con la sustancia de ensayo (la más alta no citotóxica en el ensayo de MTT), disuelto en tampón HBSS-MES al 1% (0,5 mL). Se añaden 1,5 mL de tampón HBSS-Hepes al 1% a nivel basolateral.

El transporte de LY se evalúa como el pase desde el compartimento apical al compartimento basolateral después de un período de incubación definido de 1 h a 37°C.

10 La lectura se realiza en el espectrofluorómetro (TECAN) con una excitación a 428 nm y una emisión a 535 nm. La medición de fluorescencia (UFR) se realiza a los niveles apical y basolateral y el flujo y la permeabilidad del marcador se calculan de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\text{Flujo LY} = (\text{UFR BL} / \text{UFR AP}) \times 100$$

$$\text{Permeabilidad aparente (PAPP, cm /seg)} =$$

15 $(\text{Concentración BL} / \text{Concentración AP}) \times (\text{Volumen BL} / \text{área} \times \text{tiempo})$

Para derivar la concentración de LY en el compartimento basolateral, se utiliza una curva patrón que se obtiene a partir de diferentes concentraciones de LY en la placa de 96 pocillos (100 μl por triplicado):

LY: 0-6-12 μM (concentraciones bajas de patrón)

LY: 0-6,12,25-100 μM (altas concentraciones de patrón)

20 En una monocapa intacta, el flujo de LY es menor de 10% y el coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) es menor de $2,3 \times 10^{-6}$ cm/seg (controles internos).

4.4 PRUEBA DE PASE INTESTINAL

4.4.1 Principio del método

25 Las células Caco-2 desarrolladas en forma de monocapa sobre un soporte artificial permeable reproducen la capa epitelial intestinal (monocapa de células que están polarizadas y acopladas por medio de uniones estrechas). El flujo a través de la monocapa permite establecer la permeabilidad de una sustancia.

4.4.2 Procedimiento

30 Después de 21 días de crecimiento en el inserto, las células diferenciadas muestran un lado apical, correspondiente al lumen intestinal in vivo, y uno que corresponde al compartimento basolateral de la circulación sanguínea y linfática del organismo.

35 El medio de cultivo se aspira desde todas las monocapas celulares antes de los experimentos de permeabilidad. Todas las monocapas de células se lavan una vez con solución de HBSS (Solución Salina Equilibrada de Hank) y se deja que se equilibren a 37°C durante 20 min. La sustancia de ensayo (composición A) se prepara extemporáneamente en 1X HBSS que contiene MES al 1% (pH 6,5 para reproducir la baja acidez duodenal) a una concentración de 0,25% p/p de la Composición A. La solución de ensayo se añade a la monocapa desde el lado del donante (0,5 ml por triplicado), es decir, desde la región apical. Paralelamente, la misma cantidad de sustancia se divide en partes alícuotas iguales y representa la muestra apical en el punto temporal = 0 minutos (0'AP). En el lado receptor de la monocapa se añaden 1,2 mL de 1X HBSS-Hepes al 1% (pH 7,4). Las placas así tratadas se colocan en una incubadora a 37°C durante un período de incubación definido (15-30-60 minutos).

40 En correspondencia de cada punto temporal de la cinética definida, se recogen muestras del lado receptor de las monocapas (0,6 mL). Los estudios se realizan en 60 min. Las muestras se toman a los 15, 30, 60 minutos (definido como basolateral BL). Los volúmenes del compartimento basolateral se mantienen constantes, restaurando el 1X HBSS después de cada toma de muestras. Al final de los tratamientos, se recupera la cantidad de sustancia que queda en la porción apical (T = 60'AP) y se solubilizan las células en 0,5 mL de agua destilada, se resuspenden y se conservan a 4°C para su análisis y para la determinación del equilibrio de masas.

