



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 326 933**

⑯ Int. Cl.:

A01N 65/00 (2006.01)

A01N 31/08 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/22 (2006.01)

A61K 9/28 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

A61K 31/765 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **97912779 .2**

⑯ Fecha de presentación : **14.10.1997**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **0935417**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.1999**

⑯ Título: **Formulaciones entéricas de composiciones de polímeros de proantocianidina antidiarreicas.**

⑯ Prioridad: **16.10.1996 US 730772**

⑯ Titular/es: **Napo Pharmaceuticals, Inc.**
1170 Veterans Blvd., Suite 244
South San Francisco, California 94080, US

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.10.2009

⑯ Inventor/es: **Rozhon, Edward, J.;**
Khandwala, Atul, S. y
Sabouni, Akram

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.10.2009

⑯ Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 326 933 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

Formulaciones entéricas de composiciones de polímeros de proantocianidina antidiarreicas.

5 La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas de una composición de polímero de proantocianidina, que ha sido aislada a partir de un *Croton* spp. O *Calophyllum* spp., formulaciones que son eficaces para el tratamiento de la diarrea secretora, particularmente para la reducción de la pérdida de líquido y la deshidratación resultante asociada con las diarreas secretoras.

10 Las diarreas secretoras, denominadas también diarreas acuosas, son una fuente importante de enfermedad y mortalidad en los países en desarrollo, particularmente en los niños pequeños y los muchachos jóvenes, y afectan también a una proporción importante de visitantes de los países desarrollados a los países en desarrollo, pudiendo afectar también a cualquier persona que visite un país extranjero (denominada "diarrea de los viajeros"). La diarrea secretora se caracteriza por la pérdida tanto de líquido como de electrólitos a través del tracto intestinal, conduciendo a deshidratación grave y a menudo amenazante para la vida. La diarrea secretora está causada por una diversidad de patógenos bacterianos, virales y protozoicos y es también resultado de otras etiologías no infecciosas tales como colitis ulcerosa, 15 síndrome inflamatorio intestinal, y cánceres y neoplasias del tracto gastrointestinal. De hecho, se cree que todos los tipos de enfermedad diarreica pueden tener un componente secretor.

20 Dos fuentes bacterianas importantes de diarrea secretora son *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*. Los tipos enterotóxicos de *E. coli* representan una fuente importante de diarrea secretora en los países en desarrollo y son la causa principal de la diarrea de los viajeros. Otras cepas de *E. coli* que causan diarrea incluyen cepas enterohemorrágicas, enteroinvasivas, y enteropatógenas, y otras. Otros agentes bacterianos que causan diarrea secretora incluyen otras *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp., *Clostridium* spp., *Bacteriodes* spp., *Staphylococcus* spp., y *Bacillus* spp., así como otras bacterias entéricas. La diarrea secretora puede estar causada también por patógenos protozoicos tales como *Cryptosporidium* spp., por ejemplo *Cryptosporidium parvum*. Véase en líneas generales, Holland, 1990, Clin. Microbiol. Rev. 3:345; Harris, 1988, Ann. Clin. Lab. Sci. 18:102; Gracey, 1986, Clin. In Gastroent., 15:21; Ooms y Degryse, 1986, Veterinary Res. Comm. 10:355; Black, 1982, Med. Clin. Nor. Am., 66:611.

30 *V. cholerae*, las cepas enterotoxígenas de *E. coli*, y una diversidad de otras bacterias entéricas provocan diarrea secretora por mecanismos similares. Estos patógenos producen una toxina que fija un receptor específico en la membrana apical del epitelio intestinal. La fijación del receptor desencadena una transducción de señales mediadas por adenilato-ciclasa o guanilato-ciclasa que conduce a un aumento en cAMP o cGMP. Esta cascada reguladora, que actúa 35 aparentemente por fosforilación de proteínas específicas de la membrana apical, estimula el flujo de cloruro al intestino desde las células de la cripta epitelial intestinal e inhibe la resorción normal de los iones sodio y cloruro por las células del vello epitelial intestinal. La concentración incrementada de iones cloruro y sodio aspira osmóticamente agua al lumen intestinal, dando como resultado a la vez deshidratación y pérdida de electrólitos. Los agentes que reducen 40 la secreción de ión cloruro impedirán, por tanto, el movimiento de fluidos al intestino y la eliminación resultante de fluido intestinal. Así pues, tales agentes son particularmente útiles para el tratamiento y prevención de la peligrosa deshidratación y pérdida de electrólitos asociada con la diarrea secretora.

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de la diarrea de los viajeros y diarrea inespecífica. La diarrea de los viajeros, que es un tipo de diarrea secretora, se define como diarrea experimentada por los ciudadanos de naciones industrializadas que se desplazan a países del "tercer mundo". Un ejemplo de diarrea de los viajeros es la enfermedad diarreica experimentada por los ciudadanos de los Estados Unidos que viajan a México por primera vez y sufren diarrea en el transcurso de los 3-5 días de la llegada (Castelli & Carose, 1995, Chemotherapy 4, (suplemento 1): 20-32). Se estima que las bacterias son responsables del 85% de la diarrea de los viajeros, siendo *Escherichia coli* enterotoxígena (ETEC), *Shigella* spp., y *Campylobacter* 50 *jejuni* los agentes etiológicos principales. Protozoos y virus causan también diarrea de los viajeros pero con menores frecuencias que las bacterias (DuPont, 1995, Chemotherapy, 4 (suplemento 1): 33-39). En México, en los meses de verano (mayo a noviembre), el agente etiológico predominante asociado con la diarrea de los viajeros es ETEC, en tanto que en los meses de invierno, el organismo principal es *Campylobacter jejuni* (DuPont, 1995, "Traveler's Diarrea", M. Blazer *et al.*, eds., pp. 299-311, Raven Press, Nueva York). Aproximadamente el 40% de quienes viajan 55 por primera vez desde los Estados Unidos a México experimentan diarrea de los viajeros.

60 En contraste con la diarrea de los viajeros, la diarrea inespecífica (NSD), que parece tener también un componente secretor, es una enfermedad diarreica aguda endémica experimentada por las poblaciones indígenas. La tasa de ataque de diarrea inespecífica en los residentes de México es 7% (H.L. DuPont, comunicación personal). Al contrario que la diarrea de los viajeros, sin embargo, la diarrea inespecífica no responde por regla general a la terapia con antibióticos y la etiología de la misma es desconocida.

65 Desde 1975, DuPont y colegas en el centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en Houston han conducido una serie de pruebas clínicas en México para estudiar la eficacia de una diversidad de fármacos antidiarreicos. Basándose en los resultados de los grupos de placebo de estos estudios, han podido caracterizar la historia natural de la diarrea de los viajeros y la diarrea inespecífica en los viajeros de Estados Unidos y los naturales de México, respectivamente. Los datos muestran diferencias claras tanto en la intensidad como en la duración de la enfermedad diarreica entre los pacientes que sufren diarrea de los viajeros en verano y los pacientes con diarrea inespecífica. En

evaluaciones de 5 días, la duración de la enfermedad (tiempo medio hasta la última deposición amorfas desde el momento del ingreso) era 69 horas para los viajeros de los Estados Unidos comparado con 38 horas para los naturales de México $p = 0,0001$). Si se analiza el número total de deposiciones transcurridas desde el momento del ingreso (0-120 horas), los viajeros de los Estados Unidos tienen 10,6 deposiciones frente a 5,6 deposiciones para los residentes en México ($p = 0,0001$) (H.R. DuPont, comunicación personal).

Aunque no se dispone de tantos datos acerca de la diarrea de los viajeros existente en los meses de invierno en México, en general la enfermedad diarreica en las nuevas llegadas de los Estados Unidos es similar a la diarrea experimentada por los residentes de los Estados Unidos que han estado en México durante varios meses. La misma tiende a ser menos grave que la diarrea de los viajeros en verano, y más grave que la diarrea inespecífica (H.L. DuPont, comunicación personal).

Las diarreas secretoras se han asociado también con infecciones virales, tales como las diarreas que acompañan a la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), e infección por rotavirus, en particular. Casi todos los pacientes de SIDA sufren diarrea en algún momento durante el curso de la enfermedad, y el 30% de los pacientes de SIDA sufren diarrea crónica. La diarrea que acompaña al SIDA ha sido denominada "Diarrea Crónica Asociada al HIV". Se cree que este componente diarreico de la enfermedad HIV está causado, al menos en algunos pacientes, por una infección secundaria de patógenos protozoicos, particularmente *Cryptosporidium* spp. Adicionalmente, la infección por rotavirus es una causa sustancial de diarrea, particularmente en los niños pequeños y muchachos jóvenes en los países en desarrollo.

La diarrea secretora es también un problema importante en animales no humanos, particularmente en animales de granja, tales como animales bovinos, cerdos, ovejas (animales ovinos), aves de corral (tales como pollos), y animales equinos, y otros animales domésticos tales como animales caninos y animales felinos. La enfermedad diarreica es particularmente común en los animales de granja jóvenes y recién destetados. La enfermedad diarreica de los animales de granja, particularmente animales domésticos tales como ganado vacuno, ovejas y cerdos, está causada a menudo por patógenos bacterianos tales como *E. coli* enterotoxígenos, enterohemorrágicos y otros, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter* spp., y *Yersinia enterocolitica*. Adicionalmente, patógenos protozoicos, particularmente *Cryptosporidium parvum*, y agentes virales, particularmente rotavirus y coronavirus, son causas importantes de diarrea en animales de granja. Otros agentes virales que han sido implicados en la diarrea de los animales de granja incluyen togavirus, parvovirus, calicivirus, adenovirus, bredavirus, y astrovirus. Véase en líneas generales Holland, 1990, Clin. Microbiology Rev. 3:345; véase también Gutzwiller y Blum, 1996, AJVR 57:560; Strombeck, 1995, Veterinary Quarterly 17 (Suppl. 1):S12; Vermunt, 1994, Austral. Veterinary J. 71:33; Driesen *et al.*, 1993, Austral. Veterinary J. 70:259; Mouricout, 1991, Eur. J. Epidemiol. 7:588; Ooms y Degryse, 1986, Veterinary Res. Comm. 10:355.

Los taninos se encuentran en una gran diversidad de plantas y se clasifican como hidrolizables o condensados. Las proantocianidinas son un grupo de taninos condensados y se describen con mayor detalle más adelante. Se ha encontrado que muchas plantas utilizadas en medicina tradicional como tratamiento o profilaxis para la diarrea contienen taninos y proantocianidinas en particular (véase, v.g., Yoshida *et al.*, 1993, Phytochemistry 32:1033; Yoshida *et al.*, 1992, Chem. Pharm. Bull., 40:1997; Tamaka *et al.*, 1992, Chem. Pharm. Bull. 40:2092). Se ha demostrado que Los extractos brutos de plantas medicinales, por ejemplo, *Pycanthus angolenis* y *Baphia nitida*, poseen cualidades antidiarreicos en tests realizados en animales (Onwukaeme y Anuforo, 1993, Discovery and Innovation, 5:317; Onwukaeme y Lot, 1991, Phytotherapy Res., 5:254). Extractos brutos que contienen taninos, en particular extractos de vaina de algarroba y madera de castaño dulce, se han propuesto como tratamientos o profilácticos para diarrea (Patente U.S. No. 5.043.160; Patente Europea No. 481396).

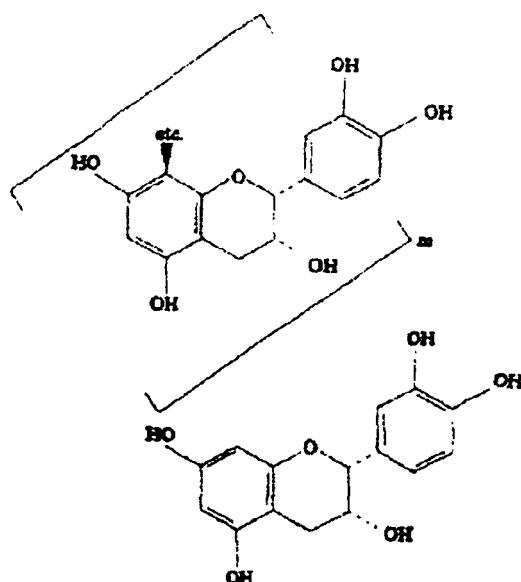
Se han propuesto también extractos brutos de plantas que contienen proantocianidinas como tratamientos o profilácticos para la diarrea. Por ejemplo, extractos brutos de pieles de frutas, que contienen antocianidinas así como otros compuestos, han sido propuestos para uso contra la diarrea (Patente U.S. No. 4.857.327). Se ha demostrado que la corteza del árbol *Q. petrea*, utilizada tradicionalmente contra la diarrea, contiene proantocianidinas oligómeras (Konig y Scholz, 1994, J. Nat. Proc., 57, 1411; Pallenbach, 1993, Planta Med., 59:264). Una fracción de extracto de corteza de *Sclerocarya birrea*, que contiene también procianidinas, reducía las contracciones intestinales asociadas con la diarrea inducida experimentalmente (Gálvez *et al.*, 1993, Phyt. Res., 7:25; Gálvez *et al.*, 1991, Phyt. Res., 5:276). Sin embargo, ninguno de estos estudios demostró que las proantocianidinas sean específicamente responsables de la actividad antidiarreica de los extractos.

Otros estudios sugieren que ciertas preparaciones que contienen proantocianidinas pueden interferir con la acción de la toxina del cólera en el intestino. Se ha demostrado que el extracto bruto de té, que contiene catequinas (monómeros de proantocianidina), previene tanto los cambios morfológicos inducidos por la toxina del cólera en células CHO cultivadas, como la acumulación de fluido intestinal inducido por la toxina del cólera en los ratones cuando se administra cinco minutos después de la toxina del cólera (Toda *et al.*, 1991, J. App. Bact., 70:109). Sin embargo, el extracto bruto de té no podía evitar la acumulación de fluido en el intestino del ratón cuando se administraba treinta minutos después de la toxina del cólera, y no se demostró que las catequinas fueran el agente activo en el extracto. Adicionalmente, una fracción de extracto de corteza de *Guazuma ulmifolia* que contiene proantocianidinas reducía el flujo de iones inducido por la toxina del cólera en el tejido intestinal del conejo aislado, aparentemente por la interacción física de las proantocianidinas polímeras con la toxina del cólera como se determinó por análisis SDS-PAGE (Hor *et al.*, 1996, Phytochemistry 42:109; Hor *et al.*, 1995, Planta Med., 61:208). En cambio, la adición de la fracción

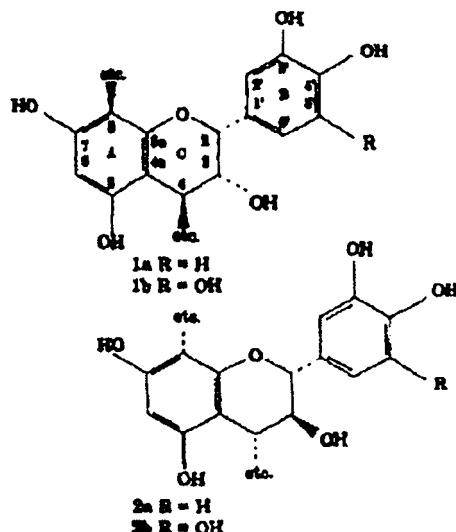
después de la adición de la toxina del cólera no tenía efecto alguno sobre la secreción de ión cloruro. Así pues, de modo completamente contrario a la presente invención, esta fracción no sería eficaz para reducir o prevenir la pérdida de fluido después de exposición al agente causal de la diarrea secretora y por consiguiente no sería útil como terapéutico para la diarrea secretora.

