

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

NOUVELLES FORMES PHARMACEUTIQUES DE LA MÉSALAMINE
POUR LA LIVRAISON COLONIQUE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MARIA MIHAELA FRICIU

MARS 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur de recherche, le professeur Mircea Alexandru Mateescu, de m'avoir accepté dans son laboratoire, de sa générosité et de son soutien scientifique qu'il m'a accordé durant mes études à la maîtrise.

Je désire remercier le Dr Pompilia Ispas-Szabo pour son aide bénéfique et pour nos discussions scientifiques. Je désire aussi remercier la société Axcan Pharma pour leur collaboration et leur soutien financier.

Je tiens à remercier le Dr Canh Tien Le pour son implication dans le projet et également pour son soutien et ses conseils indispensables.

Mes remerciements s'adressent également à mes collègues de laboratoire pour leur aide et soutien ainsi que pour les bons moments passés ensemble. Je tiens également à remercier le Dr Phuong Nguyen pour l'aide et le soutien accordé.

J'adresse mes remerciements au professeur Hu Van Tra pour son soutien accordé pendant la première année de maîtrise.

Je désire remercier à toute ma famille pour leur soutien et leur amour tout au long de mes études et spécialement à ma mère qui m'a insufflé la force et la détermination à atteindre mes objectifs.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ	x
CHAPITRE I	
L'AMIDON, LE CARBOXYMÉTHYLAMIDON, LA LÉCITHINE ET LE SUCRALFATE DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE	1
1.1 L'amidon – structure et propriétés	1
1.1.1 La structure de l'amidon et de ses composés	1
1.1.2. Modifications structurales de l'amidon lors des traitements thermiques	5
1.1.3 Le carboxyméthylamidon et ses complexes avec applications pharmaceutiques	9
1.2 La lécithine – origine, structure et propriétés.....	12
1.2.1 L'origine et la structure de la lécithine.....	12
1.2.2 Les propriétés de la lécithine.....	14
1.2.3 La lécithine dans l'industrie	15
1.3 Le sucralfate – structure et propriétés	17
CHAPITRE II	
LA LIVRAISON CIBLÉE DE PRINCIPES ACTIFS AU CÔLON	20
2.1 Facteurs déterminants dans la conception de systèmes à libération ciblée au côlon.....	21
2.2 Les approches de la libération des agents actifs au côlon	22
2.2.1 Les systèmes basés sur les variations de pH	23
2.2.2 La libération retardée	25
2.2.3 Les systèmes à libération ciblée contrôlés par l'osmose et par la pression.....	26
2.2.4 Les systèmes déclenchés par l'activité bactérienne au côlon.....	28
2.3 Polymères utilisés dans les systèmes de libération ciblée de principes actifs au côlon ...	29
CHAPITRE III	
ADMINISTRATION DE LA MÉSALAMINE PAR LA VOIE ORALE	31
3.1. Les maladies inflammatoires de l'intestin et la mésalamine	31
3.2. Mésalamine – généralités.....	32
3.2.1. La structure et les propriétés physico-chimiques de la mésalamine	33

3.2.2. Le mécanisme d'action de la mésalamine.....	34
3.2.3. Le métabolisme de la mésalamine	36
3.3. Systèmes à libération contrôlée de la mésalamine	37
3.3.1 Les promédicaments.....	38
3.3.2 L'enrobage sensible au pH.....	41
3.3.3 L'enrobage à l'éthyle cellulose	42
3.3.4 Les suppositoires et les suspensions rectales	43
CHAPITRE IV	
PRÉSENTATION DU PROJET	45
CHAPITRE V	
LE COMPLEXE CARBOXYMÉTHYLAMIDON/LÉCITHINE POUR LA LIBÉRATION CIBLÉE DE LA MÉSALAMINE.....	51
5.1 Le complexe carboxyméthylamidon/lécithine comme matrice pour la libération ciblée : I. Formes monolithiques de mésalamine pour la livraison colonique.....	52
5.2 Nouveau système à libération contrôlée de la mésalamine.....	78
CHAPITRE VI	
DISCUSSIONS ET CONCLUSION	84
ANNEXE	
LES COMPLEXES MÉSALAMINE-SUCRALFATE: PRÉPARATION, CARACTÉRISATION ET APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES	91
BIBLIOGRAPHIE	114

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Les structures de l'amylose (a) et de l'amylopectine (b)	2
1.2 Les structures de l'amylose de type A et B.	4
1.3 Représentation schématique des changements structuraux.....	7
1.4 La topographie de l'amylose... ..	8
1.5 Représentation schématique d'un complexe d'inclusion.	9
1.6 Représentation schématique du carboxyméthylamidon.....	10
1.7 Les formules générales des phospholipides.	13
1.8 Structure chimique du complexe de sucralfate.	18
2.1 Structure chimique de l'Eudragit L et S.....	24
2.2 Représentation schématique du système Pulsincap™.....	26
2.3 Représentation schématique du système osmotique.	27
3.1 Le processus d'ionisation de la mésalamine.	34
3.2 La variation de la solubilité de la mésalamine en fonction du pH	34
3.3 La synthèse des prostanoïdes et des substances apparentées.	36
3.4 L'hydrolyse bactérienne du pont azoïque du sulfasalazine.....	39
3.5 Représentation schématique de la formulation de l'Asacol®	41
3.6 Représentation schématique de la formulation de Pentasa®	43
4. 1 Présentation schématique des différentes étapes du projet de maîtrise.....	48
5.1.1 Release kinetic profiles of mesalamine from tablets.....	62
5.1.2 Iodine stained samples	65
5.1.3 FT-IR spectra of untreated tablets of Hylon VII, CMS and CMS/L.....	66
5.1.4 FT-IR spectra of tablets incubated in SGF and SIF	67
5.1.5 XRD patterns.....	68
5.1.6 Hypothetical structure of CMS/L complex	70
5.1.7 Scanning electron microscopy micrographs	71
5.1.8 Release profiles of mesalamine from coated tablets	73
5.1.9 Swelling properties of CMS/L based matrix.....	75
5.1.10 Release profiles in SIF at pH 6.5 or pH 7.5 of mesalamine.....	76

5.2.1 Release profiles of mesalamine.....	82
5.2.2 X-ray diffraction of native and derivative starch.....	83
A.1 Sucralfate structure.....	96
A.2 Ionization processes of MES, cationic, amphoteric and anionic species.	99
A.3 XRD patterns.....	102
A.4 SEM of Mesalamine and Sucralfate	103
A.5 Comparison of SEM	104
A.6 DSC curves	105
A.7 IR spectra of treated MES and SUC, the physical mixture of treated powders.	106
A.8 IR spectra of treated MES and CD MES:SUC.....	108
A.9 ¹ H-NMR spectrum.....	109
A.10 Schema of the mechanism of MES and SUC complexation.	112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
3.1 La classification des formes commerciales orales de mesalamine.....	38
A.1 Observations of the Mesalamine&Sucralfate mixed aqueous suspensions	100
A.2 Variation of C–O absorbance of various ratios of co-spray dried powders.	107
A.3 Chemical shifts of PM and CD MES:SUC 50:50 in NaCl/D ₂ O.....	110
A.4 Variation of the normalized resonance bands of MES for TPM and CD suspended in NaCl/D ₂ O.	110

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
CDB	Calorimétrie différentielle à balayage
CMA	Carboxyméthylamidon
COX	Cyclo-oxygénase
DP	Degré de polymérisation
DRX	Diffraction des rayons X
DS	Degré de substitution
E/H	Eau dans l'huile
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Facteurs de croissance des fibroblastes
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
H/E	Huile dans l'eau
HPETE	Acide hydroperoxyeicosatetraenoïques
HPMC	Hydroxypropyl methylcellulose
IL-1	Interleukine-1
ILPS	Société Internationale de la lécithine et des phospholipides
L	Lécithine
LTB4	Leucotriènes B4
MEB	Microscopie électronique de balayage

MES	Mésalamine
MII	Maladies inflammatoires de l'intestin
NF-kB	Facteur nucléaire-kB
PE	Phosphatidyl-éthanolamine
PI	Phosphatidyl-inositol
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SUC	Sucralfate
SOSNa	Sucrose octasulfate de sodium
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale- α

RÉSUMÉ

La mésalamine est couramment utilisée dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin (MII) et son efficacité est étroitement reliée à une action locale, au niveau du côlon. L'absorption systémique de la mésalamine, dans les parties pré-coloniques, entraîne non seulement une réduction importante de la dose efficace, mais aussi un risque élevé des effets indésirables. Actuellement, les formes commerciales (*i.e.* Asacol®) administrées par voie orale sont majoritairement basées sur un système pH-dépendant. L'inconvénient majeur de cette technologie est la grande variation interindividuelle du pH gastro-intestinal avec un impact notable sur le profil de libération de la mésalamine. L'objectif principal de la présente recherche a été d'élaborer un nouveau système pH-indépendant qui assure une protection de la mésalamine durant le passage gastrique et une livraison dans le côlon. Pour y parvenir, un nouvel excipient à base de Carboxyméthylamidon (CMA) a été mis au point et utilisé comme excipient pour le transport de la mésalamine dans le côlon. Le CMA a été déjà proposé comme matrice pour la libération contrôlée de petites molécules ou des agents bioactifs mais il reste moins performant pour la livraison au côlon à cause de sa solubilité élevée dans un milieu neutre et de sa sensibilité à l'amylolyse. Dans ce contexte, nous avons considéré la complexation du CMA avec la lécithine (L) afin d'obtenir une matrice plus hydrophobe qui pourrait assurer une libération retardée des substances actives. Le complexe CMA/L a été obtenu par traitement à haute température du mélange de CMA et de L. La formation du complexe a été élucidée à l'aide du test d'iode, des analyses d'infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), de diffraction des rayons X (DRX) et de la microscopie électronique de balayage (MEB). Les résultats ont montré qu'il y a une insertion partielle des chaînes alkyle de l'acide gras à l'intérieur de l'hélice du CMA, tandis que la partie polaire est dirigée à l'extérieur. De plus, certaines parties alkyles des L non incluses dans l'hélice (extra-hélicales) sont stabilisées entre les deux chaînes macromoléculaires de CMA via des interactions ioniques et associations hydrophobes. L'étude des profils de dissolution a montré qu'il y a une très faible (<5 %) libération de mésalamine pour les premières 5 h, mais une libération rapide à partir de 6 h et complète après 8 h dans le milieu intestinal simulé. Aucune différence significative n'a été observée entre les profils cinétiques de la mésalamine à des différentes valeurs de pH du milieu intestinal (6,5-7, 5) suggérant que la matrice CMA/L est un système pH-indépendant au niveau intestinal. Par ailleurs, en variant la proportion de la matrice, une libération temps-dépendante a été observée, ce qui permet de «programmer» la livraison des médicaments aux sites désirés. Ce type de complexe est différent des complexes de l'amidon (amylose) avec des acides gras (monoalkyles) inclus dans la structure hélicoïdale et aussi différent des complexes polyélectrolytes du CMA avec le chitosane. À notre connaissance, cette étude est une des premières à mettre en évidence des relations entre l'amidon modifié et les lipides dialkyles, ce qui pourrait servir de base à différentes applications telles que cosmétique, nutraceutique ou alimentaire, etc.

Un autre complexe à base de mésalamine (MES) et de sucralfate (SUC) a été préparé et caractérisé. Les études d'analyse structurale ont montré que les interactions entre la MES et le SUC ont lieu dans le milieu aqueux. Selon notre hypothèse dans ce type de complexes, le sucralfate par ses propriétés muco-adhésives, pourrait prolonger le temps de séjour du comprimé dans le côlon.

Mots clés : Carboxyméthylamidon, Lécithine, Complexe, Libération temps-dépendante, Côlon, Mésalamine, Maladies inflammatoires de l'intestin.

CHAPITRE I

L'AMIDON, LE CARBOXYMÉTHYLAMIDON, LA LÉCITHINE ET LE SUCRALFATE DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE

1.1 L'amidon – structure et propriétés

1.1.1 La structure de l'amidon et de ses composés

L'amidon est produit par les plantes vertes et constitue la source d'énergie potentielle stockée pour de longues périodes. Il est produit lors de la photosynthèse du dioxyde de carbone dans les chloroplastes sous forme de produit de stockage temporaire et dans les amyloplastes où il représente la forme de conservation pour de longues périodes. Il se présente sous forme de granules composés de polymères du glucose et localisés principalement dans les graines, les racines et les tubercules, ainsi que dans les feuilles et les fruits. En fonction de leur origine botanique, les granules d'amidon peuvent prendre des formes et tailles variées (Hoover, 2001).

Les approches de biologie moléculaire ont permis d'explorer, en profondeur, le processus de biosynthèse de l'amidon et d'avoir une vision plus large de l'organisation des processus enzymatiques impliqués. Du point de vue moléculaire, l'amidon est composé de l'amylose et l'amylopectine, que l'on peut isoler et étudier séparément. Les deux fractions contiennent des chaînes de polymères des groupes glucosiques, mais la manière dont elles sont structurées est différente d'un composé à l'autre.

L'amylose, présente dans les granules d'amidon produits par la plupart des plantes, est un polysaccharide non ramifié formé d'unités de D-glucose liés par des liaisons 1,4- α -glycosidiques (Figure 1.1). Le concept de macromolécule non ramifiée de l'amylose a été adopté, car la structure est susceptible à l'hydrolyse avancée en unités de maltose par l'enzyme bêta-amylase. Cette enzyme peut hydrolyser seulement les liaisons 1,4- α -

glycosidiques, à partir de l'extrémité non réductrice, avec libérations successives de maltose. Son action est bloquée au niveau des ramifications. Après l'hydrolyse enzymatique avec la bêta-amylase, les macromolécules linéaires sont complètement transformées en maltose, tandis que les chaînes ramifiées donnent des dextrines ramifiées (Buléon et al., 1998).

L'amylopectine se présente sous forme d'une structure dense, hautement ramifiée avec des liaisons 1,4- α - et 1,6- α -glycosidiques qui ont un impact important sur les propriétés physiques et biologiques (Figure 1.1). L'amylopectine est composé de deux types de chaînes : i) longues constituant le squelette possédant un degré de polymérisation (DP) élevé (45 unités de glucose) et ii) courtes avec un DP compris entre 15 et 20 unités de glucose, attachées sur les chaînes longues (Oates, 1997).

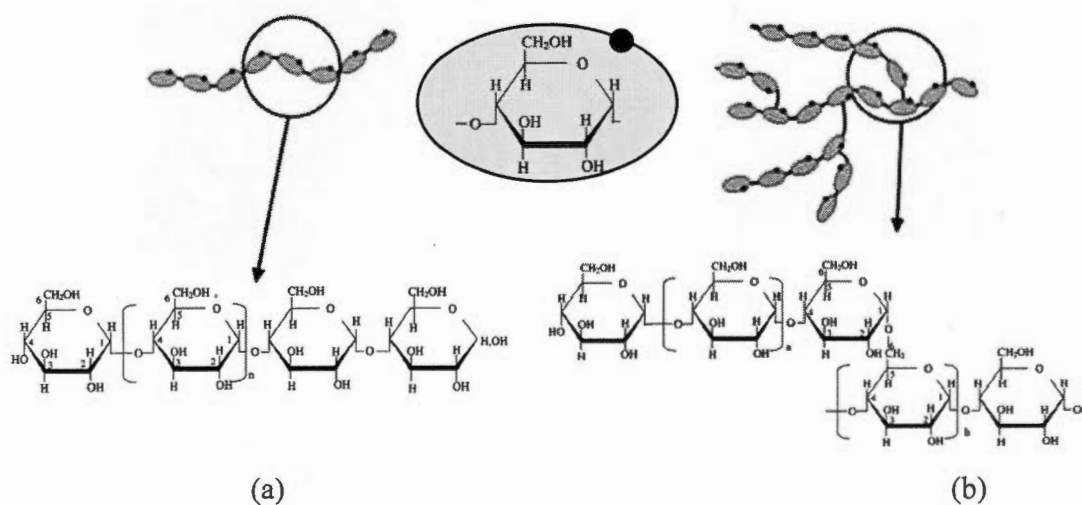


Figure 1.1 : Les structures de l'amylose (a) et de l'amylopectine (b)

L'amylose et l'amylopectine ont des propriétés différentes. L'amylose de haute masse moléculaire permet d'obtenir des gels visqueux et des films fermes tandis que l'amylopectine, dispersé dans l'eau, est plus stable et fournit des gels avec une viscosité moindre (Pérez et Bertoft, 2010). Le contenu de ces deux fractions dans différents amidons varie selon la source dont ils proviennent. La majorité des amidons contiennent 20-30% d'amylose et 70-80%

d'amylopectine (Pérez et Bertoft, 2010). Toutefois, des amidons hybrides ayant un contenu élevé en amylose peuvent être obtenus par des méthodes génétiques. Ainsi, l'amidon de type Hylon V contenant 56,8% amylose et l'amidon de type Hylon VII ayant 71% amylose ont été obtenus et commercialisés (National Starch, USA). Les différents rapports entre les deux composants peuvent influencer les propriétés physiques et la fonctionnalité de l'amidon.

La structure semi-cristalline du granule d'amidon est organisée sous forme de lamelles concentriques. Les parties cristallines, constituées principalement de chaînes d'amylose sont organisées en doubles hélices et sont disposées en alternance avec les parties amorphes du granule (French, 1984). Ces formes cristallines peuvent être identifiées à l'aide de diagramme de diffraction des rayons X. Ainsi, quatre formes polymorphes de l'amidon ont été identifiées et caractérisées : le type A, B, C et V. L'amidon de type A est présent dans l'amidon de céréales, le type B est caractéristique pour les amidons de tubercules et le type C est intermédiaire entre le type A et B, observé pour les amidons de semences de légumineuses (Biliaderis, 1991). La forme V, caractéristique pour l'amylose capable de former des complexes avec des acides gras et monoglycérides, est rarement détectée dans les amidons natifs (Buléon et al., 1998).

Les structures polymorphes de type A et B sont organisées sous forme de doubles hélices parallèles et stabilisées par des interactions Van der Waals et par des ponts d'hydrogène (Figure 1.2). La symétrie des doubles hélices diffère légèrement entre les deux types A et B. Les polymorphes A et B présentent une similitude au niveau de la structure hélicoïdale en suggérant la possibilité d'avoir des transitions entre les deux formes (Imberty et al., 1991). Les doubles hélices sont empaquetées de façon antiparallèle et compacte avec une faible teneur en eau pour le polymorphe de type A, tandis que le polymorphe de type B présente une structure plus ouverte contenant une cavité hydratée (Figure 1.2). Dans la forme A, l'unité de répétition est représentée par une unité de maltotriose, alors que l'unité de maltose réalise la répétition de la forme B (Imberty et al., 1991). Les conditions requises pour générer l'un de ces deux types de structures polymorphes de l'amylose sont bien documentées. Dans des conditions fraîches et humides (comme dans un tubercule de pomme de terre) la formation du polymorphe de type B a lieu, alors qu'à une température plus élevée et au sec (par exemple

dans un grain de céréales) la forme de type A est prépondérante (Tester, Karkalas et Qi, 2004).

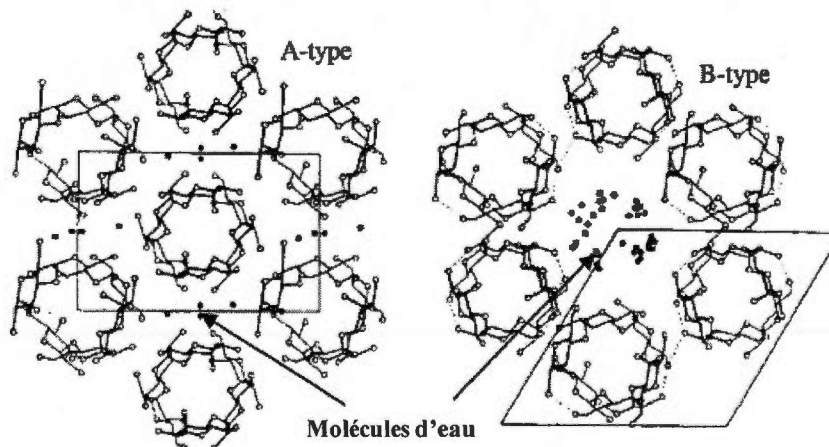


Figure 1.2 : Les structures de l'amylose de type A et B.
(d'après Tester, Karkalas et Qi, 2004)

Les études par diffraction de rayons X ont montré que la configuration de l'amylose obtenue suite au chauffage d'une solution d'amidon est différente des modèles originaux (A, B ou C). Cette nouvelle configuration est caractérisée par une structure hélicoïdale de type hélice simple dénommée la forme V de l'amylose. Ce changement est aussi observé en présence de certains agents complexants tels que des lipides monoalkylés, des émulsifiants, des alcools ou des composés aromatiques. La structure hélicoïdale de l'amylose V présente 6 unités de glucose par tour d'hélice. La cavité interne de l'hélice simple est plus large que celle observée pour les types A et B et elle présente un caractère hydrophobe bien délimité (Immel et Lichtenthaler, 2000) qui lui permet d'incorporer les différents agents complexants sous mentionnés (Figure 1.4).

1.1.2. Modifications structurales de l'amidon lors des traitements thermiques

1.1.2.1 La gélatinisation

L'amidon est un polysaccharide ayant une grande affinité pour l'eau. Les granules d'amidon gonflent légèrement dans l'eau froide (10-20%), en raison de la diffusion et l'absorption de l'eau dans les régions amorphes. Ceci conduit à la formation des liaisons d'hydrogène entre les molécules d'eau et les groupes hydroxyle de l'amylose et de l'amylopectine. Ce processus est réversible, car après dessiccation les granules d'amidons ne présentent aucune modification structurale (Biliaderis, 1991). Cependant, lorsque les granules sont chauffés dans de l'eau à des températures plus élevées, mais en dessous de la température de gélatinisation, on atteint un point où le gonflement des granules devient irréversible et l'ordre structural disparaît tel que détecté par diffraction des rayons X. Durant le gonflement des granules, les liaisons d'hydrogène sont détruites et les macromolécules d'amylose vont être libérées dans la phase aqueuse intergranulaire. Ce processus entraîne une augmentation rapide de la viscosité. La gélatinisation est un phénomène impliquant l'hydratation et le gonflement des granules d'amidon avec la solubilisation des molécules d'amylose se qui se traduit par une perturbation de la structure granulaire et une transition de l'état d'ordre à l'état de désordre structurel (Appelqvist et Debet, 1997).

1.1.2.2 La gélification

Pendant le processus de gélatinisation, le gonflement et la libération de l'amylose dépendent du type d'amidon, de sa concentration, de la température, de la présence d'autres solutés, et de la force de cisaillement pendant le chauffage. Lors du refroidissement d'une dispersion d'amidon gélatinisé, la formation d'un gel laxo aura lieu. Le processus de formation de gels à partir d'une solution d'amidon qui a préalablement été chauffée et refroidie est connu sous le nom de gélification (Appelqvist et Debet, 1997). Des concentrations supérieures à la concentration critique (habituellement $\geq 6\%$) sont nécessaires afin d'obtenir un réseau tridimensionnel, où les granules gonflés sont incorporés dans une matrice continue de molécules d'amylose (Figure 1.3). Une telle matrice complexe de polymère se comporte comme un gel viscoélastique dans lequel les associations moléculaires impliquent des liaisons

d'hydrogène entre les chaînes pour former des simples et de doubles hélices (Biliaderis, 1991). En raison de son caractère non ramifié, l'amylose est considérée comme le principal responsable du processus de gélification de l'amidon. La gélification de l'amylose se produit suite à la réorganisation des doubles hélices de la structure de type B via des ponts hydrogène. Cependant, la gélification de l'amylopectine est un processus plus lent qui nécessite des concentrations beaucoup plus élevées (15%) de polysaccharides (Gidley, 1989).

1.1.2.3 La rétrogradation

La conservation des gels d'amidon conduit à des changements dans la texture qui sont dus à la recristallisation de l'amylopectine, phénomène accompagné aussi d'une libération partielle de l'eau contenue dans le gel et d'une séparation de phase, appelée rétrogradation (Miles et al., 1985).

La rétrogradation est un processus complexe et suit la gélification. Il dépend de nombreux facteurs tels que le type d'amidon, le pH et la présence d'autres solutés tels que les lipides, les sels et les sucres (Swinkels 1985). La rétrogradation est accompagnée de deux phénomènes distincts : (i) la gélification de molécules d'amylose libérées du grain d'amidon lors de la gélatinisation et (ii) la recristallisation de l'amylopectine (Figure 1.3).

Jouppila, Kansikas et Roos (1998) ont montré que la rétrogradation dépend de la teneur en eau et de la température de stockage. La vitesse de recristallisation de l'amylopectine augmente avec la température de stockage. Toutefois, un rythme légèrement plus faible de cristallisation a été observé à 90 °C, probablement dû à la décomposition des molécules constituant l'amidon. Les valeurs de demi-temps ainsi obtenues peuvent être utilisées pour la prévision du comportement de cristallisation de l'amidon et de la stabilité des produits à base d'amidon.

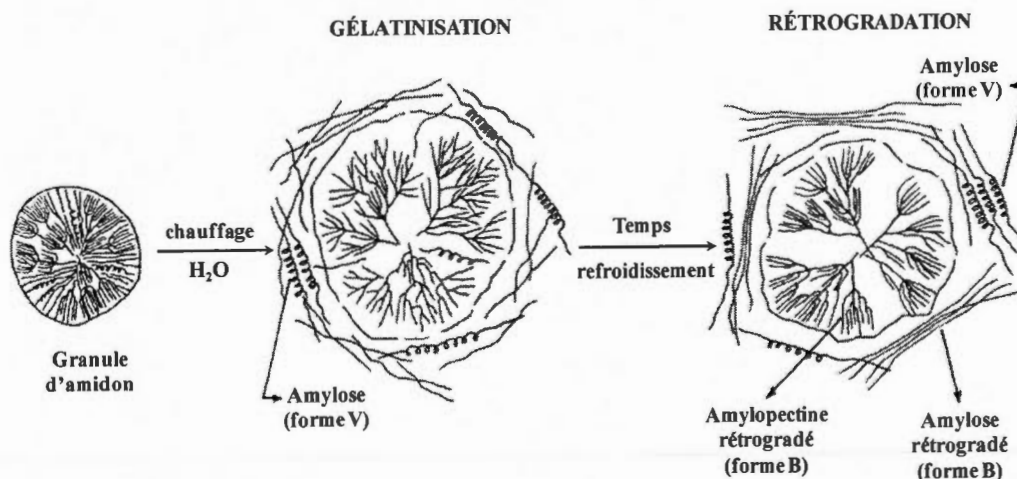


Figure 1.3 : Représentation schématique des changements structuraux observés au cours du chauffage et du stockage de suspensions aqueuses d'amidon (*d'après Biliaderis, 1991*).