45 El análisis de la cantidad de curcumina se realiza por medio de HPLC-UV.

Los coeficientes de permeabilidad aparente Papp (cm/seg) se determinan mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Papp} = dQ / (dt \times A \times C_0)$$

en donde:

- DQ/dt es la pendiente del perfil de permeabilidad de la curcumina en el tiempo (segundos) a través de la monocapa de células Caco-2 (masa transferida por unidad de tiempo)

- A es el área de superficie del inserto (1 cm^2)

5 • C_0 es la concentración del ensayo inicial del donante

Con los resultados obtenidos a partir del análisis de HPLC, el cálculo del equilibrio de masa se realiza como sigue:

$$\% \text{ EQUILIBRIO DE MASA TOTAL} = (C_{60' \text{ AP}} * 0,5 \text{ ml} * 100) / (C_d * 0,5 \text{ ml} + C_{60' \text{ BL}} + C_{\text{sedimento}} * 0,5 \text{ ml})$$

- $C_{60' \text{ AP}}$: concentración final de curcumina encontrada en el compartimento apical después de 60 minutos

- $C_{60' \text{ BL}}$: concentración de curcumina en el compartimento basolateral después de 60 minutos

10 • C_d : Concentración inicial (donante) aplicada al nivel superior que tiene en cuenta el factor de dilución dentro del intervalo de tiempo pertinente.

4.4.3 Método de cálculo

Utilizando las fórmulas matemáticas descritas por Arturrson, se calculan las relaciones entre concentraciones de sustancias en los compartimentos basolateral (receptor) y apical (donador) en cada momento de muestreo.

15 Los valores de "fracción acumulada de fármaco transportado" (cm) se calculan a partir de los datos de concentración encontrados experimentalmente a nivel basolateral (Tavelin S. "Application of epithelial cell culture in studies of drug transport" *Methods in Molecular Biology* vol. 188 "Epithelial cell culture protocols"; Le Ferrec E. "In vitro models of the intestinal barrier" ECVAM workshop 46. ATLA **2001**, 29, 649-668).

20 El resultado de la sustancia cuantificada en cada compartimento se muestra en la siguiente tabla 1:

Tabla 1

COMPARTIMENTO	Resultado
Apical	NO PENETRADO
Producto Homogeneizado Celular	Internalizado
Basolateral	PENETRADO

El producto homogeneizado celular y el compartimento basolateral contienen la fracción de curcumina que es absorbida por el transporte pasivo.

25 5. Análisis estadístico

No se realiza ningún análisis estadístico específico, con la excepción del cálculo de las desviaciones típicas.

6. Resultados

6.1 Evaluación de la toxicidad de la composición núcleo de la invención (Composición A) a tres concentraciones p/p ensayo MTT

30

Tabla 2

Muestra	Control (CN)	Composición A (0,25% p/p)	Suspensión de la Composición A (0,5% p/p)	Suspensión de la Composición A (1% p/p)
% de vitalidad celular	100	36,892	35,812	32,161

Ensayo MTT después de 2 horas de incubación con la composición núcleo de la invención (Composición A) a tres concentraciones diferentes p/p: 0,25% / 0,5% / 1%.

- 5 La citotoxicidad de la Composición A se somete a ensayo a tres concentraciones diferentes durante 2 horas de tratamiento: a las tres concentraciones (altas) el producto muestra un efecto citotóxico que no es dependiente de la dosis.

Dado que se espera que la absorción intestinal sea mayor en el plazo de 1 hora, se decide tratar las células sólo durante 1 h a 4 concentraciones más bajas (Tabla 3). También en este caso, se encuentran valores de vitalidad que son límite, pero superiores a los de 2 h y, en todos los casos, superiores al 50%.

10

Tabla 3

Muestra	Control (CN)	Comp. A (0,025% p/p)	Comp. A (0,05% p/p)	Comp. A (0,1% p/p)	Comp. A (0,25% p/p)
% de vitalidad celular	100	59,048	54,392	53,091	50,485

Ensayo MTT después de 1 hora de incubación con la COMPOSICIÓN A a cuatro concentraciones diferentes: 0,025% / 0,05% / 0,1% / 0,25%.

- 15 Basándose en estos datos, la concentración no citotóxica más alta que se va a utilizar para evaluar el pase intestinal de la Composición A es 0,25%.

La concentración teórica de curcumina dentro de los gránulos sometidos a ensayo a 0,25% corresponde a 0,052% p/p = 1,404 mM.

6.2 Pase paracelular: evaluación de la toxicidad en las uniones estrechas vía Ly y TEER

- 20 Todos los insertos preparados para el estudio presentaron valores iniciales de TEER de aproximadamente 200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Tabla 4), que son válidos para evaluar la toxicidad de la composición núcleo de la invención (COMPOSICIÓN A) 0,25% por LY.

Los insertos se tratan durante 1 h con COMPOSICIÓN A/LY; El inserto CN (control no tratado negativo) y el inserto en blanco se tratan sólo con LY.