5 Las proantocianidinas tienen efectos fisiológicos diferentes, dependiendo de su estructura y fuente. Una composición de polímero de proantocianidina soluble que puede formularse para administración oral se conoce por US-5.212.944. Otras proantocianidinas están realmente contraindicadas para tratamiento o prevención de la diarrea. Se demostró que las proantocianidinas oligómeras aisladas de la judía negra aumentan la secreción de cloruro y reducen 10 la resorción de sodio en el tejido intestinal aislado [Silverstein, 1989, "Procyanidin from Black Bean (*Phaseolus Vulgaris*): Effects on Transport of Sodium, Chloride, Glucosa, and Alanine in the Rat Ileum", Washington State University (Dissertation)]. La concentración iónica incrementada en el intestino podría promover así la acumulación de fluido en el lumen intestinal y agravar la pérdida de fluido y electrolitos así como la deshidratación asociada con la diarrea secretora. De hecho, la referencia propugna específicamente evitar del uso de proantocianidinas como tratamiento para 15 la diarrea y sugiere que las proantocianidinas podrían causar diarrea secretora.

La proantocianidina y los polímeros de proantocianidina son sustancias fenólicas encontradas en una gran diversidad de plantas, particularmente aquéllas que tienen un hábito de crecimiento leñoso (v.g., *Croton* spp. y *Calophyllum* spp.). La estructura química general de una proantocianidina polímera está constituida por cadenas lineales de unidades 20 5,7,3',4'-tetrahidroxi- o 5,7,3',5'-pentahidroxi-flavonoide-3-ol, unidas entre sí por enlaces C(4)-(6) y/o C(4)-C(8) comunes, como se demuestra a continuación:



45 Estudios de biosíntesis han indicado que los polímeros de proantocianidina están constituidos por unidades monómeras del tipo que se muestra a continuación. Véase Fletcher *et al.*, 1967, J.C.S. Perkin, 1:1628.



La unidad monómera (denominada generalmente "leucoantocianidina") de la cadena de polímero puede estar basada en cualquiera de dos estereoquímicas en el anillo C, en una posición 2 y/o posición 4 designada cis (denominadas epicatequinas) o trans (denominadas catequinas). Por esta razón, las cadenas de polímero están basadas en unidades estructurales diferentes, que crean una gran variación de proantocianidinas polímeras y un gran número de isómeros

5 posibles (Hemingway *et al.*, 1982, J.C.S. Perkin, 1:1217). La ^{13}C NMR ha sido útil para identificar las estructuras de proantocianidinas polímeras, y un trabajo reciente ha esclarecido la química de proantocianidinas di-, tri- y tetrámeras. Los polímeros mayores de las unidades flavonoide-3-ol se encuentran predominantemente en la mayoría de las plantas, y se han encontrado algunos que tienen pesos moleculares medios superiores a 2000 daltons, que contienen 6 o más unidades (Newman *et al.*, 1987, Mag. Res. Chem., 25:118).

10

Cierto número de especies diferentes de árboles *Croton*, con inclusión de *Croton sakutaris*, *Croton gossypifolius*, *Croton palanostima*, *Croton lechleri*, *Croton erythrocilus* y *Croton draconoides*, encontrados en América del Sur, producen una savia de látex roja viscosa denominada Sangre de Dragón o "Dragon's Blood". La Sangre de Dragón es utilizada en muchos casos por descendientes mixtos y gente nativa del Amazonas Peruano para la gripe y la diarrea.

15 Esto se describe v.g. en el artículo "An Antiviral Oligomeric Proanthocyanidin from the Latex of *Croton lechleri*", en Phytomedicine 1994, vol. 1, p. 77-106 por Ubillens *et al.* La misma se toma por vía interna para amigdalitis, infecciones de garganta, tuberculosis, úlceras pépticas, trastornos intestinales, reumatismo y con objeto de aumentar la fertilidad, y es utilizada tanto por adultos como por niños. La misma se utiliza también extensamente para detener las hemorragias, para lesiones de herpesvirus, y para curación de las heridas. La savia se aplica directamente en las 20 heridas abiertas como desinfectante, y para acelerar el proceso de curación. Se utiliza también como lavado vaginal en casos de hemorragia excesiva.

25 Se ha demostrado que la Sangre de Dragón de *Croton draconoides* y de *Croton lechleri* contiene un alcaloide identificado como taspina, que exhibe actividad antiinflamatoria (Persinos *et al.*, 1979, J. Pharm. Sci., 68:124). Se ha demostrado también que taspina inhibe la actividad de DNA-polimerasa dirigida a RNA en el virus de la mieloblastosis de las aves, el virus de la leucemia de Rauscher y el virus del sarcoma de los simios (Sethi, 1977, Canadian J. Pharm. Sci., 12:7).

30 Una diversidad de compuestos fenólicos y diterpénicos aislados de Sangre de Dragón se testaron respecto a sus propiedades antitumorales, antibacterianas y de curación de las heridas (Chen *et al.*, Planta Med., 60:541). Se encontró que las proantocianidinas contenidas en la savia tienen una pequeña actividad antitumoral o antibacteriana y una ligera actividad de curación de las heridas.

35 La Patente U.S. No. 5.211.944 describió por primera vez el aislamiento de una composición de polímero de proantocianidina de *Croton* spp. y el uso de la composición como agente antiviral (véase también Ubillas *et al.*, 1994, Phytomedicine, 1:77). Se demostró que la composición de polímero de proantocianidina tiene actividad antiviral contra una diversidad de virus que incluyen los virus respiratorio sincitial, de la influenza, la para-influenza y herpesvirus.

40 *Calophyllum inophyllum* es un árbol existente desde la India hasta el África Oriental y la Polinesia. El aceite de la semilla se utiliza en medicina tradicional como antiparasitario en el tratamiento de la sarna, la tiña y la dermatosis, así como otros usos tales como analgesia. En Indochina, la resina pulverizada se utiliza para úlceras y curación de las heridas. En Indonesia, la corteza se aplica externamente para tratar las glándulas hinchadas e internamente como diurético. La savia se utiliza como emoliente para el dolor torácico así como para tumores e hinchamiento. Los extractos de hojas se utilizan como lavado para los ojos inflamados. Los camboyanos utilizan extractos de hojas en inhalaciones para el tratamiento del vértigo y la migraña. Los Samoanos utilizan la savia como veneno para las flechas.

45 La Patente U.S. No. 5.211.944 describe también el aislamiento de una composición de polímero de proantocianidina de *Calophyllum inophyllum* y el uso de esta composición como agente antiviral.

50 Se ha determinado que las composiciones de polímeros de proantocianidina de la invención son lábiles en medio ácido y están sujetas a desactivación por el ambiente ácido del estómago. Antes de la presente solicitud, no se ha hecho descripción alguna de una composición farmacéutica de una composición de polímero de proantocianidina aislada de *Croton* spp. o *Calophyllum* spp., que protege la composición de polímero de proantocianidina contra la acidez del fluido gástrico de tal modo que la composición de polímero de proantocianidina puede administrarse por vía oral para 55 tratamiento de la diarrea secretora.

56 Persiste la necesidad de una composición farmacéutica eficaz, cuya administración reduzca el flujo de iones al intestino provocado por la diarrea secretora. Un agente de este tipo podría ser útil para prevenir la pérdida de fluido y electrolitos así como la deshidratación causada por la diarrea secretora. El objeto de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica eficaz de un agente antidiarreico que satisfaga esta necesidad, y específicamente proporcionar una formulación farmacéutica que sea capaz de proteger el agente antidiarreico contra la acidez del estómago, así como métodos para tratamiento de la diarrea que utilizan la formulación farmacéutica.

60 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 1 y al uso de acuerdo con las reivindicaciones 13, 14 y 15.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan de modo que protegen la composición de polímero de proantocianidina contra la degradación por las condiciones ácidas del estómago. Para dicho propósito, la composición de proantocianidina está provista de recubrimiento entérico. En una realización preferida, la composición de polímero de proantocianidina se proporciona en combinación con una sustancia capaz de reducir la secreción de ácido del estómago o capaz de reducir la acidez del fluido estomacal.

Se describen también composiciones para tratamiento de la diarrea, particularmente diarrea secretora, en animales de sangre caliente, con inclusión de humanos, que comprenden administrar, a un animal no humano o humano que sufre diarrea, una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de polímero de proantocianidina aislada de un *Croton* spp. o un *Calophyllum* spp., o un derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos formulado para proteger la composición de polímero de proantocianidina contra la acción del ácido del estómago, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describen adicionalmente composiciones para el tratamiento de la diarrea secretora en animales, con inclusión de humanos, que comprenden administrar, a un animal no humano o humano que sufre diarrea, (a) una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de polímero de proantocianidina aislada de un *Croton* spp. o un *Calophyllum* spp., o un derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (b) una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz para inhibir la secreción ácida del estómago de un compuesto que es eficaz para inhibir la secreción ácida del estómago o que comprende una cantidad eficaz para neutralizar el ácido del estómago de un compuesto que es eficaz para neutralizar el ácido del estómago, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describen adicionalmente composiciones para prevenir la diarrea en animales de sangre caliente, con inclusión de humanos, que comprenden administrar, a un animal no humano o humano que se encuentra en riesgo de sufrir diarrea, una composición farmacéutica que comprende una cantidad profilácticamente eficaz de una composición de polímero de proantocianidina aislada de un *Croton* spp. o un *Calophyllum* spp., o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, formulado para proteger la composición de polímero de proantocianidina contra la acción del ácido del estómago, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Una superposición de cromatogramas HPLC que muestra los perfiles cromatográficos de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* después de diferentes tratamientos como absorción UV en unidades de miliabsorción (mAU) a lo largo del tiempo de cromatografía en minutos. El cromatograma representado gráficamente como línea de puntos representa el perfil de la composición de polímero de proantocianidina después de incubación en agua ("en agua"), la línea de trazo continuo representa el perfil de la composición de polímero de proantocianidina después de incubación en HCl durante 0,03 horas ("HCl después de 0,03 h"), y la línea de trazos representa la composición de polímero de proantocianidina del perfil de *C. lechleri* después de incubación en HCl durante 2,0 horas ("HCl después de 2,0 h").

Figura 2. Un cromatograma HPLC de una muestra de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* después de incubación en fluido gástrico simulado a 37°C durante 0,03 horas. El cromatograma se representa gráficamente como absorción UV (mAU) a lo largo del tiempo en minutos.

Figura 3. Un cromatograma HPLC de una muestra de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* después de incubación en fluido gástrico simulado a 37°C durante 2 horas. El cromatograma se representa gráficamente como absorción UV (mAU) a lo largo del tiempo en minutos.

Figura 4. Un cromatograma HPLC de una muestra de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* después de incubación en fluido gástrico simulado a 37°C durante 2 horas, y seguido por incubación durante 4 horas más después de dilución 1:1 en fluido intestinal simulado. El cromatograma se representa gráficamente como absorción UV (mAU) a lo largo del tiempo en minutos.

Figura 5. Un cromatograma HPLC de una muestra de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* después de incubación en fluido gástrico simulado a 37°C durante 2 horas, y seguido por incubación durante 6 horas más después de dilución 1:1 en fluido intestinal simulado. El cromatograma se representa gráficamente como absorción UV (mAU) a lo largo del tiempo en minutos.

Figura 6. Representación gráfica del porcentaje de área de pico ("% área de pico"), calculado dividiendo el área del pico del perfil HPLC de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* en el medio de test por el área de pico del perfil HPLC de la composición de polímero de proantocianidina en agua y multiplicando por 100, en función del tiempo de incubación en horas. La línea con cuadrados vacíos representa el % de área de pico de la composición de polímero de proantocianidina después de incubación en SGF (fluido gástrico simulado). La línea de trazos con diamantes representa el % de área de pico de la composición de polímero de proantocianidina después de 2 horas de incubación en SGF y seguida por dilución 1:1 en SIF (fluido intestinal simulado) para incubación ulterior.

Figura 7. Este gráfico de barras representa el efecto de la formulación provista de recubrimiento entérico de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* sobre la acumulación de fluido intestinal en ratones expuestos a la toxina del cólera. Los resultados se presentan como valor medio, para cada grupo de ratones A-C, de la

relación de acumulación de fluido en mg fluido/mg intestino. Los ratones del grupo A se trataron solamente con agua; los ratones del grupo B se trataron con 131 mg de composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico en goma guar/kg; los ratones del grupo C recibieron la administración de "EUDRAGIT™" y azúcar con goma guar. Los ratones de todos los grupos se evaluaron 7 horas después de la exposición a la toxina del cólera. Véase la 5 sección correspondiente más adelante para detalles.

Figura 8. Este gráfico de barras representa el efecto de la formulación provista de recubrimiento entérico de la 10 composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* sobre la acumulación de fluido intestinal en ratones expuestos a la toxina del cólera. Los resultados se presentan como valor medio, para cada grupo de ratones A y B, de la relación de acumulación de fluido en mg/fluido/mg intestino. Los ratones del grupo A se trataron con "EUDRAGIT™" y azúcar en agua, y los ratones del grupo B se trataron con 131 mg de composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico/kg.

La composición de polímero de proantocianidina, eficaz para el tratamiento de la diarrea, está constituida por 15 unidades monómeras de leucoantocianidinas. Las leucoantocianidinas son generalmente flavonoides monómeros que incluyen catequinas, epicatequinas, galocatequinas, galoepicatequinas, flavanoles, flavonoles, y flavan-3,4-dioles, leucocianidinas y antocianidinas. La composición de polímero de proantocianidina útil para el tratamiento de la barrera secretora está constituida por polímeros de 2 a 30 unidades flavonoides, preferiblemente 2 a 15 unidades flavonoides, más preferiblemente 2 a 11 unidades flavonoides y muy preferiblemente un promedio de 7 unidades flavonoides con 20 un peso molecular medio de 2100 daltons.

La composición de polímero de proantocianidina utilizada en la presente invención se aísla de un *Croton* spp. o *Calophyllum* spp., por el método descrito en la Patente U.S. No. 5.211.944.

25 En una realización preferida, la composición de polímero de proantocianidina se aísla de *Croton lechleri*. En otra realización, la composición de polímero de proantocianidina se aísla de *Calophyllum inophyllum*.

Se ha demostrado que la composición de polímero de proantocianidina es lábil en el ambiente ácido del estómago y se ha encontrado que es estable a pH 5,0 hasta aproximadamente pH 8,0 (véase la sección 6, *infra*). Así pues, la 30 invención proporciona formulaciones farmacéuticas de composiciones de polímeros de proantocianidina que protegen las composiciones contra la acidez de las secreciones gástricas. Las formulaciones farmacéuticas de la invención contienen la composición de polímero de proantocianidina con un recubrimiento entérico junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas que contienen la composición de polímero de proantocianidina incluyen alternativamente una o más sustancias que neutralizan el ácido del estómago 35 o son activas para prevenir la secreción de ácido del estómago. Estas formulaciones pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica, véanse, v.g., los métodos descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

La composición de polímero de proantocianidina puede proporcionarse en cualquier forma farmacéutica terapéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede formularse para administración oral como, por ejemplo, 40 polvos de fármaco, cristales, gránulos, partículas pequeñas (que incluyen partículas con tamaños del orden de los micrómetros, tales como microesferas y microcápsulas), partículas (que incluyen partículas con tamaños del orden de los milímetros), cuentas, microcuentas, pélets, píldoras, microtabletas, tabletas comprimidas o triturados de tabletas, tabletas moldeadas o triturados de tabletas, y en cápsulas, que son duras o blandas y contienen la composición como un polvo, partícula, cuenta, solución o suspensión. La composición farmacéutica puede formularse también para 45 administración oral como una solución o suspensión en un líquido acuoso, como un líquido incorporado en una cápsula de gel o como cualquier otra formulación conveniente para administración, o para administración rectal, como supositorio, enema u otra forma conveniente. La composición de polímero de proantocianidina puede proporcionarse también como un sistema de liberación controlada (véase, v.g. Langer, 1990, Science 249:1527-1533).

