



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 630**

51 Int. Cl.:
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03758212 .9**
96 Fecha de presentación : **06.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1526841**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.05.2005**

54 Título: **Forma galénica para el suministro cólico de principios activos.**

30 Prioridad: **09.08.2002 FR 02 10151**
29.10.2002 FR 02 13514

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2009

73 Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)**
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR
DA Volterra

72 Inventor/es: **Bourgeois, Sandrine;**
Fattal, Elias;
Andremont, Antoine y
Couvreur, Patrick

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 327 630 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

Forma galénica para el suministro cólico de principios activos.

5 La presente invención se refiere a una forma galénica de suministro cólico, a su procedimiento de preparación y a su uso en terapia.

Se ha reconocido que los sistemas de liberación específica al nivel del colon presentan importantes ventajas terapéuticas.

10 Efectivamente, podrían tratarse un gran número de enfermedades cólicas más eficazmente si el principio activo se liberara localmente. Este es el caso, entre otras, de la enfermedad de Crohn, de colitis ulcerosas, de cáncer colorrectal y de diarrea.

15 La liberación cólica podría ser también interesante cuando, desde el punto de vista terapéutico, sea necesario un retardo de la absorción, particularmente en el tratamiento de patologías como asma nocturna o angina de pecho (Kinget R. *et al.* (1998), "Colonic Drug Targeting", *Journal of Drug Targeting*, 6, 129).

20 La administración de principios activos polipeptídicos se hace esencialmente por vía parenteral, que es dolorosa y es el origen de una mala observancia de los tratamientos. Desde hace algunos años, hay por lo tanto interés por el uso del colon como sitio de absorción de principios activos peptídicos (analgésicos, anticonceptivos, vacunas, insulina...). La absorción de péptidos al nivel del colon parece efectivamente mejor que al nivel de otros sitios del tubo digestivo, particularmente con una actividad proteolítica netamente menor que al nivel del intestino delgado y con ausencia de actividad peptidasa asociada a la membrana de células epiteliales cólicas.

25 En la administración de antibióticos por la boca, estos atraviesan el estómago y después son absorbidos al nivel del intestino delgado para difundirse por el conjunto del organismo y tratar el foco infeccioso para el que se han administrado. Sin embargo, una fracción de los antibióticos ingeridos (cuya cantidad varía con las características propias de cada tipo de antibiótico) no es absorbida y continúa su progresión hasta el colon antes de eliminarse en las heces. Estos antibióticos residuales se reúnen, al nivel del intestino delgado, con una fracción de los antibióticos absorbidos pero que se reexcretan al tubo digestivo mediante la eliminación biliar. Esta fracción es de una cantidad variable en función del metabolismo y de las vías de eliminación de cada antibiótico. Por último, para ciertos antibióticos, una fracción de la dosis absorbida se elimina directamente por la mucosa intestinal en la luz del tubo digestivo. Así, tanto si los antibióticos se han administrado por vía oral como por vía parenteral, se encuentra generalmente una fracción residual activa al nivel del colon. Esto es cierto, en diversos grados, para la gran mayoría de las familias de antibióticos usados en terapia, siendo la única excepción notable la familia de los aminoglucósidos, para los que la excreción intestinal es despreciable. Para los demás antibióticos, la excreción intestinal de una actividad antibiótica residual va a tener diferentes consecuencias, todas perjudiciales. En efecto, existe al nivel del colon un ecosistema bacteriano complejo (varios centenares de especies bacterianas diferentes) y muy denso (más de 10^{11} bacterias por gramo de contenido cólico) que se va a ver afectado por la llegada de los residuos activos de antibióticos. Se podrá observar:

40 1) un desequilibrio de la flora que sería la causa principal de las diarreas banales que siguen a veces a la toma de antibióticos (Bartlett J.G. (2002) "Clinical practice. Antibiotic associated diarrhea", *New England Journal of Medicine*, 346, 334). Aunque estas diarreas no sean generalmente graves y cedan rápidamente, o bien espontáneamente o bien al detenerse el tratamiento, son de cualquier modo mal apreciadas por los pacientes y se suman a la incomodidad de la enfermedad de base para la que se ha prescrito el antibiótico;

50 2) una perturbación de las funciones de resistencia a la colonización por bacterias exógenas (o "efecto barrera") con posibilidades de riesgo aumentado de infección, por ejemplo, intoxicación alimentaria por *Salmonella* (Holmberg S.D. *et al.* (1984) "Drug resistant Salmonella from animals fed antimicrobials", *New England Journal of Medicine*, 311, 617);

3) la selección de microorganismos resistentes al antibiótico. Estos últimos pueden ser de diversos tipos:

- 55 a) puede tratarse en primer lugar de bacterias patógenas como, por ejemplo, *Clostridium difficile*, especie capaz de secretar toxinas causantes de colitis temibles denominadas pseudomembranosas (Bartlett J.G. (1997) "Clostridium difficile infection: pathophysiology and diagnosis", *Seminar in Gastrointestinal Disease*, 8, 12);
- 60 b) puede tratarse también de microorganismos relativamente poco patógenos pero cuya multiplicación puede conducir a una infección de vecindad (candidiasis vaginal o cistitis por *Escherichia coli* resistente);
- 65 c) puede tratarse finalmente de bacterias resistentes comensales no patógenas pero cuya multiplicación y eliminación fecal va a aumentar la diseminación en el ambiente. Ahora bien, estas bacterias comensales resistentes pueden constituir una fuente importante de mecanismos de resistencia para especies patógenas. Este riesgo está actualmente considerado como alto a causa del carácter inquietante de la evolución hacia la multiresistencia de numerosas especies patógenas para el hombre.

Se han considerado por tanto numerosas estrategias que explotan los diversos parámetros fisiológicos del tubo digestivo con el objetivo de liberar los principios activos al nivel del colon. Se han realizado estudios particularmente con la ayuda de sistemas de administración basados en (1) el uso de polímeros sensibles a las variaciones del pH, (2) formas de liberación dependientes del tiempo, (3) profármacos o incluso polímeros degradables por las bacterias de la flora.

5

(1) Sistemas basados en las variaciones del pH

El pH al nivel del estómago es del orden de 1 a 3, pero aumenta en el intestino delgado y el colon para alcanzar valores cercanos a 7 (Hovgaard L. *et al.* (1996) "Current Applications of Polysaccharides in Colon Targeting", *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 13, 285). Para que un principio activo llegue al colon sin sufrir estas variaciones de pH, es posible administrarlo en forma de comprimidos, de cápsulas duras o de esferoides recubiertos con un polímero dependiente del pH, insoluble a pH ácido pero soluble a pH neutros o alcalinos (Kinet *et al.* ya citado). Los polímeros más habitualmente usados son derivados del ácido metacrílico, Eudragit® L y S (Ashford M. *et al.* (1993), "An *in vivo* investigation into the suitability of pH-dependent polymers for colonic targeting", *International Journal of Pharmaceutics*, 95, 193 y 95, 241; y David A. *et al.* (1997) "Acrylic polymers for colon-specific drug delivery", *S.T.P. Pharma Sciences*, 7, 546).

Dada la importante variabilidad inter- e intraindividual de los valores de pH existentes al nivel del tracto gastrointestinal, los polímeros dependientes del pH no representan el mejor medio para obtener una liberación específica al nivel del colon (Ashford M. *et al.*, ya citado).

(2) Sistemas basados en el tiempo de tránsito

La formulación de estos sistemas es tal que permite una liberación de principios activos después de un intervalo de tiempo predefinido. Con el fin de liberar el principio activo al nivel del colon, estas formas deben a la vez resistir el entorno ácido del estómago y entrar en una fase silenciosa de un tiempo predeterminado antes de liberar el principio activo, correspondiente al tiempo de tránsito de la boca al íleon terminal (Gazzaniga A. *et al.* (1995) "Time-dependent oral delivery systems for colon targeting", *S.T.P. Pharma Sciences*, 5, 83 y 108, 77; Liu P. *et al.* (1999) "Alginate/Pectin/Poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation", *J. Pharm. Pharmacol.*, 51, 141; Pozzi F. *et al.* (1994) "The Time Clock system: a new oral dosage form for fast and complete release of drug after predetermined lag time", *Journal of Controlled Release*, 31, 99).

La Pulsincap® de Scherer estuvo entre las primeras formulaciones de este tipo (solicitud internacional WO 90/09168). Tiene la apariencia de una cápsula dura cuyo cuerpo es insoluble en agua. El principio activo se mantiene en el cuerpo mediante un tapón de hidrogel dispuesto al nivel de la cabeza de la cápsula dura hidrosoluble. Está todo recubierto con una película gastrorresistente. Después de la disolución de la cabeza al nivel de intestino delgado, el tapón se hincha en contacto con los líquidos digestivos. Cuando este último alcanza un umbral de hinchamiento crítico, se expulsa, permitiendo así la liberación del principio activo. El tiempo de expulsión está controlado por las propiedades del hidrogel que compone el tapón.