25

Tabla 4

	Control	Composición A
Valores TEER iniciales ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	188,7	190,65
Valores TEER después de 1 h ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	159,15	170,4

Medición de TEER después de 1 hora de incubación con una solución de COMPOSICIÓN A a 0,25% p/p

No se observa ninguna diferencia en los valores de TEER después del tratamiento con la composición núcleo de la

invención en comparación con las células en HBSS-CN MES al 1%.

Los resultados confirman una acción neutra a nivel de la estructura de las uniones estrechas. En la Tabla 5 se muestran los valores del flujo de amarillo Lucifer paracelular medido después de 1 h de tratamiento con la COMPOSICIÓN A a 0,25%.

5

Tabla 5

	Control (CN)	Composición A	Valores aceptables
Flujo LY %	1,246% ± 0,021	1,148% ± 0,016	<10%
Papp	1,129* 10 ⁻⁶	8,040* 10 ⁻⁷	<2,3* 10 ⁻⁶ cm/seg

La composición núcleo de la invención a la concentración sometida a ensayo se confirma como no tóxica para las uniones (flujo de Amarillo Lucifer <10% y Papp <2,3 * 10⁻⁶ cm/seg)

6.3 Pase intestinal

10 6.3.1 Ensayo de permeabilidad para la dosificación de curcumina

Los resultados de la detección de curcumina por medio de HPLC-UV se resumen en la Tabla 6.

En la bibliografía se demostró que la curcumina tiene una biodisponibilidad baja, debido a la baja solubilidad en agua, y un alto metabolismo (Wahlang B, YB Pawar, AK Bansal. " Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model" *Eur J Pharm Biopharm.* **2011** Feb; 77 (2) :275-82).

15 Para evaluar la linealidad y la estabilidad de la curcumina, se utiliza rizoma de cúrcuma a 95% como referencia y se debe utilizar tetrahidrofurano (THF) como disolvente a una razón de 1:3 con el disolvente acuoso (que contiene ácido cítrico al 1%), considerando la muy baja solubilidad de la cúrcuma.

20 Se ha encontrado que el método analítico utilizado para el patrón es preciso y exacto para las concentraciones utilizadas (LOQ 0,05 mg/L, LOD 0,017 mg/L), pero no es suficientemente exacto para detectar la curcumina solamente en presencia de los tampones requeridos para el estudio de la absorción, que en parte restringen la solubilidad de la curcumina.

Los resultados analíticos muestran que hay menos de la cantidad teórica de curcumina presente en la muestra inicial en la solución al 0,25% p/p de la composición núcleo de la invención (Composición A), como se indica en la siguiente tabla 6 que muestra una pérdida de aproximadamente 23% en el título.

25 Esta pérdida se debe a la solubilidad incompleta de las muestras que contienen curcumina en los tampones necesarios para el estudio: la solución, de hecho, parece muy turbia y con tendencia a la precipitación.

Tabla 6

	EXTRACTO TURMÉRICO que contiene curcumina al 95% (p/p)	CANTIDAD TEÓRICA DE CURCUMINA en la solución al 0,25% (p/p)	CANTIDAD DE CURCUMINA detectada por la técnica de HPLC-UV en la solución 0,25
Concentraciones	21,93 g/100 g	0,052% = 1,404 mM	0,04% mM = 1,080 mM

30 Las concentraciones de curcumina en % detectadas en diferentes compartimentos, analizadas por triplicado (3 insertos) después del tratamiento con la composición núcleo de acuerdo con la invención (COMPOSICIÓN A) durante 1 h, se muestran en la siguiente tabla 7:

Tabla 7

Curcumina			
Compartimento	%	µM	% Recuperado en comparación con 0'AP
Apical a los 60 min	1) 0,01	1) 270	1) 25%
	2) 0,02	2) 540	2) 50%
	3) 0,01	3) 270	3) 25%
Producto homogeneizado celular A los 60 min	1) 0,01	1) 270	1) 25%
	2) 0,01	2) 270	2) 25%
	3) 0,02	3) 540	3) 50%
Basolateral (15 min +30 min +60 min)	1) 0,00075	1) 20,25	1) 1,875%
	2) 0,00075	2) 20,25	2) 1,875%
	3) 0,00075	3) 20,25	3) 1,875%
TOTAL: ÁPICE + Basolateral + producto homogeneizado CÉLULA	1) 0,02075 2) 0,03075 3) 0,03075	1) 560,25 2) 830,25 3) 830,25	1) 51,875% 2) 76,875% 3) 76,875%
(Apical = diferencia entre la lectura en la solución inicialmente aplicada y la residual después de 60 min, Basolateral y producto homogeneizado = lectura en los tiempos especificados)			

Es evidente que las dosificaciones de curcumina en las muestras biológicas analizadas están significativamente influenciadas por la escasa solubilidad de la curcumina.