50 La formulación farmacéutica puede incluir también cualquier tipo de excipientes, aditivos o vehículos farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, diluyentes o cargas, tales como fosfato dicálcico, sulfato de calcio, lactosa, celulosa, caolín, manitol, cloruro de sodio, almidón seco, sorbitol, sacarosa, inositol, azúcar pulverizado, bentonita, celulosa microcristalina, o hidroxipropilmetilcelulosa pueden añadirse a la composición de polímero de proantocianidina para aumentar el volumen de la composición. Asimismo, pueden añadirse a la formulación aglomerantes, tales como 55 almidón, gelatina, sacarosa, glucosa, dextrosa, melazas, lactosa, goma arábiga, alginato de sodio, extracto de musgo de Irlanda, goma panwar, goma ghatti, mucílago de cáscara de isapol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, Veegum y arabogalactano de alerce, polietilenglicol, etilcelulosa, y ceras, a fin de aumentar sus cualidades cohesivas. Adicionalmente, pueden añadirse a la formulación lubricantes, tales como talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, aceites vegetales hidrogenados, polietilenglicol, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, leucina, carbowax, laurilsulfato de sodio, y laurilsulfato de magnesio. Asimismo, pueden añadirse a la formulación deslizantes, tales como dióxido de silicio coloidal o talco a fin de mejorar las características de flujo de una formulación pulverizada. Finalmente, pueden añadirse también desintegrantes, tales como almidones, arcillas, celulosas, alginas, gomas, polímeros reticulados (v.g., croscarmelosa, crospovidona, y almidón-gliconato de sodio), 60 Veegum, metilcelulosa, agar, bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas cambiadoras de cationes, ácido algínico, goma guar, pulpa de cítricos, carboximetilcelulosa, o laurilsulfato de sodio con almidón a fin de facilitar la desintegración de la formulación en el intestino.

ES 2 326 933 T3

5 Recubrimientos entéricos son aquéllos que se mantienen intactos en el estómago, pero se disolverán y liberarán el contenido de la forma de dosificación una vez que la misma alcanza el intestino delgado. Un gran número de recubrimientos entéricos se preparan con ingredientes que tienen grupos ácidos tales que al pH muy bajo presente en el estómago, es decir pH 1,5 a 2,5, los grupos ácidos no se ionizan y el recubrimiento se mantiene en una forma no disociada, insoluble. A niveles de pH más altos, tales como los que reinan en el ambiente del intestino, el recubrimiento entérico se convierte en una forma ionizada, que puede disolverse para liberar la composición de proantocianidina. Otros recubrimientos entéricos se mantienen intactos hasta que son degradados por enzimas existentes en el intestino delgado, y otros se desintegran después de una exposición definida a la humedad, de tal modo que los recubrimientos se mantienen intactos hasta después de su paso al intestino delgado.

10 15 Polímeros que son útiles para la preparación de recubrimientos entéricos incluyen goma laca, almidón y acetato-ftalato de amilosa, copolímeros estireno-ácido maleico, acetato-succinato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa (CAP), poli(acetato-ftalato) de vinilo (PVAP), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (grados HP-50 y HP-55), etilcelulosa, grasas, estearato de butilo, y copolímeros de ésteres de ácido acrílico-ácido metacrílico con grupos ácidos ionizables ("EUDRAGITTM"), tales como "EUDRAGIT[®] L 30D", "EUDRAGIT[®] RL 30D", "EUDRAGIT[®] RS 30D" and EUDRAGIT[®] L 100-55". En una realización preferida, la composición farmacéutica contiene una composición de polímero de proantocianidina y el polímero de recubrimiento entérico "EUDRAGITTM L 30D", un copolímero aniónico de ácido metacrílico y acrilato de metilo con un peso molecular medio de 250.000 Dalton.

20 25 La desintegración del recubrimiento entérico ocurre sea por hidrólisis causada por enzimas intestinales o por emulsificación y dispersión por sales biliares, dependiendo del tipo de recubrimiento utilizado. Por ejemplo, las esterasas hidrolizan el éster estearato de butilo a butanol y ácido esteárico, y a medida que se disuelve el butanol, el ácido esteárico se desprende del medicamento en forma de escamas. Adicionalmente, las sales biliares emulsionan y dispersan etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, grasas y derivados grasos. Otros tipos de recubrimientos se desprenden dependiendo del tiempo de contacto con la humedad, por ejemplo recubrimientos preparados a partir de cera carnauba pulverizada, ácido esteárico, y fibras vegetales de agar y corteza de olmo se disgregan después que las fibras vegetales absorben humedad y se hinchan. El tiempo requerido para la desintegración depende del espesor del recubrimiento y de la relación de fibras vegetales a cera.

30 35 La aplicación del recubrimiento entérico a la composición de polímero de proantocianidina puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica para aplicación de recubrimientos entéricos. Por ejemplo, los polímeros entéricos pueden aplicarse utilizando soluciones basadas en disolventes orgánicos que contienen de 5 a 10% p/p de polímero para aplicaciones por pulverización y hasta 30% p/p de polímero para recubrimientos en bandeja. Disolventes que son de uso común incluyen acetona, mezclas acetona/acetato de etilo, mezclas cloruro de metileno/metanol, y mezclas terciarias que contienen estos disolventes. Algunos polímeros entéricos, tales como los copolímeros ácido metacrílico-éster de ácido metacrílico ("EUDRAGITTM") pueden aplicarse utilizando agua como disolvente. La volatilidad del sistema disolvente debe adaptarse para prevenir el pegado debido a adherencia y prevenir la porosidad alta del recubrimiento debida a un secado prematuro por pulverización o precipitación del polímero a medida que se evapora el disolvente.

40 Adicionalmente, pueden añadirse plastificantes al recubrimiento entérico para prevenir el agrietamiento de la película de revestimiento. Plastificantes adecuados incluyen los ésteres ftalato de peso molecular bajo, tales como ftalato de dietilo, monoglicéridos acetilados, citrato de trietilo/citrato de polietil-glicoltributilo, y triacetina. Generalmente, los plastificantes se añaden en una concentración de 10% en peso referida al peso de polímero de recubrimiento entérico. Otros aditivos tales como emulsionantes, por ejemplo detergentes y simeticona, y polvos, por ejemplo talco, pueden añadirse al recubrimiento para mejorar la solidez y lisura del recubrimiento. Adicionalmente, pueden añadirse pigmentos al recubrimiento para añadir color a la formulación farmacéutica.

50 55 En una realización preferida, la composición farmacéutica de la composición de polímero de proantocianidina se proporciona como cuentas con recubrimiento entérico en cápsulas de gelatina con envoltura dura. Las cuentas de polímero de proantocianidina se preparan por mezcla de una composición de polímero de proantocianidina con hidroxipropilmetilcelulosa y estratificación de la mezcla sobre cristales de siembra non-pareil (esferas de azúcar). Las cuentas se cubren luego con una capa de sellado de Opadry Clear (mezclado con agua). Un recubrimiento entérico preferido para la composición de polímero de proantocianidina es "EUDRAGITTM L 30D" aplicado como una dispersión acuosa que contiene 30% p/p de sustancia polímera seca, que se suministra con 0,7% de laurilsulfato de sodio NF (SLS) y 2,3% de polisorbato 80 NF (Tween 20) como emulsionantes, a la cual se añaden los plastificantes, polietilenglicol y ésteres de ácido cítrico a fin de mejorar la elasticidad del recubrimiento, y se añade talco para reducir la tendencia del polímero de recubrimiento entérico a aglutinarse durante el proceso de aplicación y aumentar la lisura del recubrimiento de película. La composición final de las cuentas provistas de recubrimiento entérico es 17,3% p/p de cristales de siembra non-pareil, 64,5% p/p de composición de polímero de proantocianidina, 1,5% p/p de hidroxipropilmetilcelulosa, 0,5% p/p de Opadry Clear, 14,5% p/p de "EUDRAGITTM L 30D", 1,45% p/p de citrato de trietilo, y 0,25% p/p de monoestearato de glicerilo. Esta formulación farmacéutica puede prepararse por cualquier método conocido en la técnica o por el método descrito en los ejemplos.

60 65 En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la composición de polímero de proantocianidina se formula como gránulos o polvo provistos de recubrimiento entérico (microesferas con un diámetro de 300-500 μ) proporcionadas en cápsulas con envoltura de gelatina dura o suspendidas en una solución oral para administración pediátrica. El polvo o gránulos de la composición de polímero de proantocianidina provista de recubrimiento entérico

co puede(n) mezclarse también con alimento, particularmente para administración pediátrica. Esta preparación puede elaborarse empleando métodos bien conocidos en la técnica, tales como el método descrito en los ejemplos. En general, los gránulos y polvo de la composición de polímero de proantocianidina pueden prepararse utilizando cualquier método conocido en la técnica, tal como cristalización, secado por pulverización o cualquier método de trituración, 5 utilizando preferiblemente un mezclador/granulador de alta velocidad. Ejemplos de mezcladores/granuladores de alta velocidad incluyen el mezclador "LITTLEFORD LODIGE™", el mezclador/granulador "LITTLEFORD LODIGE™" MGT, y el mezclador/granulador "GRAL™". Durante la mezcladura del polvo con cizallamiento alto, se pulverizan sobre el polvo soluciones de agentes de granulación, denominados aglomerantes, a fin de hacer que las partículas de polvo se aglomeren, formando así partículas o gránulos de mayor tamaño. Agentes de granulación que son útiles para 10 preparar los gránulos de composición de polímero de proantocianidina, incluyen derivados de celulosa (que incluyen carboximetilcelulosa, metilcelulosa y etilcelulosa), gelatina, glucosa, polivinilpirrolidona (PVP), engrudo de almidón, sorbitol, sacarosa, dextrosa, melazas, lactosa, goma arábiga, alginato de sodio, extracto de musgo de Irlanda, goma panwar, goma ghatti, mucílago de cáscaras de isapol, Veegum y arabogalactano de alerce, polietilenglicol, y ceras. 15 Pueden añadirse agentes de granulación de concentraciones comprendidas entre 1 y 30% de la masa de las partículas o gránulos.

Los polvos o gránulos de la composición de polímero de proantocianidina se recubren preferiblemente utilizando el equipo de lecho fluidizado. Los gránulos o polvo se cubren luego con una capa de sellado de Opadry Clear (mezclado con agua). Un recubrimiento entérico preferido para la composición de polímero de proantocianidina es 20 "EUDRAGIT™ L 30D" aplicado como una dispersión acuosa que contiene 30% p/p de sustancia polímera seca, que se suministra con 0,7% de laurilsulfato de sodio NF (SLS) y 2,3% de polisorbato 80 NF (Tween 20) como emulsificantes, a la cual se añaden los plastificantes, polietilenglicol y ésteres de ácido cítrico a fin de mejorar la elasticidad del recubrimiento, y se añade talco para reducir la tendencia del polímero de recubrimiento entérico a aglomerarse durante el proceso de aplicación y aumentar la lisura del recubrimiento de película. La composición final del polvo 25 con recubrimiento entérico es 81,8% p/p de composición de polímero de proantocianidina, 1,5% p/p de hidroxipropilmetilcelulosa, 0,5% p/p de Opadry Clear, 14,5% p/p de "EUDRAGIT™ L 30D", 1,45% p/p de citrato de trietilo, y 0,25% p/p de monoestearato de glicerilo. La composición final de los gránulos provistos de recubrimiento entérico es 30 81,8% p/p de composición de polímero de proantocianidina, 10% de polivinilpirrolidona, 1,5% p/p de hidroxipropilmetilcelulosa, 0,5% p/p de Opadry Clear, 14,5% p/p de "EUDRAGIT™ L 30D", 1,45% p/p de citrato de trietilo, y 0,25% p/p de monoestearato de glicerilo.

Los gránulos o partículas de polvo de la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico pueden suspenderse ulteriormente en una solución para administración oral, particularmente para administración pediátrica. La suspensión puede prepararse a partir de soluciones acuosas a las cuales se añaden espesantes y coloides protectores para aumentar la viscosidad de la solución a fin de prevenir la sedimentación rápida de las partículas o gránulos de polvo provistas(os) de recubrimiento. Cualquier material que aumente la concentración de la capa de hidratación formada alrededor de las partículas suspendidas por interacciones moleculares y que sea farmacéuticamente compatible con la composición de polímero de proantocianidina puede utilizarse como espesante, tal como gelatina, gomas naturales (v.g., tragacanto, xantano, guar, arábiga, panwar, ghatti, etc.), y derivados de celulosa (v.g., 35 carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etc.). Opcionalmente, puede añadirse 40 un agente tensioactivo tal como Tween a fin de mejorar la acción del agente espesante. Una solución de suspensión preferida es una solución al 2% p/p de hidroxipropilmetilcelulosa en agua que contiene 0,2% de Tween.

En otra realización adicional, la composición de polímero de proantocianidina se formula como tabletas de recubrimiento entérico. En esta realización, la composición de polímero de proantocianidina se granula con cualquier diluyente farmacéuticamente aceptable (tal como los arriba enumerados) por los métodos descritos arriba para preparar los gránulos de composición de polímero de proantocianidina. A continuación, los gránulos se comprimen en tabletas utilizando cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo el método de granulación húmeda, el método de granulación seca o el método de compresión directa. Un diluyente preferido es celulosa microcristalina ("AVICEL™ PH 200/300"). Adicionalmente, pueden añadirse también a la formulación de tabletas desintegrantes, tales como los 45 arriba descritos, y lubricantes, tales como los arriba descritos. Una formulación de tabletas preferida contiene 250 mg de composición de polímero de proantocianidina, 7 mg de desintegrante "AC-DI-SOL™" (carboximetilcelulosa sódica reticulada), 1,75 mg del lubricante estearato de magnesio y el peso de "AVICEL™ PH 200/300" necesario para 50 llevar la mezcla hasta 350 mg. Las tabletas se recubren con una mezcla de recubrimiento entérico preparada a partir de 250 gramos de "EUDRAGIT™ L 30D-55", 7,5 gramos de citrato de trietilo, 37,5 gramos de talco y 205 gramos de agua. Esta formulación puede prepararse por cualquier método bien conocido en la técnica o por el método descrito 55 en los ejemplos.

La composición de polímero de proantocianidina conformada en partículas pequeñas (que incluyen partículas de 60 tamaño del orden de los micrómetros, tales como microesferas y microcápsulas), partículas (que incluyen partículas con tamaños del orden de los milímetros), cristales de fármaco, pélets, píldoras y microcuentas pueden recubrirse utilizando un proceso de lecho fluidizado. Este proceso utiliza equipo de lecho fluidizado, tal como el suministrado por "GLATT™", "AEROMATIC™", "WURSTER™", u otros, por los cuales los núcleos de composición de polímero de proantocianidina se hacen girar en un recipiente cilíndrico cerrado por medio de una corriente de aire, se 65 introducen desde abajo, y se forma el recubrimiento entérico mediante secado por pulverización del mismo sobre los núcleos durante el tiempo de fluidización. Para recubrir tabletas o cápsulas, puede utilizarse un proceso Accela-Cota ("MANESTY™"). Por este proceso, las tabletas o cápsulas se disponen en una bandeja de recubrimiento cilíndrica rotativa con una camisa perforada y se instalan unidades de pulverización dentro de la bandeja, después de lo cual se

aspira aire seco a través de las tabletas o cápsulas mantenidas en rotación. Puede utilizarse también cualquier otro tipo de bandeja de recubrimiento, tal como el proceso "GLATTTM"Immersion Sword, el Dricoater "DRIAMTM", equipo "STEINBERGTM", equipo "PELLEGRINITM", o equipo "WALTHERTM".