Los sistemas basados en el tiempo de tránsito presentan sin embargo numerosos inconvenientes (variabilidades de los tiempos de vaciado gástrico y de tránsito, fenómenos de retención al nivel de la válvula ileocecal (Kinet R., ya citado), proporcionando falta de especificidad e impidiendo llegar a una validación de estos últimos como sistemas de liberación específica al nivel del colon. Por último, la producción a gran escala de este tipo de sistemas es difícilmente factible, puesto que necesitaría una adaptación importante y costosa de las tecnologías industriales.

Recientemente se ha desarrollado una nueva forma para orientación cólica, la "cápsula de suministro orientada a colon" (CTDC en inglés) (Ishibashi T. *et al.* (1998) "Design and evaluation of a new capsule-type dosage form for colon-targeted delivery of drugs", *International Journal of Pharmaceutics*, 168, 31 y 57, 45). La CTDC es un sistema que asocia a la vez el factor dependiente del pH y el factor dependiente del tiempo. Se presenta en forma de una cápsula dura clásica que comprende el principio activo y un ácido orgánico (ácido succínico) recubierta con 3 capas.

55

(3) Sistemas basados en la actividad enzimática de la flora microbiana cólica

3.1. Profármacos

Los profármacos se han estudiado mucho para la orientación cólica de diversos principios activos (antiinflamatorios no esteroideos y esteroideos, espasmolíticos...). Estos sistemas están basados en la capacidad que tienen las enzimas producidas por la flora cólica de degradar los profármacos con el fin de liberar la forma activa del principio activo.

Se han desarrollado particularmente numerosos profármacos basados en la acción de las azoreductasas bacterianas con el objetivo de liberar al nivel del colon principios activos tales como ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) usado en el tratamiento de patologías locales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosas (Peppercorn M.A. *et al.* (1972) "The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 181, 555 y 64, 240).

Otro enfoque consiste en explotar las hidrolasas bacterianas como las glucosidasas y las polisacaridasas (Friend D.R. (1995) "Glycoside prodrugs: novel pharmacotherapy for colonic diseases", *S. T. P. Pharma Sciences*, 5, 70; Friend D.R. *et al.* (1984) "A colon-specific drug-delivery system based on drug glycosides and the glycosidasas of colonic bacteria", *Journal of Medicinal Chemistry*, 27, 261; Friend D.R. *et al.* (1985) "Drug glycosides: potential prodrugs for colon-specific drug delivery", *Journal of Medicinal Chemistry*, 28, 51 y Friend D.R. *et al.* (1992) "Drug glycosides in oral colon-specific drug delivery", *Journal of Controlled Release*, 19, 109). Se han desarrollado así profármacos que acoplan, por ejemplo, esteroides a azúcares (glucosa, galactosa, celobiosa, dextrano (solicitud internacional WO 90/09168)), ciclodextrinas (Hirayama F. *et al.* (1996) "In vitro evaluation of Biphenyl Acetic Acid- β -Cyclodextrin conjugates as colon-targeting prodrugs: drug release behavior in rat biological media", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48, 27).

3.2. Recubrimiento mediante polímeros biodegradables mediante enzimas bacterianas

En este caso, la orientación cólica se hace mediante recubrimiento de la forma farmacéutica con un polímero específicamente degradado por las enzimas producidas por la microflora, aprovechando la presencia de azoreductasas o glucosidasas bacterianas.

Se han utilizado numerosos polímeros que comprenden enlaces azoaromáticos para recubrir un principio activo. Saffran *et al.* ("Oral insulin in diabetic dogs", *Journal of Endocrinology* (1991), 131, 267 y "A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs", *Science* (1986), 233, 1081) han descrito así la liberación de insulina y vasopresina en el colon de ratas y perros a partir de formas orales recubiertas con copolímeros de estireno y metacrilato de hidroxietilo (HEMA) ligados por enlaces azoaromáticos. Este recubrimiento se degrada en el colon mediante las azoreductasas bacterianas, ocasionando así la liberación de la sustancia activa.

La ventaja de los azopolímeros es que permite una selectividad cólica muy buena para la liberación de principios activos. El inconveniente ligado a su uso es la falta de conocimientos sobre su eventual toxicidad.

Para evitar este inconveniente, otros estudios se han dirigido más bien al uso de una película de recubrimiento basada en sustancias naturales como polisacáridos, particularmente películas de recubrimiento basadas en amilosa/etilcelulosa (Milojevic S. *et al.* (1996) "Amylose as a coating for drug delivery to the colon: preparation and *in vitro* evaluation using 5-aminosalicylic acid pellets", *Journal of Controlled Release*, 38, 75), basadas en un éster de dextrano (Bauer K.H. *et al.* (1995) "Novel pharmaceutical excipients for colon targeting", *S.T.P. Pharma Sciences*, 5, 54) o de pectina.

3.3. Matrices biodegradables por enzimas bacterianas

Otro enfoque de sistemas de liberación específica al nivel del colon consiste en la elaboración de matrices mediante compresión de una mezcla de principio activo y polímeros biodegradables como sulfato de condroitina (Rubinstein A. *et al.* (1992b) "Chondroitin sulfate: a potential biodegradable carrier for colon-specific drug delivery", *International Journal of Pharmaceutics*, 84, 141 y Rubinstein A. *et al.* (1992a) "Colonic drug delivery: enhanced release of Indomethacin from cross-linked chondroitin matrix in rat cecal content", *Pharmaceutical Research*, 9, 276), goma guar (Krishnaiah Y.S.R. y col. (1998) "Evaluation of guar gum as a compression coat for drug targeting to colon", *International Journal of Pharmaceutics*, 171, 137), quitosano (Tozaki H. *et al.* (1997) "Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 1016) o pectina (Rubinstein A. *et al.* (1993) *In vitro* evaluation of calcium pectinate: a potential colon-specific drug delivery carrier, *Pharmaceutical Research*, 10, 258).

Los sistemas basados en la actividad enzimática de la flora microbiana son probablemente los que presentan más especificidad cólica para la liberación de principios activos. Constituyen por tanto una vía de futuro para la orientación cólica.

El interés de los polisacáridos en la preparación de sistemas para administración cólica reside en el hecho de que son de origen natural, poco tóxicos y se degradan específicamente mediante enzimas bacterianas de la flora cólica.

Así, la pectina es un polisacárido aislado de las paredes celulares de vegetales superiores, muy usada en la industria agroalimentaria (como gelificante o espesante de mermeladas, helados...) y farmacéutica. Es polimolecular y polidispersa. Su composición varía según la fuente, las condiciones de extracción y los factores ambientales.

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

- la pectina altamente metilada (HM: rica en metoxi) cuyo grado de metilación varía entre 50 y 80%. Es poco soluble en agua y forma geles en medio ácido (pH < 3,6) o en presencia de azúcares;

- la pectina débilmente metilada (LM: baja en metoxi), con un grado de metilación que va de 25 a 50%. Más soluble en agua que la pectina HM, da geles en presencia de cationes divalentes como los iones Ca^{2+} . Efectivamente, los iones Ca^{2+} forman “puentes” entre los agrupamientos carboxilo libres de los ácidos galacturónicos. La red así formada se ha descrito por Grant *et al.* (1973) “Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model”, *FEBS Letters*, 32, 195).

Existen también pectinas amidadas. Mediante el tratamiento de la pectina con amoniaco, pueden transformarse ciertos agrupamientos carboxilato de metilo ($-\text{COOCH}_3$) en agrupamientos carboxamida ($-\text{CONH}_2$). Esta amidación confiere nuevas propiedades a las pectinas, particularmente una mejor resistencia a las variaciones del pH.

La pectina se degrada mediante enzimas procedentes de vegetales superiores y de diversos microorganismos (champiñones, bacterias) entre los que se encuentran las bacterias de la flora cólica humana. Las enzimas producidas por la microflora están compuestas por un conjunto de polisacaridasas, de glucosidasas y de esteratasas.

El recubrimiento de una forma galénica con pectina se efectúa o bien por compresión (Ashford M. *et al.* (1993b), “An evaluation of pectin as a carrier for drug targeting to the colon”, *Journal of Controlled Release*, 26, 213), o bien por pulverización. El recubrimiento por compresión se realiza generalmente con la pectina sola, mientras que el de pulverización necesita el empleo de un polímero filmogénico además de pectina (Milojevic S. *et al.* (1996) “Amylose as a coating for drug delivery to the colon: preparation and *in vitro* evaluation using 5-aminosalicylic acid pellets”, *Journal of Controlled Release*, 38, 75; Wakerly Z. *et al.* (1996) “Pectin/ethylcellulose film coating formulations for colonic drug delivery”, *Pharmaceutical Research*, 13, 1210).

Se han estudiado igualmente numerosas formas matriciales basadas en pectina. Están constituidas generalmente o bien por pectina pura o bien por su complejo con iones Ca^{2+} débilmente hidrosoluble, el pectinato de calcio. Se ha descrito particularmente una matriz de pectinato de calcio que contiene indometacina por Rubinstein *et al.* (1992a) “Colonic drug delivery: enhanced release of Indomethacin from cross-linked chondroitin matrix in rat cecal content”, *Pharmaceutical Research*, 9, 276), que muestra una mejor estabilidad del pectinato de calcio que de la pectina sola en los medios digestivos, permaneciendo sensible a la acción de las enzimas pectinolíticas.