1.1.2.4 Formation de complexes amylose-lipides

Il est bien connu que l'ajout des lipides ou des tensioactifs peut avoir une influence sur la texture des aliments à base d'amidon. Par exemple, des émulsifiants lipidiques sont incorporés dans les produits de boulangerie pour retarder le rassissement et la rétrogradation de l'amidon. Le mécanisme exact de ces effets est loin d'être clair.

Le rôle des lipides contre le rassissement est généralement attribué à la formation de complexes d'inclusion entre les molécules d'amylose et les lipides (Biliaderis, 1991).

En présence de lipides monoalkylés, la structure cristalline de l'amylose subit une conversion de sa forme polymorphe de type A (doubles hélices empilées) vers la forme de type V (simple hélice) caractérisée par une cristallinité plus faible.

Immel et Lichtenthaler (2000) ont montré que les doubles hélices empilées de la forme A sont organisées dans une structure compacte avec une répartition irrégulière de régions hydrophiles et hydrophobes sur la surface extérieure et que l'intérieur de la double hélice est inaccessible même pour les petites molécules. Leur analyse détaillée a aussi révélé que la structure de l'amylose V est organisée sous forme de deux zones distinctes (Figure 1.4) : i)

une surface extérieure hydrophile et ii) une cavité hélicale hydrophobe (Immel et Lichtenthaler, 2000). Cette séparation de zones hydrophiles / hydrophobes peut favoriser la formation des complexes d'inclusion (Figure 1.5) via des interactions hydrophobes qui peuvent avoir lieu entre les chaînes hydrocarbonées de lipides et la cavité hélicale de l'amylose (Winter and Sarko, 1974).

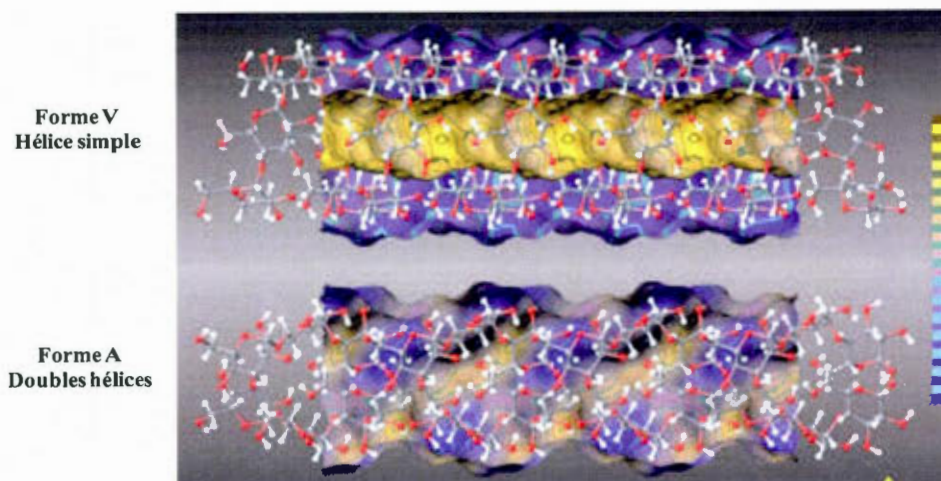


Figure 1.4 : La topographie des zones hydrophiles / hydrophobes pour l'amylose. La couleur jaune désigne une région hydrophobe; bleu désigne une région hydrophile (*d'après Immel et Lichtenthaler, 2000*).

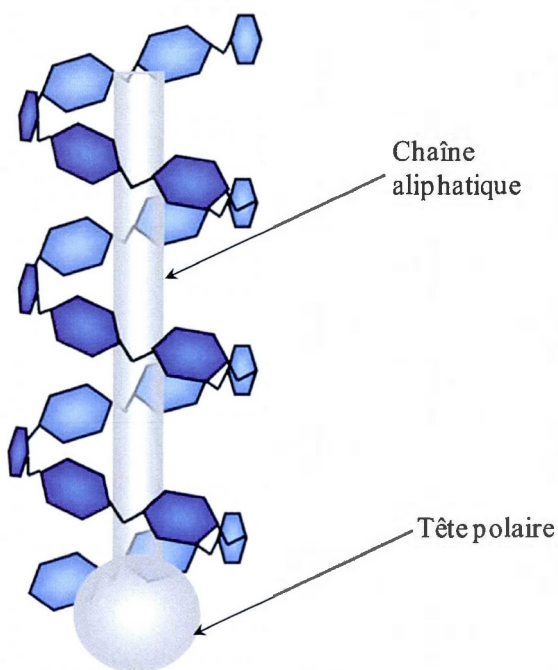


Figure 1.5 : Représentation schématique d'un complexe d'inclusion formé entre l'amylose (type V, simple hélice) et un ligand lipidique dont la tête polaire est située à l'extérieur de l'hélice, tandis que sa chaîne aliphatique est située à l'intérieur de la cavité hélicale (*d'après Putseys, Lamberts et Delcour, 2010*).

1.1.3 Le carboxyméthylamidon et ses complexes avec applications pharmaceutiques

L'amidon est rarement utilisé sous sa forme native dans l'industrie pharmaceutique. Afin d'améliorer ses performances et ses propriétés, en fonction des applications prévues, des modifications chimiques sont nécessaires. Grâce à la présence des nombreux groupes hydroxyles, l'amidon peut être modifié par une multitude des réactions. Les modifications les plus fréquentes et les plus faciles à réaliser vont être les substitutions au niveau des groupements hydroxyles. Ainsi, par une réaction d'éthérification et en utilisant l'acide monochloracétique comme agent de substitution, des groupements carboxyliques ont été introduits sur l'amidon (Figure 1.6) au niveau d'hydroxyles situés aux C₆, C₂ et C₃. Le carboxyméthylamidon (CMA) ainsi obtenu a été proposé comme excipient sensible au pH (Mulbacher, Mateescu et Calinescu, 2004b) pour la livraison d'agents bioactifs (Calinescu et al., 2005; Brouillet, Bataille et Cartilier, 2008). Le CMA est un polymère hydrophile, soluble

et malgré la substitution, est encore susceptible d'être dégradé par l' α -amylase pancréatique.

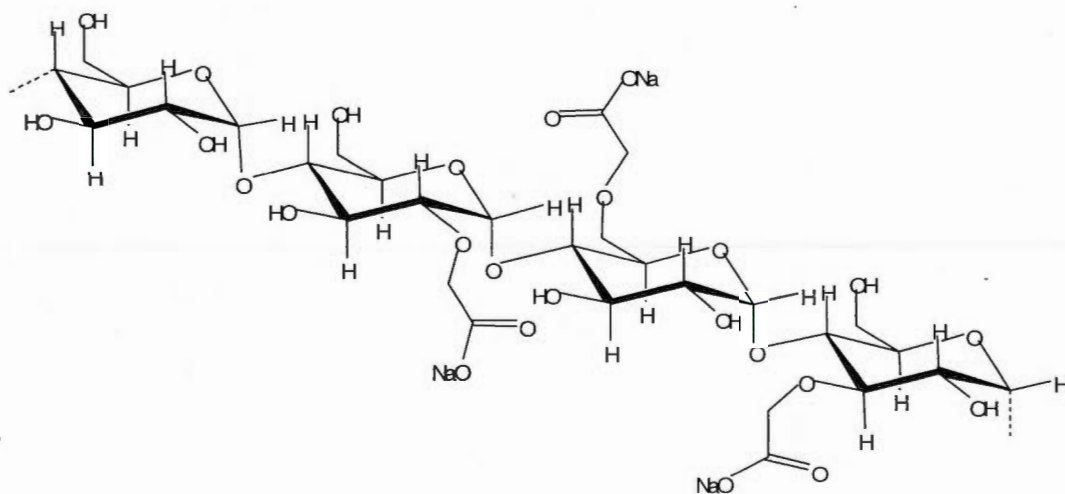


Figure 1.6 : Représentation schématique du carboxyméthylamidon.

Le CMA n'est pas un nouveau produit. En effet, il est déjà commercialisé sous forme réticulée et utilisé principalement comme agent de désintégration (Primojel®, Explotab®) (Edge et al., 2002). Cependant, son utilisation comme excipient pour la libération contrôlée de petites molécules (Mulhbacher, Ispas-Szabo et Mateescu, 2004a; Lemieux, Gosselin et Mateescu M.A, 2010 ; Assaad et Mateescu, 2010) ou des agents bioactifs (peptides et protéines) et microorganisme (Calinescu et al., 2005 et 2007) est novatrice. Dans le milieu acide (estomac) les groupes carboxyliques semblent améliorer la stabilité du comprimé par protonation et ainsi par des ponts hydrogène et même dimérisation. Lorsque le comprimé est transféré dans le milieu neutre (intestinal), la matrice devient plus hydratée grâce à l'échange de protons avec des cations. Cette hydratation facilite le gonflement de la matrice et la libération de l'agent actif. Lemieux et collaborateurs (2009) a montré que l'augmentation du degré de substitution (DS 0,03 au 0.25) du CMA synthétisé en milieu aqueux génère un temps de libération plus longue du principe actif.

Le CMA, même s'il a montré de bonnes propriétés pour la libération d'agents bioactifs au niveau de l'intestin, reste moins performant pour la livraison au côlon à cause de sa solubilité élevée dans un milieu neutre et de sa sensibilité à l'amylolyse. L'ajout du chitosane à des formulations à base du CMA réduit la solubilité de la matrice et probablement sa sensibilité à l'alpha-amylase pancréatique, permettant ainsi une libération prolongée. Ces deux polymères ont une caractéristique commune : le changement de leur comportement suite aux phénomènes de protonation-déprotonation, dépendamment du pH du milieu de dissolution.

Lors du passage gastrique le CMA (polymère anionique) se protone, réduisant ainsi la solubilité de la matrice et augmentant sa stabilisation par des interactions intra- et intermoléculaires via des ponts hydrogène (Mulhbacher, Mateescu et Calinescu, 2004). Le chitosane (polymère cationique), se protone dans un milieu acide pour se transformer en hydrogel, limitant ainsi la libération de l'agent actif et également la diffusion du milieu de dissolution dans le comprimé. Les deux polymères ont été associés sous forme d'un complexe polyélectrolyte (Assaad et Mateescu, 2010). Le nouveau complexe est caractérisé et testé *in vitro* comme excipient pour la formulation des principes actifs sous forme des comprimés administrés par voie orale. Dans des conditions simulant le transit gastro-intestinal, l'analyse par imagerie RMN a montré une diffusion lente du fluide à l'intérieur du comprimé. Les profils de dissolutions de l'acétaminophène et de l'aspirine ont montré une prolongation de la durée de libération. Le complexe semble être un excipient plus approprié pour la livraison des médicaments au côlon que le CMA (Assaad et al., 2011).

Les propriétés du CMA comme matrice pourraient être améliorées pour pouvoir assurer une libération ciblée de principes actifs au niveau du côlon. Dans ce contexte, nous avons considéré qu'il serait aussi utile de réaliser la complexation du CMA avec des agents complexants de nature lipidique tels que la lécithine afin de rendre la matrice plus hydrophobe. Une matrice moins susceptible à l'hydratation pourrait assurer une libération retardée des principes actifs lorsque ces dernières arrivent dans le côlon. La mise au point de ces formulations pourrait constituer des alternatives pour la thérapie de différentes maladies entériques liées à l'inflammation comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse.

1.2 La lécithine – origine, structure et propriétés

1.2.1 L'origine et la structure de la lécithine

Le nom de lécithine a été utilisé pour la première fois en 1847 pour décrire le matériau visqueux orange isolé à partir de jaune d'œuf contenant aussi du phosphore et de l'azote comme éléments. La Société Internationale de la lécithine et des phospholipides (ILPS) a publié la définition suivante pour la lécithine et les phospholipides : la lécithine est un mélange de glycérophospholipides obtenus à partir de matières animales, végétales ou microbiennes, contenant des sphingosylphospholipides, des triglycérides, des acides gras et des glycolipides. Les phospholipides purs, qui peuvent être isolés à partir d'un mélange, sont définis comme des lipides contenant des dérivés du glycérol (Wendel, 2000). Les phospholipides (phosphatides) sont des glycérides dont le glycérol est estérifié par deux acides gras et la dernière fonction alcool primaire par l'acide phosphorique (Elworthy et Saunders, 1956). Cette structure est commune pour tous les phospholipides et porte le nom d'acide phosphatidique.

Le groupement phosphatidyl des phospholipides est estérifié une deuxième fois dans la plupart des phospholipides par une autre molécule (Figure 1.7) par exemple :

- la choline (phosphatidyl- choline ou lécithine),
- l'éthanolamine (phosphatidyl-éthanolamine),
- l'inositol (phosphatidyl-inositol), etc.

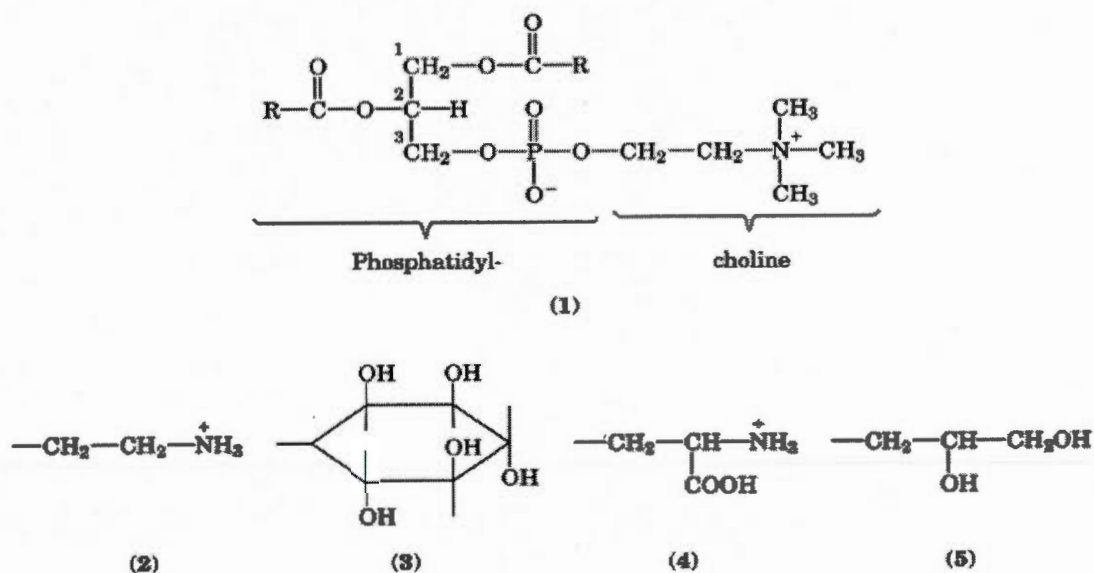


Figure 1.7 : Les formules générales des phospholipides ($R = C_{15} - C_{17}$ chaînes alkyles). Le fragment de choline peut être remplacé par d'autres groupements tels que l'éthanolamine (2) pour donner de la phosphatidyl-éthanolamine (PE), de l'inositol (3) pour donner le phosphatidyl-inositol (PI), la sérine (4) ou de la glycérine (5) (*d'après Wendel, 2000*).

Les phospholipides sont les constituants indispensables des membranes biologiques. La lécithine est une substance essentielle au bon fonctionnement du cerveau, du système nerveux, du système cardiovasculaire, du foie et de plusieurs autres organes vitaux. Dans le cerveau, la lécithine est transformée en acétylcholine, neurotransmetteur essentiel dans la transmission des messages nerveux (Zeisel, 2000). Son pouvoir émulsifiant est bénéfique au niveau du transport du cholestérol et d'autres matières grasses dans la circulation sanguine, en empêchant le dépôt de ces matières dans les artères. Elle joue aussi un rôle important dans le métabolisme des matières grasses au niveau du foie (Canty et Zeisel, 1994). Dans le tube digestif, la présence de la lécithine assure une meilleure absorption des vitamines A et D, ainsi qu'une meilleure utilisation des vitamines E et K.

La lécithine est produite dans certaines usines canadiennes et européennes à partir des graines de colza. En principe, il est possible d'obtenir la lécithine ayant une bonne composition en phospholipides à partir des huiles de graines pressées seulement, mais la disponibilité est faible (Van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008).

1.2.2 Les propriétés de la lécithine

1.2.2.1 Les propriétés physico-chimiques

La composition selon le type des acides gras estérifiés peut varier en fonction de l'origine de la lécithine. Ainsi, différentes couleurs peuvent être rencontrées selon les types d'acides gras. La lécithine commerciale brute est une substance grasse avec une couleur qui peut varier de brune à jaune pâle. La couleur dépend aussi des conditions du procédé d'extraction. La consistance est déterminée principalement par la composition en acides gras libres et le taux d'humidité. La lécithine correctement raffinée est inodore et présente un goût fade. Elle présente une bonne solubilité dans les hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques et une solubilité partielle dans les alcools aliphatiques. La phosphatidylcholine pure est soluble dans l'éthanol (Wendel, 2000).

La lécithine possède (Figure 1.7) : une tête polaire représentée par la choline et le groupe phosphate et une chaîne hydrophobe représentée par les parties aliphatiques des acides gras. Le groupe phosphate est chargé négativement, tandis que la choline est chargée positivement en conférant à la lécithine l'état zwitterionique.

1.2.2.2 Les propriétés émulsifiantes

Une émulsion est un mélange homogène, de deux phases non miscibles, cinétiquement stabilisé par l'action d'un troisième ingrédient appelé émulsifiant. La phase, discontinue, est dispersée sous forme de gouttelettes et dans la seconde phase continue (McClements, 1999). La lécithine est un émulsifiant d'origine naturelle largement utilisée dans l'alimentation. Elle permet de rendre homogène une solution comprenant plusieurs phases non miscibles. Des émulsions de deux types, huile dans l'eau (H/E ou *O/W*) et eau dans l'huile (E/H ou *W/O*), peuvent être obtenues en utilisant la lécithine comme agent émulsifiant dépendamment de la quantité relative des deux liquides. L'action émulsifiante de la lécithine est due au fait que la molécule comporte un pôle lipophile et un pôle hydrophile. Elle est donc soluble à la fois dans des solvants polaires et apolaires (Elworthy et Saunders, 1956). Cette caractéristique lui permet de faire le pont entre la phase continue et la phase discontinue. Dans la formation des

émulsions la lécithine joue un double rôle : i) diminuer la tension interfaciale entre les deux liquides et ii) former des films à la surface des gouttelettes en établissant une barrière de protection à leur approche et à leur coalescence (Walstra, 1993).

Les propriétés émulsifiantes de la lécithine peuvent être améliorées par des modifications chimiques comme l'hydroxylation et l'acétylation. Ainsi, le pouvoir émulsifiant de la lécithine est bonifié par l'augmentation de l'hydrophilie de la molécule réalisée par l'hydroxylation des acides gras insaturés. Cette réaction est effectuée en présence du peroxyde d'hydrogène. L'acétylation est réalisée au cours du raffinage par ajout de l'anhydride acétique. Elle conduit à la diminution de la polarité de la lécithine et augmente ses propriétés émulsifiantes (Joshi, Paratkar et Thorat, 2006).

Les propriétés spécifiques de la lécithine peuvent aussi être utilisées afin d'améliorer la solubilité des différents produits. Liu et al. (2009) ont préparé un complexe à base de lécithine et de dihydromyricéthine. Ce dernier est un antioxydant d'origine naturelle avec des bonnes applications dans l'industrie alimentaire, mais son utilisation est limitée par la faible solubilité dans les solvants apolaires. Le complexe lécithine-dihydromyricéthine présente une solubilité supérieure dans du *n*-octanol tout en gardant les propriétés antioxydantes du produit pur.

1.2.3 La lécithine dans l'industrie

La lécithine est un composé lipidique d'origine naturelle avec de très bonnes propriétés émulsifiantes avec un large spectre d'applications telles que l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

La lécithine dans l'industrie alimentaire

Dans le secteur de la panification (ensemble des opérations essentielles à la fabrication du pain), le volume et la fraîcheur des produits panifiés sont deux paramètres importants à respecter afin d'atteindre la qualité désirée. Pendant le stockage, des changements dans la structure de l'amidon peuvent avoir lieu en conduisant à une dureté élevée de la mie. La

principale cause est représentée par la recristallisation de l'amylose. Après la panification, les particules de petite taille d'amylose peuvent migrer vers l'extérieur des granules et recristallisent tandis que les macromolécules d'amylopectine étant plus grosses restent sous leur forme non cristalline. C'est là qu'intervient la lécithine en formant de complexes d'inclusion avec l'amylose qui vont empêcher la recristallisation et vont prolonger la durée de fraîcheur de la mie. Van Nieuwenhuyzen et Tomás (2008) ont confirmé les excellentes propriétés de complexation de la lécithine en utilisant la calorimétrie différentielle à balayage (CDB) sur des mélanges réalisés avec différentes quantités d'amidon et de lécithine. Les résultats montrent que les chaînes alkyles des acides gras de la lécithine pénètrent à l'intérieur de l'hélice de l'amylose et en résultant des complexes d'inclusion.

Dans l'industrie alimentaire, la lécithine est aussi utilisée comme émulsifiant dans la préparation des margarines qui sont des émulsions «inverses» (E/H, eau dans l'huile) contenant 80% de matière grasse et 18% d'eau ou de lait. La préparation de l'émulsion est réalisée en présence de la lécithine par la forte agitation de la phase aqueuse pasteurisée, contenant les protéines de lait, l'acide citrique et le sel, dans la phase huileuse continue contenant les huiles (Van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008).

La lécithine dans les industries pharmaceutique et cosmétique

La lécithine est utilisée dans l'industrie pharmaceutique comme excipient dans la formulation de divers produits (Van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008). Les fractions pures de phosphatidylcholine sont de plus en plus utilisées grâce à leurs propriétés d'agrégation et de formation des liposomes en présence d'eau. Les liposomes, vésicules possédant une cavité interne enveloppée d'une membrane de nature lipidique, se forment de façon spontanée à la dispersion des phospholipides dans le milieu aqueux. La dimension de vésicules obtenues est en fonction de la méthode de préparation. Les phospholipides naturels, fréquemment utilisés dans la préparation de liposomes, fournissent des membranes très proches des propriétés des membranes naturelles. Pour cette raison, les liposomes sont des outils intéressants employés dans la vectorisation de molécules actives (médicaments ou produits cosmétiques). On peut réaliser l'encapsulation des molécules hydrophiles dans la phase aqueuse interne de leur cavité afin d'améliorer la solubilité et l'absorption de certains médicaments ou, le cas échéant

de réduire leurs toxicités (Gregoriadis et Florence, 1993). Les principes actifs ainsi encapsulés peuvent être dirigés vers les sites désirés.

Le transport des molécules actives vers les couches profondes de la peau est favorisé en utilisant les liposomes préparés avec des phospholipides naturels. Grâce à la similitude entre les deux membranes, les liposomes sont très utilisés en cosmétologie. Par exemple, ils peuvent réaliser le transport d'eau à travers la barrière cutanée alors que sans phospholipides l'eau ne pourrait passer cette barrière.

Les fractions de lécithine, en particulier celles ayant une haute teneur en phosphatidylcholine, sont aussi utilisées en tant que principe actif (Wendel, 2000). Elles peuvent servir comme source diététique de phosphatidylcholine nécessaire dans le métabolisme du cholestérol et des graisses au niveau du foie et comme précurseur d'acétylcholine cérébrale. Ces phospholipides ont aussi montré des effets de protection gastrique.

1.3 Le sucralfate – structure et propriétés

Le Sucralfate (SUC) est un complexe moléculaire obtenu par le mélange d'une solution de sucrose octasulfate de sodium (SOSNa) avec du chlorure de polyaluminium $[Al(OH)_2Cl]_n$ suivit de précipitation avec d'hydroxyde de sodium. Le complexe ainsi préparé consiste en $Al(OH)_3$ liés de façon covalente au sucrose octasulfate en combinaison avec 8 autres molécules d' $Al(OH)_3$ (Figure 1.8) (Ochi, 1995).

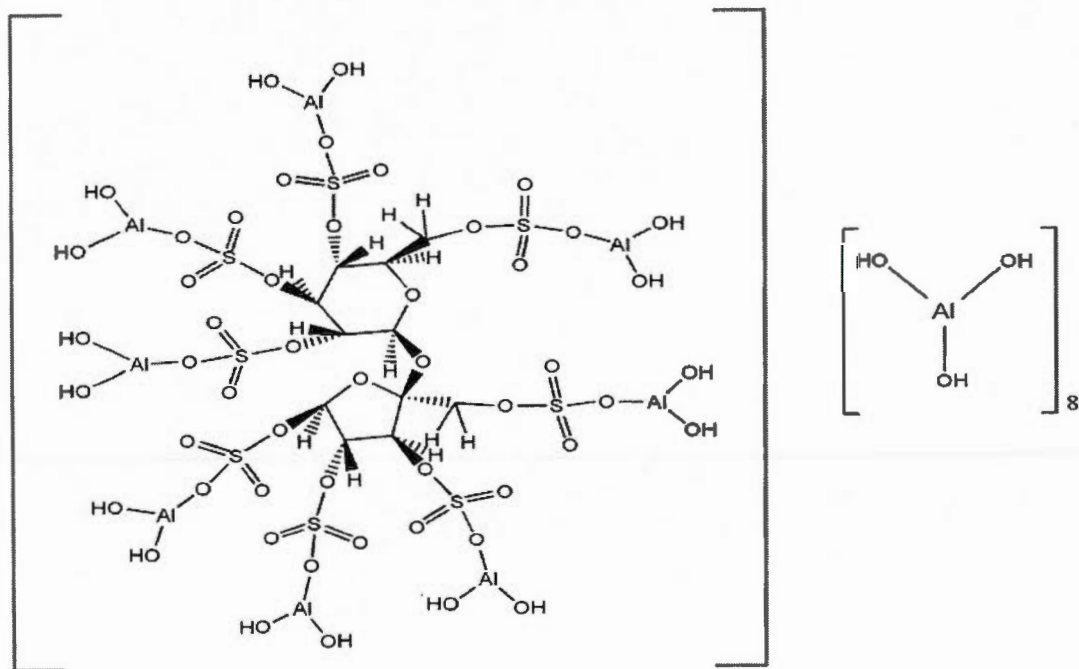


Figure 1.8 : Structure chimique du complexe de sucralfate.