- 5 De hecho, los valores de recuperación de la curcumina en (52% - 77%) muestran que un porcentaje significativo de curcumina no se ha cuantificado en las condiciones Experimentales sometidas a ensayo, lo que no permite un cálculo correcto del equilibrio de masa final.

10 Sin embargo, el análisis de la distribución en los diferentes compartimentos, aunque subestimado debido a la escasa solubilidad (por ejemplo: en el inserto 1 sólo se cuantifica 0,01% en el producto homogeneizado celular y 0,01% en la porción apical al final del periodo de incubación, después de la aplicación inicial de 0,04% de una cantidad inicial de una sustancia), muestra a los 60 minutos una distribución equivalente de curcumina entre la apical y el producto homogeneizado celular, que confirma su internalización en el epitelio intestinal.

No es detectable ningún pase de curcumina en el compartimento basolateral.

7. Conclusiones

El estudio in vitro del pase intestinal de la Composición A que contiene curcumina se lleva a cabo en células Caco-2 a la concentración de ensayo de 0,25% según se define basándose en los valores de los ensayos preliminares de citotoxicidad.

5 Los datos tanto del pase paracelular con amarillo Lucifer como de la medida de TEER muestran que el producto granulado de curcumina (composición núcleo de la invención) no inducen toxicidad a nivel de las uniones intercelulares.

En este estudio no es posible calcular el equilibrio de masa (Equilibrio de masa, MB), es decir, el porcentaje de curcumina recuperada en los diversos compartimentos al final del pase intestinal, debido a la solubilidad incompleta de la composición núcleo de la invención en los tampones utilizados para el estudio.

10 Un 23% del contenido teórico de curcumina no se detecta en la solución, por lo que esta pérdida también es aplicable al análisis de las muestras generadas en el estudio.

A continuación se calcula la suma de las cantidades de compuesto recuperado en el compartimento apical y en el compartimento basolateral, junto con la fracción asociada con el componente celular (producto homogeneizado) en comparación con la cantidad real inicialmente aplicada (51,875% y 76,875% en los insertos 1 y 2, respectivamente).

15 En el presente estudio, la curcumina, una molécula lipófila que es propensa a la acumulación intracelular, demuestra una baja permeabilidad con un Papp (A-B) de $8,040 \cdot 10^{-7}$.

Esto se confirma en la bibliografía (Wahlang B, YB Pawar, AK Bansal. "Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model" *Eur J Pharm Biopharm.* **2011** Feb; *77* (2) 275-82). De hecho, la curcumina no se detecta en el compartimento basolateral.

20 Sin embargo, el análisis de la distribución en los diferentes compartimentos, aunque subestimado debido a la escasa solubilidad de la curcumina en los tampones, muestra ya a los 60 minutos una distribución equivalente de curcumina entre el compartimento apical y el producto homogeneizado celular, confirmando su internalización a nivel del epitelio intestinal.

25 Debido a que la absorción de curcumina en el agua, que forma una solución opaca que contiene materia en partículas, es regulada por dos fases, es decir, disgregación/disolución y absorción a través de la membrana mucosa, la internalización de la forma granulada es más rápida que otras formas de administración.

Para la curcumina, que es una sustancia lipófila, el factor limitante para la internalización es de hecho su solubilidad en solución acuosa: la fracción molecular que está disponible se puede internalizar y acumular más rápidamente a nivel de la monocapa celular.

30 En apoyo de este comportamiento, se ha demostrado en la bibliografía que, utilizando células lisadas, 11,78% de la curcumina se metaboliza durante el transporte y se acumula en las células (a través de estudios cinéticos de absorción y liberación de curcumina). La cantidad acumulada es de 20%. Esta cifra es comparable con los resultados de acumulación observados en el producto homogeneizado celular: 25% (en 2 insertos) e incluso 50% (en 1 inserto).