Se han estudiado también las pectinas amidadas, más tolerantes a las variaciones de pH, para la elaboración de comprimidos matriciales de fin cólico (Wakerly Z. *et al.* (1997) “Studies on amidated pectins as potential carriers in colonic drug delivery”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49, 622).

Aydin y col. ((1996) “Preparation and evaluation of pectin beads”, *International Journal of Pharmaceutics*, 137, 133) han sido los primeros en formular perlas de pectina según el procedimiento de gelificación iónica de Bodmeier *et al.* ((1989) “Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads”, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 15, 1475 y “Spherical agglomerates of water-insoluble drugs”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78, 964), quienes habían puesto a punto perlas de alginato y quitosano. Su objetivo era incorporar a las perlas dos principios activos diferentes, uno catiónico (atenolol) y uno aniónico (piroxicam) con el fin de caracterizar las eventuales interacciones con la pectina. Han mostrado también que era posible formar perlas con los dos tipos de principios activos y que las condiciones operativas tenían una influencia importante sobre las propiedades de las perlas obtenidas.

Sriamornsak se ha servido de perlas de pectinato de calcio con el fin de establecer un sistema para la liberación específica de proteínas al nivel del colon utilizando seroalbúmina bovina (BSA) de un peso molecular de 66.400 Da como proteína modelo (Sriamornsak P. (1998) “Investigation on pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads”, *International Journal of Pharmaceutics*, 169, 213 y (1999) “Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8, 221). Ha estudiado la influencia de diferentes factores de formulación sobre las propiedades de las perlas obtenidas, como su forma, tamaño, tasa de encapsulación de la BSA y cinética de liberación específica de proteínas al nivel del colon. Sriamornsak ha demostrado por tanto que las perlas de pectinato de Ca podrían emplearse para la liberación específica de proteínas al nivel del colon. La obtención de un perfil de cinética de liberación adecuado depende principalmente de la elección de la formulación y de las condiciones operativas para la preparación de perlas. No se ha establecido ninguna correlación *in vitro/in vivo* de los perfiles de liberación de los principios activos encapsulados.

Con el fin de aumentar la estabilidad de las partículas a lo largo del tracto digestivo y de evitar cualquier liberación prematura del principio activo encapsulado, es posible reforzar las perlas de pectina reticulándolas con un polímero catiónico.

Munjeri *et al.* ((1997) “Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release”, *Journal of Controlled Release*, 46, 273) han reticulado perlas de pectina amidada con quitosano. Han mostrado entonces, comparando las cinéticas de disolución de formas reticuladas y de formas no reticuladas, que el quitosano permitía minimizar la liberación de principios activos insolubles pero no modificaba significativamente la liberación de los principios activos hidrosolubles. La pérdida de principio activo en condiciones que imitan las del estómago y el intestino delgado puede estar limitada por tanto por la formación de un complejo entre el quitosano y la pectina amidada; permaneciendo las perlas de pectina reticuladas sensibles a la acción de las enzimas pectinolíticas cólicas.

ES 2 327 630 T3

Se ha ensayado otro agente reticulante, la polilisina, en presencia de perlas de alginato/pectina (Liu P. *et al.* (1999) "Alginate/Pectin/Poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation", *J. Pharm. Pharmacol.*, 51,141). Las perlas reticuladas con polilisina parecen liberar menos principio activo en medio ácido (HCl 0,1 N) que las perlas no reticuladas, salvo en presencia de principios activos muy hidrosolubles. Se encuentra el mismo tipo de efecto en medio alcalino (tampón fosfato a pH 7,5) pero es netamente menos marcado que en medio ácido.

La solicitud de patente internacional WO 88/07865 sugiere administrar al nivel del colon bacterias productoras de β -lactamasas con el fin de hidrolizar los antibióticos residuales. Los microorganismos usados son bacterias de metabolismo anaeróbico estricto cuya producción y liofilización en cantidad suficiente para elaborar un medicamento son difíciles. Además, son portadoras de genes de resistencia a antibióticos codificados por las β -lactamasas, que generan así un riesgo de diseminación de estos genes dentro del ecosistema cólico y en el ambiente.

La solicitud de patente internacional WO 93/13795 propone una forma galénica oral que contiene β -lactamasas. Puede estar compuesta por partículas de sacarosa de 1 a 2,5 mm de diámetro que contienen β -lactamasas o amidasas y eventualmente un inhibidor de tripsina, estando recubiertas dichas partículas por un polímero gastrorresistente. Estas partículas tendrían la posibilidad de liberar la enzima al nivel de diferentes segmentos del tubo digestivo para que su actividad se ejerciera según las necesidades al nivel deseado del intestino.

Ninguno de los ejemplos implica datos experimentales que muestren que la formulación galénica propuesta es efectivamente capaz de suministrar la enzima en forma activa al nivel deseado del intestino. Además, ninguno aporta pruebas de la capacidad de la preparación galénica de hidrolizar efectivamente el antibiótico *in vivo*, ni siquiera *in vitro* en un medio que reproduzca las características del medio intestinal.

Por todas estas razones, es altamente deseable disponer de un sistema destinado a reducir la cantidad de antibióticos residuales que llegan al colon después de terapia antibiótica oral o parenteral, o capaz de suministrar un principio activo directamente al nivel del colon.

Así, la presente invención tiene por tanto como objeto formas galénicas multiparticuladas aptas para usarse por vía oral y destinadas al suministro cólico de principios activos.

En el sentido de la presente invención, se entiende por principio activo una sustancia o composición que sea apta para usarse en terapia o diagnóstico y pueda incorporarse a la forma galénica según la invención.

El principio activo puede ser un antiinfeccioso, por ejemplo antibióticos, compuestos antiinflamatorios, antihistamínicos, anticolinérgicos, antivíricos, antimicóticos, péptidos, proteínas, genes, oligonucleótidos no codificantes, agentes de diagnóstico y/o agentes inmunosupresores o bacterias.

Entre los principios activos particularmente ventajosos, se encuentran agentes antiinflamatorios, agentes antitumorales, oligonucleótidos no codificantes y enzimas capaces de inactivar los antibióticos al nivel del colon, particularmente β -lactamasas o enzimas capaces de inactivar macrólidos y similares como la eritromicina esterasa descrita por Andremont A. *et al.* ((1985) "Plasmid mediated susceptibility to intestinal microbial antagonisms in *Escherichia coli*", *Infect. Immun.* 49 (3), 751) o capaces de inactivar quinolonas como los descritos por Chen Y *et al.* ((1997) "Microbicidal models of soil metabolisms biotransformations of danofloxacin". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19, 378).

Los principios activos pueden ser hidrosolubles o liposolubles.

La invención se refiere a formas galénicas multiparticuladas aptas para usarse por vía oral y destinadas al suministro cólico de principios activos que comprenden perlas de pectina presentes en forma de una sal catiónica que contiene el principio activo, estando reticulada dicha pectina con un polímero catiónico.

Según la invención, el polímero catiónico que permite la reticulación de la pectina se elige del grupo compuesto por polietilenimina, polilisina y sus derivados.

Más ventajosamente, el peso molecular de estos polímeros catiónicos está comprendido entre 10.000 y 100.000 D, preferiblemente entre 20.000 y 50.000 Da.

En otro modo ventajoso de la invención, la sal catiónica de pectina usada es el pectinato de calcio.

En el sentido de la presente invención, se entiende por pectina tanto la pectina metilada como no metilada, amidada o amidada.

Las formas galénicas según la invención pueden administrarse en cualquier forma oral, particularmente en forma de cápsula dura y cápsula.

Estas cápsulas duras y estas cápsulas pueden administrarse simultánea o sucesivamente con otros principios activos, particularmente cuando las cápsulas duras o cápsulas contienen enzimas capaces de inactivar los antibióticos, pueden administrarse simultánea o sucesivamente con la preparación de antibióticos correspondientes.

ES 2 327 630 T3

Los principios activos administrados conjuntamente con las cápsulas duras y cápsulas que contienen las formas galénicas según la invención se administran por vía oral o cualquier otra vía.

5 Las formas galénicas según la invención pueden prepararse mediante procedimientos conocidos por el experto en la técnica o mediante procedimientos nuevos que forman igualmente parte de la invención.

Así, la presente invención tiene igualmente como objeto un procedimiento de preparación de formas galénicas multiparticuladas caracterizado porque se introduce gota a gota una solución acuosa de pectina que contiene el principio activo a una concentración de 0,5 a 5% (v/v) en una solución de cloruro de calcio para formar perlas de pectinato de calcio, después se recuperan las perlas de pectinato de calcio así obtenidas y se introducen en una solución acuosa del polímero catiónico.

En un modo de realización ventajoso del procedimiento, la solución de pectina es de 4 a 10% (m/v), preferiblemente de 4 a 7%, la solución de cloruro de calcio de 2 a 10% (m/v) y la solución de polímero catiónico de 0,5 a 2% (m/v), siendo preferiblemente dicha solución de polímero catiónico una solución de polietilenimina.

En un modo aún más ventajoso de realización de la invención, se preparan las formas galénicas a partir de una solución de pectina al 6% (m/v), una solución de cloruro de calcio al 6% (m/v) y una solución de polietilenimina al 1% o al 0,6%.

Se mantienen las perlas en el cloruro de calcio con agitación lenta durante 10 min a 1 hora, preferiblemente durante 20 min.