Le SUC est un agent cytoprotecteur topique efficace utilisé dans le traitement de l'inflammation et de l'ulcération du tractus gastro-intestinal supérieur en raison de sa capacité à améliorer la fonction protectrice de la barrière mucoale (Nagashima, 1981; Rees, 1991). Dans un environnement acide, le SUC présente la capacité de former un gel avec des propriétés mucoadhésives. Par ailleurs, il a été démontré que le sucralfate accélère la cicatrisation épithéliale en se liant au facteur de croissance des fibroblastes (bFGF) assurant de cette façon sa protection contre l'acidité gastrique. Lorsque le sucralfate est administré par voie orale à des rats ayant des lésions gastriques, le niveau de bFGF est considérablement élevé au niveau de lésions. Folkman et al. (1991) a démontré que l'application du bFGF sur des lésions chroniques améliore l'angiogenèse et accélère la cicatrisation. De plus, le sucralfate induit la production de prostaglandines ainsi que la protection contre l'apoptose cellulaire en favorisant la ré-épithélialisation dans le processus de cicatrisation (Folkman et al., 1991).

L'association du sucralfate à des agents actifs a été étudiée par plusieurs chercheurs (Maggi et al., 1993; Roveda et al., 1991). Les auteurs ont élaboré de nouvelles formes posologiques basées sur l'association du sucralfate avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) afin de prévenir les lésions muco-sales induites par les, AINS. Les agents actifs sont formulés sous forme de comprimés à double noyau contenant l'AINS à l'intérieur et le sucralfate dans la couche externe du comprimé. Il a été montré que la libération *in vitro* des principes actifs (AINS) n'est pas influencée par la présence du sucralfate.

Les groupements fonctionnels (sulfate et hydroxyde d'aluminium) trouvés dans la structure du SUC peuvent être ionisés selon le pH du milieu. Dans ce contexte, Higo et al. (2004) ont étudié la complexation du SUC avec la tétracycline en termes de mécanisme de complexation et de propriétés mucoadhésives du complexe formé en vue d'un nouveau traitement pour *H. pylori*. L'hypothèse était que le pH acide du milieu favorise les interactions entre les groupes fonctionnels des deux agents actifs et leur complexation. Il a été suggéré que les groupes amide ou amine de la tétracycline sont impliqués dans la complexation et les fragments d'aluminium du sucralfate peuvent servir de sites de liaison. La quantité d'acide ajoutée semble le facteur le plus important dans la préparation du complexe. Une quantité appropriée d'acide chlorhydrique ajoutée influence la production d'un complexe riche en tétracycline.

Dans cette nouvelle approche de traitement, le sucralfate joue un double rôle : i) il participe dans la complexation du principe actif et contrôle la libération de celui-ci et ii) par ses propriétés mucoadhésives pourrait prolonger le temps de séjour du principe actif au niveau de son site d'action. De plus, le sucralfate pourrait contribuer à la guérison des tissus lésés par ses propriétés cicatrisantes, action bénéfique dans différentes maladies associées à une altération des tissus comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Un tel système basé sur des complexes du SUC avec la mésalamine pourrait apporter une action anti-inflammatoire de la mésalamine en combinaison avec les particularités bénéfiques du SUC. Ce système peut être considéré comme un traitement d'actualité.

CHAPITRE II

LA LIVRAISON CIBLÉE DE PRINCIPES ACTIFS AU CÔLON

La livraison de médicaments par voie orale sous forme des comprimés reste la méthode préférée par les patients et aussi par l'industrie pharmaceutique. Des formes à libération ciblée ont été développées afin d'augmenter l'action thérapeutique de certains principes actifs en les libérant de manière sélective au niveau de l'organe visé. Ceci permet également d'administrer de faibles doses des médicaments et de limiter les effets secondaires reliés à l'absorption non-spécifique du principe actif dans la circulation systémique. Afin d'optimiser l'absorption d'un principe actif au niveau de l'organe cible, depuis plusieurs années, un grand nombre de recherches ont été entreprises sur les systèmes à libération ciblée de médicaments.

Le côlon est un segment du tractus gastro-intestinal qui bénéficierait de la mise au point et de l'utilisation de technologies à libération ciblée. Le côlon est vulnérable à un certain nombre de maladies dont la colite ulcéreuse, la maladie de Crohn, le syndrome du côlon irritable et les carcinomes. L'administration ciblée des médicaments au niveau du côlon pourrait assurer un traitement direct au site de la maladie, avec une faible dose de principes actifs et moins d'effets secondaires dus à l'absorption systémique (Basit et Bloor, 2003).

Les systèmes à libération colonique de médicaments devraient être capables d'assurer la protection du principe actif contre la dégradation par l'acidité gastrique et de limiter l'absorption dans les parties pré-coloniques. Ces systèmes sont également appropriés pour la livraison de médicaments polaires et/ou susceptibles à la dégradation chimique et enzymatique dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal, en particulier, des protéines et des peptides thérapeutiques tels que l'insuline, la calcitonine et la vasopressine (Saffran et al., 1986). D'autres exemples incluent des inhibiteurs des cytokines et des antibiotiques, utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin et des infections gastro-intestinales.

Les systèmes de libération ciblée au niveau du côlon sont principalement utilisés afin d'assurer la libération des principes actifs ayant une mauvaise absorption dans la partie proximale du tractus gastro-intestinal. Des substances actives utilisées dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin, de la diarrhée et le cancer du côlon sont des candidats idéaux pour la livraison locale au niveau du côlon (Osler, 2007). L'administration, orale et intraveineuse, de glucocorticoïdes tels que la dexaméthasone et la méthylprednisolone conduit à des effets secondaires systémiques, y compris adenosuppression, immunosuppression et le syndrome de Cushing. Ainsi, la libération sélective de ces principes actifs au niveau du côlon pourrait, non seulement diminuer la dose requise pour le traitement, mais aussi de réduire les effets secondaires causés par les doses élevées utilisées dans les formes pharmaceutiques conventionnelles (McLeod, Friend et Tozer, 1994).

2.1 Facteurs déterminants dans la conception de systèmes à libération ciblée au côlon

Le côlon, comme site pour la livraison de médicaments, offre plusieurs avantages distincts en raison de son pH neutre et temps de transit élevé. Malgré une flore microbienne riche, les activités enzymatiques extracellulaires sont relativement faibles par rapport au duodénum et aux autres régions du tractus gastro-intestinal. Ceci permet d'assurer un plus haut taux d'absorption dans la circulation sanguine des substances actives délivrées au côlon. Il peut être considéré comme un site où l'administration de médicaments à la fois locale ou systémique pourrait être atteinte (Chourasia et Jain, 2003).

La performance des systèmes à libération colonique de principes actifs est influencée par plusieurs facteurs tels que les propriétés pharmacocinétiques du principe actif, le type de système de livraison et son interaction avec l'intestin. Par exemple, la solubilité du principe actif dans les fluides luminaux du côlon peut être un facteur limitant pour les formes pharmaceutiques à administration ciblée. La disponibilité réduite des liquides dans le côlon par rapport à l'intestin grêle pourrait être problématique pour la dissolution des principes actifs ayant une faible solubilité dans l'eau. Dans ces cas, la formulation du principe actif sous une forme présolubilisée ou sa libération au niveau du côlon proximal, partie de l'intestin

contenant une quantité plus élevée de fluides, est assurée (Basit et Bloor, 2003). Un autre facteur limitant le l'absorption systémique des substances actives dans le côlon est représentée par la petite surface luminale du côlon. Dans une certaine mesure, cet inconvénient est compensé par un temps de séjour plus long de la forme pharmaceutique dans le côlon. De plus, la faible activité enzymatique des cytochromes P450 3A, dans la muqueuse du côlon pourra assurée des concentrations plasmatiques élevées et l'amélioration de la biodisponibilité par voie orale pour les actifs métabolisés par cette classe d'enzymes (Basit et Bloor, 2003).

Les matrices utilisées comme transporteurs de principes actifs au niveau du côlon sont un autre facteur qui influence sur la performance de systèmes à administration ciblée. La sélection des matrices dépend premièrement de la nature physico-chimique du principe actif ainsi que de la maladie pour laquelle le système doit être utilisé. Des facteurs tels que la nature chimique, la stabilité et le coefficient de partition de la substance active influencent la sélection du transporteur. En outre, le choix de vecteur dépend des groupes fonctionnels contenus par la molécule active (Friend et Chang, 1984). Par exemple, les molécules contenant de groupes amine ou nitro peuvent être utilisées pour les relier à un autre groupe aromatique par une liaison azoïque en résultant des promédicaments. Les matrices contenant des polymères peuvent aussi influencer les propriétés de libération et l'efficacité des systèmes (Philip et Philip, 2010).

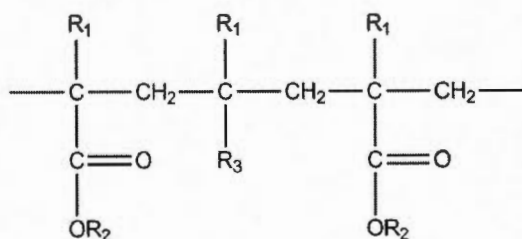
2.2 Les approches de la libération des agents actifs au côlon

Les caractéristiques physiologiques uniques du gros intestin ont permis le développement d'une large variété de formes pharmaceutiques orales destinées à libérer les principes actifs au niveau du côlon. Ces approches impliquent la conception des promédicaments ou des formulations spécifiques pour assurer une libération intacte de principes actifs au niveau du côlon. Quatre types de systèmes de libération ciblée sont actuellement utilisés pour réaliser la libération du principe actif dans le côlon sous sa forme non modifiée (Leopold, 1999).

2.2.1 Les systèmes basés sur les variations de pH

Le gradient de pH dans le tractus gastro-intestinal a été exploité en tant que moyen pour le transport des principes actifs au niveau de l'intestin grêle et/ou côlon. L'enrobage représente l'approche technique la plus simple pour réaliser une formulation pharmaceutique à libération ciblée au niveau du côlon. Il consiste dans l'application d'une ou plusieurs couches d'un polymère entérique. Ces polymères d'enrobage sont sensibles aux variations du pH au long du tractus gastro-intestinal. Ils peuvent assurer la protection gastrique du principe actif et permettre la livraison, dépendamment du polymère utilisé, à un pH supérieur à 6-7 (Tuleu et al., 2001).

Les plus couramment utilisés pour la libération ciblée au niveau du côlon sont les copolymères de l'acide acrylique et méthacrylique, commercialisés sous le nom Eudragit®. Ces copolymères présentent différentes propriétés physico-chimiques générées par la présence de différents groupements fonctionnels de type carboxyliques et amines (Figure 2.1). Dans le milieu acide (estomac), les groupements carboxyliques contenus dans la structure des copolymères d'Eudragit de type L et S améliorent la stabilité du comprimé suite aux phénomènes de protonation tandis que dans le milieu neutre de l'intestin le polymère devient plus hydraté grâce à l'échange de protons avec des cations. Cette hydratation facilite le gonflement du polymère et la libération de l'agent actif. L'enrobage à base d'Eudragit L commence à se solubiliser à une valeur du pH de 6 tandis que cette valeur est de 7 pour Eudragit S. En effet, la valeur du pH dans la partie distale de l'intestin grêle est généralement autour de 7,5, tandis que dans le côlon proximal cette valeur est plus proche de pH 6. Ces copolymères ont donc la tendance de libérer le principe actif avant d'atteindre le côlon. Pour contourner cet inconvénient de la libération prématurée du principe actif, un nouveau copolymère a été développé. Le nouveau copolymère d'Eudragit de type FS est basé sur l'association d'acide méthacrylique, le méthacrylate de méthyle et l'acrylate d'éthyle. Il se dissout à un rythme plus lent et à un pH plus élevé (7 - 7,5) (Chourasia et Jain, 2003).



$\text{R}_1 = \text{CH}_3; \text{H}$

$\text{R}_2 = \text{CH}_3; \text{CH}_3\text{CH}_2$

$\text{R}_3 = \text{COOH}$ (Eudragit L et S)

Figure 2.1: Structure chimique de l'Eudragit L et S
(d'après Chourasia et Jain, 2003)

Les valeurs du pH pour un individu en bonne santé varient de 1,2 dans l'estomac à $6,6 \pm 0,5$ dans le duodénum avec un pic d'environ $7,5 \pm 0,4$ vers iléum distal, suivi par une diminution du pH au niveau du caecum ($\text{pH } 6,4 \pm 0,4$) et, finalement, par une augmentation lente du pH du côlon droit vers le côlon gauche avec un pH final de $7,0 \pm 0,7$ (Evans et al., 1988). La diminution du pH à l'entrée dans le côlon est provoquée par la présence d'acides gras à courte chaîne résultante de la fermentation bactérienne de polysaccharides.

Plusieurs inconvénients ont été rencontrés en utilisant les systèmes basés sur les polymères pH dépendants. Les variations intra- et inter-individuelles du pH gastro-intestinal sont des paramètres très importants à prendre en considération, car elles peuvent causer des variations importantes lors de la libération du principe actif. Par exemple, chez le même individu, des variations du pH sont observées en fonction de sa diète, de l'état pathologique et de la consommation alimentaire.

Des études antérieures ont montré que la valeur du pH de l'intestin distal chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin est inférieure à celle observée chez des volontaires sains. Dans une étude portant sur six patients atteints de la colite ulcéreuse, le pH colonique de trois patients variait de 5,0 à 7,0, tandis que dans le cas des trois autres sujets des valeurs très faibles de 2,3, 2,9 et 3,4 ont été observés (Fallingborg et al., 1993). Alors, les polymères dépendants de pH ne représentent pas le meilleur moyen pour réaliser la libération ciblée des principes actifs au niveau du côlon dans certains cas.

2.2.2 La libération retardée

Les systèmes de libération retardée réalisent la livraison de leur charge médicamenteuse après un délai préprogrammé. Le temps de transit d'une forme pharmaceutique dans la partie supérieure du tube digestif est très variable et fortement influencé par de nombreux facteurs. Toutefois, le temps de transit dans l'intestin grêle est en général constant et il est en moyenne de trois heures. Cette approche a été utilisée dans la conception du dispositif Pulsincap™ (Figure 2.2), un système comprenant une capsule étanche contenant le principe actif et scellé à l'extrémité avec un bouchon d'hydrogel. Les polymères constituants possèdent la capacité de s'hydrater en contact avec les fluides gastro-intestinaux. Après un temps de latence d'environ six heures, le bouchon est largué, permettant la libération du principe actif. Ce temps de latence est contrôlé par la taille et la composition du bouchon (Basit et Bloor, 2003). Un temps de transit d'environ six heures est nécessaire au système avant d'atteindre le côlon. Une étude *in vivo* réalisée chez l'humain en utilisant la scintigraphie gamma a montré que les systèmes Pulsincap™ libèrent la substance active approximativement cinq heures après administration avec une variation importante au niveau de l'endroit de libération (Hebden et al., 1999). Afin de réduire la fluctuation de la performance du système Pulsincap™, l'application d'un enrobage entérique a été proposée.

Les limitations importantes de ces systèmes sont représentées par : i) les technologies et les compétences de pointe nécessaires à la fabrication à grande échelle (Davis et al., 1984) et ii) les modifications de la durée de transit rencontrées au cours de certaines pathologies ou en présence de certains médicaments/excipients.

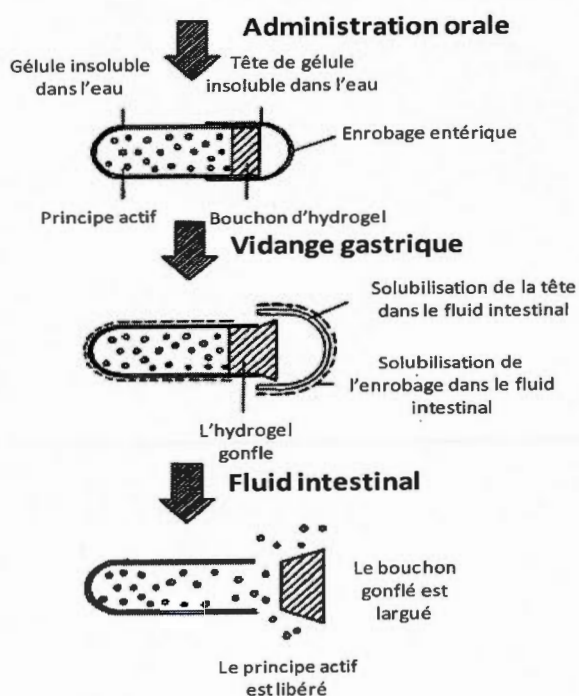


Figure 2.2: Représentation schématique du système Pulsincap™
(d'après Vandamme et al., 2002).

2.2.3 Les systèmes à libération ciblée contrôlés par l'osmose et par la pression

Les processus digestifs dans le tractus gastro-intestinal impliquent l'activité contractile de l'estomac et les mouvements péristaltiques afin d'assurer le déplacement du contenu intestinal. Dans l'intestin gros, le contenu est déplacé d'un segment à l'autre par des mouvements péristaltiques. L'augmentation de la viscosité du contenu intestinal due à l'absorption progressive d'eau le long du tractus gastro-intestinal conduit à une pression plus élevée dans le côlon que dans l'intestin grêle.

Un système à libération ciblée de principes actifs contrôlée par la pression produite par les mouvements péristaltiques dans le côlon a été développé (Niwa et al., 1995; Takaya et al., 1995). Ce système est composé d'une capsule de gélatine contenant plusieurs compartiments

utilisant l'éthyle cellulose comme enrobage. La désintégration de la formulation est induite par la pression produite par les ondes péristaltiques, et dépend de l'épaisseur du film d'éthyle cellulose. Ainsi, il a été montré qu'une épaisseur d'environ 35 à 60 μm est souhaitable. La performance du système dépend également de la taille de gélules (Takaya et al., 1998).

Le système osmotique OROS-CT a été mis au point pour assurer un traitement local efficace ou une absorption systémique au niveau du côlon (Figure 2.3). Le système est composé de plusieurs compartiments osmotiques encapsulés dans une capsule de gélatine. Chaque compartiment est divisé en deux parties distinctes ; une contenant le principe actif et l'autre le gel osmotique. Les compartiments sont protégés par un enrobage entérique imperméable. Un orifice est prévu à travers la membrane semi-perméable en regard de la couche de principe actif. Le principe actif encapsulé dans les unités est sous forme de solution, ce qui constitue un avantage étant donné la faible quantité de liquide disponible dans le côlon distal.

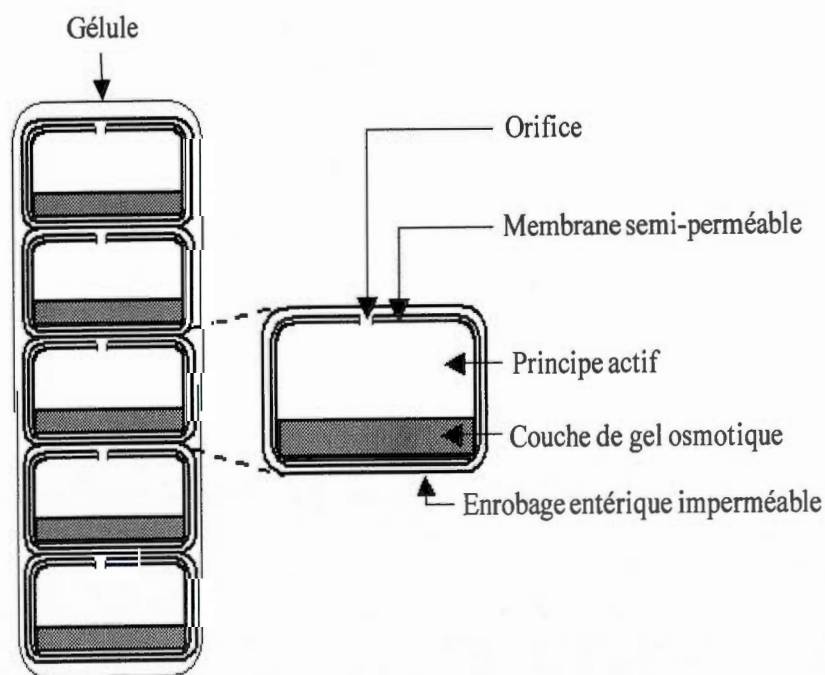


Figure 2.3: Représentation schématique du système osmotique.
OROS-C (d'après Chourasia et Jain, 2003)

Après l'administration orale, la capsule de gélatine se dissout dans l'estomac et libère les unités contenues. L'enrobage entérique imperméable protège le compartiment contre l'absorption de l'eau dans le milieu acide de l'estomac. En se solubilisant dans l'intestin grêle (pH supérieur à 7), il permet à l'eau de diffuser à travers la membrane semi-perméable dans le compartiment, ce qui provoque le gonflement du gel osmotique et par conséquent la création d'une pression à l'intérieur. Le gonflement de la couche osmotique force le liquide contenant le principe actif de sortir à travers l'orifice à un débit contrôlé avec précision par le taux de transport de l'eau à travers la membrane semi-perméable (Chourasia et Jain, 2003).

2.2.4 Les systèmes déclenchés par l'activité bactérienne au côlon

La libération des principes actifs contrôlée par l'activité bactérienne repose sur l'existence de micro-organismes produisant des enzymes au niveau du côlon. Le microbiote colonique dispose d'une population de bactéries de 10^{11} - 10^{12} unités formatrices de colonies/mL (Gorbach, 1971). Une large variété d'enzymes est produite dans le côlon, comme β -glucosidase, β -galactosidase, β -xylosidase, β -arabinofuranosidase, nitro-réductase, azo-réductase, etc. (Englyst, Hay et MacFarlane, 1987). Ces enzymes peuvent métaboliser les substrats endogènes et exogènes, comme les glucides non digérés dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal. Par conséquent, les matériaux résistants aux conditions acides de l'estomac et de l'intestin grêle, mais sensibles à la dégradation par les enzymes bactériennes dans le côlon peuvent être utilisés comme transporteurs pour la livraison de principes actifs. Ainsi, plusieurs approches ont été développées pour la libération ciblée des principes actifs contrôlée par l'activité bactérienne. Dans la conception des systèmes de libération ciblée de principes actifs au niveau du côlon l'utilisation de polymères biodégradables semble une approche plus spécifique par rapport à d'autres approches grâce à la présence des enzymes bactériennes.

Ce principe a été utilisé dans la conception des promédicaments, en utilisant une molécule inactive comme transporteur de la molécule pharmacologiquement active. Le promédicament peut être constitué de deux moitiés séparées, reliées par une liaison de type *azo*. Il traverse la

partie supérieure du tractus intact, mais, une fois dans le côlon, en présence des azo-réductases (produites par les bactéries du côlon) les liaisons azo sont clivées, libérant le transporteur et l'agent actif (Azad Khan, Piris et Truelone, 1977). Ce concept a conduit à l'élaboration de nouveaux azo-polymères dans le but d'obtenir des systèmes de transport universel. Ainsi, les biopolymères ont été proposés comme transporteurs pour (a) la formation des promédicaments (b) en tant qu'enrobage pour protéger le noyau contenant le principe actif ou (c) comme transporteur pour encapsuler le principe actif dans des matrices ou des hydrogels (Leopold, 1999). Ainsi, divers promédicaments à base de glucose, dextrane et cyclodextrine ont été développés pour la libération spécifique de principes actifs au niveau du côlon. Même si ces promédicaments assurent la livraison du principe actif au site spécifique, ils représentent de nouvelles entités chimiques et des études toxicologiques détaillées doivent être effectuées avant leur utilisation (Sinha et Kumria, 2001).

2.3 Polymères utilisés dans les systèmes de libération ciblée de principes actifs au côlon

Les propriétés spécifiques des systèmes à libération ciblée de principes actifs au niveau du côlon peuvent être obtenues en utilisant certains polymères, seuls ou en combinaison. Les polymères jouent un rôle important dans la formulation des systèmes de livraison ciblés, car ils peuvent influencer la vitesse de libération et l'absorption des agents actifs. Plusieurs polymères naturels et synthétiques ont été évalués pour l'administration orale des principes actifs au niveau de l'intestin. Toutefois, pour des raisons de sécurité et toxicité de polymères synthétiques, les polysaccharides d'origine naturelle sont préférés que les polymères synthétiques. De plus, les produits issus de la biodégradation *in vivo* des biopolymères sont de simples saccharides sans effet important sur la santé.

Les polymères d'origine naturelle sont peu coûteux et disponibles dans une variété de structures. Ces matériaux incluent l'amylose, le chitosane, le sulfate de chondroïtine, le dextran, la gomme de guar, l'inuline et la pectine (Shirwaikar et al., 2008). La plupart de ces matériaux sont déjà approuvés comme excipients pharmaceutiques ce qui constitue un avantage majeur pour l'industrie pharmaceutique. Les polysaccharides sont hydrosolubles ce

qui les rend impropres comme vecteurs de principes actifs. Pour contourner cet inconvénient et assurer une libération spécifique d'une substance active dans la partie inférieure du tractus gastro-intestinal des polysaccharides tels que l'amylose ont été mélangés avec un polymère insoluble dans l'eau comme l'éthyle cellulose (Milojevic et al., 1996). L'amylose, une composante importante de l'amidon, possède la capacité de former des films par gélification. Le film formé est partiellement résistant à l'action de l'amylase pancréatique, mais il est dégradé par les amylases de la microflore du côlon (Chourasia et Jain, 2003). Le système de livraison ciblée utilisant l'amylose comme polysaccharide d'origine naturelle en combinaison avec l'éthyle cellulose est connu sous le nom de COLAL™. En comparaison avec d'autres polysaccharides, l'amylose est dégradée par un plus large éventail de bactéries du côlon (Salyers et al., 1977). Après l'application de cet enrobage (amylose et éthyle cellulose) sur des formes pharmaceutiques solides, le principe actif a été protégé dans un milieu gastrique simulé et libéré spécifiquement dans l'environnement colonique (Milojevic et al., 1996).

D'autres polymères d'origine naturelle utilisés dans les systèmes à libération colonique sont les polysaccharides linéaires tels que la cellulose et ses dérivés. Ces polymères possèdent la propriété de rester intacts dans l'estomac et l'intestin grêle, mais ils sont susceptibles à la dégradation induite par les bactéries du côlon humain. Cette propriété est particulièrement intéressante dans le développement de systèmes à libération ciblée au niveau du côlon (Sinha et Kumria, 2001).

CHAPITRE III

ADMINISTRATION DE LA MÉSALAMINE PAR LA VOIE ORALE

3.1. Les maladies inflammatoires de l'intestin et la mésalamine

Depuis plusieurs décennies, il y a une incidence croissante des maladies inflammatoires chroniques qui peuvent affecter divers systèmes, organes ou tissus impliquant des changements fonctionnels et structuraux avec une certaine gravité et différentes durées de l'inflammation. Ces changements chroniques nécessitent souvent des traitements prolongés ayant des conséquences négatives sur la qualité de vie des patients (Hanauer, 1996).