5 La composición de polímero de proantocianidina puede proporcionarse como suppositorio para administración rectal. Los supositorios pueden formularse con cualquier sustancia base que es farmacéuticamente aceptable para la preparación de supositorios y que es compatible con la composición de polímero de proantocianidina. Dado que la administración rectal no expone la composición de polímero de proantocianidina al ambiente ácido del estómago, las formulaciones farmacéuticas para administración rectal no precisan estar formuladas para proteger la composición 10 contra las condiciones ácidas. Bases de supositorios que pueden utilizarse para preparar supositorios con la composición de polímero de proantocianidina, incluyen manteca de cacao, gelatina glicerinada, aceites vegetales hidrogenados, mezclas de polietilenglicoles o ácidos grasos de polietilenglicoles o combinaciones glicol-agente tensioactivo o materiales tensioactivos no iónicos (tales como ésteres de ácidos grasos con polioxietilen-sorbitán (Tweens), poli(oxietilen-estearatos), y mezclas de ésteres de ácidos grasos de sorbitán (Span y Arlacel)). Sin embargo, debido a la naturaleza 15 hidrófila de la composición de polímero de proantocianidina, se sugiere una base hidrófila para el suppositorio. Una formulación de supositorios preferida para la composición de polímero de proantocianidina se prepara a partir de 91 gramos de glicerina, 9 gramos de estearato de sodio, 5 gramos de agua purificada y posiblemente 5% a 50% p/p de la composición de polímero de proantocianidina. Alternativamente, el suppositorio puede contener 10 gramos de composición de polímero de proantocianidina, 20 gramos de gelatina, y 70 gramos de glicerina. Los supositorios preparados 20 a partir de la composición de polímero de proantocianidina pueden conformarse por cualquier método conocido en la técnica, con inclusión de moldeo por compresión, fusión o, preferiblemente, moldeo en fusión.

Se describe también la composición de polímero de proantocianidina formulada con un compuesto o compuestos que neutralizan el ácido del estómago. Alternativamente, la composición farmacéutica que contiene la composición de 25 polímero de proantocianidina se administra simultáneamente a o subsiguientemente a la administración de una composición farmacéutica que neutraliza el ácido del estómago. Compuestos, tales como antiácidos, que son útiles para neutralizar el ácido del estómago incluyen carbonato de aluminio, hidróxido de aluminio, subnitrato de bismuto, sub-salicilato de bismuto, carbonato de calcio, carbonato de hidroxialuminio y sodio, magaldrato, carbonato de magnesio, hidróxido de magnesio, óxido de magnesio, y mezclas de los mismos.

30 Se describe también la composición de polímero de proantocianidina formulada con un compuesto o compuestos que inhiben la secreción de ácido del estómago. Alternativamente, la composición farmacéutica que contiene la composición de polímero de proantocianidina se administra simultáneamente a subsiguientemente a la administración de una composición farmacéutica activa para inhibir la secreción de ácido en el estómago. Compuestos que son útiles para inhibir la secreción de ácido en el estómago incluyen ranitidina, nizatidina, famotidina, cimetidina, y misoprostol.

40 La composición de polímero de proantocianidina reduce el flujo de cloruro a través de las células del epitelio intestinal y reduce el movimiento de fluidos en el lumen intestinal que da como resultado pérdida de fluido y deshidratación asociadas con diarrea secretora. Así pues, las formulaciones farmacéuticas de la invención son útiles en aplicaciones profilácticas y terapéuticas contra la diarrea secretora, particularmente en la prevención de la deshidratación y la pérdida de electrolitos que acompaña a la diarrea secretora.

45 Las formulaciones farmacéuticas de la composición de polímero de proantocianidina pueden utilizarse terapéutica o profilácticamente contra cualquier tipo de diarrea secretora en humanos o animales no humanos. En una realización preferida, la formulación farmacéutica se utiliza para tratar diarreas secretoras causadas por bacterias entéricas. Estas bacterias entéricas incluyen *Vibrio cholerae*, *E. coli*, con inclusión de los tipos enteropatógenos, enterotoxígenos, enteroadherentes, enterohemorrágicos, o enteroinvasivos de *E. coli*, otras *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Staphylococcus* spp., y *Bacillus* spp. Esta realización incluye también el tratamiento de la 50 diarrea de los viajeros.

En otra realización, la formulación farmacéutica se utiliza para tratar diarrea secretora causada por protozoos, con inclusión de *Giardia* y *Cryptosporidium* spp., particularmente *Cryptosporidium parvum*.

55 En otra realización, la conformación farmacéutica se utiliza para tratar diarrea secretora causada por etiologías no infecciosas, tales como diarrea inespecífica, síndrome inflamatorio intestinal, colitis ulcerosa, y cánceres y neoplasias del tracto gastrointestinal.

60 En otra realización, las formulaciones farmacéuticas de la invención se utilizan para el tratamiento de la Diarrea Crónica Asociada con HIV en pacientes con SIDA. En otra realización adicional, la formulación farmacéutica se utiliza para tratar la diarrea en niños pequeños o muchachos, con inclusión de diarrea causada por rotavirus.

65 Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden utilizarse también para tratar la diarrea en animales no humanos, particularmente animales de granja, tales como animales bovinos, cerdos, animales ovinos, aves de corral (tales como pollos), y animales equinos, y otros animales domésticos tales como animales caninos y animales felinos. En particular, las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden utilizarse para tratar la enfermedad diarreica en animales no humanos, particularmente animales para carne tales como ganado vacuno, ovejas y cerdos, causada por patógenos bacterianos tales como *E. coli* enterotoxígenos, enterohemorrágicos y otros, *Salmonella* spp., *Clostridium*

perfringens, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter spp.*, y *Yersinia enterocolitica*, patógenos protozoicos, particularmente *Cryptosporidium parvum*, y agentes virales, particularmente rotavirus y coronavirus, pero también togavirus, parvovirus, calicivirus, adenovirus, breditavirus, y astrovirus.

5 Adicionalmente, las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse también profilácticamente a humanos y animales no humanos para prevenir el desarrollo de diarrea secretora. A modo de ejemplo, una formulación farmacéutica de composición de polímero de proantocianidina puede administrarse a turistas que viajan a un país en el que existe el riesgo de diarrea de los viajeros en un momento o en momentos que son eficaces para prevenir la enfermedad. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a pacientes de SIDA para 10 prevenir la aparición de la Diarrea Crónica Asociada con el HIV. Asimismo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a niños en una comunidad amenazada de cólera epidémico o rotavirus epidémico para prevenir la propagación de la enfermedad. Análogamente, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a animales de granja, particularmente animales de granja jóvenes o recién destetados, a fin de prevenir 15 el desarrollo de la enfermedad diarreica.

15 Cuando se utiliza de acuerdo con las formulaciones de la presente invención como tratamiento para la diarrea secretora, los intervalos de dosificación eficaces de las formulaciones farmacéuticas de la composición de polímero de proantocianidina para administración oral están comprendidas en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg por día, con preferencia aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 mg/kg por día, opcionalmente 0,1 a 25 mg/kg por día, y 20 también opcionalmente 0,1 a 10 mg/kg por día. Debe apreciarse que la dosis apropiada dependerá del tipo y gravedad de la diarrea secretora. Se ha encontrado que los individuos humanos pueden tolerar al menos hasta 2 gramos de la composición de polímero de proantocianidina por día (25-30 mg/kg/día) durante hasta 2 días. Se cree que las dosis pueden exceder de 40 mg/kg por día, opcionalmente hasta 100 mg/kg por día, si tales dosis son necesarias para tratar 25 la diarrea secretora.

25 Cuando se utilizan de acuerdo con las formulaciones de la presente invención como profilaxis para la diarrea secretora, los intervalos de dosificación eficaces de las formulaciones farmacéuticas de la composición de polímero de proantocianidina para administración oral están comprendidos en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg por día, con preferencia aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 mg/kg por día, opcionalmente 0,1 a 25 mg/kg por día, y 30 también opcionalmente 0,1 a 10 mg/kg por día. Debe apreciarse que la dosis apropiada dependerá del tipo y gravedad de la diarrea secretora a prevenir. Se ha encontrado que los individuos humanos pueden tolerar al menos hasta 2 gramos de la composición de polímero de proantocianidina por día (25-30 mg/kg/día) durante hasta 2 días. Se cree que las dosis pueden exceder de 40 mg/kg por día, opcionalmente hasta 100 mg/kg por día, si tales dosis son necesarias para 35 prevenir la diarrea secretora.

35 La composición de polímero de proantocianidina puede administrarse para tratamiento o prevención de la diarrea secretora en cualquier forma farmacéutica terapéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede administrarse por vía oral, en la forma de, por ejemplo, cristales de fármaco, gránulos, partículas pequeñas (que incluyen partículas con tamaño del orden de los micrómetros, tales como microesferas y microcápsulas), partículas (que incluyen partículas con tamaño del orden de los milímetros), cuentas, microcuentas, pélets, píldoras, microtabletas, tabletas o triturados de tableta comprimidos, tabletas o triturados de tableta moldeados, y en cápsulas, que son duras o blandas y contienen la composición como un polvo, partícula, cuenta, solución o suspensión. La composición farmacéutica puede administrarse también por vía oral, como una solución o suspensión en un líquido acuoso, como un líquido incorporado en una cápsula de gel o como cualquier otra formulación conveniente para administración, o por vía rectal, 40 como supositorio, enema u otra forma conveniente.

45 En una realización preferida, una composición farmacéutica con recubrimiento entérico que contiene la composición de polímero de proantocianidina se administra para el tratamiento o la prevención de la diarrea secretora. Formulaciones provistas de recubrimiento entérico preferidas incluyen cuentas con recubrimiento entérico en una cápsula de gelatina con envoltura dura, microesferas con recubrimiento entérico en una cápsula de gelatina con envoltura dura, microesferas con recubrimiento entérico proporcionadas en una suspensión o mezcladas con alimento, preparaciones que son particularmente convenientes para administración pediátrica, y tabletas comprimidas con recubrimiento entérico. En otra realización, una composición farmacéutica que contiene la composición de polímero de proantocianidina y un compuesto que neutraliza el ácido del estómago o inhibe la secreción de ácido del estómago se administra para el 50 tratamiento de la diarrea secretora. En otra realización adicional, una composición farmacéutica que contiene la composición de polímero de proantocianidina se administra simultánea o subsiguientemente a la administración de una composición farmacéutica que neutraliza el ácido del estómago o inhibe la secreción de ácido del estómago para el tratamiento de la diarrea secretora. La composición de polímero de proantocianidina puede formularse también como supositorio para administración rectal.

55 Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse también solas o en combinación con otros agentes para tratamiento o mejora de los síntomas de la diarrea secretora tales como agentes de rehidratación, antibióticos, agentes antimotilidad, y absorbentes de fluidos, tales como attapulgita.

60 Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden incorporarse también en alimentación animal para uso en el tratamiento de la diarrea secretora en animales tales como animales bovinos, cerdos, animales ovinos, aves de corral, animales equinos, animales caninos, y animales felinos.

ES 2 326 933 T3

La serie de ejemplos que sigue se presenta para propósitos de ilustración.

Comparación

5 Ejemplo

*Efecto del fluido gástrico simulado, fluido intestinal simulado y ácido clorhídrico sobre la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri**

10 Después de administración peroral de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri*, ni los polímeros ni los derivados de los polímeros se detectaron en muestras de plasma humano o animal. Sin embargo, los polímeros se detectaron y cuantificaron en el plasma de animales después de administración intravenosa. Esto condujo a la hipótesis de que la composición de polímero de proantocianidina, después de administración oral, se altera en el tracto gastrointestinal y una especie que se deriva de la composición de polímero de proantocianidina pero no es 15 detectable por el método HPLC usado, se absorbe luego en la circulación sistémica. Una segunda posibilidad es que la composición de polímero de proantocianidina se absorbe intacta en el tracto gastrointestinal pero se transforma rápidamente después de la absorción. Existe otra posibilidad adicional que estriba en que los polímeros de proantocianidina de peso molecular elevado no son absorbidos en el estómago o en el intestino.

20 Así pues, esta investigación se realizó a fin de adquirir una comprensión de los efectos de HCl, jugo gástrico simulado y fluido intestinal simulado sobre la estabilidad de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri*. Se seleccionaron estas condiciones para mimetizar las condiciones químicas del tracto digestivo. La incubación con HCl producía una reducción aproximada del 25% en la concentración de la composición de polímero de proantocianidina al cabo de varios minutos. Se observó una reducción similar de 32% en el transcurso de varios minutos después 25 de incubación de la composición de polímero de proantocianidina con fluido gástrico simulado (SGF), y se observó una reducción de 48% después de 2 horas de incubación. La pérdida adicional observada después de incubación en fluido gástrico simulado en comparación con la pérdida observada después de incubación de HCl, podía ser debida a la fijación de la composición de polímero de proantocianidina a la pepsina en el fluido gástrico simulado. Cuando, 30 después de la incubación en fluido gástrico simulado, se incubó la mezcla composición de polímero de proantocianidina-fluido gástrico simulado con fluido intestinal simulado, no se observó reducción significativa adicional en la concentración.

35 Despues de administración per-oral, un fármaco se mantiene en contacto con fluido gástrico durante aproximadamente 2 a 3 horas antes que el mismo pase al duodeno donde el fluido gástrico y el fármaco se mezclan rápidamente con fluido intestinal. Por esta razón, a fin de mimetizar de la mejor manera las condiciones *in vivo*, se incubó primero 40 la composición de polímero de proantocianidina en fluido gástrico simulado durante 2 horas y se diluyó luego con fluido intestinal simulado en la relación de 1:1 y se incubó durante 6 horas adicionales a 37°C. Adicionalmente, la composición de polímero de proantocianidina se incubó en fluido gástrico simulado (SGF), ácido clorhídrico (HCl) o agua a 37°C. Se tomaron partes alícuotas de cada muestra de tratamiento a intervalos de tiempo diferentes, y se cuantificó la cantidad de composición de polímero de proantocianidina por HPLC.

Preparación de las mezclas de test y las muestras

1. Se preparó Fluido Gástrico Simulado (SGF) de acuerdo con USP XX, p. 1105, por disolución de 2,0 g de cloruro de sodio y 3,2 g de pepsina (de mucosa estomacal de porcino, Sigma) en 7,0 ml de ácido clorhídrico y agua suficiente (grado HPLC, Fisher) para completar 1000 ml. Esta solución de test tenía un pH de aproximadamente 1,2.
2. Se preparó Fluido Intestinal Simulado (SIF) de acuerdo con USP XX, p. 1105, por disolución de 6,8 g de fosfato de potasio monobásico en 250 ml de agua y adición de 190 ml de hidróxido de sodio 0,2 N y 400 ml de agua. Se añadieron luego 10,0 g de pancreatina (de páncreas de porcino, Sigma), se mezcló y la solución resultante se ajustó a pH $7,5 \pm 0,1$ con NaOH 0,2 N. La solución se diluyó con agua hasta 1000 ml.
3. Se preparó ácido clorhídrico (pH = 1,7) por adición de 800 μ l de ácido clorhídrico 12 N a 100 ml de agua.
4. Se preparó solución stock de polímero de proantocianidina por disolución de 1,0 g de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* en 10 ml de agua destilada.