La etapa de reticulación por el polímero catiónico se realiza con agitación lenta durante 15 a 40 min, preferiblemente durante 20 min.

Después de la recuperación de las perlas de pectinato, se secan las perlas a una temperatura comprendida entre 20 y 40°C durante 30 min a 10 horas, preferiblemente a 37°C durante 2 horas.

El diámetro de las partículas según la invención está comprendido entre 800 y 1.500 μm , preferiblemente entre 1.000 y 1.200 μm .

Los rendimientos de encapsulación están comprendidos entre 50 y 90%, o sea 3-6 UI/perla de β -lactamasa, actividad expresada en el sustrato bencilpenicilina, esté amidada la pectina o no.

La estabilidad en medio gástrico es superior a 10 horas y es igualmente muy buena en medio intestinal USP XXIV puesto que es superior a 7 horas (la duración de estabilidad de las perlas de pectina no reticuladas no supera 1 hora) y esto cualquiera que sea el tipo de pectina usada.

Los ejemplos 1 a 7 y las figuras 1 a 8 siguientes ilustran la invención.

La Figura 1 representa el efecto de la reticulación con diferentes concentraciones de PEI (0,6; 0,7; 0,8; 0,9 y 1%) sobre los tiempos de desagregación de las perlas de pectina amidada dispuestas en tres medios diferentes: PBS, 0,01 M, pH a 7,4; medio intestinal a un pH de $6,8 \pm 0,1$ UPS XXIV; medio gástrico a un pH de 1,1 USP XXIV.

La Figura 2 ilustra la estructura de las perlas que contienen β -lactamasas a razón de 4,4 UI/perla y reticuladas durante 20 minutos con PEI al 1% y observadas mediante microscopía electrónica de barrido.

La Figura 3 ilustra la liberación de β -lactamasas *in vitro* a partir de perlas de pectina amidada reticuladas preparadas según el ejemplo 1 con concentraciones de PEI de 0,6 y 0,7% y que contienen aproximadamente 5 UI/perla, dispuestas en medio intestinal USP XXIV y después en medio cólico (tampón HEPES a pH 6 + enzimas pectinolíticas).

La Figura 4 ilustra la evolución de la actividad β -lactamasa en las heces de ratón en función del tiempo después de la administración oral de perlas de pectina reticuladas con PEI preparadas según el ejemplo 1 y que contienen 4,4 UI/perla.

La Figura 5 ilustra la estructura de perlas que contienen β -lactamasas a razón de 4,44 UI/perla 30 minutos después de la administración *in vivo*. Las perlas están entonces en el estómago. A y B representan las perlas enteras y C y D las perlas cortadas.

La Figura 6 ilustra la estructura de perlas que contienen β -lactamasas a razón de 4,4 UI/perla 2 horas después de la administración *in vivo*. Las perlas están entonces en el intestino delgado. A y B representan las perlas enteras y C y D las perlas cortadas.

La Figura 7 ilustra la estructura de perlas que contienen β -lactamasas a razón de 4,4 UI/perla 4 horas después de la administración *in vivo*. Las perlas están entonces en el colon. A y B representan las perlas enteras y C y D las perlas cortadas.

ES 2 327 630 T3

La Figura 8 ilustra la encapsulación en perlas de pectina de ADN de plásmido libre o complejado con lípidos catiónicos (lipoplexo) o con un polímero catiónico (poliplexo).

5 Ejemplo 1

Preparación de formas galénicas

10 Se introduce gota a gota una solución acuosa de pectina al 6% (OF 400 o OG 175C Unipectine® de Degussa) en una solución de cloruro de calcio al 6% (m/v). Se introduce la solución de pectina en la solución de cloruro de calcio gracias a un conducto Tygon® conectado a una bomba peristáltica (Microperpex® LKB Bromma). Se pasa la solución a través de una aguja de 0,8 mm de diámetro (21G, Nedus Terumo) para formar gotas de pectina que, en contacto con el cloruro de calcio (40 ml), gelifican instantáneamente y dan perlas de pectinato de calcio. Se mantienen las perlas en el cloruro de calcio con agitación lenta durante 20 minutos.

15 Las perlas blancas que no contienen principio activo (β -lactamasas) se obtienen partiendo de una solución de pectina amidada (OG 175C) o no amidada (OF 400) al 6%. Para la preparación de perlas cargadas, se mezcla el principio activo (β -lactamasas, penicilinasas de tipo A extraídas de *Bacillus cereus* de Sigma) con la solución de pectina a una relación de 3% ($v_{pa}/v_{pectina}$).

20 Las perlas de pectinato de calcio así obtenidas se recuperan a continuación mediante filtración, se aclaran con agua destilada, se disponen en una placa Petri y se secan en estufa a 37°C durante 2 horas.

25 Para la reticulación con polietilenimina, se introducen las perlas no secadas, recuperadas de la solución de $CaCl_2$ mediante filtración, en una solución acuosa de polietilenimina (PEI) al 1% y se mantienen allí durante 20 minutos con agitación ligera.

Las perlas preparadas a partir de la pectina no amidada OF 400 contienen de 1 a 2,5 UI/perlas y las perlas preparadas a partir de la pectina amidada OG 175C contienen de 1 a 5 UI/perla.

30

Ejemplo 2

Estabilidad de perlas

35 1. *Modo de operación*

Se preparan las perlas según el ejemplo 1 con o sin etapa de reticulación; la duración de la reticulación en la PEI es de 20 minutos en soluciones de concentración que va de 0,6 a 1%.

40 Se disponen las perlas o bien en un tampón fosfato (PBS 0,01 M, pH 7,4) o bien en medios que simulan los medios digestivos (gástrico e intestinal USP XXIV) y se observa el tiempo de desagregación.

45 2. *Resultados*

Se dan en la Figura 1.

Las perlas reticuladas o no son estables en PBS y en medio gástrico. En contraposición, las perlas no reticuladas son inestables en el medio intestinal, mientras que las perlas según la invención son estables más de 7 horas.

50

Ejemplo 3

Características morfológicas de las perlas

55

Se ilustran en las Figuras 2A a 2D. Se observa en los cortes que el centro de las perlas está lleno y denso. La cubierta en superficie corresponde a la PEI. El interior y el exterior tienen estructuras diferentes.

60 Ejemplo 4

Cinética de liberación in vitro

65 1. *Modo de operación*

Se preparan perlas reticuladas con dos concentraciones diferentes de PEI (0,6 y 0,7%) según el ejemplo 1 a partir de pectina amidada y que contiene 5 UI/perla. Se dejan durante 5 horas en un medio intestinal USP XXIV a pH 6,8, se introducen después en medio cólico sintético a pH 6 que contiene enzimas pectinolíticas (Pectinex® Ultra SPL).

ES 2 327 630 T3

Se mide la actividad β -lactamasa residual en las perlas a lo largo del tiempo mediante espectrofotometría en presencia de nitrocefina.

5 2. Resultados

Se ilustran en la Figura 3.

Después de 5 horas de incubación de las perlas en medio intestinal (T_{5H}), se libera menos del 25% de la actividad β -lactamasa que contienen. La liberación se vuelve importante en medio cólico con la acción de enzimas pectinolíticas (T_{10H}) para las perlas reticuladas con 0,6% de PEI, mientras que el blanco sin enzimas pectinolíticas (control T_{10H}) no presenta modificaciones significativas de la actividad β -lactamasa. Por el contrario, las perlas reticuladas con 0,7% de PEI no ven disminuir su actividad después de 5 h en medio cólico. Así, la concentración de PEI modifica la resistencia de las perlas y actúa sobre el tiempo de liberación de los principios activos en medio cólico.

Ejemplo 5

Cinética de liberación in vivo

1. Modo de operación

Se ha realizado este ensayo con ratones macho CD1. Las perlas contienen 4 UI/perla.

Se administran por vía oral a ratones cápsulas duras que contienen 10 perlas. Se recuperan las heces en los tiempos 0, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H y 8H y se detecta la dosificación de β -lactamasa en estas heces (ensayo realizado con 5 animales para cada tiempo). Además, se sacrifica un ratón a tiempo 30 min, 2 h y 4 h con el fin de recuperar las perlas de su tubo digestivo y de observar sus modificaciones morfológicas mediante microscopía electrónica de barrido.

2. Resultados

Se ilustran en las Figuras 4 a 7.

Las perlas llegan intactas al colon aproximadamente después de 3 horas de tránsito.

La tasa de β -lactamasa liberada directamente en las heces de ratón recogidas a diferentes tiempos después de la absorción de las perlas por vía oral muestra que la actividad β -lactamasa de base es baja al inicio. 2 a 4 horas después de la administración, hay un aumento neto de esta actividad, lo que corresponde bien al tránsito de las perlas (Figura 4).

Las fotos tomadas por microscopio electrónico de barrido muestran la integridad de la perla en diferentes lugares del tubo digestivo.

La estructura está ligeramente fragilizada al nivel del intestino delgado y el interior está completamente destruido al nivel cólico, en que las perlas aparecen portando una cavidad.