Le tractus gastro-intestinal est susceptible d'être affecté par plusieurs maladies inflammatoires chroniques, parmi lesquelles les plus représentatives sont les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) touchant tout ou une partie du tube digestif. En pratique, elles sont surtout représentées par la colite ulcéreuse et par la maladie de Crohn. L'étiologie précise de ces maladies n'est pas encore bien établie ce qui rend le traitement particulièrement difficile. Les concepts actuels sur la pathogenèse des maladies inflammatoires de l'intestin sont basés sur quatre facteurs clés assez bien définis: l'environnement, la prédisposition génétique, la flore commensale et la réponse immunitaire (Fiocchi, 2005; Scaldaferrri et Fiocchi, 2007). Il ya aussi un accord sur la conclusion qu'aucune de ces quatre composantes ne peut par elle-même déclencher ou maintenir l'inflammation intestinale (Schirbel et Fiocchi, 2010). Il a été également montré que les patients atteints des maladies inflammatoires de l'intestin présentent une perméabilité intestinale élevée ayant comme conséquence l'exposition du système immunitaire mucosal aux antigènes bactériens de la microflore commensale. De plus, la dérégulation de la réponse immunitaire de l'hôte et

l'activation inadéquate du système immunitaire intestinal conduisent à l'intensification de l'inflammation et à des dommages tissulaires (Fiocchi, 1998).

L'évolution de ces maladies se fait par poussées en alternance avec des rémissions plus ou moins longues. Des complications possibles telles que des occlusions, des fistules (surtout internes), des abcès et des perforations peuvent survenir, car, la cicatrisation des lésions durant les périodes de rémission va provoquer des zones de rétrécissement et des brides entre les anses intestinales. Chez les enfants atteints, un retard du processus de croissance est fréquent (Hanauer, 1996).

Le traitement de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse repose sur une thérapie médicamenteuse à long terme afin d'induire et de maintenir les périodes de rémission. Parmi les traitements couramment utilisés, les formulations pharmaceutiques à base de mésalamine (acide 5-aminosalicylique) se sont avérées efficaces pour les patients ayant des poussées d'intensité moyennes ou légères (Carter et al., 2004; Kornbluth et al., 2004). Le traitement comprend des formulations administrées par la voie orale ou rectale ainsi que des formulations basées sur des promédicaments tels que la sulfasalazine (acide 5-aminosalicylique lié à la sulfapyridine), l'olsalazine (dimère de l'acide 5-aminosalicylique) et la balsalazide (acide 5-aminosalicylique lié à 4-aminobenzoyl- β -alanine). Sandborn et Hanauer (2003) ont montré qu'il n'y a aucune différence entre les concentrations plasmatiques obtenues suite à l'administration de la mésalamine par la voie orale et celles sous forme de promédicament et que cette concentration est comparable pour toutes les formulations de mésalamine (Sandborn et Hanauer, 2003). Ceci suggère que la sélection d'une posologie à base de mésalamine pour le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin doit être fondée sur d'autres facteurs tels que l'efficacité, la dose-réponse, la toxicité de ses métabolites et les coûts.

3.2. Mésalamine – généralités

La mésalamine, la thérapie de premier choix utilisée dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin, nécessite des doses répétées pour maintenir les épisodes de

rémission aux patients (Prakash et Markham, 1999). L'efficacité du traitement est étroitement reliée à une action locale, au niveau du côlon, du principe actif (Osler, 2007). L'absorption systémique de la mésalamine, dans les segments pré-coloniques, entraîne non seulement une réduction importante de la dose efficace, mais aussi peut provoquer l'apparition des effets indésirables comme des douleurs abdominales, des nausées et l'hépatite étaient les plus courants entraînant l'arrêt du traitement (Kedia et Cohen, 2007).

3.2.1. La structure et les propriétés physico-chimiques de la mésalamine

La mésalamine (l'acide 5-aminosalicylique) est le dérivé aminé de l'acide salicylique. La molécule possède un caractère amphotère dû à la présence des groupements carboxyle et amino avec des pKa différents. Ainsi, la solubilité et les phénomènes d'ionisation de la molécule sont dépendants du pH de la solution. La formule chimique ainsi que les phénomènes d'ionisation de la mésalamine sont représentés dans la Figure 3.1. Les espèces cationiques prédominent à un pH inférieur au point isoélectrique (pI 3.8), les espèces amphotères prédominent à la proximité du point isoélectrique, et les espèces anioniques prédominent à des valeurs de pH au-dessus du point isoélectrique (French et Mauger, 1993). Les valeurs de pKa et du pH peuvent influencer la solubilité et déterminer les espèces prédominantes en solution (Figure 3.2). À leur tour, la solubilité et les propriétés d'ionisation affectent la vitesse de libération intrinsèque et les caractéristiques de transport membranaire du principe actif. Les propriétés physico-chimiques et le taux de dissolution de la mésalamine peuvent fournir une base utile pour évaluer la vitesse de libération contrôlée du médicament dans différents milieux et aux pH variables (French, Himmelstein et Mauger, 1995). En raison de cette variation de la solubilité de la mésalamine, sa formulation pour la libération au côlon est difficile et nécessite un enrobage pour éviter la libération gastrique.

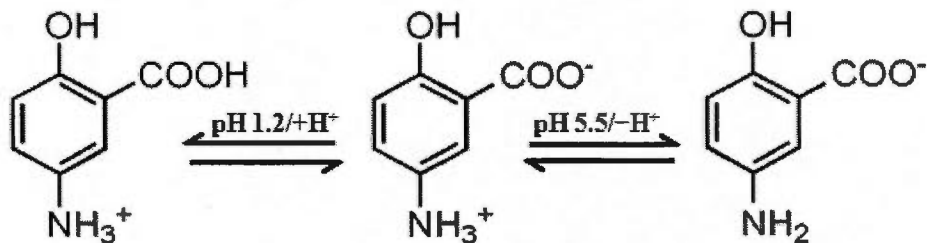


Figure 3.1: Le processus d'ionisation de la mésalamine et les différentes espèces (cationique, amphotérique et anionique) formées à des différentes valeurs de pH.

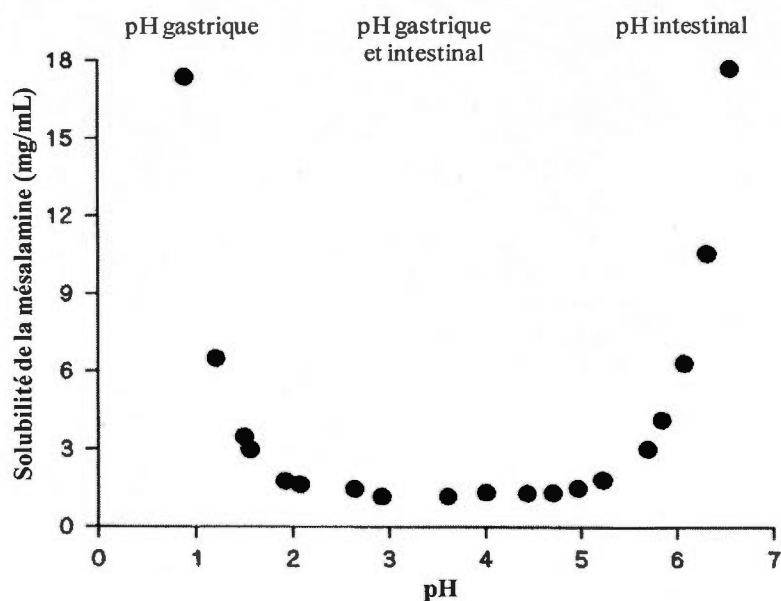


Figure 3.2: La variation de la solubilité de la mésalamine en fonction du pH (d'après French et Mauger, 1993)

3.2.2. Le mécanisme d'action de la mésalamine

Le mécanisme d'action précis de la mésalamine n'est pas encore élucidé, mais il est probablement dû à une combinaison de propriétés anti-inflammatoires (Allgayer, 2003). Des études précédentes ont montré que l'efficacité de la mésalamine dans le traitement des maladies inflammatoires intestinales est liée à son activité sur le métabolisme de l'acide

arachidonique (Figure 3.3). La mésalamine est un puissant inhibiteur du cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2), ce qui conduit à la diminution de la production de prostaglandine E2 produite lors de l'inflammation intestinale (Collier et al., 1976; Sharon et al., 1978). La mésalamine produit aussi le blocage de la voie de lipoxycgénases (Stenson, 1990) ce qui va conduire à l'inhibition de la production de l'acide hydroperoxyeicosatetraenoïques (HPETE) et des leucotriènes B4 (LTB₄). Son efficacité en tant qu'agent anti-inflammatoire est probablement due aussi aux effets sur le métabolisme des leucotriènes.

La mésalamine possède des propriétés antioxydantes étant l'un des plus puissants piègeurs de radicaux libres (Tamai et al., 1991). Ahnfelt-Ronne et coll. (1990) ont montré que la concentration élevée des lipides oxydés présents dans les biopsies rectales des patients atteints des maladies inflammatoires de l'intestin non traité a été normalisée de façon concomitante avec l'amélioration des symptômes après une période de traitement de 5 semaines avec la mésalamine. Donc, un rôle important est attribué au mécanisme de piègeur de radicaux libres de la mésalamine dans la thérapie de ces maladies chroniques (Ahnfelt-Ronne et al., 1990).

L'inhibition de l'activation du facteur nucléaire-kB (NF-kB), facteur de transcription ayant un rôle important dans la régulation des gènes impliqués dans l'inflammation, peut expliquer plusieurs autres effets de la mésalamine (Barnes et Karin, 1997). Les macrophages et les cellules épithéliales provenant des patients contiennent une valeur élevée de NF-kB activé par rapport aux cellules de la muqueuse normale ce qui nous indique l'implication dans le processus inflammatoire (Rogler et al., 1998). De plus, la mésalamine exerce une activité inhibitrice sur la production d'interleukine-1 (IL-1) et du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) (Mahida et al. 1991; Rachmilewitz et al., 1992).

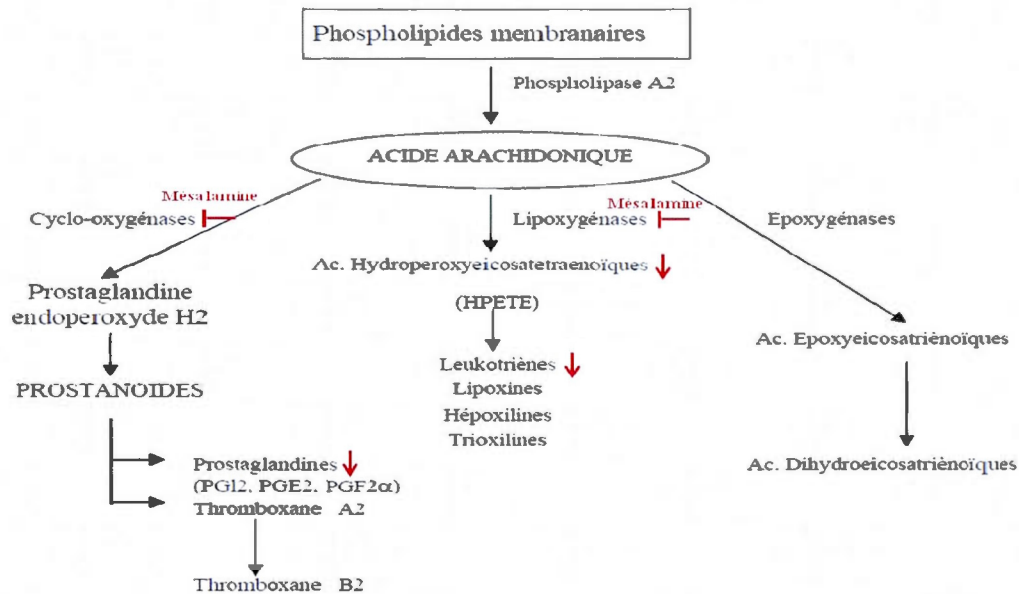


Figure 3.3: La synthèse des prostanoïdes et substances apparentées, dérivées de l'acide arachidonique et l'impact de la mésalamine (d'après Monassier, 2005).

3.2.3. Le métabolisme de la mésalamine

La mésalamine est une molécule amphotère. Après administration orale, en fonction du pH local, elle est susceptible à l'absorption systémique rapide dans la partie proximale de l'intestin grêle. Une conversion enzymatique à N-acétyl-mésalamine a lieu dans les cellules épithéliales intestinales et le foie suivi par l'excrétion dans l'urine sous forme de mélange de mésalamine libre et N-acétyl-mésalamine (Rijk, van Schaik et van Tongeren, 1988; Goebell et al., 1993). Le métabolite formé suite à la réaction enzymatique, N-acétyl-mésalamine, est inactif comme agent anti-inflammatoire (Sandborn et Hanauer, 2003). Le temps de demi-vie de la mésalamine est de 0,6 à 1,4 h tandis que le temps de demi-vie du métabolite (N-acétyl-mésalamine) est plus long (6 h).

3.3. Systèmes à libération contrôlée de la mésalamine

Initialement, la mésalamine était prescrite sous forme de sulfasalazine, dérivé diazoïque formé de mésalamine et la sulfapyridine. Cette dernière est un sulfamide qui n'était pas utilisé pour son rôle antibactérien, mais en effet son rôle était de former avec la mésalamine une molécule plus grosse et difficilement absorbée pour lui permettre d'atteindre le colon où la sulfasalazine subit une hydrolyse bactérienne au niveau de la fraction *di-azo* et les deux molécules de départ sont obtenues (sulfapyridine et mésalamine).

Une limitation est qu'environ un tiers des patients atteints des maladies inflammatoires de l'intestin ne peuvent pas tolérer le traitement à la sulfasalazine et manifeste plusieurs effets indésirables liés à l'activité de la sulfapyridine telles que des éruptions cutanées, la fièvre, l'hépatite et la pneumonie (Collins, 1968; Das et al., 1973). En raison de ces effets indésirables, les patients ont souvent dû renoncer au bénéfice thérapeutique de ce principe actif. La plupart des effets secondaires de la sulfasalazine semblent être liés à un niveau sérique élevé de sulfapyridine (Das et al., 1973).

Le taux élevé d'intolérance à la sulfasalazine a conduit à l'utilisation de la mésalamine, le métabolite actif de sulfasalazine, comme agent thérapeutique de premier choix pour le traitement des formes légères et modérées de maladies inflammatoires de l'intestin. Comme décrit précédemment, la mésalamine est rapidement absorbée au niveau proximal de l'intestin grêle ce qui conduit à sa métabolisation et à l'apparition des effets secondaires. Pour éviter ces inconvénients et pour permettre au principe actif d'atteindre les différents sites enflammés du petit intestin et/ou du côlon, plusieurs systèmes de libération ciblée ont été développés. Ces systèmes visent la libération de la mésalamine aux différents sites du tractus gastro-intestinal. Ils présentent des points forts et des faiblesses et peuvent être classifiés comme suit :

- Les promédicaments
- L'enrobage sensible au pH
- L'enrobage à l'éthyle cellulose
- Les suppositoires et les suspensions rectales

Tableau 3.1: La classification des formes commerciales orales de mésalamine
(d'après *Lichtenstein, 2009*)

Principe actif	Nom commercial	Méthode de libération du principe actif	Le site de libération
Mésalamine	Asacol	pH-dépendent, soluble à pH ≥ 7	Iléon terminal, côlon
	Salofalk, Claversal	pH-dépendent, soluble à pH ≥ 6	Jéjunum, iléon, côlon
	Pentasa	Libération contrôlée par la couche d'éthylcellulose	Duodénum, jéjunum, iléon, côlon
	Lialda	pH-dépendent, soluble à pH ≥ 7	Iléon terminal, côlon
Sulfasalazine	Azulfidine	pH-indépendant, azo-réduction bactérienne	Côlon
Balsalazide	Colazal	pH-indépendant, azo-réduction bactérienne	Côlon
Olsalazine	Dipentum	pH-indépendant, azo-réduction bactérienne	Côlon

3.3.1 Les promédicaments

Les promédicaments sont basés sur la création d'une molécule plus grosse constituée soit de deux molécules mésalamine ou d'une molécule transporteuse et une molécule de mésalamine reliées entre elles par un pont azoïque. Prise par la voie orale la nouvelle molécule est peu absorbée par le tube digestif et arrive intacte au niveau du côlon où, elle est clivée par les azo-réductases bactériennes et libère la mésalamine (Figure 3.4).

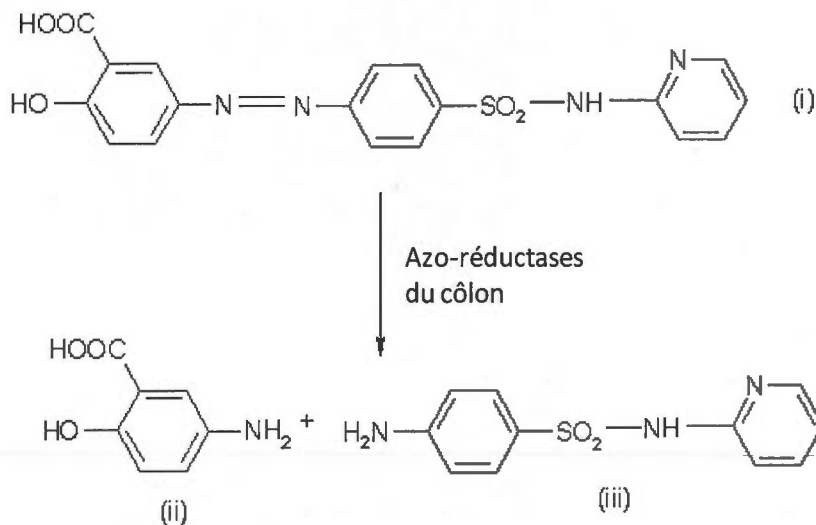


Figure 3.4: L'hydrolyse bactérienne du pont azoïque de la (i) sulfasalazine par les azo-réductases du côlon en libérant (ii) la mésalamine et (iii) la sulfapyridine (*d'après Qureshi et Cohen, 2005*)

La sulfasalazine est un promédicament développé et utilisé initialement pour traiter l'arthrite rhumatoïde (Svartz, 1988). Les patients atteints aussi de colite ulcéreuse traités avec la sulfasalazine ont connu une amélioration des symptômes intestinaux, ceci menant à une investigation plus approfondie sur la partie spécifique de la molécule responsable de l'efficacité du traitement. Azad Khan Piris et Truelove (1977) ont été les premiers à identifier la mésalamine comme le composant thérapeutiquement actif de la sulfasalazine dans le traitement des patients atteints de la colite ulcéreuse. Il a été montré que la fraction active de la sulfasalazine est la mésalamine et que la sulfapyridine agit seulement comme transporteur en assurant la livraison de la partie active dans le côlon. La sulfapyridine est facilement absorbée par le côlon ce qui conduit à des concentrations plasmatiques élevées qui sont associées à des taux élevés des effets indésirables. Cependant, la mésalamine est mal absorbée par le côlon, ce qui réduit son potentiel d'entraîner des effets secondaires et augmente sa capacité d'exercer ses effets anti-inflammatoires directement sur la muqueuse intestinale (Sandborn et Hanauer, 2003).

L'olsalazine est un autre agent anti-inflammatoire destiné à libérer son fragment actif, la mésalamine au côlon, tout en évitant les effets indésirables associés à l'utilisation d'un transporteur comme la sulfapyridine. L'olsalazine contient deux molécules de mésalamine reliées par un pont azoïque qui, suite au clivage par les azo-réductases bactériennes, libère les deux molécules actives. Comme promédicament, l'olsalazine est efficace dans le traitement par voie orale pour la colite ulcéreuse active et pour l'entretien de la rémission de la maladie. Elle peut aussi être bénéfique chez les patients atteints de la maladie de Crohn (Wadworth et Fitton, 1991). Plus précisément, l'olsalazine délivre efficacement la mésalamine au niveau du côlon, mais le promédicament lui-même augmente la sécrétion nette d'eau luminale et accélère le transit gastro-intestinal d'un repas. La diarrhée induite par le promédicament peut se produire suite à une inhibition de l'absorption de l'eau et des électrolytes dans l'intestin grêle (Raimundo et al., 1991). Cette diarrhée est différente de celle associée aux maladies inflammatoires de l'intestin par la forte teneur en eau et l'absence de sang. Elle se produit généralement après l'initiation du traitement avec l'olsalazine ou après l'augmentation de la dose. D'autres effets indésirables associés à l'olsalazine sont les douleurs abdominales, des nausées et la dyspepsie.

La balsalazide a été conçue en utilisant des analogues de la sulfasalazine dans lesquels la sulfapyridine a été remplacée par des molécules de transport inertes. Dans ce promédicament, la mésalamine est liée par l'intermédiaire d'un pont azoïque au 4-aminobenzoyl- β -alanine, une molécule de transport ayant une absorption réduite (Chan et al., 1983). Après l'administration par la voie orale, les azo-réductases du côlon vont scinder la balsalazide en libérant l'actif de son transporteur (Green, 1993). Les effets indésirables associés à la balsalazide étaient les maux de tête, les douleurs abdominales, la diarrhée, les nausées, les vomissements, l'infection des voies respiratoires et les arthralgies (douleurs articulaires) (Qureshi et Cohen, 2005).

Les inconvénients majeurs des promédicaments sont les effets indésirables et la nécessité d'une réaction de clivage, afin de libérer la mésalamine, réalisée par les azo-réductases sécrétées dans le côlon. Ce clivage dépend du temps de transit du médicament dans le côlon et il est nettement réduit chez les patients prenant des antibiotiques ou après l'ablation d'une partie du côlon (Qureshi et Cohen, 2005).

3.3.2 L'enrobage sensible au pH

Le système implique un enrobage pH sensible, insoluble dans le milieu acide de l'estomac, mais soluble dans le milieu alcalin ou neutre de l'intestin. L'Asacol® (Figure 3.5) est une formulation de mésalamine, à libération retardée, composée d'un noyau de 400 mg substance active (la même quantité contenue dans 1 g de la sulfasalazine) enrobée dans un polymère sensible au pH (Eudragit-S). L'enrobage a été conçu afin de réaliser le transport de la mésalamine au niveau du côlon avec une absorption systémique minimale (Qureshi et Cohen, 2005). La libération du principe actif suite à la dissolution de l'enrobage survient dans l'iléon terminal et le côlon ascendant quand le pH du milieu atteint la valeur neutre (Dew et al., 1983).

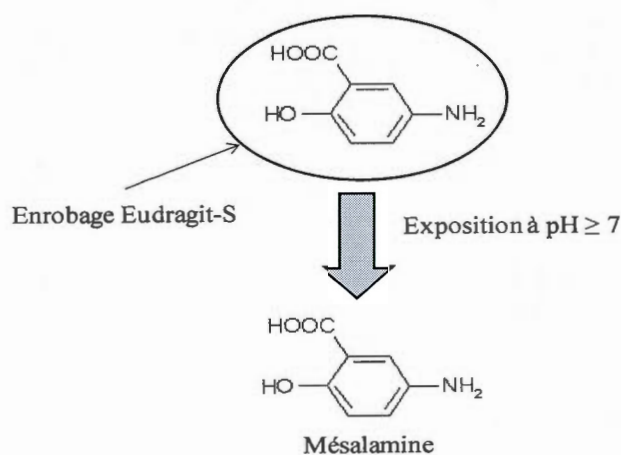


Figure 3.5: Représentation schématique de la formulation de l'Asacol®
(d'après Qureshi et Cohen, 2005)

Green et al. (1998) ont suggéré que les systèmes de libération ciblée de la mésalamine basés sur l'enrobage entérique (Asacol®) sont moins fiables, car leur efficacité est en fonction de l'évolution du pH luminal, de la vidange gastrique et du temps de transit. Par conséquent, la solubilisation de l'enrobage au niveau de l'iléon, permet l'absorption systémique de mésalamine (augmentation de la probabilité d'effets secondaires) et la réduction de la

quantité disponible dans le côlon. La quantité de mésalamine disponible au niveau du côlon peut également être réduite si le revêtement de résine n'est pas solubilisé totalement.

Des études effectuées en utilisant la scintigraphie gamma sur des humains ont démontré que le polymère est capable de protéger le noyau du comprimé dans l'estomac et l'intestin grêle supérieur. Les variations du temps de désintégration (de 5,0 à 15 h) ainsi que des sites de désintégration *in vivo* montrent un manque de spécificité pour le site de livraison. Les systèmes à libération ciblée basés sur des polymères sensibles au pH ne sont pas adaptés pour la livraison des principes actifs au niveau du côlon en raison de la pauvre spécificité du site de libération. Ce problème peut être partiellement corrigé en réalisant des formes pharmaceutiques à livraison ciblée multi-compartimentées (Ashford et al., 1993).

3.3.3 L'enrobage à l'éthyle cellulose

La mésalamine sous forme de microgranules est encapsulée dans une membrane polymérique sensible à l'humidité qui permet la libération du principe actif lors du contact avec les liquides du tractus gastro-intestinal (Pentasa®). Le polymère utilisé, l'éthyle cellulose, un éther moins polaire de cellulose, est largement utilisé comme matériau d'enrobage de formes pharmaceutiques à libération contrôlée (Katikanenia et al., 1995). Il possède une bonne capacité à former des films et fournit une membrane semi-perméable qui permet une hydratation lente et continue de la matrice conduisant à une libération indépendante de pH du principe actif tout au long de la durée d'incubation. Lors de l'administration orale, la capsule se désintègre dans l'estomac pour fournir des microgranules individuels de mésalamine qui agissent comme des unités discrètes à libération prolongée de mésalamine (Figure 3.6). L'hydratation progressive des microgranules en contact avec les fluides corporels permet leurs gonflements et la diffusion de la mésalamine peut se produire. Les effets indésirables observés lors des essais cliniques avec Pentasa® ont été généralement réversibles et les plus fréquents étaient la diarrhée, les maux de tête, les nausées, les douleurs abdominales, la dyspepsie et vomissements.

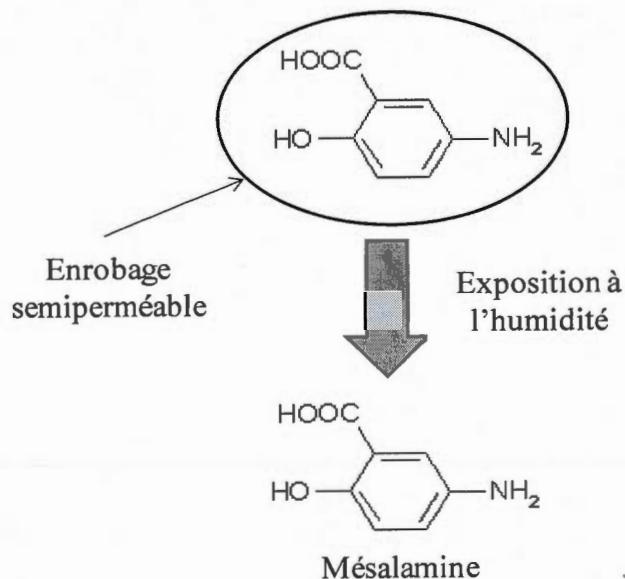


Figure 3.6: Représentation schématique de la formulation de Pentasa®
(d'après Qureshi et Cohen, 2005)

3.3.4 Les suppositoires et les suspensions rectales

L'administration de la mésalamine par voie rectale a été la première méthode utilisée (Truelove et Hambling, 1958) pour assurer la libération du principe actif au niveau du côlon en utilisant des suppositoires, des mousses et des lavements. Cette voie semble être une bonne alternative pour assurer le traitement local et systémique lorsque le patient ne peut pas prendre des formes pharmaceutiques administrées par voie orale. La voie rectale pourrait être considérée pour traiter des inflammations au côlon, mais en réalité les principes actifs n'arrivent pas toujours au niveau des sites d'absorption colonique. De plus, cette voie d'administration est inconfortable pour la plupart de patients. L'administration de la mésalamine sous forme de lavement (Rowasa®) ou de suppositoire (Canasa®) minimise de manière efficace les effets adverses associés à l'absorption systémique. Toutefois, l'administration de suppositoire est liée à d'autres effets secondaires comme l'acné, la douleur rectale et la fièvre.