Procedimiento

60 La solución stock de composición de polímero de proantocianidina se diluyó en relación 1:20 (hasta un volumen total de 10 ml) en SGF o en agua purificada. Las soluciones de test se incubaron en una estufa a 37°C y se tomaron luego partes alícuotas de 1 ml mientras se agitaba a intervalos de tiempo de 0,03, 0,5 y 2,0 horas. Después de centrifugar las partes alícuotas durante 10 minutos a 14.000 rpm, se retiraron 700 μ l del sobrenadante y se neutralizaron con NaOH 1 65 N que contenía fosfato de sodio dibásico 50 mM a un pH de $7,0 \pm 0,1$. Al final del periodo de incubación de 2 horas, se añadió SIF a la composición de polímero de proantocianidina en SGF en la relación de 1:1 y se ajustó el pH a $7,0 \pm 0,1$. Se tomaron partes alícuotas y se procesaron como se ha descrito arriba al cabo de 2, 2,5, 4 y 6 horas después de la mezcladura inicial con SGF. El sobrenadante neutralizado se diluyó en relación 1:9 en tetrahidrofurano (grado HPLC,

Fisher). Las muestras se ensayaron por HPLC en un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Hewlett Packard 1050 utilizando una columna PLgel 500A de 5 m (Polymer Laboratories) (300 x 7,5 mm) y una columna de guarda de 5 m (50 x 7,5 mm), con una fase móvil constituida por 95% de tetrahidrofurano y 5% de agua, un volumen de inyección de 50 ml, un caudal de 1 ml/min y un tiempo de ejecución de 11 minutos. Los polímeros de proantocianidina se detectaron por ensayo de la absorción en UV a una longitud de onda de 280 nm.

Resultados y discusión

El método HPLC utilizado para cuantificar la composición de polímero de proantocianidina no incluía derivatización o cambio de iones y mide los polímeros de proantocianidina no combinados o "libres" y no los polímeros de proantocianidina combinados con proteína. Adicionalmente, la cromatografía HPLC está basada en cromatografía de exclusión de tamaños y detecta por tanto cambios en el tamaño molecular (polimerización o degradación) de los polímeros de proantocianidina, pero no alteraciones químicas que no afectan al tamaño o el coeficiente de extinción molar a 280 nm.

Efecto de HCl sobre la composición de polímero de proantocianidina

Para testar el efecto de HCl (un componente principal del fluido gástrico) sobre la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* *in vitro*, se incubó la composición de polímero de proantocianidina durante 2 horas en HCl a pH 1,2. Se tomaron luego muestras al cabo de 0,03, 0,5 y 2,0 horas de incubación y se analizaron utilizando HPLC. El área de pico para el perfil HPLC de la composición de polímero de proantocianidina después de incubación en HCl se comparó con el área de pico para el perfil de la composición de polímero de proantocianidina después de incubación en agua (Tabla 1).

25

TABLA 1

Efecto del ácido clorhídrico (pH = 1,7) sobre la composición de polímero de proantocianidina

30

Tiempo, h	Muestra # 1 % área de pico	Muestra # 2 % área de pico	Promedio (n = 2)
0,03	94	67	81
0,5	73	71	72
2,0	77	70	74

* El % de área de pico se calculó dividiendo el área de pico del perfil de la composición de polímero de proantocianidina en el medio de test por el área de pico del perfil de la composición de polímero de proantocianidina en agua (control) y multiplicando por 100

50

Los resultados indican que al cabo de 0,03 horas en HCl, el área de pico del perfil de la composición de polímero de proantocianidina, es decir la concentración de la composición de polímero de proantocianidina, se reducía en 19%. Despues de 0,5 horas y 2,0 horas de incubación con HCl, el área de pico del perfil de polímero de proantocianidina se reducía en 28% y 26%, respectivamente. Estos resultados indican que la mayor parte de la disminución de la composición de polímero de proantocianidina debida a exposición a HCl ocurría dentro de los primeros 2-3 minutos de incubación.

La Figura 1 presenta cromatogramas de muestras de la composición de polímero de proantocianidina después de incubación en agua y en HCl durante 0,03 horas, y en HCl durante 2,0 horas. Además de la reducción obvia en el área del pico del perfil de polímero de proantocianidina después de incubación durante 2 horas en HCl, se observó un desplazamiento notable en el tiempo de retención de la meseta. Una posible interpretación del desplazamiento observado en el tiempo de retención de la meseta desde 5,8 a 6,2 min después de la incubación de la composición en HCl es que HCl descompone los polímeros de proantocianidina en subunidades de peso molecular ligeramente inferior con tiempos de retención más largos que el tiempo de retención del compuesto originario.

ES 2 326 933 T3

Efectos de SGF sobre la Composición de Polímero de Proantocianidina

Cuando se añadió la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* a SGF, la mezcla formaba un precipitado opaco de color rojo. Para determinar si el precipitado era debido a pepsina o cloruro de sodio, se añadió

5 la composición de polímero de proantocianidina en una concentración final de 5 mg/ml a SGF sin cloruro de sodio o a SGF sin pepsina. Después de centrifugar las muestras a 14.000 rpm durante 10 minutos, únicamente la mezcla que contenía pepsina era de color rojo opaco con precipitación, lo que indicaba que la precipitación es debida a la interacción del polímero de proantocianidina con pepsina.

10 Después de una incubación de 2 minutos (0,03 horas) de la solución de la composición de polímero de proantocianidina en SGF, el análisis por HPLC demostró una reducción aproximada de 32% en el área de pico del perfil del polímero de proantocianidina. Las muestras tomadas 0,5 y 2,0 horas después de la incubación a 37°C no exhibían cambio significativo adicional alguno del área de pico del perfil del polímero de proantocianidina. Los cromatogramas de las muestras de polímero de proantocianidina incubadas durante 2 minutos y 2 horas en SGF se presentan en las 15 Figuras 2 y 3, respectivamente, y los datos de área de pico de este experimento se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

*Efecto de SGF sobre la composición de polímero de proantocianidina *in vitro**

Tiempo, h	Muestra # 1 % área de pico	Muestra # 2 % área de pico	Promedio (n = 2)
0,03	59	76	68
0,5	70	67	69
2,0	54	49	52
6,0	45	55	50

* El % de área de pico se calculó dividiendo el área de pico del perfil de la composición de polímero de proantocianidina en el medio de test por el área de pico del perfil de la composición de polímero de proantocianidina en agua (control) y multiplicando por 100

45 La mayor parte de la reducción en la concentración de los polímeros de proantocianidina ocurría en el transcurso de 2 minutos de exposición a SGF. Adicionalmente, la disminución en la composición de polímero de proantocianidina detectada por el ensayo HPLC podría ser debida a una combinación de los efectos de la degradación por el ácido en el SGF y la fijación a la pepsina en el SGF.

50 La rápida disminución en el área de pico bajo la curva después de la adición de la composición de polímero de proantocianidina a la solución de SGF se demuestra en las Figuras 4 y 5 que representan cromatogramas de muestras de la composición de polímero de proantocianidina al cabo de 2 minutos y 2 horas de incubación en SGF respectivamente.

Efecto de SIF Sobre la Conversión de Polímero de Proantocianidina

Para mejor comprensión del destino de la conversión de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* en el intestino delgado, se investigó *in vitro* el efecto del fluido intestinal sobre la composición de polímero de proantocianidina. Para imitar mejor las condiciones *in vivo*, se incubó primeramente la composición de polímero de proantocianidina en fluido gástrico simulado durante 2 horas y se diluyó luego con fluido intestinal simulado en la relación de 1:1 y se incubó durante 6 horas adicionales a 37°C. Las muestras tomadas a diversos intervalos de tiempo después de la adición de SIF a la solución de composición de polímero de proantocianidina-SGF se analizaron por HPLC. En las Figuras 4 y 5 se presentan cromatogramas representativos. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y la Figura 6 e indican que SIF no reducía significativamente la cantidad de composición de polímero de proantocianidina.

TABLA 3

Interacción de SIF con la mezcla SGF-composición de polímero de proantocianidina después de 2 horas de incubación en SGF seguida por 4 horas de incubación después de dilución 1:1 en SIF

5	Tiempo, h	Muestra # 1 % área de pico	Muestra # 2 % área de pico	Promedio (n = 2)
10	2,0	44	52	48
	2,5	50	42	46
15	4,0	59	45	52
	6,0	45	55	50
20	* El % de área de pico se calculó dividiendo el área de pico del perfil de la composición de polímero de proantocianidina en el medio de test por el área de pico del perfil de la composición de polímero de proantocianidina en agua (control) y multiplicando por 100			
25				

Conclusión

30 Las condiciones de incubación testadas en este estudio mimetizan las condiciones encontradas por la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* después de administración peroral. Se observó cierta pérdida de la composición de polímero de proantocianidina (25-32%) en el transcurso de unos minutos de la incubación de la composición con HCl diluido y SGF. La mayor pérdida observada después de incubación en SGF en comparación con la pérdida después de incubación en HCl podría estar causada por la fijación de la composición de polímero de proantocianidina a la pepsina en el SGF. Cuando la solución de la composición de polímero de proantocianidina en fluido gástrico simulado se incubó con fluido intestinal simulado, no se observó reducción significativa adicional alguna en la composición de polímero de proantocianidina.

40 Dado que el método utilizado para analizar la composición de polímero de proantocianidina estaba basado en cromatografía de exclusión de tamaños, debe ponerse precaución en la interpretación de los resultados aquí presentados debido a que el método es incapaz de diferenciar entre la composición de polímero de proantocianidina nativa y una composición de polímero de proantocianidina que se ha alterado químicamente de un modo que no cambia significativamente su tamaño.

45 Ejemplo

Evaluación del efecto de la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico sobre la acumulación de fluido en ratones tratados con toxina del cólera

50 El propósito de este estudio fue determinar el efecto de la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico preparada a partir de *Croton lechleri* sobre la acumulación de fluido en el tracto gastrointestinal de ratones tratados con toxina del cólera (CT). El mecanismo patofisiológico por el cual la toxina del cólera produce acumulación de fluido en los ratones es idéntico al mecanismo por el cual la toxina del cólera y otras toxinas bacterianas producen acumulación de fluido en humanos. La reducción del fluido en este modelo por un compuesto de test indica que el compuesto es útil como agente antidiarreico. En el momento inicial (t_0), ratones recibieron toxina del cólera (15 μ g por peso corporal medio de aproximadamente 20 g) por sonda esofágica oral y se sellaron por vía anorrectal con un éster de ciano-acrilamida. Tres horas más tarde (t_3 h), se administró por sonda esofágica oral una dosis simple de composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico (131 mg/kg) suspendida en goma guar al 0,75% (vehículo). Se administraron también a dos grupos de control agua y una solución de control constituida por una concentración equivalente de "EUDRAGITTM" y azúcar en vehículo. Después de una exposición de 7 horas (t_7 h) a la toxina del cólera, se sacrificaron los ratones y se aisló el tracto intestinal murino completo desde el píloro al recto, con inclusión del ciego. Se aisló el tracto intestinal entero debido a que, aunque la acumulación de fluido ocurre en el intestino delgado, algo de fluido se fuga de hecho al intestino grueso. Se midió la acumulación de fluido (FA) como la relación de la masa de fluido acumulado en el tracto intestinal y el recto, con inclusión del ciego, frente a la masa del tracto intestinal menos la masa del fluido. En las condiciones experimentales, se demostró que la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico administrada por vía oral reducía significativamente la acumulación de fluido en el tracto intestinal de los ratones adultos aislados tratados con toxina del cólera.

ES 2 326 933 T3

La administración oral de la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico (131 mg/kg) reducía la relación acumulación de fluido en un promedio de 45% y 38% comparada con la relación media de fluido acumulado en controles de agua y controles “EUDRAGIT™”/azúcar/vehículo, respectivamente.

5 *Preparación de toxina del cólera y las composiciones de polímero de proantocianidina*

Se obtuvieron los materiales siguientes de suministradores comerciales: toxina del cólera (List Biological Lab, lote #CVX-48-3D); éster de ciano-acrilamida (Borden Inc., Columbus, OH); agujas de alimentación animal (Popper and Sons, Hyde Park, NY); bicarbonato de sodio (ACROS lote #83559/1); goma guar (Sigma, lote #94H0195); “EUDRAGIT™ L 30D” (PMRS, lote #R10538); esferas de azúcar de mallas 40-60 (PMRS, lote #R10542).

Para preparar la solución stock de toxina del cólera, se añadió un mililitro de agua de grado HPLC (Mill Q) a un vial que contenía 1 mg de toxina del cólera y se agruparon 2 viales diferentes y se guardaron a 4°C. Se prepararon recientemente soluciones de toxina del cólera para administración a animales por dilución de 240 μ l de solución stock 15 de toxina del cólera con 560 ml de NaHCO₃ al 7% p/v. La concentración final de NaHCO₃ era 4,9%. Cada ratón de toxina del cólera en 50 μ l de volumen por sonda esofágica oral en el momento inicial (t₀).

La formulación para la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico de *C. lechleri* contenía 17,3% (p/p) de cristales de siembra non-pareil (esferas de azúcar, mallas 46/60) (Paulaur, lote #60084060), 20 64,6% de composición de polímero de proantocianidina, 1,5% de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), Dow Chemical Co., lote #MM9410162E), 0,5% de Opadry Clear (Colorcon, lote #S835563), 14,5% de “EUDRAGIT™ L 30D” (Rohm Tech., lote #1250514132), 1,45% de citrato de trietilo (Morflex, lote #N5X291), monoestearato de glicerilo (Rohm Tech., lote #502-229), y agua purificada (USP).

25 La solución para estratificación de la composición de polímero de proantocianidina sobre las esferas de azúcar se preparó por adición de HPMC y la composición de polímero de proantocianidina a agua purificada (USP), y mezcla hasta que se disolvió. Los cristales de siembra non-pareil se cargaron en el bol de producto del procesador de lecho fluido (Niro-Precision Coater). La solución de composición de polímero de proantocianidina/HPMC se pulverizó luego 30 sobre cristales de siembra non-pareil fluidizados, mientras se mantenía la temperatura diana del lecho a 30-35°C. El proceso de estratificación se continuó hasta que se hubo aplicado toda la solución. Una vez que se había completado la estratificación de la composición de polímero de proantocianidina, se aplicó una capa de sellado de Opadry Clear (preparada por mezcladura del Opadry Clear con Agua Purificada, USP), manteniendo la temperatura diana en el lecho a 30-35°C. Cuando se hubo aplicado la capa de sellado, se descargaron los pélets y se pasaron a través de tamices de 35 1000 μ y 425 μ , y las esferas estratificadas mayores que 425 μ y menores que 1000 μ m se cargaron de nuevo al procesador de lecho fluido. Entretanto, se preparó la solución de recubrimiento entérico por adición de citrato de trietilo y monoestearato de glicerilo a agua que se había calentado a 65°C con mezcladura continuada. Esta solución se añadió al “EUDRAGIT™ L 30D-55” mientras se llevaba a cabo la mezcladura. La solución de recubrimiento entérico resultante se pulverizó luego sobre las esferas estratificadas en el procesador de lecho fluidizado, a una temperatura del lecho de 30-35°C hasta que toda la composición de recubrimiento entérico se hubo estratificado sobre las cuentas.

40 Para facilitar la sonda esofágica oral y prevenir la sedimentación instantánea de las cuentas, se utilizó un agente espesante, goma guar. Se prepararon 100 ml de goma guar al 0,7% y se ajustaron a pH 2 con 2 ml de HCl 0,5 M. Las cuentas de la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico se suspendieron en solución de goma guar al 0,7%. Se preparó también una solución de control constituida por concentraciones finales equivalentes 45 de “EUDRAGIT™” y azúcar, en solución de goma guar al 0,7%.