Las partículas ilustradas en la Figura 5, que han residido en el estómago, tienen un aspecto muy cercano al de aquellas no han sufrido ningún tratamiento (Figura 2). Efectivamente, la superficie tiene el mismo aspecto rugoso e irregular (Figuras 5A y 5B) debido a la presencia de polietilenimina, y el corte de las perlas parece uniforme y denso (Figuras 5C y 5D).

Al cabo de 2 h, se ve aparecer una ligera deformación de las perlas (Figura 6A), pero las partículas siguen teniendo el mismo aspecto superficial (Figura 6B) y un corte denso (Figura 6C), aunque un poco fragilizado por la estancia en el intestino delgado (Figura 6D).

Al final del tránsito, es decir 4 h después de la administración, las perlas se encuentran en el colon; el aspecto externo de las partículas está intacto (Figura 7A), con las mismas irregularidades de superficie debidas a la polietilenimina (Figura 7B). En contraposición, el corte de las perlas está hueco (Figuras 7C y 7D) a causa de la degradación de la red central de pectinato de calcio por las enzimas pectinolíticas cólicas. Al final, sólo queda la “cubierta” externa formada por polietilenimina.

ES 2 327 630 T3

Ejemplo 6

Encapsulación de eritromicina esterasa

5 6.1 Producción de una fracción soluble que contiene eritromicina esterasa

6.1.1. Modo de operación

10 Se realiza el cultivo a partir de la cepa de *E. coli* C600 pIP1100 del Instituto Pasteur. Las condiciones de cultivo son las siguientes: siembra de medio Mueller-Hinton al 0,5% a partir de un precultivo de aproximadamente 20 h, volúmenes de cultivo de 200 o 400 ml en matraz Erlenmeyer, agitación fijada a 150 rpm y temperatura de 37°C.

Un ensayo GOTS ha permitido establecer que la cepa produce bien eritromicina esterasa.

15 Se han concentrado 3,6 l de cultivo de *E. coli* C600 pIP1100 según el protocolo siguiente:

- centrifugación durante 15 min a 3.400 g,
- recogida del sedimento en tampón fosfato de potasio 5 mM, pH 7,5, volumen final 70 ml,
- 20 • segunda centrifugación de sobrenadante de 15 min a 3.400 g,
- recogida del sedimento en 20 ml de tampón fosfato de potasio 5 mM, pH 7,5,
- combinación de los sedimentos de las dos centrifugaciones (aproximadamente 100 ml),
- 25 • lavado de los sedimentos y centrifugación (10 min a 12.000 g),
- segunda centrifugación del sobrenadante (10 min a 12.000 g),
- 30 • volumen final de los sedimentos recogidos en tampón fosfato de potasio: 100 ml.

La eritromicina esterasa es una enzima intracelular. Esto es por lo que su solubilización requiere la rotura de las células. Esta operación se ha efectuado mediante sonicación de los sedimentos de centrifugación recogidos en tampón fosfato de potasio 5 mM, pH 7,5 según el protocolo descrito a continuación.

- 35 • adición de Tritón X100 al 1% (v/v),
- enfriamiento a 5°C
- 40 • 7 ciclos de sonicación de 1 min, temperatura inicial 5°C, temperatura máxima 15°C, potencia 100% (500 W, 20 kHz); temperatura llevada a 5°C después de cada ciclo,
- centrifugación de 10 min a 12.000 g,
- 45 • recogida del sedimento en 10 ml de tampón fosfato de potasio 5 mM, pH 7,5,
- recuperación y congelación del sobrenadante (91 ml)= solución A.

50 Se evalúa la actividad eritromicina esterasa mediante la dosificación microbiológica en el sobrenadante y en las fracciones insolubles (desechos celulares) según técnicas conocidas por el experto en la técnica.

6.1.2. Resultados

Se presentan los resultados en la Tabla 2

55 TABLA 2

Muestra	Diámetro de inhibición (mm)			
	T0	T30	T60	T120
Sobrenadante después de la sonicación	31	25	18	-
	21	-	18	14
Sedimento después de la sonicación	30	28	24	-
	22,5	-	19,5	19

ES 2 327 630 T3

Se evalúa la actividad eritromicina esterasa a partir del diámetro de inhibición.

Este es de 2 U/ml para el sobrenadante de sonicación y de 1,5 U/ml para el sedimento de sonicación (1 unidad (U) = 1 μ g de eritromicina degradada por min).

El resto de recuperación de la actividad eritromicina esterasa se presenta en la Tabla 3 a continuación.

TABLA 3

Muestra	Actividad estimada (U/ml)	Volumen (ml)	Actividad total estimada (U)
Sobrenadante después de sonicación	2,0	92	184
Sedimento después de sonicación	1,5	10	15

Los resultados muestran claramente que el elemento esencial de la actividad eritromicina esterasa presente se ha solubilizado bien en el medio de sonicación.

6.2 Encapsulación de eritromicina esterasa

6.2.1. Modo de operación

Se realiza la encapsulación a partir de la fracción soluble no purificada obtenida después de la rotura de las células (solución A) según el protocolo siguiente.

- Solubilización de 0,5 g de pectina en los 10 ml de solución A con el fin de obtener una concentración final de pectina del 5% (solución B). Se añade la pectina muy progresivamente con agitación magnética con el fin de no causar variaciones demasiadas bruscas de pH. Se mantiene el pH aproximadamente a 7 mediante la adición de varias gotas de sosa 1 M.
- Dispersión de la solución de pectina (solución B) gota a gota con la ayuda de una bomba peristáltica en 40 ml de CaCl_2 al 6%. Se mantienen las perlas así formadas en CaCl_2 durante 20 minutos, se recuperan mediante filtración en Büchner y después se aclaran con agua desmineralizada.
- Reticulación de perlas mediante baño en una solución de PEI al 0,6% durante 20 min con agitación magnética.
- Recuperación de las perlas reticuladas mediante filtración.
- Secado de las perlas a temperatura ambiente (20°C). Se han preparado 567 perlas en un total de 6,1 ml de mezcla de pectina/solución A, para una actividad de 12,2 U.
- Desagregación de las perlas secadas en un tampón HEPES/NaCl/1% de EDTA.

6.2.2. Resultados

Se dosifican la actividad eritromicina esterasa presente en la solución inicial de pectina y la liberada en el medio de desagregación según el mismo protocolo que anteriormente.

Se presentan los resultados de la dosificación microbiológica en las Tablas 4 y 5.

ES 2 327 630 T3

TABLA 4

Muestra	Diámetro medio de inhibición (mm)
Pectina/solución A (solución B)	23
Pectina/solución A- T3h	19
Perlas desagregadas- T0	24
Perlas desagregadas – T3h	18

TABLA 5

Muestra	Actividad estimada (U)
Pectina (solución B)	2,4
Perlas desagregadas	2,2

Los resultados muestran que la actividad medida en presencia de pectina (solución B) es de 2,4 U, mientras que la actividad teórica presente debería ser de aproximadamente 12 U (6,1 ml a 2 U/ml, según la dosificación de eritromicina esterasa en el sobrenadante de sonicación (Tabla 3).

La dosificación de actividad enzimática de las perlas después de desagregación se ha estimado en 2,2 U; representa un 90% de la actividad inicial introducida en las perlas.

Estos resultados permiten establecer sin ambigüedad la presencia de actividad eritromicina esterasa en la fracción final después de encapsulación de la enzima y desagregación de las perlas.

Ejemplo 7

Encapsulación de ADN en las perlas de pectinato de calcio

7.1 Preparación de ADN

El principio activo encapsulado aquí es un plásmido radiomarcado con fósforo 33. El radiomarcaje se hace con la ayuda del "Nick Translation Kit" N5500 de Amersham Biosciences según el protocolo descrito por el proveedor.

7.2 Encapsulación

7.2.1. Modo de operación

El ADN encapsulado está o bien en forma libre o bien complejado con lípidos catiónicos (lipoplexo) o con un polímero catiónico (polioplexo) según el modo de operación descrito en el ejemplo 1.

Para el ADN libre, se introducen aproximadamente 5 μg de ADN radiomarcado en solución de 750 μl de agua MilliQ en 0,75 g de una solución de pectina, amidada o no, al 10% con el fin de obtener una concentración final de pectina del 5%. En el caso de lipoplexos, se mezclan 375 μl de una solución acuosa de ADN radiomarcado con 375 μl de una suspensión de liposomas catiónicos (relación N/P de 10). Los 750 μl de lipoplexos así obtenidos se mezclan a continuación con 0,75 g de solución de pectina al 10% con el fin de obtener una concentración final de pectina del 5%.

En el caso de los polioplexos, se mezclan 375 μl de una solución acuosa de ADN radiomarcado con 375 μl de una solución acuosa de PEI 4 mM. Se mezclan a continuación 375 μl de la suspensión de polioplexos así obtenidos con 0,75 g de solución de pectina al 10% con el fin de obtener una concentración final de pectina del 5%.

Se preparan a continuación perlas de pectinato de calcio que encapsulan ADN libre o complejado a partir de soluciones obtenidas anteriormente según el procedimiento descrito en el ejemplo 1. La concentración de cloruro de calcio usada aquí es del 5% y la de PEI para reticulación es del 0,6%.

7.2.2. Resultados

Se ilustran en la Figura 8, que muestra los rendimientos de encapsulación de un ADN de plásmido en perlas de pectina amidada o no amidada.