* * *

Malgré les succès obtenus avec les formulations mentionnées, ci-dessus, le FDA propose, une revision des systèmes basés sur l'enrobage pH-dépendent à cause des effets indésirables observés et des variations du site de libération du principe actif. Dans ce contexte, le projet présent est dédié à la réalisation d'un nouveau système pH-indépendant assurant la libération de la mésalamine au site désiré et à un intervalle de temps prédéterminé. Nous avons préparé un nouveau complexe à partir du carboxyméthylamidon et de la lécithine. La nouveauté réside dans la complexation du carboxyméthylamidon avec un agent cationique de nature lipidique et son utilisation comme excipient dans la formulation des médicaments à administration orale.

CHAPITRE IV

PRÉSENTATION DU PROJET

Malgré l'avancement dans le développement des polymères biodégradables synthétiques, les polymères d'origines naturelles restent toujours des excipients d'intérêt majeur pour livraison de médicaments par voie orale. Parmi les polymères naturels, renouvelables, disponibles et versatiles, l'amidon est le plus économique et largement utilisé dans différentes formes pharmaceutiques surtout comme liant ou désintégrant. Au début des années '90, l'équipe de recherche du professeur Mateescu (UQAM) a introduit le Contramid®, amidon riche en amylose à faible réticulation (Lenaerts, Dumoulin et Mateescu, 1991; Mateescu, Lenaerts et Dumoulin, 1994) comme matrice pour la libération contrôlée des médicaments. L'amidon à réticulation élevée (Liamid®) a été aussi proposé comme excipient à la fois liant et désintégrant pour la libération rapide (Cartilier et al., 1994; Dumoulin et al., 1994). Les deux produits ont été valorisés et commercialisés par la société Labopharm inc.

Une nouvelle génération d'excipients ayant de propriétés particulières a été obtenue plus tard par l'introduction des fonctions carboxyliques sur l'amidon non réticulé et proposé comme matrice pour la livraison d'agents bioactifs (Mulhbacher, Mateescu et Calinescu, 2004; Calinescu et al., 2005; Calinescu et al., 2007). Le CMA est un polymère hydrophile, insoluble en milieu acide qui peut assurer la stabilité des actifs durant le passage gastrique des comprimés. Les fonctions ioniques peuvent moduler la libération de certains médicaments, mais peuvent aussi limiter le relargage d'autres, principalement les actifs susceptibles à former des complexes ioniques avec la matrice. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que les interactions non désirables entre l'excipient et le principe actif peuvent être éliminées par l'introduction d'un agent complexant et stabilisant de fonctions ioniques du CMA. La nouveauté de ce projet consiste dans l'association du CMA et de la lécithine sous forme d'un nouveau complexe (CMA/L) et son utilisation comme excipient pour le transport des principes actifs aux différents sites du tractus gastro-intestinal. Les excipients à base de

CMA/L sont pH-indépendants et ne permettent aucune ou une très faible (<5 %) libération du principe actif pour une durée de 5 h (2h dans milieu gastrique et 3h en fluide intestinal simulé), suivie par une libération rapide à partir de 6 h et complète après 8 h dans le milieu intestinal simulé (temps nécessaire aux comprimés d'atteindre le côlon). Le mécanisme de libération du principe actif repose sur l'éclatement du comprimé dû à l'hydratation graduelle de la matrice sans la formation de l'hydrogel (caractéristique aux excipients à base de CMA non complexé).

Ce nouveau complexe et son utilisation font l'objet d'une demande de brevet, ainsi que d'un article accepté par la revue *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2013).

Dans cette étude, nous avons utilisé la mésalamine comme principe actif avec l'objectif de réaliser des formes pharmaceutiques améliorées pour le traitement des maladies intestinales inflammatoires (MII). L'efficacité du traitement est étroitement liée à une action locale, au niveau du côlon, du principe actif. L'absorption systémique de la mésalamine, dans les parties pré-coloniques, peut entraîner non seulement une réduction importante de la dose efficace, mais aussi un risque élevé des effets indésirables. Actuellement, les formes commerciales (Asacol®) administrées par voie orale sont majoritairement basées sur un système pH-dépendant. L'inconvénient majeur de cette technologie est la grande variation inter-individuelle du pH gastro-intestinal avec un impact notable sur le profil de libération de la mésalamine. L'originalité de notre approche utilisant le complexe CMA/L nous a permis l'élaboration d'un nouveau système de transport pH-indépendant qui assure une libération totale de la mésalamine dans le côlon. De plus, en variant la proportion de la matrice, une libération temps-dépendante a été observée, ce qui permet de «programmer» la livraison des médicaments à un site spécifique désiré (au niveau de l'intestin grêle ou au côlon).

L'objectif principal de la recherche a été d'élaborer un nouveau système pH-indépendant qui assure une protection des principes actifs durant le passage gastrique et une livraison dans le côlon.

L'objectif principal du présent projet de maîtrise peut être articulé dans plusieurs objectifs d'étape qui peuvent être définis comme suit :

- élaborer et préparer le complexe CMS/L par une incubation de deux ingrédients, l'un en présence de l'autre, sous forme de solutions et le séchage du complexe par atomisation de la suspension obtenue;
- réaliser des formulations à charge médicamenteuse élevée à base de mésalamine administrables par la voie orale sous forme de comprimés (compression directe du mélange homogène de poudres de mésalamine et complexe CMA/L);
- identifier la meilleure formulation assurant une libération minimale *in vitro* (<5 %) de la mésalamine dans des conditions simulant l'estomac et une libération après 5 h (dans milieu gastrique 2h et intestinal simulé 3h), mais rapide à partir de 6 h et complète après 8 h dans le milieu intestinal simulé (temps nécessaire aux comprimés pour atteindre le côlon);
- évaluer les profils de dissolution *in vitro* de la mésalamine à différentes valeurs de pH du milieu intestinal (6,5 et 7,5)
- investiguer la structure du complexe à l'aide du test de l'inclusion de l'iode, analyses par spectrométrie IR (FTIR), diffractométrie de rayons X (DRX) et par microscopie électronique à balayage (MEB)

* * *

Le présent projet constitue la suite aux contrats de recherche financés par *Axcan Pharma*, société fortement impliquée dans le développement de systèmes à libération gastro-intestinale. Dans le cadre de ces contrats, un nouveau complexe a été réalisé entre deux principes actifs connus (mésalamine et sucralfate) et couramment utilisés dans le traitement de différentes affections. L'intérêt de la société était de réaliser de comprimés à base de ce complexe afin de développer de nouveaux produits pharmaceutiques destinés au traitement des maladies gastro-intestinales. L'ensemble de ces résultats constitue la base d'un article en préparation pour soumission à : *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*.

L'ensemble des travaux effectués durant la maîtrise est présenté schématiquement à la figure 4.1.

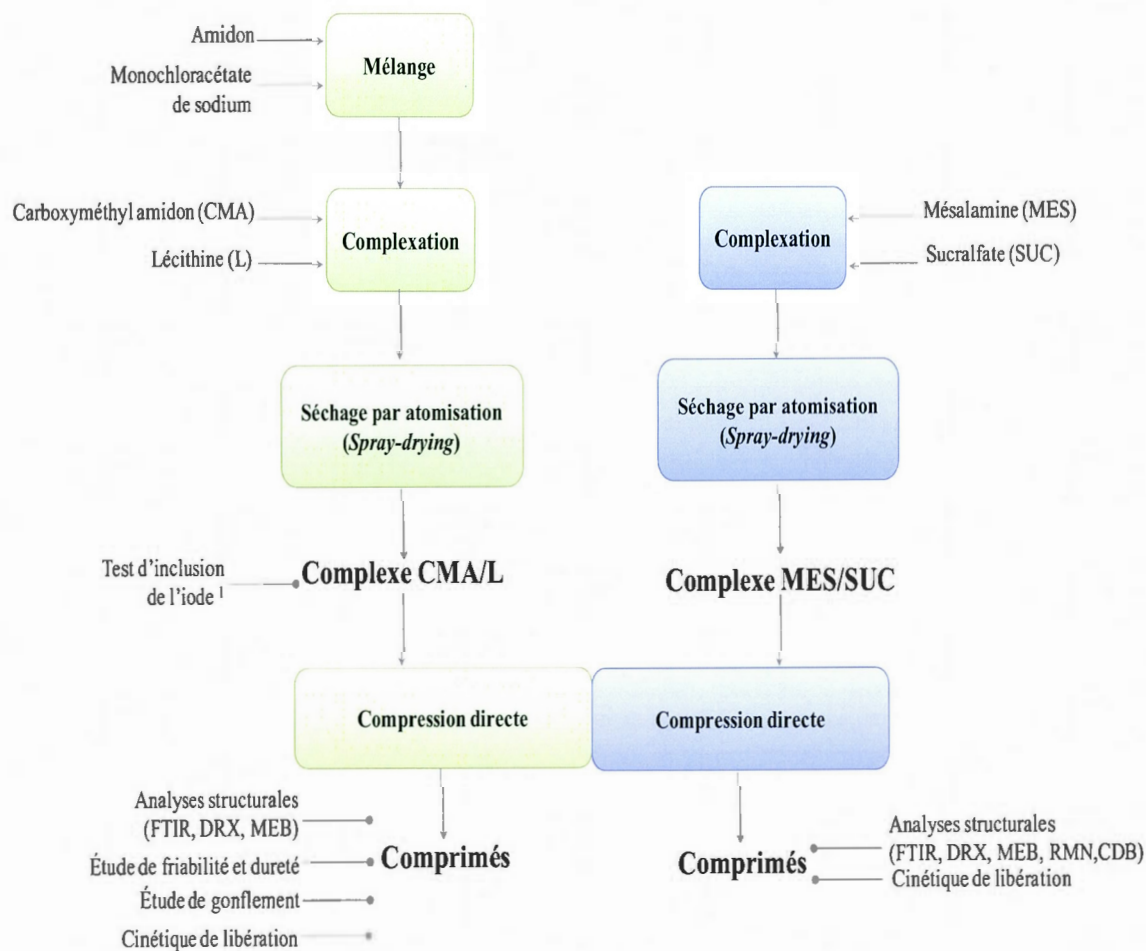


Figure 4. 1: Présentation schématique des différentes étapes du projet de maîtrise.

¹ Le test d'inclusion de l'iode à été utilisé afin de vérifier l'incorporation des chaînes dialkyle de la lécithine à l'intérieur de la cavité hélicale du CMA

Contributions à la recherche réalisées durant la maîtrise

Articles avec comité de lecture

M. M. Friciu, C.Tien Le, P. Ispas-Szabo and M. A. Mateescu - Carboxymethyl starch and Lecithin complex as matrix for targeted drug delivery: I. Monolithic Mesalamine forms for colon delivery (accepté à *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2013).

P. Ispas-Szabo, M. M. Friciu, P. Nguyen, Y. Dumoulin and M. A. Mateescu - Mesalamine-Sucralfate Complexes: Preparation, Characterization and Pharmaceutical Applications (prêt pour être soumis à *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*)

Demande de Brevet

M. M. Friciu, C.Tien Le, P. Ispas-Szabo and M. A. Mateescu - Complex containing Carboxyl Substituted Starch and Lipid for Delayed Delivery of Drugs. Demande provisoire de brevet, Numéro d'application 61640597/2012

Conférence avec arbitrage (texte intégral ou abrégé publié)

M. M. Friciu, T. Canh Le, P. Ispas-Szabo, M. Arella and Mircea A. Mateescu – Mesalamine – Novel Delayed Delivery System. Transaction of 39th Meeting of the Controlled Release Society. # 549, 2012.

M. M. Friciu, T. Canh Le, P. Ispas-Szabo, M. Arella et Mircea A. Mateescu – Nouveau système à libération contrôlée de la mésalamine. UQAM, Canada. 4^{ème} Colloque annuel Pharmaqam, 2012.

SECTION II

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE V

LE COMPLEXE CARBOXYMÉTHYLAMIDON/LÉCITHINE POUR LA LIBÉRATION CIBLÉE DE LA MÉSALAMINE

5.1 Le complexe carboxyméthylamidon/lécithine comme matrice pour la libération ciblée : I. Formes monolithiques de mésalamine pour la livraison colonique

5.2 Nouveau système à libération contrôlée de la mésalamine

5.1 Le complexe carboxyméthylamidon/lécithine comme matrice pour la libération ciblée : I. Formes monolithiques de mésalamine pour la livraison colonique

Maria Mihaela Friciu, Canh Tien Le, Pompilia Ispas-Szabo and
Mircea Alexandru Mateescu*

Département de Chimie, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada.

La mésalamine est couramment utilisée dans la thérapie des maladies inflammatoires de l'intestin et nécessite des traitements répétés pour induire et maintenir les épisodes de rémission aux patients. L'efficacité du traitement est étroitement liée à une action locale de la mésalamine au niveau du côlon. Un système de libération ciblée est nécessaire pour la réussite du traitement, car l'absorption systémique diminue l'efficacité et pourrait causer des effets secondaires. Divers systèmes à libération ciblée sont actuellement commercialisés, mais la plupart d'entre eux sont basés sur l'approche pH-dépendante (Asacol®). L'inconvénient majeur de ces systèmes est la variation intra- et interindividuelle du pH gastrique et intestinal. Dans cette étude, un nouvel excipient a été développé pour la livraison ciblée au niveau du côlon. La nouvelle matrice est basée sur le complexe obtenu entre le carboxyméthylamidon et la lécithine. Différemment des excipients existants, le nouveau complexe CMA/L est indépendant aux variations de pH, peu coûteux, simple à fabriquer et permet une charge médicamenteuse élevée. Les analyses structurales (FTIR, X-Ray et SEM) soutiennent l'hypothèse de la formation d'un complexe. Par ailleurs, en variant la proportion de la matrice, une libération temps-dépendante a été observée, ce qui permet de «programmer» la livraison des médicaments aux sites désirés.

* Contribution de l'auteur principal et des co-auteurs

Maria Mihaela Friciu – expérimentation, rédaction, figures, recherche bibliographique
Canh Tien Le – idée générale du projet, supervision du projet, rédaction
Pompilia Ispas-Szabo – rédaction, recherche bibliographique
Mircea Alexandru Mateescu – supervision du projet

Article accepté, sous presse à: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2013)

Carboxymethyl starch and Lecithin complex as matrix for targeted drug delivery:

I. Monolithic Mesalamine forms for colon delivery

Maria Mihaela Friciu, Canh Tien Le, Pompilia Ispas-Szabo and

Mircea Alexandru Mateescu*

Departement of Chemistry, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada.

*Corresponding author

Phone : 1 (514) 987 4319

Facs : 1 (514) 987 4054

e-mail : mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Abstract

For drugs expected to act locally in the colon, and for successful treatment, a delivery device is necessary, in order to limit the systemic absorption which decreases effectiveness and causes important side effects. Various delayed release systems are currently commercialized; most of them based on pH-dependent release which is sensitive to gastrointestinal pH variation. This study proposes a novel excipient for colon delivery. This new preparation consists in the complexation between carboxymethyl-starch (CMS) and Lecithin (L). As opposed to existing excipients, the new complex is pH-independent, inexpensive, easy to manufacture and allows a high drug loading. FTIR, X-Ray and SEM structural analysis all support the hypothesis of the formation of a complex. By minor variation of the excipient content within the tablet, it is possible to modulate the release time and delivery at specific sites of the gastro-intestinal tract. This study opens the door to a new pH-independent delivery system for mesalamine targeted administration. Our novel formulation fits well with the posology of mesalamine, used in the treatment of Inflammatory Bowel Disease (IBD), which requires repeated administrations (1 g orally 4 times a day) to maintain a good quality of life.

Keywords: Carboxymethyl starch, Lecithin, Complex, Colon delivery, High drug loading, Mesalamine

1. INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (IBD), including irritable bowel syndrome, ulcerative colitis, and Crohn's disease, are serious colonic disorders and often require lifelong medical attention (Baumgart et Sandborn, 2007). Mesalamine belongs to the family of aminosalicylates and is currently used as first-line therapy of IBD (Carter, Lobo et Travis, 2004; Sandborn, 2008) with efficacy based on localized delivery (Osler, 2007).

The oral administration of mesalamine is frequently associated with related systemic side effects, particularly when absorbed at the level of the upper gastrointestinal (GI) tract. Minimizing the systemic upper-intestinal absorption would not only reduce the adverse effects of mesalamine but will also afford better colon delivery with a high concentration at the targeted site thus enhancing its efficacy.

Since the mesalamine is absorbed and inactivated in the upper GI tract, various strategies have been developed (Qureshi et Cohen, 2005; Lichtenstein et Kamm, 2008) to delay its upper intestinal release and to enhance its delivery to regions where the bowel is inflamed (terminal ileum and colon). These strategies include enteric coatings to ensure pH-dependent mesalamine release, semipermeable membranes to facilitate delayed release, and prodrug formulations that rely on colonic flora to release mesalamine (Lichtenstein et Kamm, 2008). Considering that different inflamed segments of the tract can appear, the formulations are expected to respond to specific needs related to the concerned location in terms of amount of drug and site of delivery.

The pH-dependent technologies are based on polymeric coatings or carriers that are insoluble in the low gastric pH but dissolve at the higher, near neutral pH of the distal gut. These delayed formulations can cause high variations of mesalamine kinetic profiles among patients, due to the variability of pH range in the intestinal tract. It was shown that the luminal pH of the distal intestine in patients with IBD can be significantly lower than that seen in healthy volunteers (Fallingborg et al., 1993).

The main objective of this work was to develop a new effective and inexpensive pH-independent oral colonic drug delivery system of mesalamine as an alternative to commercial formulations. This novel delayed release system is based on carboxymethyl starch (CMS)

which prevents drug release in the upper gastrointestinal regions and ensures drug release in the colon, improving thus the effectiveness of the treatment for IBD. Even though the carboxymethylation of starch has been used for a long time, for food and other industrial applications, various studies have only recently proposed the carboxymethyl high amylose starch (with more than 70% amylose) as excipient (Mulhbacher, Mateescu et Calinescu, 2008) for oral monolithic tablets able to control the release of active molecules (Ispas-Szabo et al., 2007; Nabais et al., 2007) and of bioactive agents (Calinescu et al., 2005; Calinescu et al., 2007). CMS showed good properties as an excipient to control the release of active and bioactive agents but it is less efficient for colon delivery because of its high solubility in the neutral environment and its sensitivity to pancreatic α -amylase (Assaad et Mateescu, 2010; Calinescu et Mateescu, 2008). With the aim to ensure a longer time of drug release, a novel polyelectrolyte complex (PEC) of CMS and chitosan was prepared and tested in vitro as a matrix for oral drug delivery system (Assaad et al., 2011). It was shown that PEC is a more suitable drug carrier for colon targeting than CMS alone, since it can prolong the release time of active agents. Moreover, the hydration of PEC is moderately high and there are still some concerns on in vivo behavior of chitosan of some sources.

In order to improve the effectiveness of CMS as an excipient for colon targeted formulations, the complexation of CMS with lipids could be used. Our aim was to produce a more hydrophobic matrix which is less susceptible to hydration and could ensure a delayed release of the active ingredients in the colon. The addition of a hydrophobic part to the CMS structure was found to prevent the outer gel layer formation on the tablet in simulated intestinal fluid (SIF). Lecithin, with high phosphatidylcholine content, was selected as an appropriate lipid for complexation because of the important lipophilic segment represented by dialkyl chains (Elworthy et Saunders, 1956). Lecithin possesses also a hydrophilic segment (quaternary amine from choline) and ionic interactions may occur between part of carboxylic groups of the CMS and the positively charged amine of lecithin increasing thus the complex stability. Furthermore, lecithin is non toxic, inexpensive, largely accepted and easy to handle. Lecithins, especially fractions with high phosphatidylcholine content, are used as excipients and as an active drug. The excipient forms can be liposomes, mixed micelles and emulsions. The functions are resorption enhancement, solubilization and reducing drug toxicity (van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008).

The obtained CMS/L complex is pH-independent, and affords a programmable release time (chronodelivery). The concept is based on two essential characteristics of the CMS/L complex: i) mechanically stable in acidic (gastric) fluid maintaining shape with no swelling, and ii) gradually swollen in neutral (intestinal) fluid affording rapid disintegration after at least 4h, or according to the desired release time (chronodelivery). The formulation can be easily realized by direct compression of dry powder mix of mesalamine and of the CMS/L complex, reducing the number of manufacturing steps needed. To the best of our knowledge this is the first investigation on the preparation of carboxymethyl starch/lecithin complexes and on their use as a carrier of active ingredients for colon targeting.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Materials*

High Amylose Starch (Hylon VII) was from National Starch (Bridgewater, NJ, USA). Lecithin Ultralec F was purchased from Archer Daniels Midland Company (Decatur, IL, USA). Glyceryl tristearate (GT), Carboxymethylcellulose (CMC) and Ethyl cellulose were pharmaceutical grade from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Mesalamine (pharmaceutical grade) was a product of PharmaZell (Raubling, Germany). Other reagents were chemical grade and were used without further purification.

2.2. *Synthesis of Carboxymethyl Starch/Lecithin complex*

2.2.1. *Synthesis of sodium Carboxymethyl-Starch (CMS)*

The CMS was synthesized by etherification of the starch using sodium monochloroacetate as a functionalization agent in alkaline medium, as previously described (Assaad et Mateescu, 2010). Briefly, an amount of 140 g of high amylase starch was dispersed in 340 mL of distilled water under continuous vertical stirring (Servodyne Mixer, 50000-40, IL, USA) and heated to a constant temperature (55 °C) during the synthesis in a jacketed beaker (2 L) by using a heating circulator bath (Haake D1, Berlin, Germany). Then, 470 mL of 1.5 M NaOH was added for gelatinization under continuous mixing and the stirring was maintained for 30 min. The carboxymethylation occurred by adding a freshly prepared solution of sodium

chloroacetate to the alkaline (0.9 M NaOH) mixture. After 1 h of reaction, a volume of 540 mL of distilled water was added, the mixture was cooled-down to room temperature and the reaction was stopped by neutralization with acetic acid. The carboxymethylated starch powder was obtained by precipitation in methanol, dried in acetone and then sieved retaining particles smaller than 300 μm . The degree of substitution of CMS determined by back-titration was about 0.17 (Assaad et Mateescu, 2010). This value corresponds to 1.00 milliequivalents of functional groups per gram of polymeric powder (meq/g).

2.2.2. *Complexation of Carboxymethyl-Starch and Lecithin (CMS/L)*

The complexation of CMS/L was performed at ratios 10:1.5 and 10:3. An amount of 5 g of CMS was dispersed in 800 mL distilled water under vigorous agitation at 60 °C. Then, a quantity of Lecithin (0.75 or 1.5 g) previously dissolved in 200 mL ethanol was slowly added to CMS solution until obtaining a homogenous suspension. The suspensions were dried using a Mini spray dryer Büchi B-290 (Flawil, Switzerland). The spray dryer was equipped with a two-fluid nozzle and operated in a co-current mode (the feeding suspension and the drying air flow in the same direction). The drying was performed using the following parameters: inlet temperature 200 °C, outlet temperature 100 °C, spray flow approximately 500 L/h and aspirator setting at 38 m³/h. The CMS/L suspension was mixed continuously during the drying process using a magnetic stirrer to prevent sedimentation. The same conditions were applied also to the preparation of CMS/GT (glyceryl tristearate) and CMC/L complexes.

2.3. *Wet granulation of mesalamine*

The wet granulation was carried out by suspending an amount of 5 g of mesalamine in solution of ethyl cellulose (2 %, w/v) dissolved in pure ethanol. Complete dispersion was achieved by stirring for 30 min and the suspension was centrifugated at 447 x g for 10 min. The precipitate was collected and air dried at 40 °C for 24 h. The resulted powder was ground in a ceramic mortar and sieved through a 300 μm screen and stored away from light, at room temperature.

2.4. Tablet preparation

Monolithic tablets containing 400 mg active agent (untreated or granulated mesalamine) and 140 mg excipient (complex CMS/L or CMC/L or CMS/GT) were obtained by direct compression of homogenous mixture of dry powders in flat-faced punches at 2.3 T/cm² in a Carver hydraulic press. The compression pressure was maintained for 20 seconds. The coating was performed by spraying the tablets with a solution of ethyl cellulose 2 % (w/v) in methanol and the drying was done at room temperature. This operation was repeated four times on each side of the tablet. The average amount of ethyl cellulose deposited on the tablets was 13.7 ± 0.5 mg. In order to optimize the formulation based on CMS/L, monolithic tablets containing 400 mg mesalamine and various amounts (110-160 mg) of complex were also prepared.

2.5. Dissolution assay

Dissolution assay was followed in simulated gastric fluid (SGF) and in simulated intestinal fluid (SIF) which were prepared according to USP methods (USP-NF, 2010), without enzymes. The dissolution conditions were 100 rpm and 37 °C using an USP dissolution apparatus II (Distek 5100, North Brunswick, NJ, USA). The mesalamine release from tablets (one tablet per dissolution vessel) was followed in 900 mL of enzyme-free SGF (pH 1.2) for 2 h. After the appropriate period of incubation in SGF, the tablets were transferred into 900 mL of pancreatin-free SIF (pH 7.2) and mesalamine release was monitored at different time intervals (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14h). Samples of 1 mL were collected at each sampling time, properly diluted and then assayed in an UV Spectrophotometer (OceanOptics SD2000, Dunedin, FL, USA) at 303 nm for SGF media and at 330 nm for SIF media. The quantity of mesalamine released was evaluated with calibration curves ($R^2 = 0.9999$) prepared in SGF and SIF media with mesalamine concentrations ranging from 1.5 to 50 µg/mL.

2.6. Characterization

2.6.1. Swelling and crushing strength of tablet

The swelling test was performed by immersion of tablets in 50 ml SIF (pH 7.2) medium only at 37 °C in a graduated cylinder. Swelling profile of the tablet was determined by measuring the volume gain of the tablet at various incubation times. The crushing strength (n = 5) was evaluated with tablet hardness tester (Varian, VK 200, Cary, NC, USA).