35 De este modo, la composición núcleo de acuerdo con la presente invención proporciona un método seguro y más eficaz para el suministro con una alta tasa de absorción de una sustancia activa de otra manera escasamente biodisponible.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 - a) un núcleo que comprende al menos un principio activo con baja biodisponibilidad, un polisorbato y una sal de N-acetilcisteína-quitosano;
 - 5 b) una capa de recubrimiento entérico que encierra dicho núcleo a),
 en donde dicha sal de N-acetilcisteína-quitosano comprendida en a) se obtiene mediante la protonación del grupo amino libre de quitosano por medio de N-acetilcisteína, comportándose como un ácido.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la capa b) es una película entérica aplicada directamente sobre el núcleo a).
- 10 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el al menos un principio activo con baja disponibilidad se selecciona entre trans-resveratrol, melatonina, ácidos grasos omega-3, terpenos esteroideos como ácidos boswellicos, terpenos no esteroideos, saponinas, aceites esenciales y polifenoles incluyendo curcumina, berberina y mezclas de los mismos.
- 15 4. La composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde el al menos un principio activo con baja disponibilidad es curcumina o berberina.
5. La composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde el polisorbato es polisorbato 80.
6. La composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde el núcleo a) comprende adicionalmente un extracto de *Citrus x paradisi* titulada a al menos 40% en peso/peso total del extracto de *Citrus x paradisi* en bioflavonoides, y titulados específicamente en Naringina y Naringenina, y/o un extracto de *Piper nigrum* titulado en piperina al 95% en peso/peso total del extracto de *Piper nigrum*.
- 20 7. La composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde el recubrimiento b) comprende o consiste en goma laca.
8. La composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores en forma de un gránulo entérico, en donde el núcleo a) está incluido en una película entérica b, o de una cápsula gastro-resistente en donde dicho núcleo a) está incluido en una envuelta dura o blanda con recubrimiento entérico (capa b)).
- 25 9. Un comprimido que comprende la composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho comprimido comprende adicionalmente, por fuera de la capa b), una capa c) que comprende al menos un excipiente adecuado para la formación de comprimidos.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en donde al menos un excipiente de la capa exterior c) adecuado para la compresión se selecciona entre almidón, celulosa microcristalina, estearato de magnesio, fosfato de calcio, talco, sílice y mezclas de los mismos.
- 30 11. La composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, para su uso como medicamento.
12. Un suplemento dietético o una composición nutracéutica que comprenden la composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-9.
- 35 13. Un método para la formación de la composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende las etapas de:
 - i. preparar una solución o dispersión acuosa que comprende al menos un polisorbato a una concentración entre 1 y 30% en peso/peso total de la solución o dispersión acuosa y una sal de N-acetilcisteína-quitosano, en donde la N-acetilcisteína y el quitosano están a una concentración entre 0,01 y 3% en peso/peso total de la solución;
 - 40 ii. granular en húmedo una composición que comprende al menos el principio activo con baja biodisponibilidad con la solución o dispersión acuosa obtenida en la etapa i;
 - iii. secar hasta un peso constante y tamizar el producto granulado obtenido en la etapa ii
 - iv. formar el núcleo a) de la composición por compresión del sólido obtenido en la etapa iii;
 - 45 v. recubrir el núcleo a) obtenido en la etapa iv con una capa entérica gastro-resistente.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la granulación de la etapa ii se realiza combinando la solución o dispersión acuosa obtenida en la etapa i y una composición que comprende la sustancia activa con baja biodisponibilidad, un extracto de *Citrus x paradisi* titulada a al menos 40% en peso/peso total del extracto de *Citrus x*

5 *paradisi* en flavonoides y titulado específicamente en Naringina y Naringenina y un extracto de *Piper nigrum* titulado en piperina hasta 95% en peso/peso total del extracto de *Piper nigrum* y, en caso necesario, N-acetilcisteína y quitosano en cantidades tales que se obtenga en una única forma de dosificación, una cantidad de quitosano entre 1 y 150 mg, una cantidad de N-acetilcisteína entre 1 y 75 mg, una cantidad de extracto de pomelo (*Citrus x paradisi*) entre 1 y 300 mg, y una cantidad de extracto de *Piper nigrum* entre 1 y 30 mg.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, que comprende adicionalmente:

vi. añadir al núcleo recubierto con película obtenido en la etapa v al menos un excipiente adecuado para la formación de comprimidos;

10 vii. comprimir la composición obtenida en la etapa vi, obteniendo la composición en forma de un comprimido de acuerdo con la reivindicación 9.