5

El ADN encapsulado está o bien en forma libre o bien complejado con lípidos catiónicos (lipoplexo) o un polímero catiónico (poliplexo).

10

Los rendimientos de encapsulación de ADN varían entre 60 y 90% según el tipo de pectina usada. Son generalmente mayores con la pectina amidada. La complejación con lípidos o con un polímero catiónico no causa modificaciones significativas de estos rendimientos, que permanecen relativamente elevados.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 327 630 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Forma galénica multiparticulada apta para usar por vía oral y destinada al suministro cólico de principios activos, **caracterizada** porque comprende perlas de pectina presente en forma de una sal catiónica que comprende el principio activo, estando dicha pectina reticulada con un polímero catiónico elegido del grupo constituido por polietilenimina, polilisina y sus derivados.
- 10 2. Forma galénica según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el polímero catiónico es polietilenimina.
- 10 3. Forma galénica según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque el polímero catiónico tiene un peso molecular comprendido entre 10.000 y 100.000 Daltons, preferiblemente entre 20.000 y 50.000 Daltons.
- 15 4. Forma galénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque la sal de pectina es un pectinato de calcio preparado a partir de una pectina amidada o no amidada.
- 15 5. Forma galénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque se prepara a partir de una solución de pectina al 4-10% (m/v), ventajosamente de 4 a 7% (m/v), de una solución de cloruro de calcio al 2-10% (m/v) y de una solución de polietilenimina al 0,5-2% (m/v).
- 20 6. Forma galénica según la reivindicación 5, **caracterizada** porque la solución de pectina es al 6%, la solución de cloruro de calcio al 6% y la solución de polietilenimina al 1 ó 0,6%.
- 25 7. Procedimiento de preparación de una forma galénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:
- 25 a) preparación de una solución acuosa de pectina que contiene el principio activo,
- 30 b) adición de la solución obtenida en la etapa a) a una solución acuosa de una sal catiónica divalente, de manera que se obtengan perlas de pectina en forma de una sal catiónica que comprende el principio activo, y
- 30 c) reticulación de dichas perlas mediante introducción en una solución acuosa del polímero catiónico.
- 35 8. Procedimiento de preparación de una forma galénica según la reivindicación 7, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:
- 35 a) preparación de una solución de pectina al 4-10% (m/v), ventajosamente de 4 a 7% (m/v), que contiene el principio activo,
- 40 b) adición de la solución obtenida en la etapa a) a una solución de cloruro de calcio al 2-10% (m/v), y
- 40 c) reticulación por una solución de polietilenimina al 0,5-2% (w/v).
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la solución de pectina es al 6%, la solución de cloruro de calcio al 6% y la solución de polietilenimina al 1% ó 0,6%.
- 45 10. Forma galénica multiparticulada apta para usar por vía oral y destinada al suministro cólico de principios activos, **caracterizada** porque puede obtenerse mediante un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
- 50 11. Forma galénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 10, **caracterizada** porque el principio activo se elige entre antibióticos, compuestos antiinflamatorios, antihistamínicos, anticolinérgicos, antivíricos, antimicrobóticos, péptidos, proteínas, genes, oligonucleótidos no codificantes, agentes de diagnóstico, agentes inmunosupresores y/o bacterias, preferentemente entre agentes antitumorales y enzimas capaces de inactivar los antibióticos al nivel del colon.
- 55 12. Forma galénica según la reivindicación 11, **caracterizada** porque las enzimas se eligen del grupo constituido por β -lactamasas, enzimas capaces de inactivar macrólidos y similares, y enzimas capaces de inactivar quinolonas.
- 60 13. Forma galénica según la reivindicación 11, **caracterizada** porque la enzima es la eritromicina esterasa.
- 60 14. Composición farmacéutica que comprende una forma galénica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende una enzima capaz de inactivar un antibiótico, administrada en combinación con el antibiótico correspondiente para un uso simultáneo o sucesivo en terapia antibiótica.
- 65

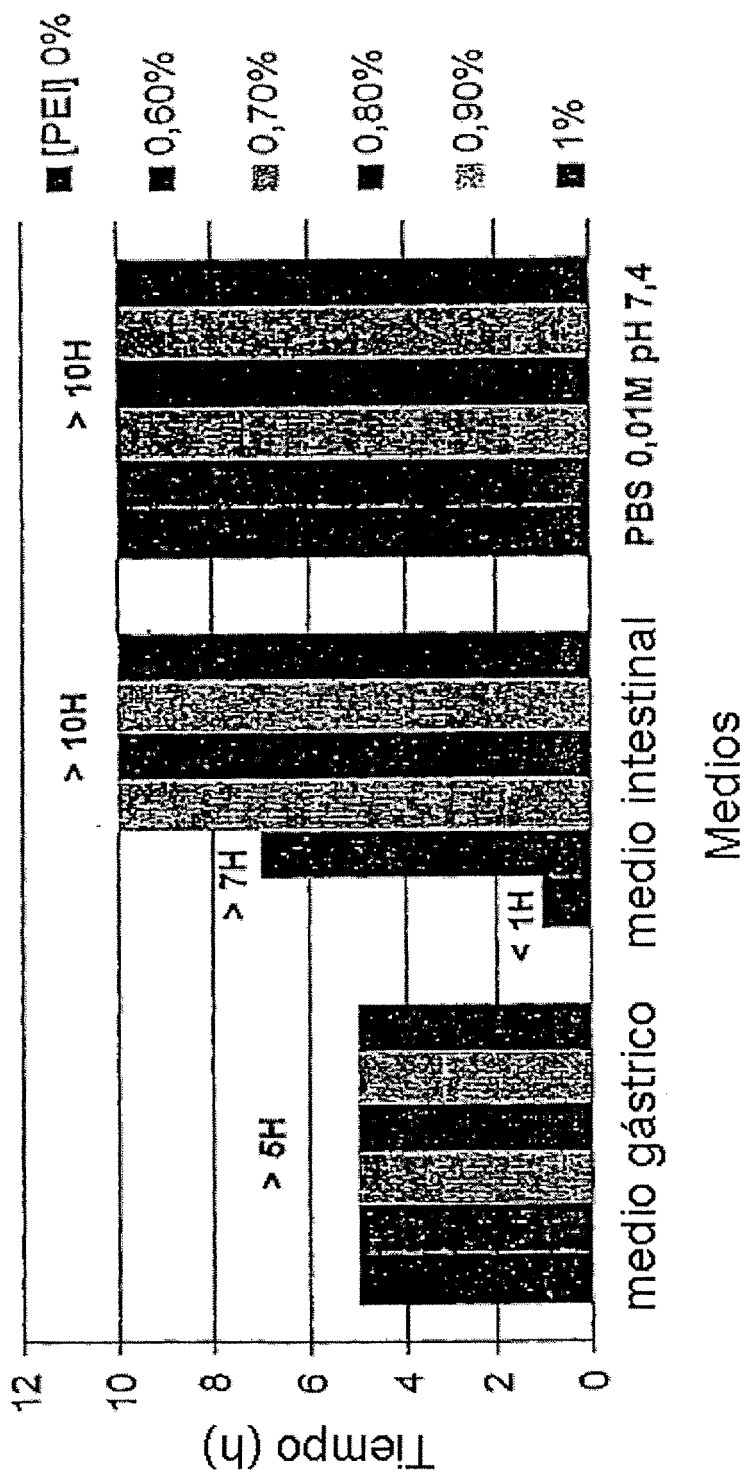
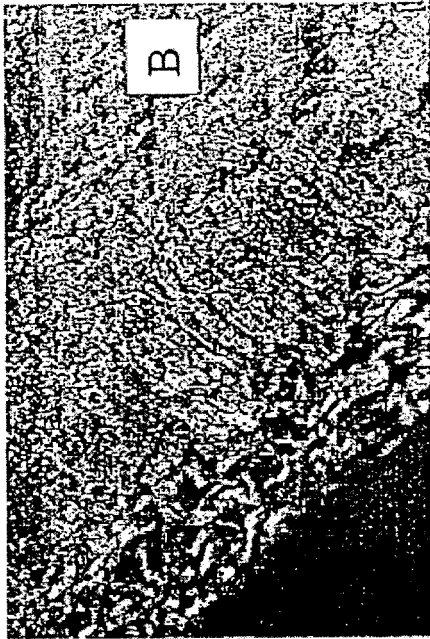
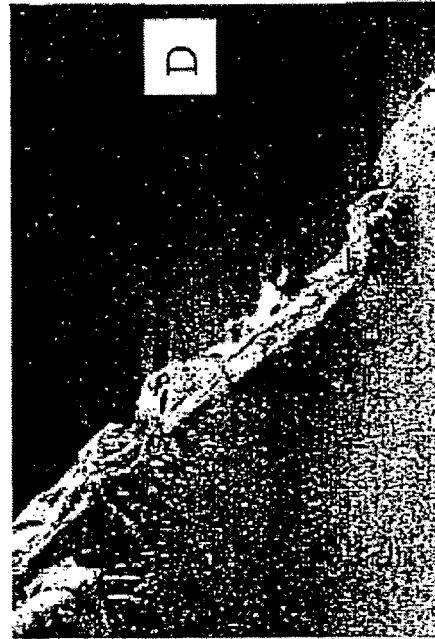