2.6.2. Iodine coloration test

The structure of CMS /lecithin complex was characterized by the iodine test as described by Kawai et al. (2012). Indeed, an amount of 100 µL of iodine solution (2.0 % KI and 1.0 % I₂ in distilled water) was added to solutions containing 0.5 % (w/w) of different samples (potato starch, CMS, CMS/L complex or CMS/GT) at 60 °C. Because high amylose starch is insoluble in aqueous medium, potato starch was used as positive control.

2.6.3. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The FTIR spectra were recorded (8 scans at a resolution of 2 cm⁻¹) using a Thermo-Nicolet 6700 (Madison, WI, USA) FTIR spectrometer equipped with a deuterated triglycine sulfate-KBr (DTGS-KBr) detector and a diamond smart attenuated total reflection platform.

2.6.4. X-ray diffractometry (XRD)

XRD patterns were obtained with a Siemens D-5000 diffractometer (Munich, Germany) SOL-X detector and operating in reflectance mode of Co-K α at 1.789Å wavelength. The XRD spectra, recorded between 5 and 50° for 2 θ , were treated using DiffracPlus software.

2.6.5. Scanning electron microscopy (SEM)

The morphology and surface characteristics of high amylose starch (Hylon VII), CMS and CMS/L complex were examined at various magnifications with a JSM-6010LV InTouchScope™ (SEM) (JEOL Ltd, Tokyo, JP) using a secondary electron image (SEI) detector. The images were obtained with accelerating voltages of 1.5 kV and high vacuum. Samples were placed on metallic stubs using double-sided carbon conductive tape.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

Mesalamine is soluble in gastric ($\text{pH} < 3.0$) and in intestinal ($\text{pH} > 6.0$) environment (French et Mauger, 1993). When formulated without excipient, the drug was completely released within 2 h in SGF medium. In contrast, when formulated with CMS mesalamine showed a rapid release (about 40 %) of drug in SGF (Figure 5.1.1A) followed by a slow release up to 24 h in SIF. This is probably due to the retention of drug by interactions of amino (positively charged) groups of mesalamine with the carboxylate (negatively charged) groups from CMS excipient.

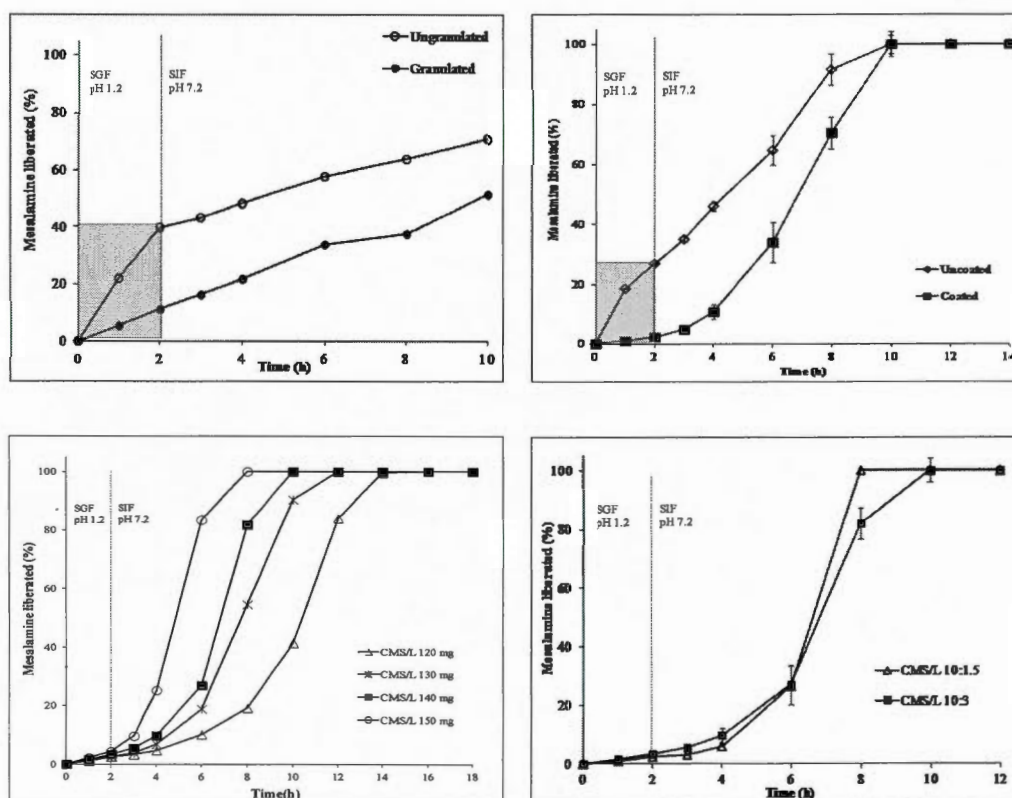


Figure 5.1.1: Release kinetic profiles of mesalamine from tablets formulated with: **A)** 75 % ungranulated or granulated mesalamine and 25 % CMS; **B)** 75 % ungranulated mesalamine and 25% CMS/L complex (uncoated/coated tablets); **C)** 400 mg mesalamine and various contents of CMS/L complex (coated tablets); **D)** 75 % ungranulated mesalamine and 25% CMS/L complex at two ratios 10:1.5 and 10:3 (coated tablets). Dissolution media were SGF pH 1.2 (2 h) followed by SIF pH 7.2 at 100 rpm (37 °C).

In order to avoid the undesired drug/excipient interactions (Jackson, Young et Pant, 2000), wet granulation of mesalamine was assayed. The active agent is confined in a protective film and thus the direct contact with the matrix is limited. Although a reduction (from 40 to 10 %) of drug release in SGF was obtained with granulated mesalamine formulation, no significant difference in release profile was observed in SIF (Figure 5.1.1A) between granulated or ungranulated mesalamine. This behavior can be due to the formation of a gel layer at the surface of the tablets which limits the drug release. Indeed, the formulation with CMS alone

did not generate the desired colon delivery. The color changes of granulated mesalamine powder during the granulation process, the imprecise dosage of tablets and the low level of reproducibility were considered as major disadvantages of wet granulation. For these reasons, this process was discontinued and in all subsequent formulations, mesalamine was used as received without modification.

3.1. CMS/L complex

Mesalamine tablets formulated with CMS/L complex showed good mechanical properties; particularly in SIF, no gel layer was observed. The dissolution assays showed a complete release of mesalamine after 10 h (Figure 5.1.1B). However, a considerable release (25 %) in SGF was found mainly due to the drug exhibited at the tablet surface, since the drug loading is high (75 %). For this reason, a coating of tablets is required.

Ethyl cellulose, currently used as a coating material (Katikanenia et al., 1995; Majid et Zhu, 1998), is a good film forming agent able to slowdown the matrix hydration. When mesalamine was formulated with CMS/L complex and coated with ethyl cellulose, no significant release was noticed in SGF (Figure 5.1.1B). This delay lasted for approximately additional 2 h in SIF, a complete release of the drug being obtained after 6 h of incubation in intestinal medium. These results suggest that the ethyl cellulose coating is of particular interest for tablets based on CMS/L complex intended for colon delivery. An important aspect to be noted is the particularly high loading (75% mesalamine) of tablets based on the new complex CMS/L used as excipient. It is also worth mentioning that CMS alone or other excipients combinations (GT and CMC/L) have not provided similar results.

3.2. Formulation optimization

In order to optimize the formulation, coated tablets containing 400 mg mesalamine and various quantities of CMS/L complex (110-160 mg) were prepared and the *in vitro* dissolution assays were done. The dissolution patterns (Figure 5.1.1C) suggest that for all formulations, no significant release of drug occurred in SGF, whereas in SIF, the release time depended only on the amount of CMS/L complex used in the formulations. A longer release

time was observed for tablets containing a lower amount (120 mg) of CMS/L complex, while a faster release was obtained for tablets with a higher quantity (150 mg). This phenomenon is probably due to the high hydration capacity of the complex in SIF favoring a faster drug release. By changing the amount of excipient in the formulation, it is possible to target the release site within the gastro-intestinal tract at a predetermined time interval in a manner close to chronodelivery.

Figure 5.1.1C shows the release patterns of mesalamine with a specific lag time covering the gastric and eventually a short upper intestinal transit followed by a time-dependent release (chronodelivery) as a function of the excipient content in the tablet formulation.

Figure 5.1.1D shows the dissolution profiles of mesalamine from coated tablets formulated with 140 mg CMS/L complex prepared at two ratios (CMS:L, 10:1.5 and 10:3) with no major differences found between the two release patterns. The CMS/L at 10:3 ratio was used for the subsequent dissolution studies.

3.3. Structural analysis of CMS/L complex

There are numerous reports (Godet et al., 1993; Morrison, Law et Snape, 2010) describing the amylose-lipid complexes. However, the incorporated lipids in these complexes were mainly monoalkyl chains. To our knowledge, there are no reports on the complexes involving modified amylose (i.e. carboxylated starch) and lipids with dialkyl chains. From studying the structure of the amylose-monoalkyl lipid complex, it is assumed that the aliphatic part of the lipid is included inside the amylose helix whereas the polar group is lying outside (Putseys, Lamberts et Delcour, 2010), being too large and probably too polar to be incorporated.

3.3.1. Iodine test

The amylose of starch has a well-known capacity to bind iodine and a deep blue color is obtained when the iodine is included in the central channel of the amylose helix. In case of the amylose-lipid complex described by previous studies (Exarhopoulos et Raphaelides, 2012; Kawai et al., 2012), the center channel is occupied by mono-alkyl chains and no color

change can be observed. The iodine test was used in this study to investigate the structure of CMS/L complex and the results (Figure 5.1.2) showed that the potato starch and CMS (controls) solutions developed a blue or violet color, indicating the presence of iodine/derivative starch inclusion complex with an unoccupied channel. In contrast, no color change was observed for the solution containing the CMS/L complex suggesting that dialkyl chains of lecithin were localized inside the CMS single helix. The incorporation of alkyl chains inside the helical cavity prevented the access of iodine and no color development was observed. As previously mentioned, the polar groups of lecithin (mainly phosphate and choline) were possibly located near the entrance of the helix. This is due to the steric hindrance and electrostatic repulsions which prevent the polar groups to penetrate inside the cavity. It is well known that the structure of amylose starch is mainly based under double helix-B form. When amylose is modified by carboxymethylation, the double helix-B form is changed to the single helix-V form (Assaad et al., 2011; Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2010). This helix V-form presents a pronouncedly hydrophobic channel compared with the double helix form (Immel et Lichtenthaler, 2000). In this case, the incorporation of dialkyl chains inside the helix-V form is probably more favorable than that in the double helix.

The CMS treatment with the triglyceride GT (glyceryl tristearate derived from glycerol and three units of stearic acid) did not provide the same results as CMS/L complex suggesting GT remained outside of the cavity, due to its voluminous structure.

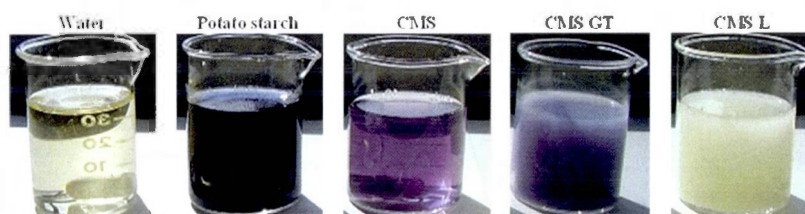


Figure 5.1.2: Iodine stained samples containing: water, potato starch, CMS, CMS/GT and CMS/L complex.

3.3.2. FTIR analysis of complex CMS/L

Figure 5.1.3 shows FTIR spectra in the $1800\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ region for native high amylose starch (Hylon VII), for CMS and for the complex CMS/L. The pattern of native amylose

starch presents a characteristic band at 1643 cm^{-1} assigned mainly to the hydroxyl group stretching. The CMS presents two more absorption bands at 1590 cm^{-1} and 1417 cm^{-1} which were attributed to symmetrical and asymmetrical stretching vibrations of carboxylate groups (Zoldakova et al., 2005; Silverstein, Webster et Kiemle, 2005). The spectrum of CMS/L complex showed a pattern similar to CMS, with an additional absorption band at 1530 cm^{-1} assigned to the ionic interactions developed between -COO^- groups of CMS and the $\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ groups of lecithin fitting well with the data on CMS:chitosan complexes (Assaad et al., 2011; Wang, Khor et Lim, 2001).

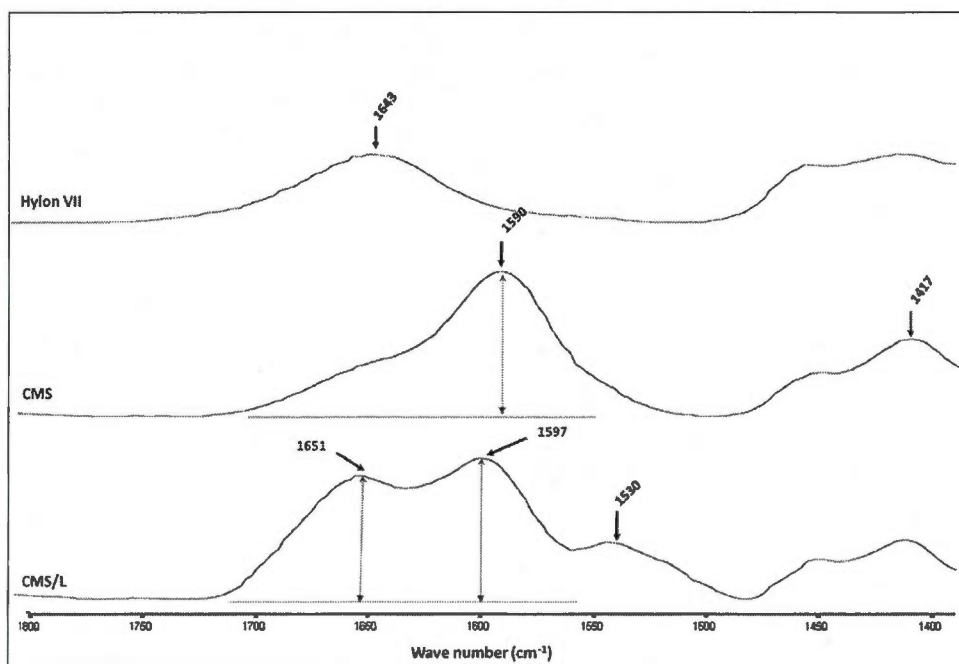


Figure 5.1.3: FT-IR spectra of untreated tablets of Hylon VII, CMS and of CMS/L complex

To monitor the behavior of complexes in gastrointestinal media, tablets based on CMS and CMS/L were analyzed by FTIR after incubation during 2 h in SGF (pH 1.2) and after additional 4 h in SIF (pH 7.2). Native amylose starch tablets were not stable (rapid disintegration) in SGF and were therefore not included in this study.

When tablets were incubated in SGF, a decrease of absorption intensities for the bands at 1590 and 1417 cm^{-1} (Figure 5.1.4A) was obtained due to the protonation of carboxylate to carboxylic acid groups characterized by a new absorption band at 1725 cm^{-1} . It is important to mention that the intensity of absorption band at 1725 cm^{-1} for CMS/L complex is weaker compared to that of CMS suggesting that part of carboxylate groups of the CMS/L complex was already involved in ionic interaction with the amino groups of lecithin and those remained available (free-carboxylate) are lesser compared to the CMS.

Differently from previous spectra, the disappearance of the absorption band at 1725 cm^{-1} for tablets treated in SIF (Figure 5.1.4B) is due to the deprotonation of carboxylic acid groups to carboxylate conducting to the reappearance of absorption bands at 1590 and 1417 cm^{-1} again at weaker intensity for the CMS/L complex, due to the partial interaction of these groups with amino group of lecithin.

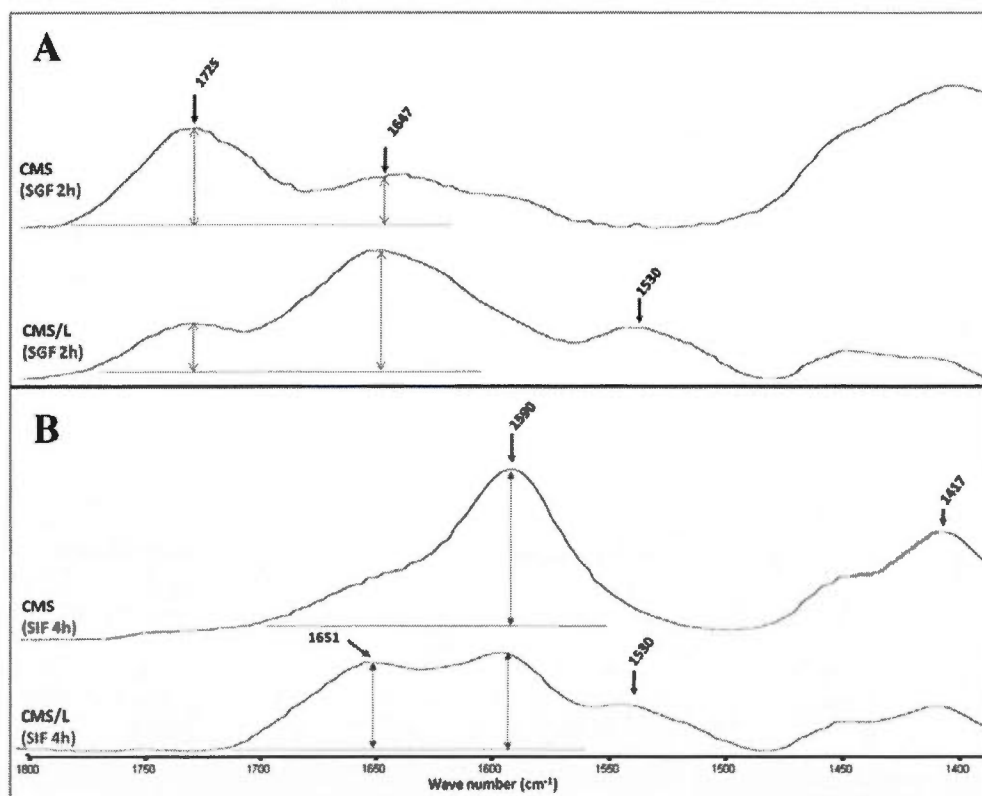


Figure 5.1.4: FT-IR spectra of CMS and CMS/L complex tablets incubated: A) in SGF (pH 1.2) during 2 h followed by B) SIF (pH 7.2) for additional 4 h.

It is also of interest to mention the presence of the band at 1530 cm^{-1} observed in the CMS/L spectra and, in spite of considerable variations of pH values (1.2 and 7.2), no significant change of absorption intensity was observed. The FTIR data seem to confirm the presence of ionic interactions in the CMS/L complex almost stable at various pH values mimicking the biological media suggesting a pH-independent behavior of the complex.

3.3.3. X-ray diffraction

Figure 5.1.5A shows the diffractograms of tablets of native starch (Hylon VII), of CMS and of CMS/L complex. The native high amylose starch (Hylon VII) pattern presents a semi-crystalline structure corresponding to the double helix-B form (Ispas-Szabo et al., 2000).

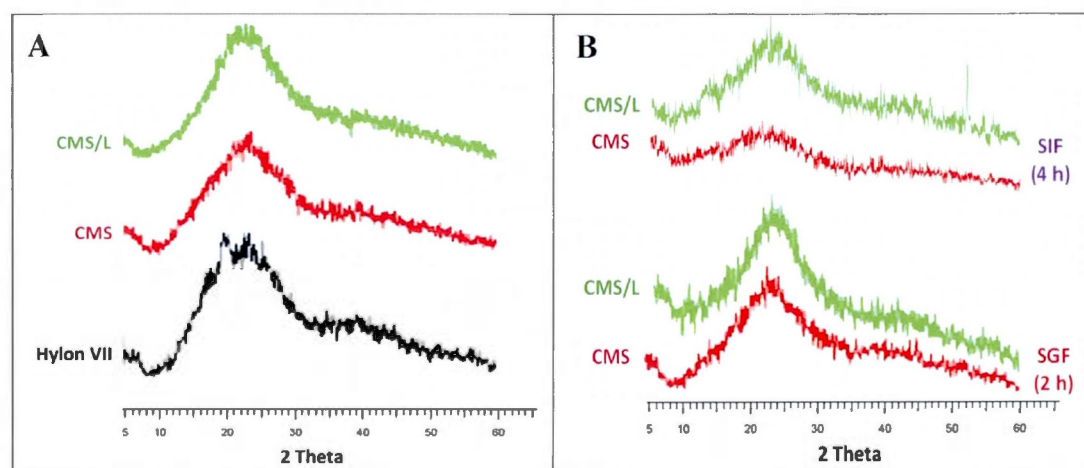


Figure 5.1.5: XRD patterns of A) untreated tablets of native Hylon VII, of CMS and of CMS/L and B) tablets of CMS and CMS/L treated 2h in SGF followed by 4h in SIF.

The X-ray diffractogram of CMS obtained by carboxymethylation of Hylon VII showed a wide band suggesting a decrease in crystallinity when compared with native starch. It is possible that the carboxymethylation of native amylose starch altered part of the hydrogen associations between the macromolecular chains and induced a structural change from double helix-B form to single helix-V form (Assaad et al., 2011; Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2010).

On the other hand, the X-ray diffractogram of CMS/L complex showed band with a moderate intensity and less wide than that of CMS, suggesting that the CMS/L has a structure more organized and more stable than CMS. The higher degree of crystallinity of CMS/L is probably due to the structural stabilization of complex by ionic and hydrophobic interactions that occur between CMS and lecithin.

When tablets were incubated in SGF (pH 1.2), an increase in crystallinity (Figure 5.1.5B) was observed for CMS and CMS/L complex. The carboxyl groups were protonated in acidic medium. The protonation reduces the repulsion effects and provides additionally hydrogen interactions leading to a more organized structure. Rapid disintegration of native amylose starch tablets was observed in SGF medium and for this reason was not included in this study. The SIF (pH 7.2) treatment caused a considerable decrease in crystallinity for CMS, due to the deprotonation phenomenon. In contrast, no considerable change of the crystallinity was noticed for CMS/L complex (Figure 5.1.5B).

The X-ray patterns of CMS/L complex showed an almost unchanged crystallinity at various pH of biological media suggesting that other stabilizations, differing from ionic interactions can be involved. Probably, hydrophobic interactions occur between dialkyl chains of part of lecithin from outside the helical cavity. Indeed, a part of the lecithin seems incorporated inside the helical cavity of CMS, as highlighted above by iodine test and another portion of lecithin remained outside the helical structure being stabilized via hydrophobic interactions as described by Le Tien et al., 2003. These hydrophobic interactions would improve the complex stability and also can explain the pH-independent property of CMS/L complex.

3.3.4. Hypothetical structure of CMS/L complex

Considering that i) iodine test revealed that the single helix V-form of CMS can incorporate dialkyl chains inside the hydrophobic cavity; ii) FTIR spectra showed ionic interactions involving carboxylate groups of CMS and amino groups of lecithin; iii) X-ray diffraction analysis showed that self-assembling hydrophobic interactions can occur between dialkyl chains of lecithin sitting outside the CMS helical cavity, the following structure of CMS/L complex was hypothesized as schematically presented in Figure 5.1.6.

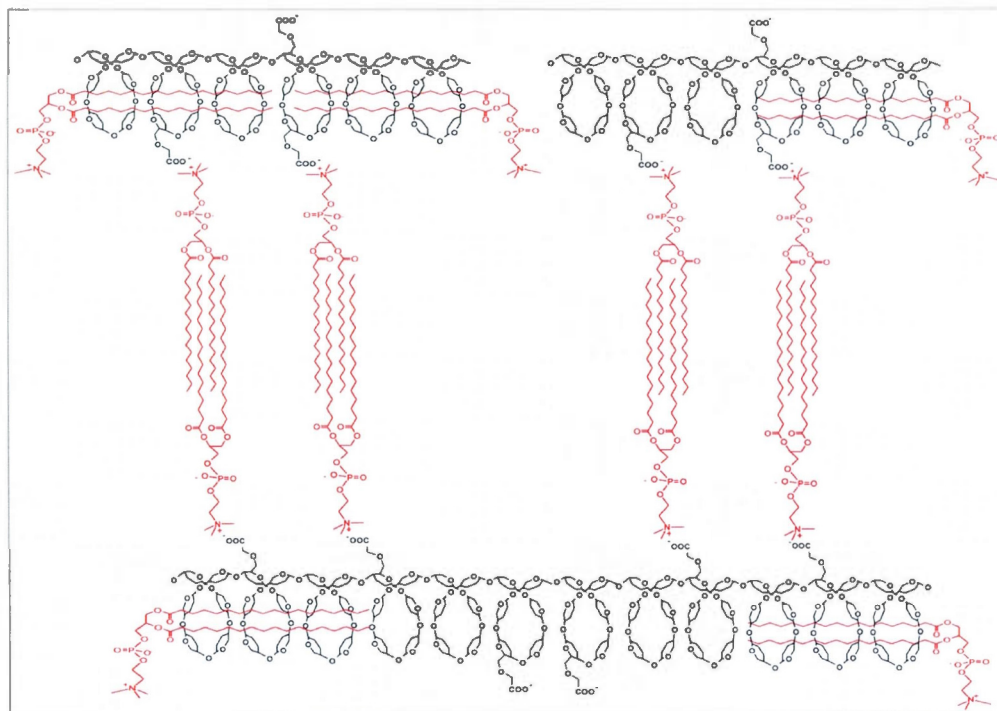


Figure 5.1.6: Hypothetical structure of CMS/L complex stabilized by dialkyl chains included in the V structure of CMS, ionic interactions and hydrophobic self-assembly of remaining lecithin chains.

3.3.5. Scanning electron microscopy (SEM)

The SEM micrographs of native starch (Hylon VII), of CMS and of CMS/L granules are shown in Figure 5.1.7. The native starch granules (Figure 5.1.7-a1 and a2) were predominantly round or oval in shape, with smooth surface and uniform range of size distribution (5-10 μm). The crystalline structure of Hylon VII is due to the high content of amylose (more than 70 %) which is characterized by a double helix-B form. This structure is mainly stabilized by hydrogen bonds between the hydroxyl groups of glucopyranose units.

Lemieux *et al.* reported the influence of drying procedures on the structure of CMS and showed that CMS particle morphology obtained from solvent precipitation (SP) and spray drying (SD) were obviously different at higher magnifications (10000). However, no evident disparity was observed at the low magnification (< 300). In this case, a compact

agglomeration of particles was noticed for CMS obtained from SP, whereas a sparse or porous aspect was observed for CMS from SD (Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2010). Although the particles obtained by SP or SD are different, both dyeing methods provided granules having the same appearance at low magnification (< 300). Differently from Hylon-VII granules, CMS granules were characterized by irregular shape with uneven surface likely due to the association of numerous small particles forming larger granules (Figure 5.1.7-b1 and b2) with axes about of 50-100 μm .