Métodos y resultados

50 Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con Richardson y Kuhn, 1986, Infect. and Immun. 54:522-528. Se utilizaron ratones macho de 50 a 52 días de edad con masas corporales que estaban comprendidas entre 15,7 y 18,7 g. Los animales de test eran ratones C57BI/6 de tipo salvaje y se obtuvieron de Charles River Lab. Todos los animales se mantuvieron en jaulas de metabolismo con agua a discreción durante toda la duración del experimento. Los ratones se privaron de alimento durante 24 horas antes del comienzo del experimento y durante el curso del experimento. Inicialmente (t₀h), los ratones recibieron 15 μ g de toxina del cólera por sonda esofágica oral y se sellaron luego 55 anorrectalmente con un éster de ciano-acrilamida (Superglue). Tres horas más tarde (t₃h), los ratones recibieron por sonda oral una suspensión de la composición de polímero de proantocianidina provista de recubrimiento entérico en solución de goma guar, o una solución de control. Después de exposición de 7 horas (t₇ h) a la toxina del cólera, se sacrificaron los ratones y se aisló el tracto intestinal murino entero desde el piloro al recto, con inclusión del ciego. Se tomaron precauciones para evitar la ruptura tisular y la pérdida de fluido, y se retiraron luego el mesenterio adherido 60 y el tejido conectivo. La masa de tejido y el fluido contenido en su interior se determinaron utilizando una balanza analítica. El tejido se abrió luego, se retiró el fluido, y se secó el tejido por frotamiento. Se midió la acumulación de fluido como la relación de la masa de fluido acumulado en el intestino (delgado y grueso con inclusión del ciego) frente a la masa del intestino menos la masa del fluido.

65 Se realizaron comparaciones estadísticas de la relación de acumulación de fluido para diferentes tratamientos, por análisis de la varianza utilizando Microsoft Excel (Versión 5.0). Se utilizó un valor p de p < 0,05 para determinar la significación. Se llevó a cabo un test de intervalos múltiples de Duncan para determinar si se producían reducciones estadísticamente significativas en la acumulación de fluido inducida por la toxina del cólera en los ratones que recibían

ES 2 326 933 T3

la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico comparados con los animales que recibían únicamente H_2O o "EUDRAGITTM" más azúcar en solución de goma guar al 0,75%.

En el experimento que se describe a continuación, se trataron como sigue un total de 24 ratones (8 ratones por cada tratamiento):

- 5 Grupo A: Los ratones recibieron toxina del cólera seguida por una dosis simple de agua a t_3 y se sacrificaron a t_7 después de la administración de toxina del cólera.
- 10 Grupo B: Los ratones recibieron toxina del cólera a t_0 . A t_3 , los ratones recibieron una dosis simple de composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico (131 mg/kg de peso corporal). El vehículo estaba constituido por solución de goma guar acidificada al 0,75%. Todos los animales se sacrificaron a t_7 .
- 15 Grupo C: Los ratones recibieron toxina del cólera a t_0 . A t_3 , los ratones recibieron una dosis simple de una concentración equivalente de "EUDRAGITTM" y azúcar (1,33 mg de "EUDRAGITTM" más 1,046 mg de azúcar/kg de peso corporal). El vehículo estaba constituido por solución de goma guar al 0,75% acidificada. Todos los animales se sacrificaron a t_7 .
- 20 Basándose en los estudios preliminares que indicaban la necesidad de mayor tiempo de incubación para asegurar la transferencia completa de las cuentas recubiertas en el intestino, todos los animales se sacrificaron a t_7 después de dosificación de la toxina del cólera. Para conseguir resultados más fiables, se aumentó el número de animales a 8 ratones por cada grupo. La Tabla 4 y la Figura 7 muestran el efecto de la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico sobre la secreción de fluido inducida por la toxina del cólera en el modelo del ratón adulto aislado. Como pudo observarse, una dosis simple de 131 mg de composición de polímero de proantocianidina/kg reducía significativamente ($P < 0,05$) la acumulación de fluido inducida por la toxina del cólera después de una incubación de 7 horas con toxina del cólera. Comparados con los resultados después de tratamientos de control (grupos A y C), las cuentas de composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico (grupo B) reducían significativamente la relación de acumulación de fluido en un promedio de 45% y 38% respectivamente.

30 En este experimento, ninguno de los ratones murió como resultado del tratamiento por sonda esofágica oral.

TABLA 4

35 *El efecto de las cuentas de composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico sobre la acumulación de fluido intestinal en ratones tratados con toxina del cólera*

40 Grupo	45 No. de ratones	50 Tratamiento	55 Acumulación de fluido * (mg fluido/mg intestino)
40 A	45 8	50 H_2O	55 $1,28 \pm 0,09$ a
50 B	55 8	60 131 mg de composición de polímero de proantocianidina en solución de goma guar/kg	65 $0,71 \pm 0,17$ b
60 C	65 8	65 "EUDRAGIT TM " y azúcar/ solución de goma guar	65 $1,15 \pm 0,16$ A

65 * Los valores con letras diferentes difieren significativamente ($P < 0,05$) en el Test de Rangos Múltiples de Duncan

En las condiciones experimentales, la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico reducía significativamente la acumulación de fluido en el intestino de los ratones adultos aislados tratados con toxina del cólera. Basándose en estos resultados, la administración oral de la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico (131 mg/kg) reducía la relación de acumulación de fluido en un promedio de 38%, comparada 5 con la relación de acumulación media de fluido en controles de "EUDRAGIT™" más azúcar.

Los resultados de un experimento adicional utilizando 18-20 ratones por grupo se presentan en la Figura 8 y la 10 Tabla 5, y estos resultados confirman los resultados del experimento inicial. Los ratones del grupo B, que recibieron 131 mg de la composición de polímero de proantocianidina/kg tres horas (t_3) después de la exposición a la toxina del cólera, exhibían una reducción significativa en la acumulación de fluido comparados con los ratones que recibieron "EUDRAGIT™" y azúcar en agua a t_3 .

TABLA 5

15 *El efecto de las cuentas de composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico sobre la acumulación de fluido intestinal en ratones tratados con toxina del cólera*

20 Grp.	25 No. de ratones	30 t_0 h	35 t_3 h	40 Acumulación de fluido (mg fluido/mg intestino)
25 A	30 20	35 CT/NaHCO ₃	40 "EUDRAGIT™" & azúcar/H ₂ O	45 1,34 ± 0,09 a*
30 B	35 18	40 CT/NaHCO ₃	45 131 mg/kg composición de polímero de proantocianidina	50 0,75 ± 0,10 b*

* Los valores con letras diferentes difieren significativamente ($P < 0,001$) por el Test T

Preparación de formulaciones farmacéuticas

45 Se describen a continuación métodos ilustrativos para la fabricación y el envasado de formulaciones farmacéuticas preferidas diferentes de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* de acuerdo con la presente invención.

50 Cuentas encapsuladas con recubrimiento entérico

Se proporcionan a continuación descripciones detalladas de la fórmula de lote y métodos utilizados para preparar 55 la formulación de cuentas de composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico encapsulada. Cada cápsula de gelatina con envoltura dura contenía 250 mg de cuentas con recubrimiento entérico de la composición de polímero de proantocianidina. Las cápsulas se envasaron en frascos de HDPE que contenían dieciséis (16) cápsulas de 250 mg cada una. La formulación para las cuentas de composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico contenía 17,3% (p/p) de cristales de siembra non-pareil (esferas de azúcar de mallas 40/60) (Paulaur, lote #60084060), 64,5% de composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri*, 1,5% de hidroxipropilmetilcelulosa (Methocel E5 Premium, Dow Chemical Co., lote #MM9410162E), 0,5% de Opadry Clear (Colorcon, lote #583563), 14,5% de "EUDRAGIT™ L 30D" (Rohm Tech., lote #1250514132), 1,45% de citrato de trietilo (Morflex, lote #N5X291), monoestearato de glicerilo (Imwitor-900, Rohm Tech., lote #502-229), y agua purificada (USP).

60 La solución de recubrimiento de estratificación que contenía la composición de polímero de proantocianidina se preparó por adición de hidroxipropilmetilcelulosa y la composición de polímero de proantocianidina a agua purificada (USP) y mezcla hasta disolución. Las cristales de siembra non-pareil se cargaron en el bol de producto del procesador de lecho fluido (Nior-Precision Coater). La solución de polímero se estratificó luego sobre los cristales de siembra non-pareil por pulverización de la solución sobre los cristales de siembra non-pareil fluidizados a una temperatura diana del lecho de 30-35°C. Una vez que se hubo completado la estratificación del polímero de proantocianidina, se

ES 2 326 933 T3

aplicó una capa de sellado utilizando Opadry Clear (que se preparó por mezcla del Opadry Clear con Agua Purificada, USP), con una temperatura diana del lecho de 30-35°C. Después que se aplicó la capa de sellado, se descargaron los pélets y se tamizaron a través de tamices de 1000 μ y 425 μ , y las esferas estratificadas mayores que 425 μ y menores que 1000 μ se cargaron de nuevo en el procesador de lecho fluido. Entretanto, se preparó la solución de recubrimiento entérico por mezcla de citrato de trietilo y monoestearato de glicerilo con agua que se había calentado a 65°C por mezcladura de esta solución con el "EUDRAGIT™ L 30D-55". La solución de recubrimiento entérico resultante se pulverizó luego sobre las esferas estratificadas en el procesador de lecho fluidizado, a una temperatura de lecho de 30-35°C, hasta que se hubo estratificado toda la solución de recubrimiento entérico sobre las cuentas. Basándose en los resultados del ensayo HPLC que indicaban que la composición de polímero de proantocianidina estaba presente a una concentración de 52,9%, las cuentas con recubrimiento entérico se introdujeron manualmente en una cápsula de gelatina con envoltura dura de tamaño #0 para proporcionar una dosis de 250 mg y se envasaron luego en frascos adecuados de HDPE con un tapón revestido interiormente por inducción térmica.

15

TABLA 6

Fórmula de lote

20

Producto: Cuentas con Recubrimiento Entérico de Polímero de Proantocianidina

25

Tamaño de lote:	578,0 g	
Materia prima		Cantidad Utilizada por Lote
Esferas de Azúcar Non-Pareil, NF	100,0 g	
(40/60)		
Composición de polímero de proantocianidina	372,8 g	
Hidroxipropilmethylcelulosa E5, USP	8,7 g	
(K29/32)		
Opadry Clear (YS-1-19025A)	2,9 g	
"EUDRAGIT™ L 30D-55" (30% sólidos)	279,4 g	
Citrato de trietilo, NF	8,4 g	
Monoestearato de glicerol	1,4 g	
Agua, USP (eliminada durante el procesamiento)	1284,8 g	

50

Gránulos y partículas de polvo con recubrimiento entérico

A continuación se describe un método para formular la composición de polímero de proantocianidina como gránulos o polvo con recubrimiento entérico (microesferas con un diámetro de 300-500 μ) es cápsulas de gelatina con envoltura dura o suspendidos en una solución oral. Las partículas de polvo de la composición de polímero de proantocianidina se preparan por mezcladura de polvo con cizallamiento alto de la composición de polímero de proantocianidina e hidroxipropilmethylcelulosa en un mezclador/granulador de alta velocidad. Los gránulos de la composición de polímero de proantocianidina se preparan por pulverización de polivinilpirrolidona sobre el polvo en el mezclador/granulador de alta velocidad de tal modo que las partículas de polvo se aglomeran para formar gránulos mayores. Utilizando equipo de lecho fluidizado, los gránulos o polvo se cubren luego con una capa de sellado de Opadry Clear (mezclado con agua) y se recubren luego con el recubrimiento entérico "EUDRAGIT™ L 30D" aplicado como una dispersión acuosa que contiene 30% p/p de sustancia de polímero de metacrilato seca, que se suministra con 0,7% de laurilsulfato de sodio NF (SLS) y 2,3% de polisorbato 80 NF (Tween 20) como emulsionantes, a los cuales se añaden los plastificantes, citrato de trietilo y monoestearato de glicerilo, a fin de mejorar la elasticidad del recubrimiento. La composición final del polvo provisto de recubrimiento entérico es 81,8% p/p de composición de polímero de proantocianidina, 1,5% p/p de hidroxipropilmethylcelulosa, 0,5% p/p de Opadry Clear, 14,5% p/p de "EUDRAGIT™ L 30D", 1,45% p/p de citrato de trietilo, y 0,25% p/p de monoestearato de glicerilo. La composición final de los gránulos con recubrimiento entérico es 81,8% p/p de composición de polímero de proantocianidina, 10% de polivinilpirrolidona,

ES 2 326 933 T3

1,5% p/p de hidroxipropilmelcelulosa, 0,5% p/p de Opadry Clear, 14,5% p/p de “EUDRAGIT™ L 30D”, 1,45% p/p de citrato de trietilo, y 0,25% p/p de monoestearato de glicerilo.

Los gránulos o partículas de la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico pueden 5 introducirse en una cápsula de gelatina con envoltura dura en una cantidad que proporcione una dosificación adecuada.

Los gránulos o partículas de polvo de la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico pueden suspenderse también en una solución para administración oral, particularmente para administración pediátrica. 10 La solución de suspensión se prepara por mojado de 2 gramos de hidroxipropilmelcelulosa en 97,8 ml de agua destilada y 0,2 gramos de Tween 80; mezcladura de esta preparación hasta homogeneidad mediante tratamiento por ultrasonidos, calentamiento de la solución a 40°C y agitación durante 3 horas; seguido por adición de las partículas de polvo o gránulos de la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico a la solución homogénea.

15 Tabletas comprimidas con recubrimiento entérico

Un método para formular la composición de polímero de proantocianidina como tabletas con recubrimiento entérico se describe a continuación. Para cada tableta de 350 mg, se granulan 250 mg de composición de polímero de proantocianidina con 7 mg de carboximetilcelulosa sódica reticulada (“AC-DI-SOL™”) y una masa suficiente de celulosa microcristalina (“AVICEL™ PH 200/300”) hasta llevar la masa total a 350 mg. Se mezclan estos ingredientes durante 20 a 30 minutos en un mezclador V. Al cabo de los 20 a 30 minutos de mezcladura, se añaden 1,75 mg de estearato de magnesio y la mixtura se mezcla durante 4 a 5 minutos adicionales. Los gránulos resultantes se comprimen en una prensa rotativa de tabletas utilizando troqueles cóncavos estándar de 5 dieciseisavos de pulgada. Las tabletas se recubren con una mixtura de recubrimiento entérico preparada a partir de 250 gramos de “EUDRAGIT™ L 30D-25 55”, 7,5 gramos de citrato de trietilo, 37,5 gramos de talco y 205 gramos de agua. Las tabletas se disponen luego en un aplicador de recubrimiento de bandeja perforada (v.g. el sistema “ACCELA-COTA™”) y se hacen girar a 15 rpm a 40°C. La formulación de recubrimiento entérico se pulveriza utilizando las condiciones siguientes: temperatura de entrada del aire de 44°C-48°C, temperatura del aire de escape de 29°C-32°C, temperatura del producto de 26°C-30°C, una tobera de pulverización de 1 mm, una velocidad de bandeja de 30 a 32 rpm, un caudal de aire de 30-32 CFM (849-906 l/min), y una presión de pulverización de 20 PSI (1,41 kg/cm²). Las tabletas se curan finalmente durante 30 minutos mientras la bandeja gira a 35 rpm con una temperatura de entrada de aire de 60°C y a continuación, después de desconexión de la fuente de calor, se mantienen en rotación las tabletas a 15 rpm hasta que las tabletas se han enfriado a la temperatura ambiente.