Figura 1



Perlas enteras



Perlas cortadas

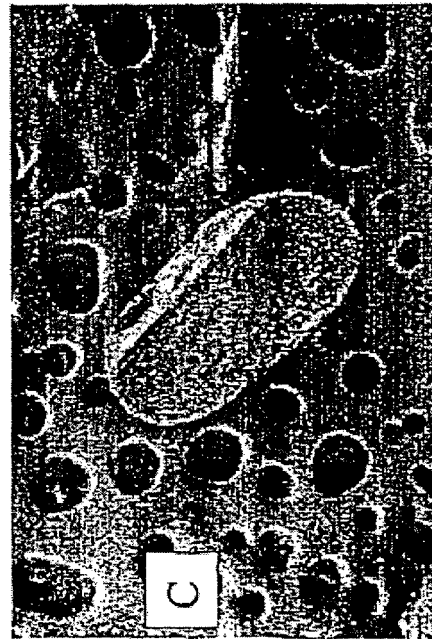
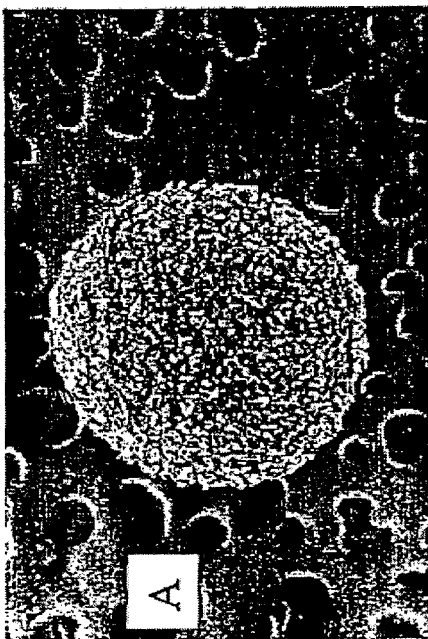