Surface roughness indicates an alteration of the starch structure. The carboxylic groups reduced the network self-assembling by hydrogen association between hydroxyl groups and promoted the repulsion effects conducting to the reorganization of the network (Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2010).

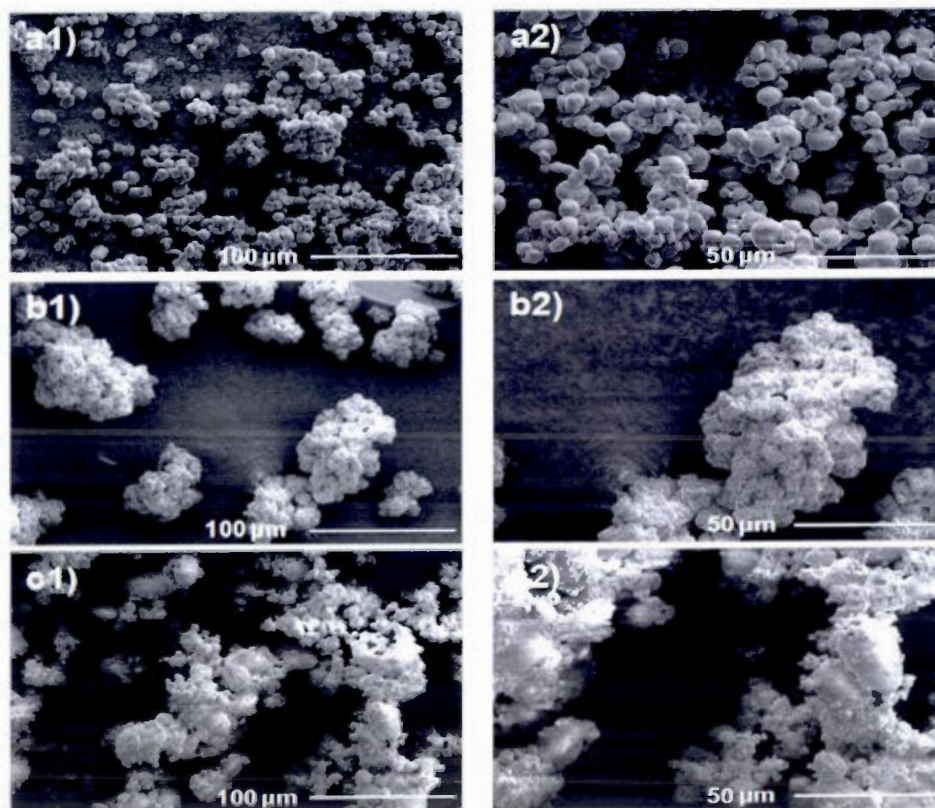


Figure 5.1.7: Scanning electron microscopy micrographs of (a) native Hylon VII, (b) CMS, and (c) CMS/L complex at magnifications of 250 \times (1) and 500 \times (2) at a 15 kV voltage.

The morphology and surface of CMS/L complex (Figure 5.1.7-c1 and c2) appeared different from those of Hylon VII and CMS indicating that structural changes occurred. The CMS/L micrographs showed smooth, oval and round granules with axes of 5-25 μm covered by numerous particles which are agglomerated together. Hoover *et al.* described granules of inclusion compounds of native starch with (C_8 to C_{18})-alkyl preserved their integrity only in the presence of monoglyceride (Hoover et Hadziyev, 1981).

In our CMS/L complex, the structural rearrangement is probably due to i) the incorporation of dialkyl chain inside single-helical cavity leading to changes in the shape and size of the granules as well as ii) ionic and hydrophobic interactions of lecithin pending outside the helical cavity leading to the formation of agglomerates of small particles covering the larger granules.

3.3.6. *Single helix V-form and cationic lipid*

In order to understand the importance of structural particularities forming complex (V-form and cationic lipids), some additional trials were performed.

- Replacement of the single helix V-form of CMS by a linear polymer (CMC)

In one series of experiments, the single helix V-form of CMS was replaced by carboxymethylcellulose (CMC) that possesses a linear structure. The complexation process between CMC and lecithin was conducted under the same conditions as described for CMS/L complex. The resulting CMC/L complex was used in the formulation of tablets and then submitted to the dissolution assay. As illustrated in Figure 5.1.8, more than 90 % of mesalamine was released after 4 h. The release profile of mesalamine from tablets formulated with CMC/L is different from that of tablets based on CMS/L. One explanation for this difference may be the important hydration capacity of CMC/L which allows a faster hydration rate of tablet and thus an increased diffusion of drug.

- Replacement of Lecithin by glyceryl tristearate

When lecithin was replaced by glyceryl tristearate (GT), a non-charged triglyceride with three units of stearic acid, different behaviors were observed. As previously showed by iodine test,

the CMS/GT aqueous solution developed a violet color when iodine was added, indicating that the glyceryl tristearate is not included inside the helical cavity of CMS. The release profile of mesalamine from tablets based on CMS/GT is longer with a total liberation after 12 h in SIF medium (Figure 5.1.8). This delayed delivery could be attributed to the hydrophobic barrier formed by GT and thus limiting the access of water and dissolution of the drug.

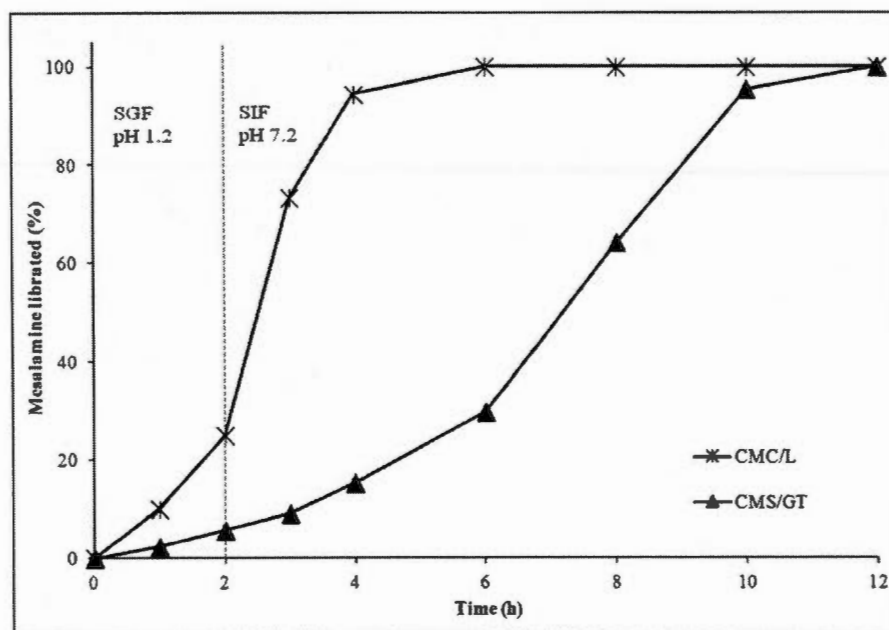


Figure 5.1.8: Release profiles of mesalamine from coated tablets formulated with 75% mesalamine and 25% CMC/L or CMS/GT. Dissolution medium was SGF pH 1.2 (2 h) followed by SIF pH 7.2 (10 h).

3.4. Release mechanism from CMS/L based matrix

To better understand the release mechanisms, a comparative swelling study between matrices (CMS and CMS/L) was carried out. In acidic medium CMS-based tablets (SGF, pH 1.2) showed a slight decrease of tablet size which has been associated with the conversion of the carboxylate groups ($-\text{COO}^-\text{Na}^+$) of the external layer in carboxylic acid groups ($-\text{COOH}$). When CMS tablets were incubated in SIF (pH 7.2), the deprotonation of $-\text{COOH}$ to $-\text{COO}^-\text{Na}^+$ groups led to the formation of a gel-like structure forming a barrier controlling thus the

drug release mainly by diffusion through the gel layer, which would be dissolved or eroded (Colombo et al., 2000). In the case of CMS/L, no significant change in view of size was observed after the incubation in SGF, probably due to the presence of ethyl cellulose coating and to the complex stabilisation ensured by ionic and hydrophobic interactions. No visible alterations (sticking and erosion) were observed when CMS/L tablets were subsequently exposed in SIF. The tablet disintegration started after 4 h and the complete dispersion in SIF medium occurred after 8 h associated with the total release of the active agent. It is worthwhile to note that the release of active agent from CMS-based tablets is prolonged and incomplete whereas the CMS/L excipient affords a unique mechanism of delayed delivery, when the drug is rapidly released after a lag time.

3.5. Mechanical properties of CMS/L tablets

The mechanical properties of tablets may also affect the performance of formulations in simulated gastro-intestinal conditions. Tablets must remain intact until administration but they must be soft enough to release the active agent in the gastrointestinal tract. The mechanical strength of tablets was tested using the diametral compression test (crushing test). The tablets containing the active agent and the CMS/L as excipient showed crushing strengths higher than the excipient-free mesalamine tablets, indicating that the presence of excipient favors the physical stabilization of tablets following compression. Therefore, the presence of CMS/L markedly enhanced the crushing strength of excipient-free tablets from 29 ± 0.8 N to 118 ± 0.7 N with excipient.

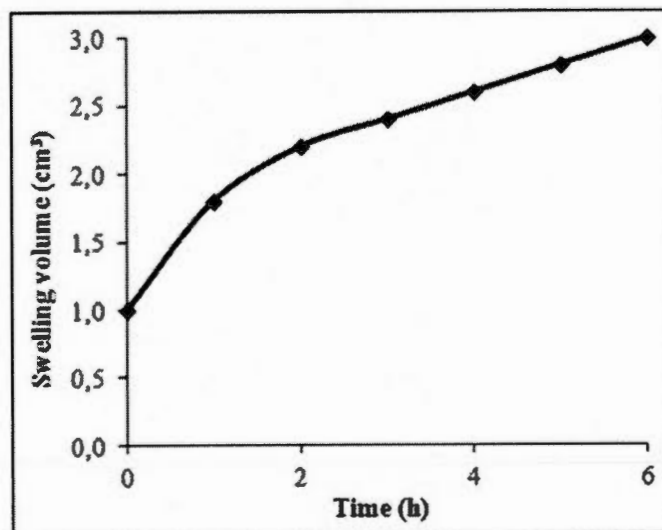


Figure 5.1.9: Swelling properties of CMS/L based matrix performed in SIF medium at pH 7.2 with uncoated tablets.

The swelling properties in intestinal medium, the volume of tablets based on CMS/L without coating were followed in simulated intestinal fluid only at pH 7.2 for 6h (in simulated gastric fluid no swelling was noticed). As illustrated in Figure 5.1.9, tablets exhibited significant swelling (threefold of initial volume), without the formation of a gel-like structure specific for CMS at this value of pH (Wang et al., 2011).

3.6. Comparative study between the CMS/L complex (pH-independent) approach with current pH-dependent forms

The mesalamine oral delivery systems available on the market consist of tablet forms with a protective coating of copolymers based on methacrylic acid and methyl methacrylate (Eudragit-S or L).

Methacrylate copolymers do not disintegrate in acidic conditions and are pH-dependent. These delivery systems provide the release of the active agent at the mid to terminal ileum and colon, at pH above 6.5.

Chuong *et al.* showed no mesalamine released when Asacol (Eudragit-S coated mesalamine) tablets were placed in dissolution medium at pH 6.5. At pH 7.5, the amount of mesalamine liberated was higher than 50% after 1 h with a complete release in 5 h showing the pH-dependent release profile of Asacol (Chuong, Christensen et Ayres, 2008).

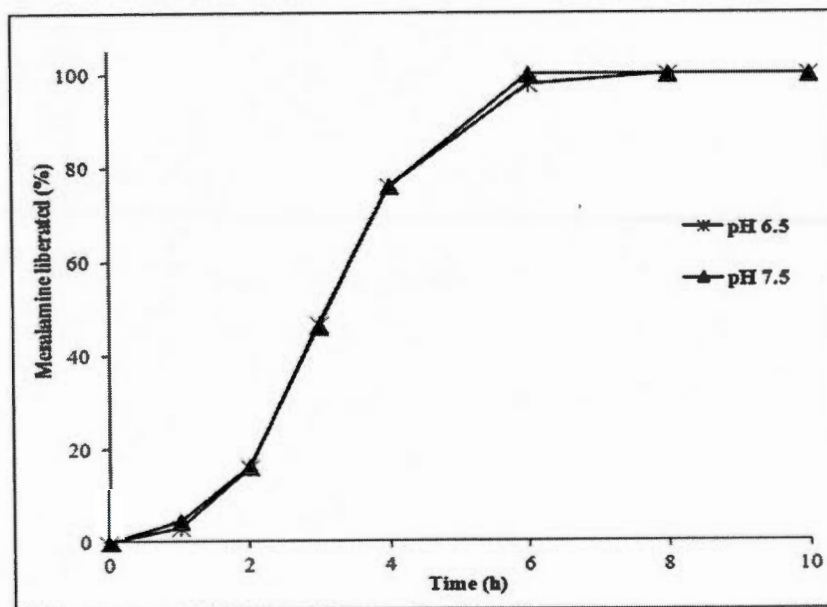


Figure 5.1.10: Release profiles in SIF at pH 6.5 or pH 7.5 of mesalamine from coated tablets formulated with 75% mesalamine and 25% CMS/L.

Differently, the CMS/L complex is a pH-independent system. To confirm this behavior, tablets formulated with CMS/L complex were tested in simulated intestinal fluid (SIF) only, at two different pH values (6.5 to 7.5). The results (Figure 5.1.10) show almost no differences between the mesalamine releases profiles observed at these two pH values.

4. CONCLUSION

CMS and lecithin were successfully combined to obtain a novel complex (CMS/L) with characteristics that render the material useful as excipient for chronodelivery. A coating with ethyl cellulose is required for mesalamine tablets, because of its relatively high solubility in

gastric acid and the high loading of monolithic tablets. For other drugs, it is possible to specifically deliver the active agent by varying the content of CMS/L in the formulation. The optimal formulation showed also a pH-independent release profile of mesalamine. It was suggested that the CMS/L has a unique mechanism of delivery based on tablets swelling followed by the fast liberation of drug after a lag time depending on loading. The performed structural analysis demonstrated the formation of a novel complex with properties based on the characteristics of CMS and lecithin complex that confirms the hypothetical structure we proposed. This novel excipient could improve for several drugs the safety, efficacy and patient compliance.

Acknowledgements

Thanks are due to Mr Michel Preda and Dr Marc Lemieux for the assistance with the X-ray diffraction and Scanning electron microscopy analyses, respectively.

5.2 Nouveau système à libération contrôlée de la mésalamine

Mihaela Friciu ¹, Tien Canh Le ¹, Pompilia Ispas-Szabo ¹, Maximilien Arella ² and
Mircea Alexandru Mateescu ^{1*}

¹Département de Chimie, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada.

²Spencer Pharmaceutical, Canada.

Les maladies inflammatoires de l'intestin nécessitent des traitements chroniques pour améliorer la qualité de vie des patients. La mésalamine est le principal principe actif utilisé dans ce cas. Son effet positif est exercé sur le côlon, et l'absorption systémique provoque des effets secondaires. Les systèmes de livraison sont alors essentiels pour réduire l'absorption systémique et d'assurer un ciblage approprié. Nous proposons maintenant un nouvel excipient basé sur un dérivé d'amidon, le carboxyméthylamidon (CMA) complexé avec la lécithine (L) comme une alternative aux formulations commerciales.

MESALAMINE – NOVEL DELAYED DELIVERY SYSTEM

Mihaela Friciu¹, Tien Canh Le¹, Pompilia Ispas-Szabo¹, Maximilien Arella² and Mircea A. Mateescu¹

¹Department of Chemistry and Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montreal, Montréal, Québec, H2X1X7, Canada; ²Spencer Pharmaceutical Canada.
friciu.maria_mihaela@courrier.uqam.ca

Abstract Summary

The yet incurable inflammatory bowel disease (IBD) requires chronic treatments to improve the patient life quality. Mesalamine is the main active principle used in this case. Its positive effect is exerted on the colon, and systemic absorption causes side effects. The delivery systems are then critical to reduce upper-intestinal absorption and to ensure an appropriate targeting. We propose now a novel proprietary excipient based on a derivative starch as an alternative to the commercial formulations.

Introduction

IBD including irritable bowel syndrome, ulcerative colitis, and Crohn's disease are serious colonic disorders and often require lifelong medical attention (Baumgart et Sandborn, 2007) Mesalamine (5-Aminosalicylic acid, 5-ASA) belongs to aminosalicylates family and currently is the first-line therapy of IBD. It is thought that mesalamine has two therapeutic actions: i) anti-inflammatory (decreasing the level of inflammatory lipid mediators) and ii) immunosuppressive (lowering the level of interleukines). In addition, it is also known as a potent scavenger of free radicals (Qureshi et Cohen, 2005)

The oral administration of 5-ASA is frequently associated with related systemic side effects, particularly when absorbed at the level of upper gastrointestinal (GI) tract. Minimizing the systemic upper-intestinal absorption would not only reduce the adverse effects of 5-ASA (and drug loss) but also will afford its better delivery and higher efficacy with a high concentration at the targeted site.

Since the 5-ASA is rapidly absorbed in the upper GI tract, various strategies have then been developed to delay its upper intestinal release and to enhance the liberation of the active ingredient to the colon. There are several colon delivery technologies currently commercialized for 5-ASA and most of them are pH-dependent, which causes high variations of drug kinetic profiles among patients due to their intestinal tract extended pH range.

Oral delivery systems, of 5-ASA available in the United States allowing to the drug to reach the inflamed small bowel and/or colon, include:

- a) A moisture-sensitive coating (ethyl cellulose) releasing the active principle slowly throughout the length of the GI tract (Pentasa®);
- b) A pH-sensitive coating that dissolves when pH reaches 7 or higher in the terminal ileum and colon (Asacol® and Lialda®);
- c) An azo-bonded prodrug, sulfasalazine releasing 5-ASA after bacterial azoreduction in the colon (Azulfidine®).

Considering that the disease can appear in different segments of the tract, the existing formulations are expected to respond to specific needs related to the concerned location in terms of amount of drug and site of delivery.

The novel delayed release system based on a starch derivative differs from those previously described since it is: pH-independent, and afford a programmable release time (chronodelivery). The concept is based on two essential characteristics of the starch derivative: i) mechanically stable in SGF (Simulated Gastric Fluid) with no shape change, no sticking or no inflating and ii) gradually swollen in SIF (Simulated Intestinal Fluid) affording rapid disintegration after at least 4h, or according to the desired released time (chronodelivery).

The formulation can be easily realized by direct compression of dry powders of mesalamine and of the starch derivative excipient an advantageous technique with reduced number of steps time and energy consumed).

Experimental

Mesalamine (pharmaceutical grade) was purchased from PharmaZell (Germany). A high amylose starch derivative was provided by Spencer Pharmaceutical and used without further purification to prepare the tablets. The matrix was ground in a blender, and then sieved to obtain a powder (particles granulometry between 75 and 300 μm).

Monolithic tablets of 500 mg with 70% (w/w) active ingredient and 30% (w/w) excipient (high amylose starch derivative) were obtained by direct compression of homogenous mixture of ingredients (flat-faced punches with 13.0 mm diameter, 2.5T, Carver hydraulic press).

The in vitro dissolution tests were carried out at 100 rpm and 37 °C using an USP dissolution apparatus II (Distek 5100, North Brunswick, NJ, USA). The 5-ASA released from tablets was followed for 2 h in 900 mL of enzyme-free simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) and then transferred into 900 mL of simulated intestinal fluid (SIF, pH 7.5) and followed for 24 h. Samples of 1 mL were collected at each 30 min in SGF and at every 2 h in the SIF over the first 12 h and after 24 h. The collected samples were assayed in an UV Spectrophotometer (OceanOptics SD2000, Dunedin, FL, USA) at 303 nm for acidic medium and at 330 nm for neutral medium. The quantity of 5-ASA released was evaluated with a calibration curve ($R^2 = 0.9999$) prepared in SGF and SIF media with 5-ASA concentrations ranging from 1.50 to 50 $\mu\text{g/mL}$.

Results and Discussion

The dissolution profile of the formulated 5-ASA, with no gastric or upper-intestinal liberation, but with a moderately-high release rate after 12-14 h (see Fig. 1) is of major interest for the IBD.

The proposed monolithic tablet form can ensure a gastro-protection by itself, eliminating the requirement of an expensive enteric coating. After 2 h in SGF, the tablets keep their structural integrity and less than 5% of 5-ASA is liberated due to a low hydration rate of the matrix in this acidic media. After subsequent transfer in SIF, tablets hydrate slowly, resulting in a gradual swelling. The hydration control of the excipient in this neutral media manages the

delivery. The active will be gradually liberated after 2 h in SIF medium (Fig. 1). The release rate of 5-ASA gradually increases to reach 60 % after 10h.

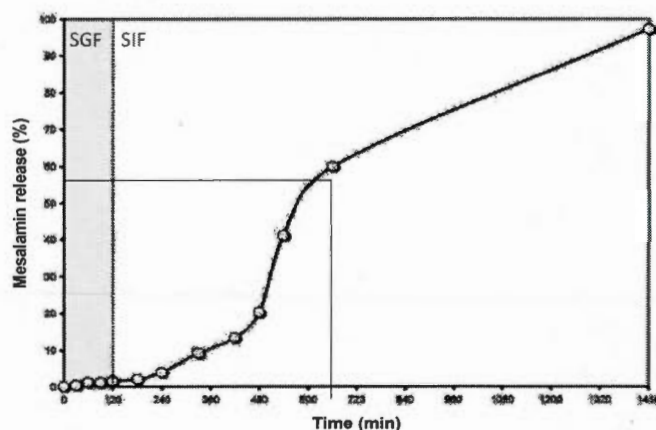


Figure 5.2.1: Release profiles of mesalamine (350 mg) from tablets (500 mg). Dissolution medium was SGF pH 1.2 (2 h) and then SIF pH 7.5.

The crystalline structure of native starch showed in Fig. 2 is reduced by our chemical derivatization, which allows a higher solubility and hydration. Despite this amorphous structure, the hydration of our excipient is limited in acidic media such as SGF, allowing an appropriate target release. The system is versatile, and other bioactive agents can be formulated or co-formulated. The proposed excipient also affords gastro-protection of the loaded active agents. The SGF passage is followed by a controlled release in SIF, started 8-10 hours after administration, corresponding to the time needed for a pill to reach the colon.

Mesalamine is an amphoteric drug carrying amino and carboxyl groups. Consequently, ionic interactions between mesalamine and the functional groups of the excipient can also be considered as part of mechanism controlling the drug release. In addition to the ionic and swelling characteristics, the excipient also exhibits mucoadhesion properties that can be of interest for locally acting drugs (as mesalamine).

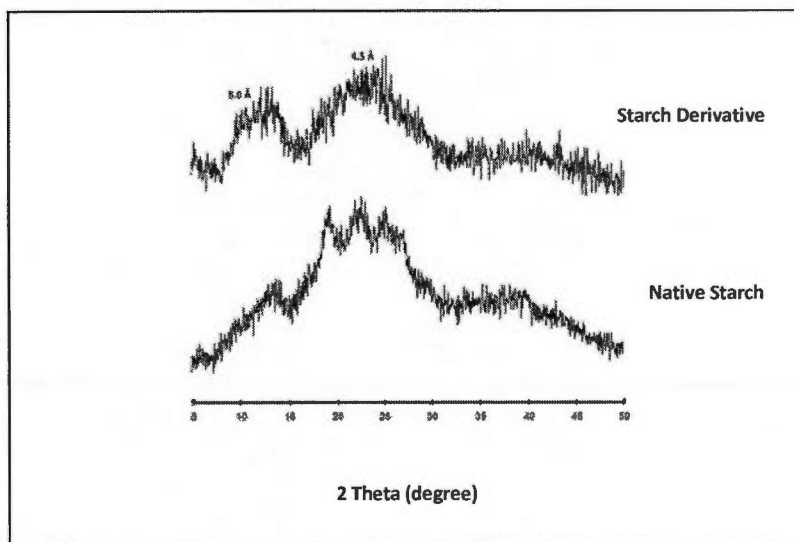


Figure 5.2.2: X-ray diffraction of native and derivatized starch.

Conclusion

The novel system based on starch derivative shows promising results. High loading formulations and in vivo studies are in progress, to measure the mesalamine absorption and the related side effects. Our excipient is non-toxic and allows a controlled and target release to reduce the side effects of upper-intestinal absorbed mesalamine. Considering these results, our matrix is a promising alternative to the existing delivery systems for mesalamine.

CHAPITRE VI

DISCUSSIONS ET CONCLUSION

La maladie de Crohn et la colite ulcéreuse sont les formes les plus répandues de maladies intestinales inflammatoires (MII). La colite ulcéreuse affecte habituellement le côlon tandis que la maladie de Crohn peut toucher la totalité du tube digestif. Ces maladies incurables ont un effet négatif sur la qualité de vie de personnes atteintes et nécessitent un traitement chronique (Baumgart et Sandborn, 2007). La thérapie couramment utilisée dans MII est représentée par l'administration de comprimés à base de mésalamine. L'efficacité du traitement est étroitement reliée à une action locale de la mésalamine, au niveau du côlon (Carter, Lobo et Travis, 2004; Sandborn, 2008; Osler, 2007). L'absorption systémique du principe actif dans les parties pré-coloniques entraîne non seulement une réduction importante de la dose efficace, mais aussi un risque élevé des effets indésirables. En conséquence, plusieurs stratégies ont été mises au point afin de retarder la libération de la mésalamine dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal et d'améliorer sa livraison aux régions enflammées de l'intestin (iléon terminal et/ou côlon). La grande partie de ces stratégies sont basées sur le système pH-dépendant (Qureshi et Cohen, 2005; Lichtenstein et Kamm, 2008). L'inconvénient majeur de cette technologie est la grande variation interindividuelle du pH gastro-intestinal avec un impact notable sur le profil de libération de la mésalamine. Ainsi, le système de livraison de mésalamine devrait être : i) pH-indépendant ii) assurer sa protection durant le passage gastrique et iii) permettre sa livraison dans le côlon.

Dans ce contexte, nous avons proposé la complexation de la mésalamine (MES) avec un autre principe actif connu, le sucralfate (SUC). Il a été constaté que, sans modifications chimiques, il est possible d'obtenir un complexe en suspendant les deux principes actifs dans l'eau suivie par le séchage par atomisation de leur association. Les analyses structurales (SEM, DRX, CDB, FTIR et ¹H-RMN) ont mis en évidence la formation d'un nouveau complexe MES:SUC différent du mélange physique des deux principes actifs. Les résultats ¹H-RMN

ont aussi confirmé que la complexation a eu lieu avant le séchage, lorsque les suspensions aqueuses des deux principes actifs ont été mélangées. Les tests préliminaires de dissolution réalisés dans le liquide intestinal simulé à pH 7,2 ont montré que le profil de libération de la mésalamine des comprimés à base du complexe MES:SUC est différent (libération linéaire durant plus de 8h) par rapport au mélange physique des principes actifs (libération complète de la mésalamine en moins de 3h). Le nouveau complexe pourrait être considéré comme un produit ayant un potentiel pharmaceutique en mesure d'exercer des propriétés anti-inflammatoires à la surface de la muqueuse colonique.