35 Ejemplo

Efecto de las formulaciones de composición de polímero de proantocianidina en pacientes que sufren diarrea de los viajeros o diarrea inespecífica

40 A continuación se resumen los resultados provisionales obtenidos de los 20 pacientes iniciales de una prueba clínica abierta de seguridad y eficacia de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* para el tratamiento sintomático de la diarrea inespecífica aguda y la diarrea de los viajeros.

45 Estudio de seguridad y eficacia en humanos

Intervinieron en el estudio un total de 20 pacientes con diarrea de los viajeros. La población de pacientes estaba 50 constituida por pacientes jóvenes (promedio de edad = 24 años) varones y hembras que eran estudiantes de los Estados Unidos en Méjico. Los estudiantes fueron reclutados por el investigador a medida que entraban en el país y se les indicó que informaran a la clínica después del desarrollo de la diarrea y antes del comienzo de cualesquiera otras medicaciones.

Los individuos se evaluaron por los parámetros siguientes:

- 55 a) Frecuencia usual de deposición (número de deposiciones por día o semana).
 - b) Fecha y hora de aparición de la diarrea.
 - c) Número de deposiciones en las últimas 24 horas, clasificadas de acuerdo con la consistencia como sigue:
 - Con forma: retiene su forma original en agua
 - Blanda: adquiere la forma del recipiente
 - Acuosa: puede verterse
- 60 (Las deposiciones de forma intermedia (v.g., blanda/acuosa) se clasificaron en la categoría formada finalmente (v.g. acuosa)).

ES 2 326 933 T3

- d) Síntomas experimentados durante las últimas 24 horas, que incluían:
- Retortijones
 - Irritación anal
 - Tenesmo
 - Urgencia (imposibilidad de retardar el tiempo tanto como 15 minutos)
 - Incontinencia fecal (control reducido de los movimientos del intestino)
 - Incomodidad (interferencia con las actividades normales)
 - Náusea
 - Vómito
 - Gas intestinal incrementado

Una vez completadas las evaluaciones de selección, se obtuvieron muestras para los tests de referencia de laboratorio y se administró la primera dosis de la medicación del estudio. Se administró a los individuos una dosis de carga inicial de 1250 mg de la composición de polímero de proantocianidina con recubrimiento entérico con tres dosis más de 250 mg cada 6 horas durante las primeras 24 horas de tratamiento, y luego 500 mg 4 veces al día para un total de 2 gramos por día el segundo día de dosificación. La composición de polímero de proantocianidina se administró únicamente durante 2 días.

Durante la visita clínica de referencia, los participantes en el estudio fueron instruidos para completar exactamente los impresos de diario y de estudio, y se consideraron los parámetros de evaluación siguientes:

1. Seguridad

Los pacientes fueron consultados acerca de cualquiera sucesos adversos experimentados durante el estudio. Estos sucesos se clasificaron en cuanto a gravedad, duración, relación con el fármaco de estudio y cualquier acción emprendida. La sangre y la orina obtenidas en el momento de ingreso y al finalizar el estudio se utilizaron para evaluar cambios cualesquiera.

2. Eficacia

La eficacia fue evaluada por el diario del paciente y las visitas a la clínica. Los parámetros fundamentales de eficacia medidos fueron la frecuencia de deposición, la consistencia y el tiempo hasta la última deposición amorfa.

Resultados

Durante el estudio, no se observaron efectos adversos importantes en ninguno de los individuos que pudieran ser atribuidos a la composición de polímero de proantocianidina. Los parámetros fundamentales de eficacia para esta prueba incluían la frecuencia de deposiciones auto-informada y el tiempo hasta la última deposición amorfa. Estos datos se resumen en la Tabla 7.

TABLA 7

Frecuencia de deposiciones comunicada (20 pacientes tratados)

55	Tiempo	Deposiciones por día (valor medio)
	24 horas antes de la entrada	5,6
60	Día 1	4,0
	Día 2	2,9
	Día 3	2,1
65	Usual	1,6

ES 2 326 933 T3

Como promedio, la frecuencia de deposiciones anormales tendía hacia la normalidad a lo largo de los 3 días del estudio. El número promedio de deposiciones por día volvía a la frecuencia quasi-normal el día 3. Cuatro pacientes volvieron a su frecuencia de deposiciones normal el tercer día del estudio. Adicionalmente, el tiempo hasta la última deposición amorfa era 30,3 horas por término medio.

5 Se obtuvieron informes de referencia y de seguimiento de los síntomas gastrointestinales. Se pidió a los pacientes que registraran la gravedad (leve, moderada o grave) de 9 síntomas, que incluían náusea, vómito, retortijones, gas, urgencia, tenesmo, irritación anal, incontinencia e incomodidad.

10 Un total de 9 pacientes se habían curado completamente de sus síntomas al final del tercer día del estudio. La Tabla 8 presenta el número de pacientes que se curaron de todos sus síntomas durante el tiempo indicado.

15

TABLA 8

Curación de todos los síntomas a lo largo del tiempo (20 pacientes tratados)

20	Tiempo	Número de pacientes curados
	24 horas	1
25	48 horas	2
	60 horas	4
30	72 horas	2

35 Se obtuvo un registro total de los síntomas por asignación de un registro de 0 a la ausencia de síntomas, 1 a síntomas leves, 2 a moderados y 3 a síntomas graves. Los registros totales para todos los pacientes en cada periodo de tiempo se promediaron y se presentan en la Tabla 9.

TABLA 9

Registro de síntomas a lo largo del tiempo (20 pacientes tratados)

45	Tiempo	Registro medio
	Entrada	8,9
50	12 horas	6,1
	24 horas	4,5
55	36 horas	3,8
	48 horas	3,0
60	60 horas	1,8
	72 horas	1,1

Basándose en la revisión de los datos realizada por los inventores, se ha llegado a las conclusiones siguientes:

65 1. Si bien el fármaco era por regla general bien tolerado, 3 pacientes experimentaron náusea grave, autolimitada que estaba posiblemente relacionada con el fármaco de estudio. Sin embargo, ninguno de los pacientes se retiró del estudio debido a un suceso adverso.

ES 2 326 933 T3

2. No se produjeron cambios importantes de ningún tipo en la química del suero o la hematología durante el periodo de tratamiento. Seis pacientes experimentaron cambios leves en su análisis de orina. Los inventores no creen que estos cambios en el análisis de orina representen efectos adversos importantes. No estaba claro si estos cambios eran resultado del fármaco de estudio o evolución de su enfermedad subyacente.
- 5 3. La frecuencia de deposiciones tendía a volver a la frecuencia normal a lo largo de los 3 días del periodo de estudio.
- 10 4. El tiempo medio hasta la última deposición amorfa fue 30,3 horas comparado con un valor comunicado de 69 horas en los controles históricos.

15 En resumen, se llega a la conclusión de que una formulación entérica de la composición de polímero de proantocianidina de *C. lechleri* es útil para la mejora de la frecuencia de deposiciones y los síntomas gastrointestinales en los pacientes afligidos por la diarrea de los viajeros. Globalmente, el fármaco parece ser seguro, siendo la náusea el suceso más común.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para administración oral que comprende una composición de polímero de proantocianidina aislada de un *Croton* spp. o de un *Calophyllum* spp., un vehículo farmacéuticamente aceptable y un recubrimiento entérico.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, **caracterizada** porque la composición de polímero de proantocianidina se aísla de *Croton* spp.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, **caracterizada** porque el *Croton* spp es *Croton lechleri*.
4. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque la composición farmacéutica está formulada como una cápsula.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, **caracterizada** porque la composición farmacéutica está formulada como una cápsula de gelatina con envoltura dura que contiene cuentas con recubrimiento entérico.
6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque está formulada como gránulos o polvo con recubrimiento entérico (microesferas con un diámetro de 300-500 μm) proporcionados en cápsulas de gelatina con envoltura dura o suspendidos en una solución oral para administración pediátrica.
7. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque la composición está formulada como una tableta de gránulos comprimidos con recubrimiento entérico.
8. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque el recubrimiento entérico comprende un copolímero ácido metacrílico-éster de ácido metacrílico con grupos ácidos ionizables.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, **caracterizada** porque el recubrimiento entérico comprende adicionalmente plastificante.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, **caracterizada** porque el plastificante es un éster de polietilenglicol y éster de ácido cítrico.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, **caracterizada** porque comprende un lubricante.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, **caracterizada** porque el lubricante es estearato de magnesio.
13. Uso de una composición que comprende una composición de polímero de proantocianidina aislada de un *Croton* spp. o de un *Calophyllum* spp., un vehículo farmacéuticamente aceptable y un recubrimiento entérico en la fabricación de un medicamento.
14. Uso de una composición que comprende una composición de polímero de proantocianidina aislada de un *Croton* spp. o de un *Calophyllum* spp., un vehículo farmacéuticamente aceptable y un recubrimiento entérico en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diarrea secretora.
15. Uso de una composición que comprende una composición de polímero de proantocianidina aislada de un *Croton* spp. o de un *Calophyllum* spp., un vehículo farmacéuticamente aceptable y un recubrimiento entérico en la fabricación de un medicamento para la prevención de diarrea secretora.
16. Uso de acuerdo con la reivindicación 14 ó 15, **caracterizado** porque la diarrea secretora se produce en un animal no humano.
17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado** porque el animal no humano se selecciona del grupo constituido por animales bovinos, cerdos, animales ovinos, aves de corral, animales equinos, animales caninos y animales felinos.
18. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 14 ó 15, **caracterizado** porque la diarrea secretora se produce en un humano.
19. Uso de acuerdo con la reivindicación 18, **caracterizado** porque el humano con diarrea secretora es un niño pequeño o un muchacho.
20. Uso de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19, **caracterizado** porque el humano va a ser tratado por Diarrea Crónica Asociada al HIV.

ES 2 326 933 T3

21. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, **caracterizado** porque la diarrea secretora está causada por *Cryptosporidium* spp.
22. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, **caracterizado** porque la diarrea secretora está causada por una bacteria.
23. Uso de acuerdo con la reivindicación 22, **caracterizado** porque la bacteria se selecciona del grupo de *Escherichia coli*, *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Staphylococcus* spp., y *Bacillus* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, y *Cryptosporidium parvum*.
24. Uso de acuerdo con la reivindicación 22 ó 23, **caracterizado** porque la bacteria es *Escherichia coli* enterotoxígeno o *Campylobacter jejuni*.
25. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, **caracterizado** porque la diarrea secretora está causada por un agente viral.
26. Uso de acuerdo con la reivindicación 25, **caracterizado** porque el agente viral es rotavirus y coronavirus.
27. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, **caracterizado** porque la diarrea secretora está causada por una etiología no infecciosa.
28. Uso de acuerdo con la reivindicación 27, **caracterizado** porque la etiología no infecciosa se selecciona del grupo constituido por diarrea inespecífica, colitis ulcerosa, síndrome inflamatorio intestinal, y cánceres y neoplasias del tracto gastrointestinal.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