Figura 2

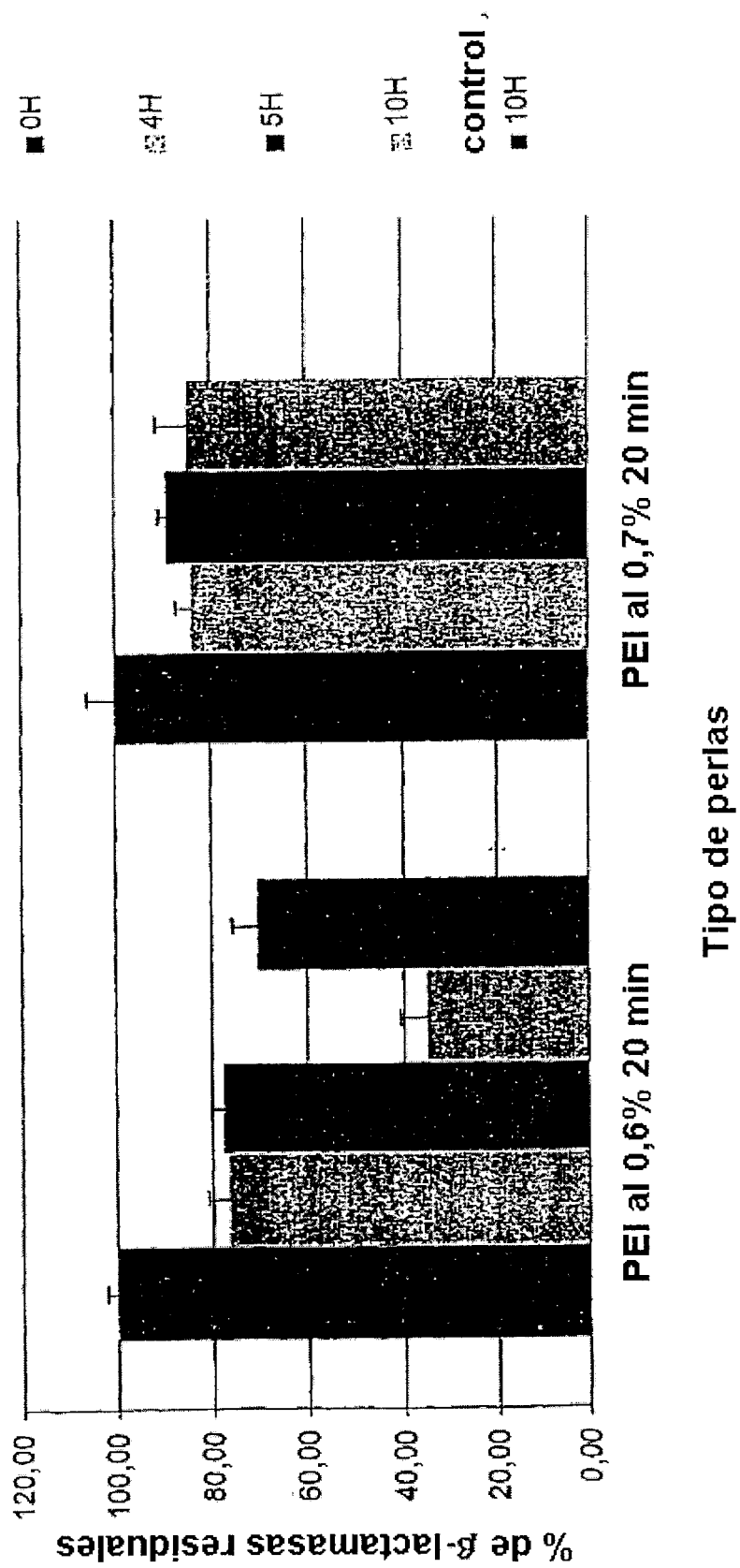


Figura 3

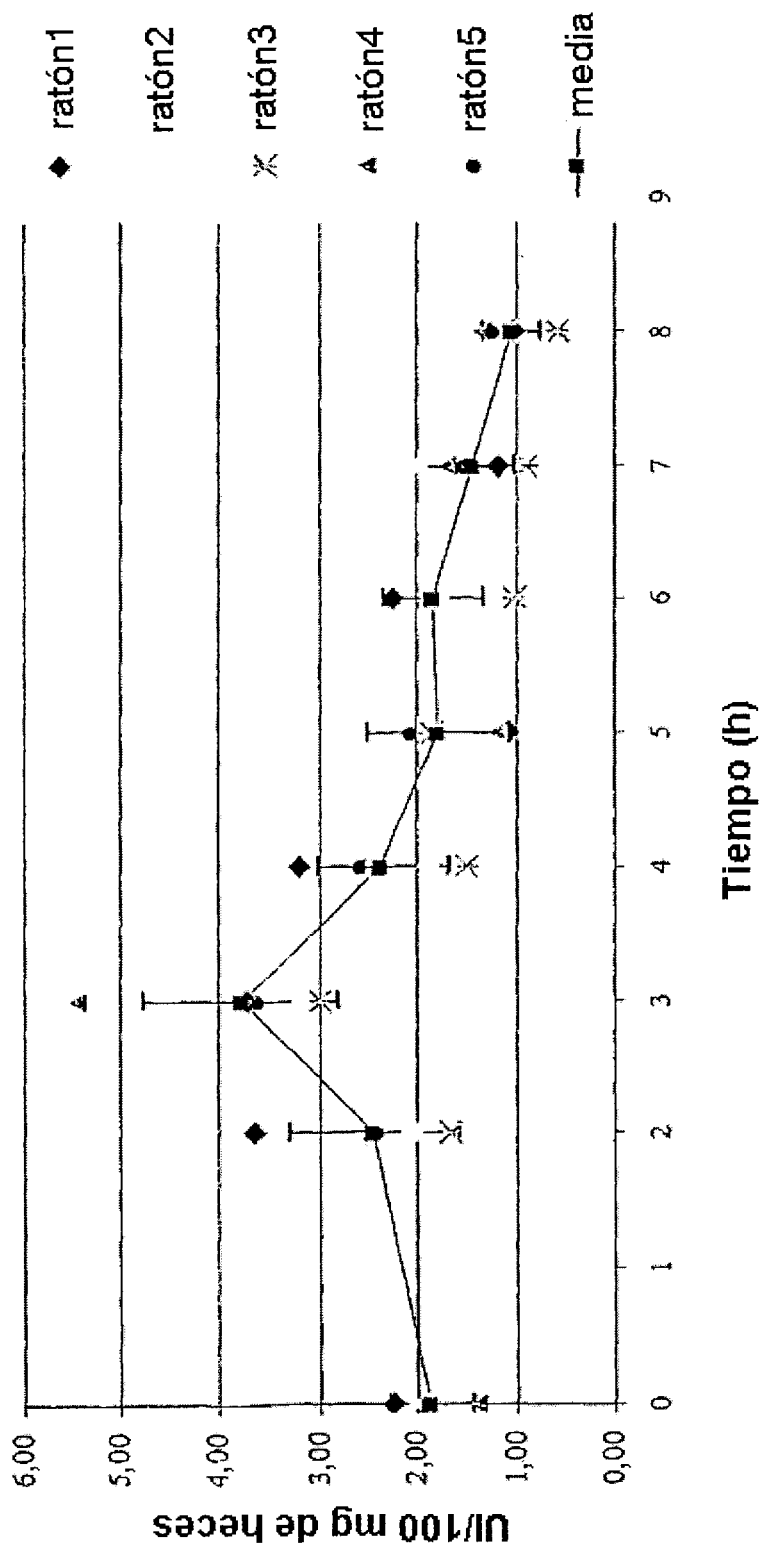


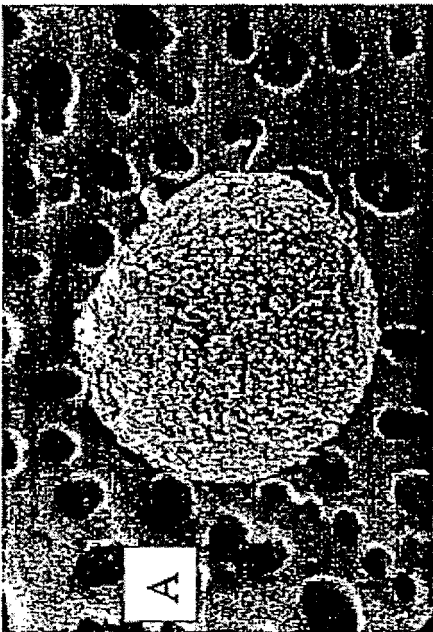
Figura 4



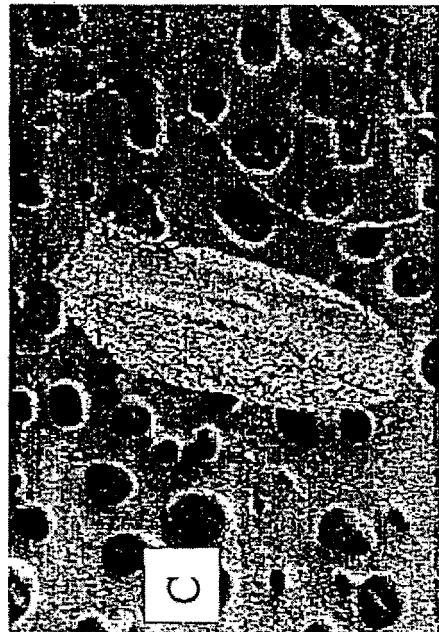
Perlas enteras



Perlas cortadas



A



C

Figura 5



Perlas enteras



Perlas cortadas

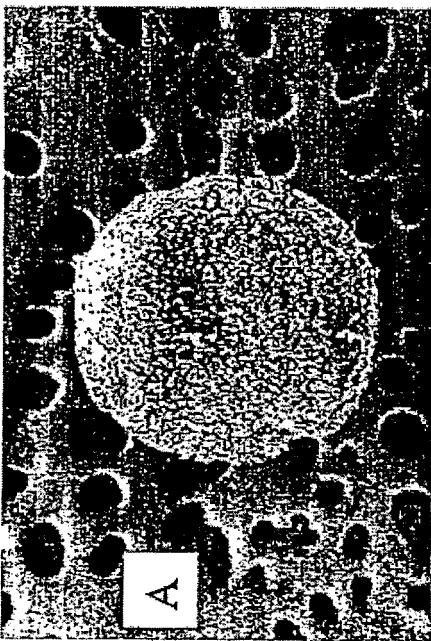
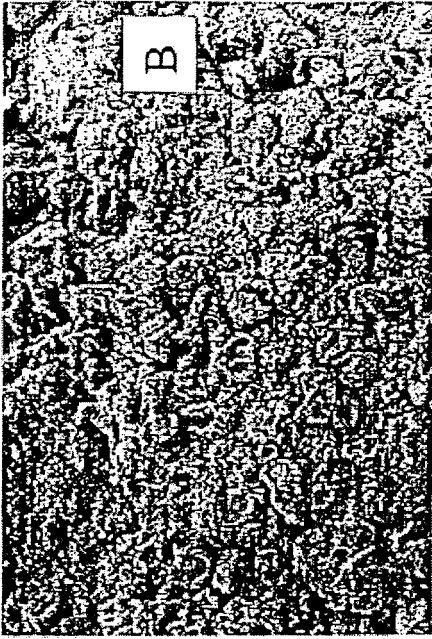


Figura 6



Perlas enteras



Perlas cortadas

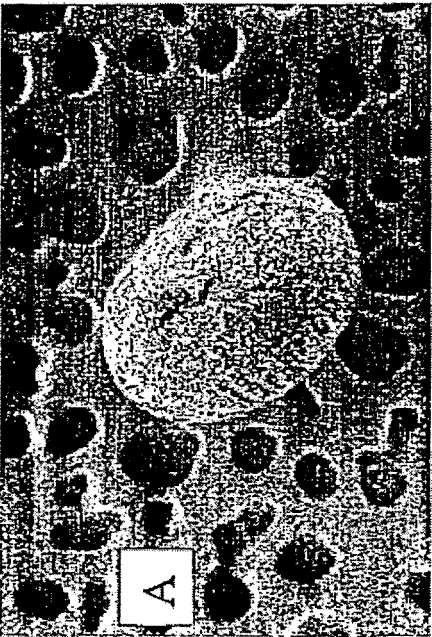


Figura 7

Rendimientos de encapsulación en las perlas de pectinato de calcio de ADN de plásmido complejado o no con lípidos o polímeros catiónicos

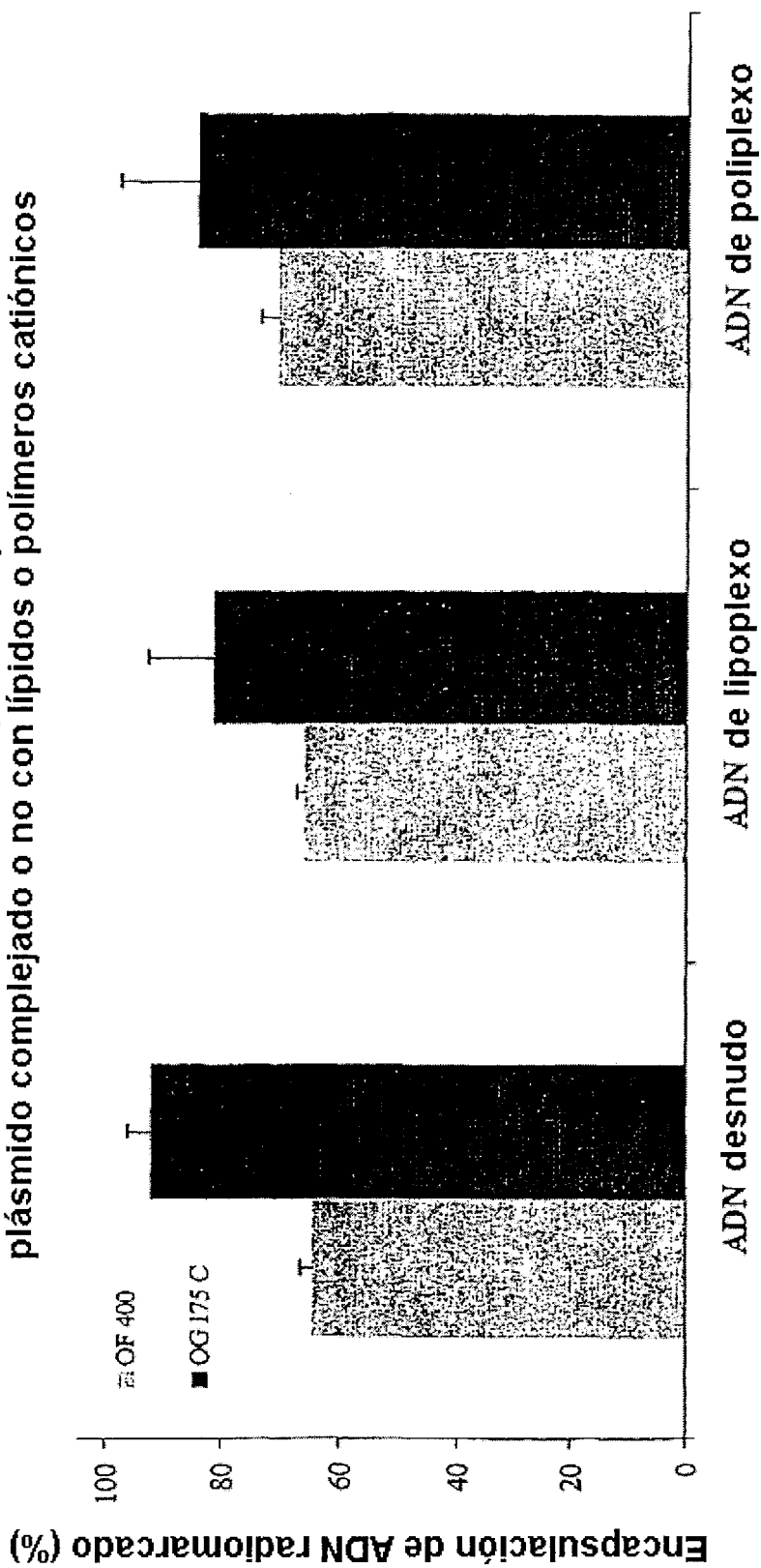


Figura 8