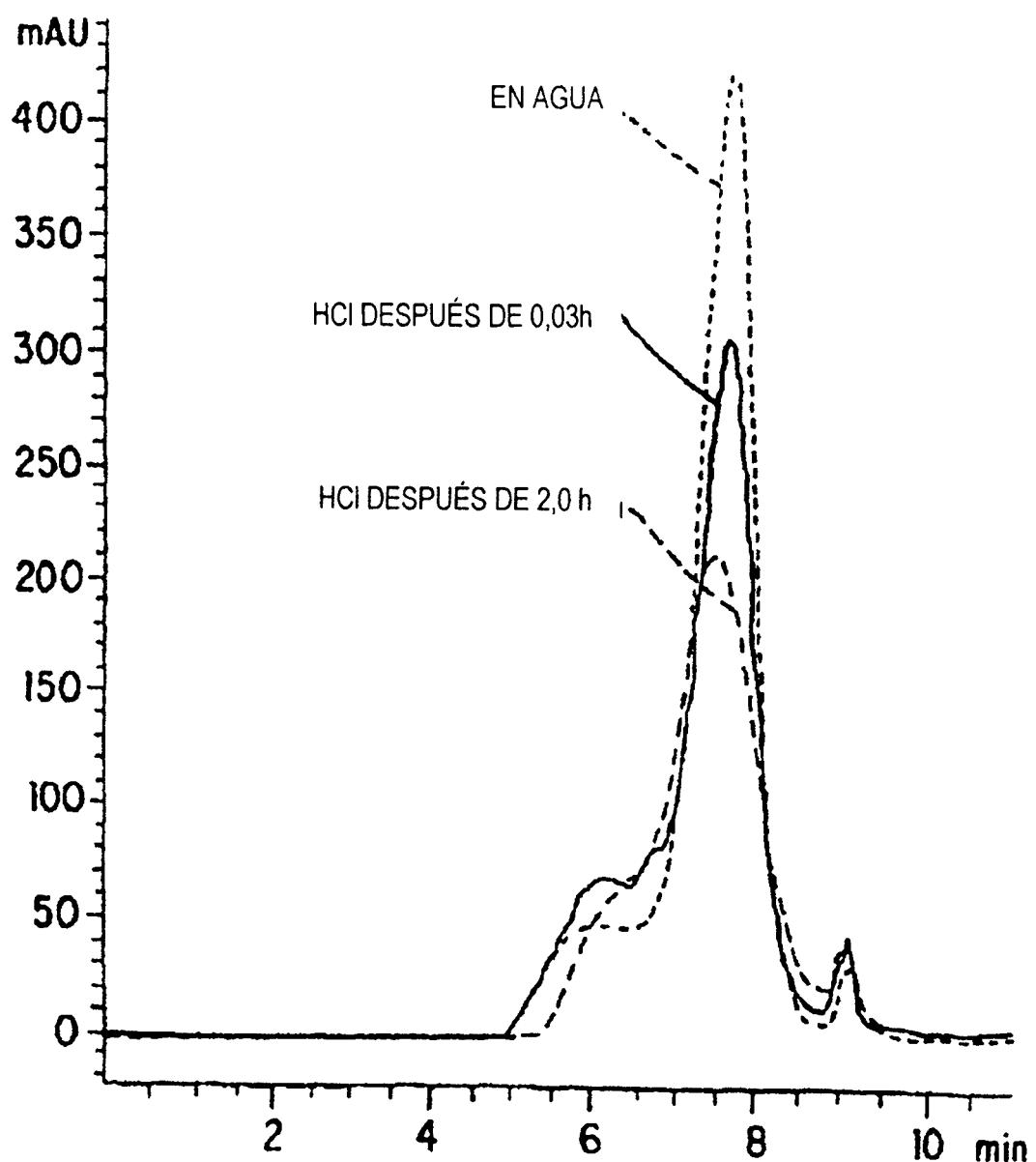


FIG. 1

ES 2 326 933 T3

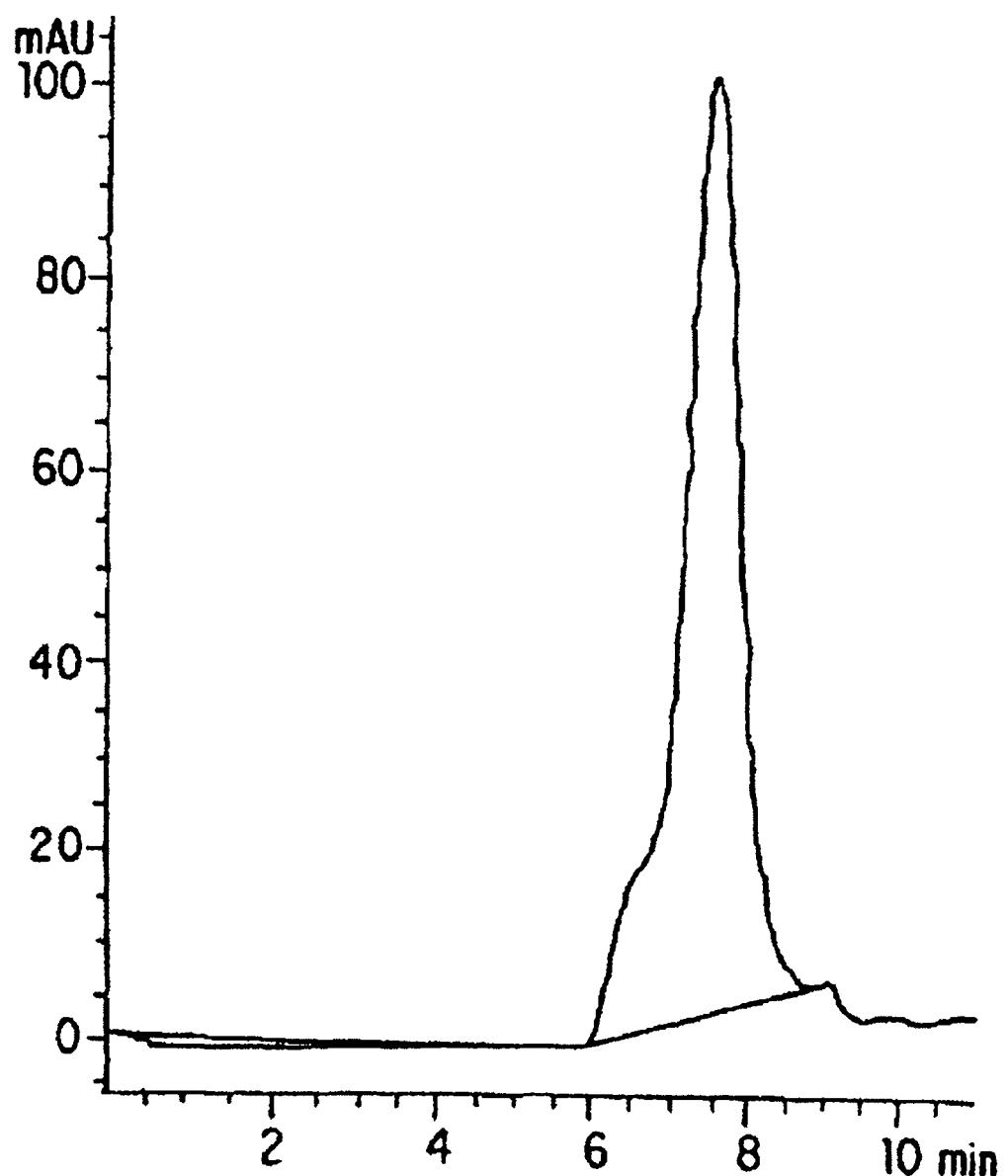


FIG. 2

ES 2 326 933 T3

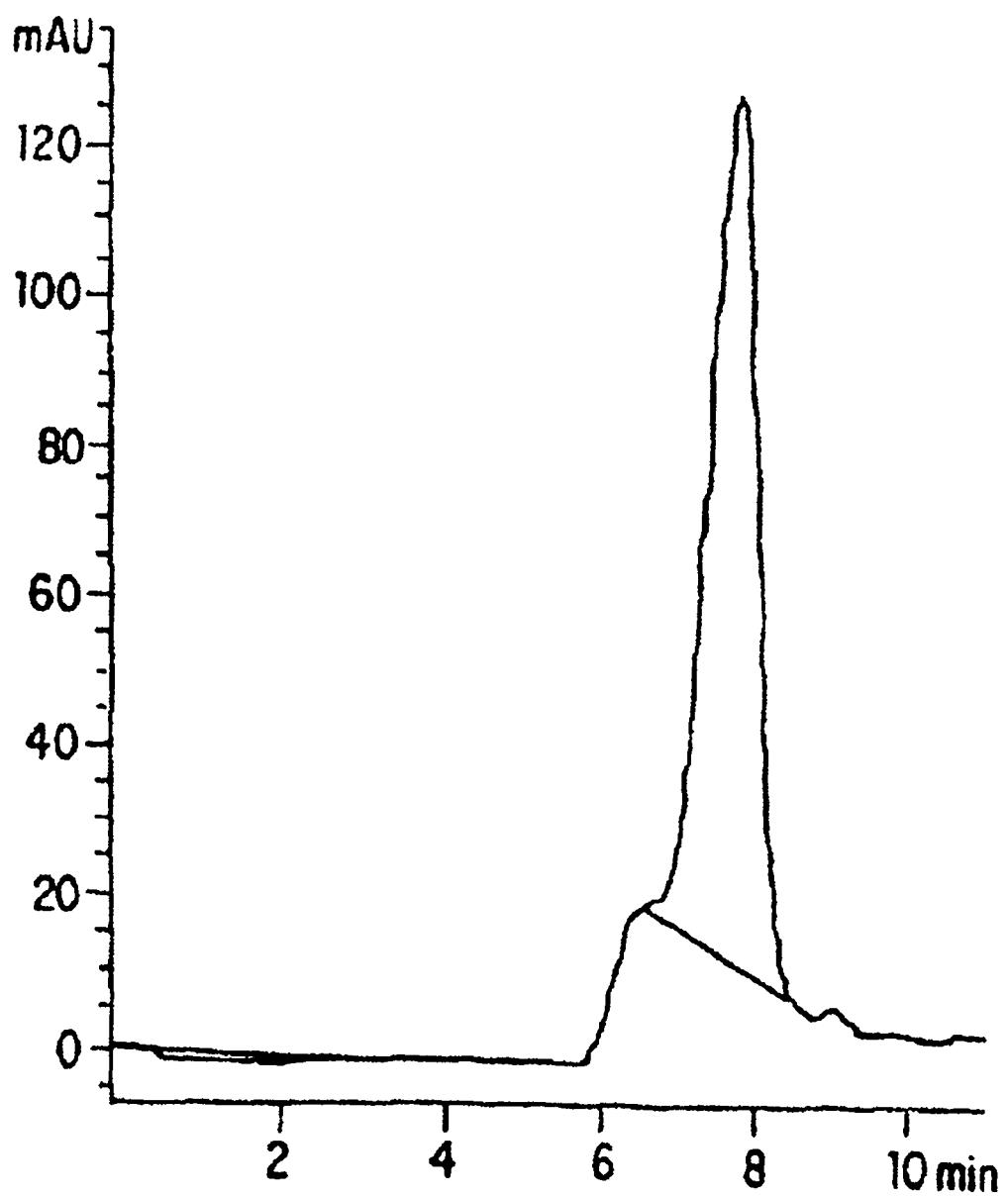


FIG. 3

ES 2 326 933 T3

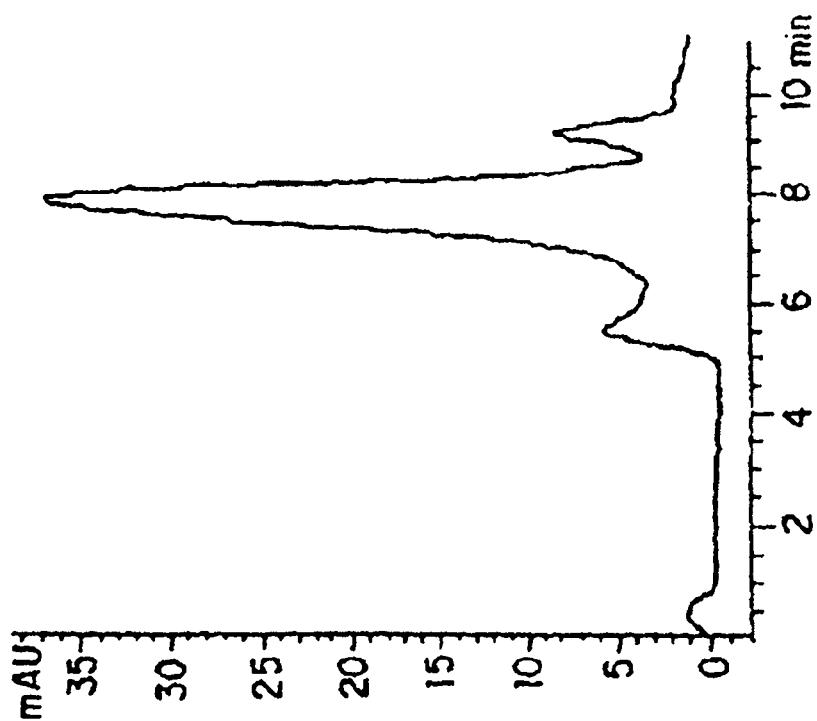


FIG. 5

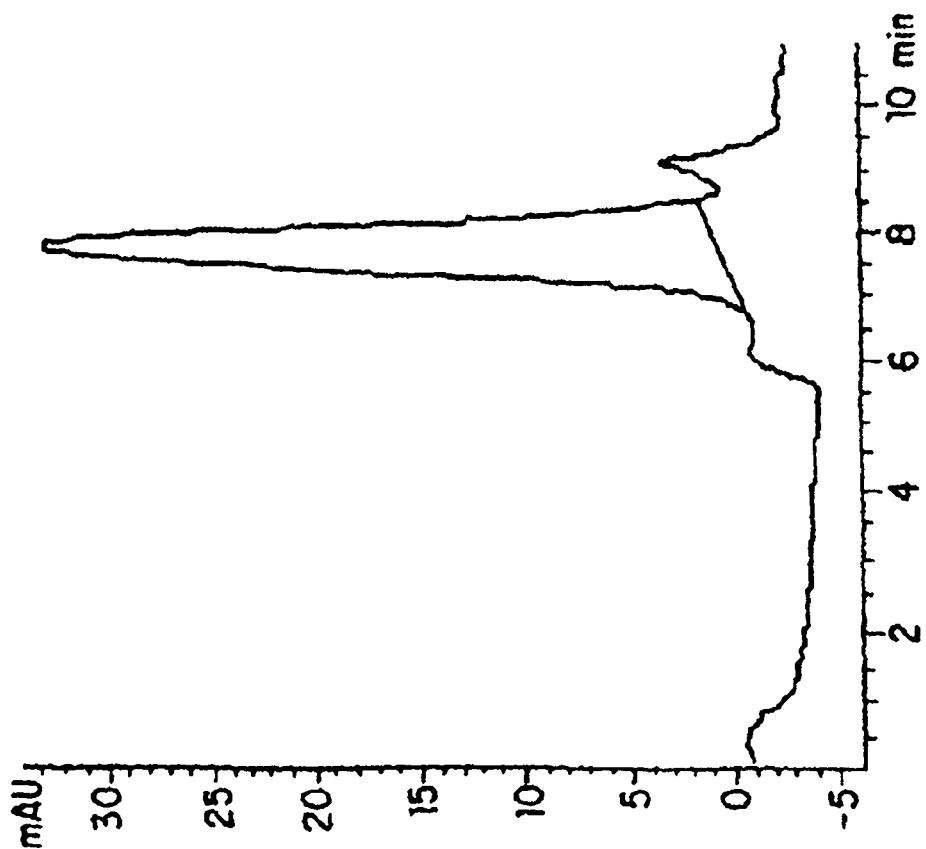


FIG. 4

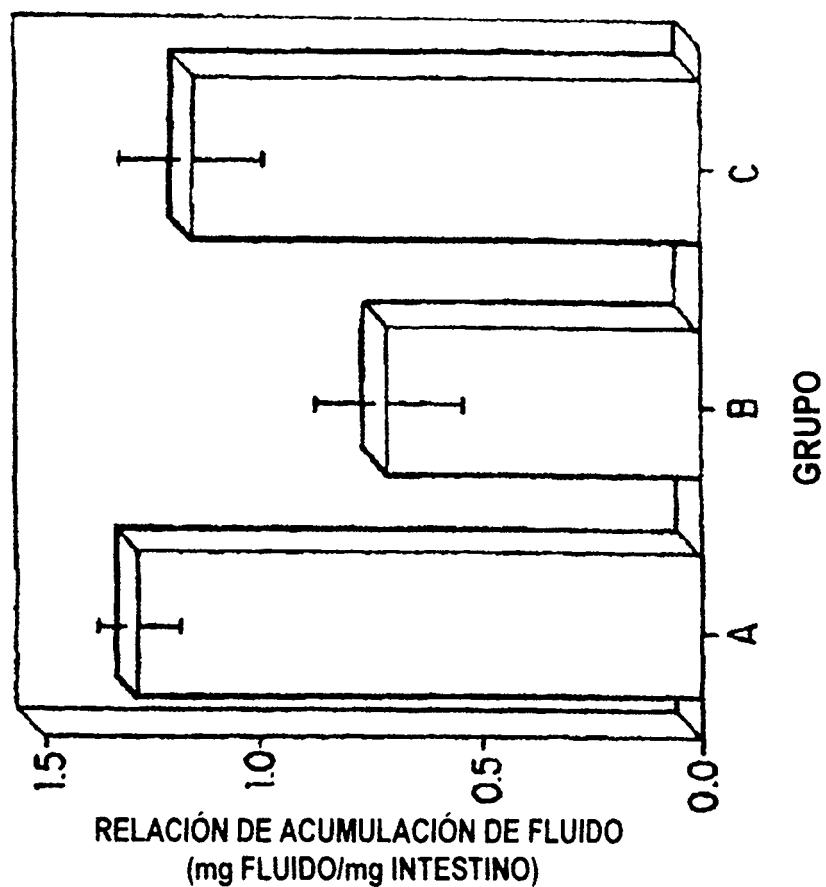


FIG. 7

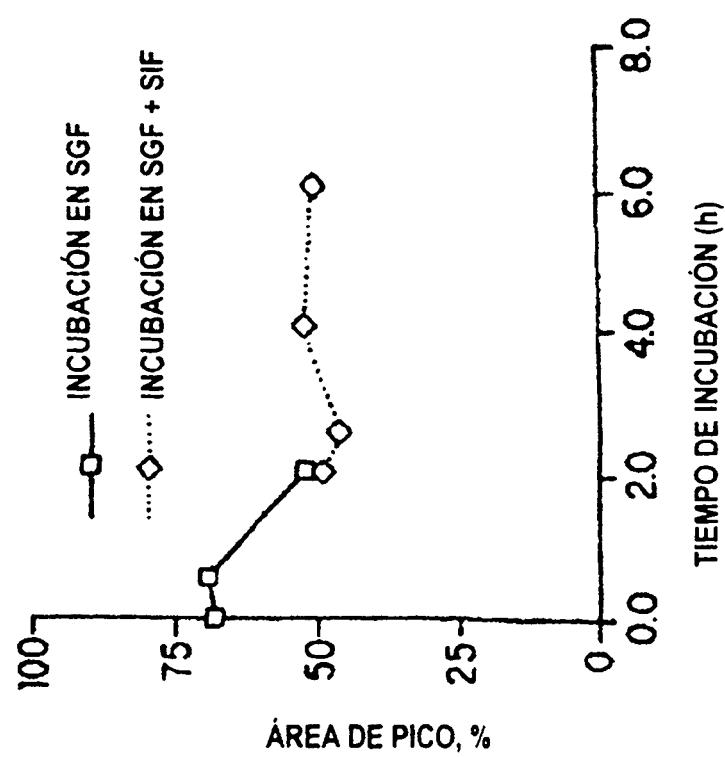


FIG. 6