Les inconvénients majeurs du complexe sont: i) la libération incomplète de la mésalamine des comprimés formulés avec le complexe MES:SUC et ii) les changements de couleur de la poudre du complexe pendant le procédé de séchage probablement dû à la grande sensibilité à la lumière de la mésalamine. Pour ces raisons, ce processus a été interrompu et dans toutes les formulations ultérieures, la mésalamine a été utilisée sans modification.

Ces dernières années, les dérivés d'amidon riche en amylose, non réticulée, possédant des groupements carboxyméthyle ont pris de l'ampleur dans la formulation pharmaceutique des comprimés surtout suite aux travaux de l'équipe du Laboratoire d'Enzymologie et des Polymères Biocompatibles (Université du Québec à Montréal). Ces dérivés sont principalement destinés à la fabrication des systèmes de livraison contrôlée administrables par la voie orale (Calinescu et al. 2005; Calinescu et al. 2007; Ispas-Szabo et al. 2007; Nabais et al. 2007). Dans ce contexte, le carboxyméthylamidon (CMA) a été proposé comme matrice pour des formulations pharmaceutiques utilisées pour l'administration orale de la mésalamine. Le CMA est un excipient polymérique qui peut être associé aux différents principes actifs sous forme de comprimés. Le concept est basé sur les deux caractéristiques connues du CMA: i) sa stabilité dans le milieu acide stomacal suite à la protonation et ii) le gonflement graduel dans milieu neutre de l'intestin dû aux phénomènes de déprotonation et d'ionisation (Calinescu et al. 2005; Calinescu et al. 2007; Assaad et al. 2011).

La mésalamine présente une solubilité variable en fonction du pH avec une solubilité élevée au milieu acide (gastrique) et neutre ou alcalin (intestinal). Lorsqu'elle est formulée sans excipient, sa dissolution complète a été observée après 2 h d'incubation dans le milieu gastrique simulé (résultats non présentés dans le manuscrit soumis). Cependant, les

comprimés monolithiques, à charge médicamenteuse élevée (75%), préparés à base de mésalamine et CMA gardent leur intégrité à un pH acide, mais libèrent une quantité élevée de mésalamine dans ces conditions ce qui est probablement due à la grande solubilité de la mésalamine en milieu acide et également à la charge médicamenteuse élevée de comprimés.

Dans le fluide intestinal simulé, l'hydratation des comprimés induit la formation d'une couche de gel associé à la formation des ponts d'hydrogène entre les groupements hydroxyle, les groupements hydroxyle et carboxyliques ou carboxylate et entre les groupements carboxylate. Une libération incomplète a été notée malgré la bonne solubilité de la mésalamine dans ce milieu. La libération incomplète de la mésalamine peut être attribuée à des interactions qui ont lieu entre ce principe actif et la matrice (CMA).

Par conséquent, une granulation humide de la mésalamine a été proposée afin de limiter les interactions entre les deux ingrédients. Les formulations à base de mésalamine granulée et de CMA ont présenté une diminution de la libération en milieu gastrique simulé avec une libération toujours incomplète en milieu intestinal simulé. En outre, des changements de la couleur de poudre ont été observés lors de la granulation humide probablement due à des phénomènes d'oxydation de la mésalamine (produit sensible à la lumière).

Dans ces conditions, une nouvelle approche a été utilisée afin de limiter les interactions ioniques qui ont lieu entre le principe actif et le CMA. Elle consiste dans la complexation des groupements carboxyliques du CMA avec la lécithine (Friciu et al. 2012). Ainsi, un nouveau complexe (CMA/L) a été obtenu et proposé comme excipient dans la réalisation de formes pharmaceutiques pour l'administration orale de la mésalamine. Des comprimés à charge médicamenteuse élevée (75%) ont été préparés en utilisant le nouveau complexe comme excipient et leurs cinétiques de libération du principe actif suivies dans les deux milieux acide (stomacal) et intestinal simulés. Les comprimés à base de CMA/L présentent une libération relativement élevée du principe actif dans le milieu gastrique simulé. Pour réduire cette libération à une valeur minimale (inférieure à 5 %) l'enrobage à l'éthyle cellulose des comprimés est proposé. L'éthyle cellulose, l'éther de cellulose moins polaire, est largement utilisé comme matériau d'enrobage des formes posologiques à libération contrôlée (Katikanenia et al. 1995; Majid et Zhu, 1998). Cet enrobage procure aux comprimés une membrane semi-perméable qui permet une hydratation lente et continue de la matrice.

L'hydratation progressive de la matrice a lieu en contact avec les fluides gastrique et intestinal et permet le gonflement du comprimé avec la diffusion de mésalamine.

L'étude des profils de dissolution, réalisée avec les comprimés enrobés, a montré qu'il y a aucune ou très faible (inférieure à 5 %) libération de mésalamine après 5 h (dans les milieux gastrique et intestinal simulés), suivie par une libération rapide à partir de 6 h et complète après 8 h dans le milieu intestinal simulé. Les comprimés enrobés ont montré une libération retardée du principe actif, ce qui suggère que l'enrobage est en mesure d'empêcher la libération du médicament dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal (estomac et intestin grêle) avec la libération totale du médicament dans le côlon. De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les profils cinétiques de la mésalamine à différentes valeurs de pH du milieu intestinal (6,5 et 7,5) suggérant que le système, composé du complexe CMA/L comme excipient et de l'enrobage, est pH-indépendant. Par ailleurs, en variant la proportion de la matrice dans les comprimés, des profils de libération différents ont été obtenus. Ainsi, une libération de la mésalamine plus longue a été observée pour les comprimés contenant une quantité inférieure (120 mg) de complexe CMS/L, tandis qu'une libération plus rapide a été obtenue pour les comprimés avec une quantité plus élevée (150 mg). Ce phénomène est probablement dû à la capacité d'hydratation élevée du complexe en milieu intestinal favorisant une libération plus rapide de la mésalamine. En variant la quantité de complexe dans la formulation, il est possible de choisir le site de libération du principe actif dans le tractus gastro-intestinal à un intervalle de temps prédéterminé.

La structure du complexe CMA/L a été investiguée à l'aide du test à l'iode, des analyses FTIR, XDR et MEB. Les résultats du test à l'iode ont révélé que l'amidon de pomme de terre, le CMA et CMA/ST évalués par ce test, présente une coloration spécifique bleue ou violette. Toutefois, avec la solution contenant le complexe CMA/L, la coloration était absente, ce qui suggère que les chaînes hydrocarbonées de la L étaient localisées à l'intérieur de la cavité centrale du CMA, bloquant la formation du complexe d'inclusion coloré iode/CMA.

Il est connu que l'introduction des groupements carboxyméthyle sur l'amidon induit des changements dans la conformation de l'amylose par la modification des liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyles ce qui produit la transformation de la cristallinité représentée par des doubles hélices (forme A ou B) vers une structure plus amorphe caractérisée par l'hélice

simple (forme V). L'amylose V possède une cavité centrale relativement large dans son hélice, ce qui permet aux différentes molécules d'entrer. De plus, cette transformation implique des changements au niveau de la distribution des zones hydrophiles/hydrophobes. L'amylose A ou B possède des zones hydrophobes disposées en alternance avec celles hydrophiles tandis que dans la structure de type V (hélice simple) les deux zones sont distinctes avec une surface extérieure hydrophile et la cavité centrale hydrophobe. Cette disposition de la zone hydrophobe à l'intérieur de la cavité hélicale favorise la formation d'interactions hydrophobes avec les chaînes dialkyle de la lécithine.

Les spectres FTIR, des comprimés de CMA/L, montrent une allure semblable au CMA, avec des bandes à environ 1651, 1597, 1530 et 1417 cm^{-1} . La présence d'un épaulement à 1530 cm^{-1} dans le spectre CMA/L pourrait être attribuée à des interactions ioniques qui surviennent entre les groupes COO^- du CMA et les groupes $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de la lécithine. De plus, il faut mentionner que l'incubation des comprimés en milieu gastrique simulé suivie par le milieu intestinal simulé a révélé des intensités différentes des bandes à 1725 et 1590 cm^{-1} correspondant aux groupes COOH et COO^- respectivement. L'intensité de la bande à 1725 cm^{-1} apparue après protonation dans le complexe CMA/L est diminuée par rapport au CMA en suggérant un nombre réduit de groupes carboxylates disponibles pour la protonation dans le complexe et leur implication dans des interactions ioniques. Cette diminution de l'intensité est aussi notée pour la bande 1590 cm^{-1} , caractéristique aux groupes carboxylate obtenus après déprotonation en milieu neutre.

Les analyses par diffraction de rayons X (DRX) ont montré que le complexe CMA/L présente des changements importants, dans la structure cristalline, induits par l'incorporation des chaînes latérales hydrophobes de la lécithine. En outre, il semble que ces interactions hydrophobes peuvent stabiliser la structure du CMA/L en lui conférant une organisation en réseau autoassemblé insensible au pH.

Les analyses par microscopie électronique à balayage (MEB) révèlent une nouvelle morphologie pour le complexe avec des propriétés différentes de CMA et de l'amidon natif. Les granules du complexe, en contraste avec le CMA, exhibent des surfaces lisses avec des grandes formes ovales qui sont associées à de petites particules dispersées uniformément. Ce réarrangement structural est probablement dû: i) à l'incorporation de chaînes alkyles de la

lécithine l'intérieur de la cavité hélicoïdale conduisant à la formation de grandes granules; ii) aux interactions ioniques développées, à l'extérieur de la cavité hélicale, entre la lécithine et le CMA entraînant la formation de petites granules, et iii) aux associations hydrophobes entre des chaînes dialkyles de la lécithine menant à l'association des granulés.

En conclusion, la matrice à base du complexe CMA/L permet de moduler la libération d'agents actifs, notamment la mésalamine à un site de livraison ciblé (au niveau de l'intestin grêle ou au côlon) du tractus gastro-intestinal et à un intervalle de temps prédéterminé. L'utilisation du complexe peut présenter un grand intérêt dans l'industrie pharmaceutique pour les formulations à libération ciblée pH-indépendante. Il permet également la réalisation de formulations à charge médicamenteuse élevée dans des comprimés de petite taille, tout en assurant une forte concentration du principe actif aux sites spécifiques pour exercer l'effet thérapeutique. En principe, un tel système de libération de médicaments permettrait d'améliorer la sécurité et l'efficacité des médicaments.

Enfin, il sera important d'évaluer la performance du nouveau complexe en utilisant d'autres principes actifs d'intérêt dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin. Des études *in vivo* seront aussi nécessaires pour établir le rôle du complexe dans la protection des principes actifs durant le passage gastrique et la livraison dans le côlon.

ANNEXE

Les complexes mésalamine-sucralfate: préparation, caractérisation et applications pharmaceutiques

Pompilia Ispas-Szabo¹, Maria Mihaela Friciu¹, Phuong Nguyen¹, Yves Dumoulin^{2,3} and Mircea Alexandru Mateescu¹

¹ Département de Chimie Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada.

² Aptalis Pharma, 597 Boul. Laurier, Mont St-Hilaire (Québec), J3H 6C4, Canada

³ Uman Pharma, 100 Boul. de l'industrie, Candiac (Québec), J5R 1J1, Canada

Le mélange aqueux contenant de la Mésalamine (MES) et du Sucralfate (SUC), deux principes actifs connus, a été séché par atomisation. Une nouvelle série de produits a été obtenue par cette procédure à des variables ratios de MES:SUC (1:3, 1:1 et 3:1) et caractérisé par X-Ray, FTIR, MEB, DSC et ¹H-RMN. L'analyse structurale montre que les interactions entre la MES et le SUC ont lieu dans le milieu aqueux. Les complexes obtenus ont des propriétés différentes du mélange physique de deux agents actifs. Les résultats ¹H-RMN ont confirmé que la complexation a eu lieu avant le séchage par atomisation lorsque les suspensions aqueuses des actifs ont été mélangées. Sur la base de ces données structurales, un mécanisme de complexation a été proposé. Ces complexes pourront représenter des nouveaux systèmes à libération contrôlée de la MES au niveau du côlon. Selon notre hypothèse dans ce type de complexes, sucralfate joue un double rôle: il contrôle la libération mésalamine et en même temps, par ses propriétés muco-adhésives, pourrait prolonger le temps de séjour du comprimé dans le côlon.

* Contribution de l'auteur principal et des co-auteurs

Pompilia Ispas-Szabo – supervision du projet, rédaction, recherche bibliographique

Maria Mihaela Friciu – expérimentation, rédaction, figures, recherche bibliographique

Phuong Nguyen – analyses structurales, rédaction, recherche bibliographique

Yves Dumoulin – idée générale du projet, rédaction

Mircea Alexandru Mateescu – supervision du projet

Article en préparation pour: *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences.*

Research Paper

**Mesalamine-Sucralfate Complexes:
Preparation, Characterization and Pharmaceutical Applications**

Pompilia Ispas-Szabo^{a,*}, Maria Mihaela Friciu^a, Phuong Nguyen^a, Yves Dumoulin^{b,c} and
Mircea Alexandru Mateescu^a

^a Department of Chemistry Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succ. A, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada.

^b Aptalis Pharma, 597 Boul. Laurier, Mont St-Hilaire (Québec), J3H 6C4, Canada

^c Uman Pharma, 100 Boul. de l'industrie, Candiac (Québec), J5R 1J1, Canada

*Corresponding author

Phone : 1(514) 987-3000 #0318

Facs : 1 (514) 987 4054

E-mail : ispas-szabo.pompilia@uqam.ca

Abstract

Mesalamine (MES) and Sucralfate (SUC), two well-known drugs, were co-processed together by spray-drying their aqueous mixture. A new series of products was obtained by this procedure varying the ratio MES:SUC in the range 1:3, 1:1 and 3:1 and was characterized by X-Ray, FT-IR, SEM, DSC and $^1\text{H-NMR}$. The structural analysis has shown that MES and SUC are interacting in aqueous media leading to complexes with properties differing from those of each active or from their physical blends. The $^1\text{H-NMR}$ results confirmed that the complexation occurred prior to spray-drying when the aqueous suspensions of drugs were mixed. Based on these structural data, a mechanism of complexation is proposed. The new series of complexes open the perspective of a novel class of compounds indented for therapeutic application manly the inflammatory bowel diseases. Preliminary findings with oral solid dosage forms have shown that MES release could be controlled and a new colonic targeted delivery system may be developed. Based on our hypothesis in such type of complexes, sucralfate delays the mesalamine release.

Keywords: mesalamine, sucralfate, co-processing, spray-drying, complexation, structural characterization.

Abbreviations: MES, mesalamine; SUC, sucralfate; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; MCC, microcrystalline cellulose; SEDS, supercritical fluids; HPMC, hydroxypropyl methylcellulose; PM, physical mixture; UNTPM, physical mixture of untreated powders; TPM, physical mixture of treated powders; CD, co-spray dried powder; XRD, X-ray powder diffractometry; SEM, scanning electron microscopy; DSC, differential scanning calorimetry; FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy; NMR, nuclear magnetic resonance spectroscopy; NaSOS sucrose octasulfate sodium salt

1. Introduction

Inflammatory bowel diseases including ulcerative colitis and Crohn's disease are chronic affections and require prolonged medical therapy (Baumgart and Sandborn, 2007). Mesalamine (5-aminosalicylic acid, MES) is an efficacious active ingredient used for the long-term therapy of inflammatory bowel disease (Ng and Kamm, 2009). However, the oral administration of MES is frequently associated with systemic side effects caused by the drug absorption from the upper gastrointestinal tract (Jung et al., 2001). Minimizing the systemic absorption of MES would reduce the adverse effects and drug loss and will ensure the topic action at the targeted site for an extended period of time (Qureshi and Cohen, 2005). Sucralfate (SUC) is an effective agent in the treatment of inflammation and ulceration of the upper gastrointestinal tract and presently is accepted as a nonsystemic site protector (Nagashima, 1981; Rees, 1991). Its gastric mucoadhesive property comes from its adhesive gel-forming properties in acidic environment. The association of sucralfate with active agents was also investigated by Maggi et al., 1993 and Roveda et al., 1991. The authors designed new dosage forms based on sucralfate in combination with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) to prevent NSAID-induced mucosal lesions and ulcer formation. The active agents were formulated in a press-coated tablet in which the inner core contains NSAID and the outer shell sucralfate. It was also shown that the *in vitro* release of the anti-inflammatory drug is not influenced by the sucralfate delivery.

Both active agents, MES and SUC, carry functional groups which can become charged depending on pH of media. Mesalamine is an amphoteric molecule in aqueous media and its solubility and ionization are dependent upon pH and pKa values of its carboxylic and amino groups (French and Mauger, 1993). Sucralfate carries sulfate and aluminum hydroxide as functional groups (Fig. A.1) that can become charged/ionized depending on surrounding medium. The hypothesis of the present study was that ionization phenomena can promote interactions between the functional groups of the two active agents and their complexation.

The co-processing of an active with a selected excipient was suggested to improve its solubility (Li et al., 2009). For instance dextrans (ie. beta-cyclodextrin) were found to improve drug solubility (Aggarwal et al., 2002; Aleem et al., 2008 and Dua et al., 2011). Recently extrusion-spheronization performance of mixtures of co-processed microcrystalline

cellulose (MCC) and Eudragit E with sorbitol was prepared to increase water solubility of hydrochlorothiazide. It was found that when a higher proportion of sorbitol (50%) was incorporated the dissolution rate of hydrochlorothiazide was high undergoing rapid disintegration (Goyanes et al., 2011).

The effect of co-crystallization of drug with an excipient was also studied (Masuda et al. 2012 and Mirosnyk et al. 2009). The formation of solid particles in the Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids (SEDS) process from a model drug and two different types of carriers, mannitol and Eudragit E100 was evaluated by Juppo et al. 2003. An interaction between the hydroxyl group of the drug and the carboxyl group of Eudragit E100 was observed. SEDS was shown as effective for forming intimate blends and solid solutions of the drug and two different types of carriers with an important impact on drug dissolution rate. Co-processing was also successfully applied to obtain excipients with enhanced properties. For example, Microcelac was obtained by spray-drying of lactose and microcrystalline cellulose (MCC) that have been synergistically co-processed in a single excipient with improved tableting performance.

The co-processing could be an interesting approach to improve formulation by valorising interactions occurring between drug and excipient or between two excipients (Milallos et al., 2008 and Sandri et al., 2006).

Some previous studies explored the formation of an inclusion complex of MES with alpha /beta cyclodextrin in solution and solid state to enhance the MES stability (Zerrouk et al., 1998). It was shown that MES forms preferentially inclusion complexes with β -cyclodextrin and steric features of the active agent are crucial in the formation of these complexes. On the other hand, the complexation of SUC with tetracycline was studied by Higo et al., 2004 in term of complexation mechanism and mucoadhesive properties of the formed complex aiming a new treatment of *H. pylori*. They suggested that the amide or amine groups of tetracycline and aluminum moieties of sucralfate serve as the binding sites. The amount of added acid seemed to be the most important factor in the preparation of the complex. The appropriate amount of hydrochloric acid added could influence the production of a complex rich in tetracycline.

Differing to mentioned studies, we propose the complexation of MES and SUC without any chemical alteration of the two actives. Our aim was to investigate the capacity of the two active agents to interact and form a new and stable entity. We propose a simple mix in aqueous media followed by a spray-drying of the obtained suspension leading to a new series of products with interesting properties.

The present study describes the potential interaction between MES and SUC and assesses the feasibility of co-spray drying of a MES:SUC aqueous suspension as method to obtain new compounds. The new preparations were compared with the physical mixtures of the two active powders. The X-Ray diffraction analysis, the scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry and proton nuclear magnetic resonance were used to characterize the new class of compounds. Another objective of the study consisted in the *in vitro* investigation of the MES release from tablets formulated with MES:SUC complexes proposed as a carrier of MES to deliver the active drug to the colon. The related data make the subject of a distinct publication.

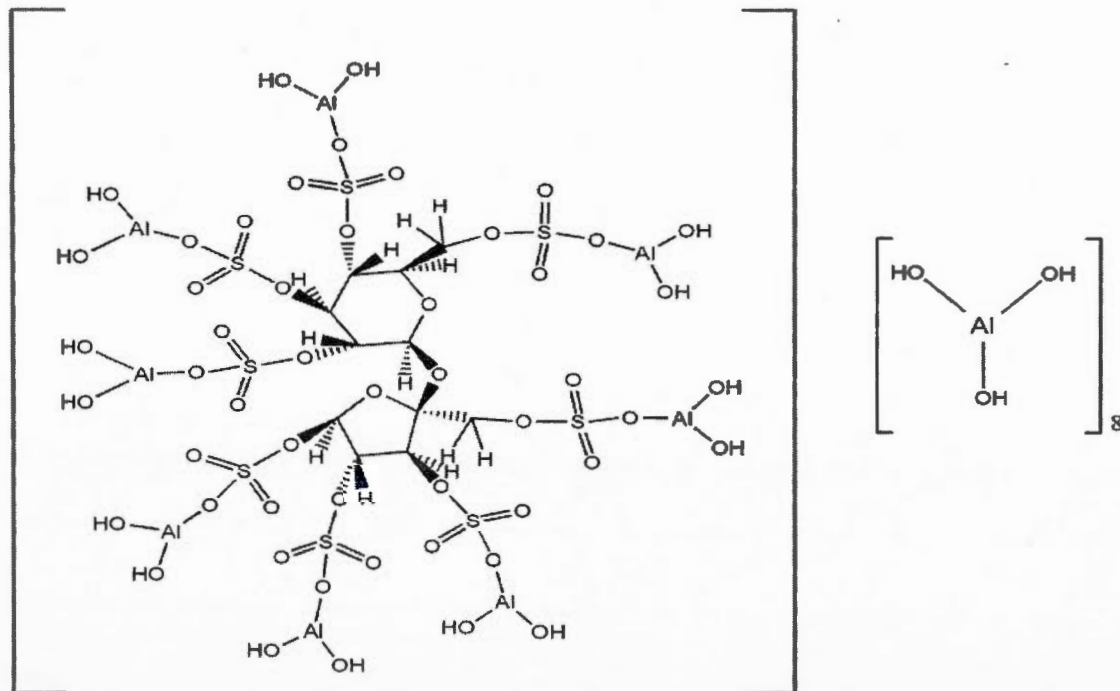


Figure A.1: Sucralfate structure

2. Materials and methods

2.1. Materials

Mesalamine MES and SUC (both pharmaceutical grade) were provided by Axcan Pharma (Mont-Saint-Hilaire, Canada). The polymers such as Microcelac 100 (75% lactose monohydrate and 25% microcrystalline cellulose) were obtained from Meggle (Wasserburg, Germany) and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC-K100) was from Dow Chemicals USA. Other reagents, were all chemical grade and used without further purification.

2.2. Preparation of MES:SUC powders

The co-spray dried (CD) MES:SUC powders were prepared at 25:75, 50:50 and 75:25 (w/w) ratios. The MES and SUC were dispersed individually in suitable volumes of distilled water (pH 5.5) to form suspensions at 15% (w/v). The individual suspensions were mixed at different ratios and agitated continuously for 20 min on a rotary mixer. Unexpectedly the consistency of samples of MES:SUC at 15% became a paste-like indicating some interactions occurred when the two actives were in presence. A dilution at 5% (w/v) was necessary in order to adjust samples viscosity allowing the spray-drying (Büchi Mini Spray Dryer B-290). The drying was done at: inlet and outlet temperatures 200 °C and 99 °C respectively, flow of nitrogen 357 l/h and aspirator at 38 m³/h. The conditions of the spray-drying were the same for all preparations.

In order to evaluate the impact of suspending in aqueous media (pre-mixing step) and of spray-drying processes on physicochemical properties of the drugs and on their ability to make complexation, individual drying of MES and SUC powders were done maintaining the same concentration of aqueous suspensions and drying parameters as above. These materials were called treated MES and treated SUC. Physical mixtures of untreated (UNTPM) and treated (TPM) powders were also prepared and are characterized by same techniques as the CD MES:SUC powders. The term untreated powder is employed for original material used as received without further modifications.

2.3. Characterization methods

2.3.1. X-ray powder diffractometry (XRD)

XRD patterns were obtained with an X-ray diffractometer (Siemens D5000, Germany) CoK α and SOL-X detector at 1.789Å wavelength. The XRD spectra, recorded between 5 and 50° for 2 θ , were treated using DiffracPlus software.

2.3.2. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM images were recorded using a variable pressure scanning electron microscope of model S-4300SE/N VP-SEM with an environmental secondary electrons detector (ESED). The samples were glued on a metallic holder with an adhesive double-sided conductive and the micrographs were obtained with a Hitachi software.

2.3.3. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC analyses were performed using a DSC Mettler Toledo with a heating rate of 20 K/min in the temperature range of 25 to 580°C. The powders were weighed (samples were between 4 to 6 mg) in an aluminum pan and hermetically sealed.

2.3.4. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The spectra were recorded (128 scans at a resolution of 2 cm⁻¹) using a Thermo-Nicolet 6700 FTIR spectrometer equipped with a DTGS-KBr detector and a diamond smart attenuated total reflection platform. The baseline of all spectra was corrected between 4000 to around 1750 cm⁻¹ and the spectra are offset at 4000 cm⁻¹. For qualitative and quantitative purposes the spectra were normalized with the band at 1489 cm⁻¹ assigned to the stretching vibration of C-C bonds of aromatic group of MES.

2.3.5. Nuclear magnetic resonance spectroscopy ($^1\text{H NMR}$)

Proton NMR experiments were performed using a hybrid liquid/solid-state Varian Inova Unity 600 spectrometer (Varian, Walnut Creek, CA, USA) operating at frequencies of 599.95 MHz. Data were processed using MestRe-C program. About 5 to 10 mg of the powders were dispersed in 500 μl of D_2O containing 1% NaCl to obtain a partial dissolution.

3. Results and discussion

3.1 Complex preparation

French and Mauger (1993), demonstrated that MES has the ability to influence the microenvironmental pH and to reduce its own dissolution rate. The pK_a values and pH influence the solubility and determine the predominant species of MES in solution, at pH values below the isoelectric point (pI 3.8; French et al., 1995) the cationic species predominates; at pH near the pI dipolar species are present and the anionic species are prominent at pH values above the pI (Fig. A.2). At pH values above 5.5, MES dissolves and dissociates generating hydrogen ions which lower the pH of surrounding medium (French and Mauger, 1993).

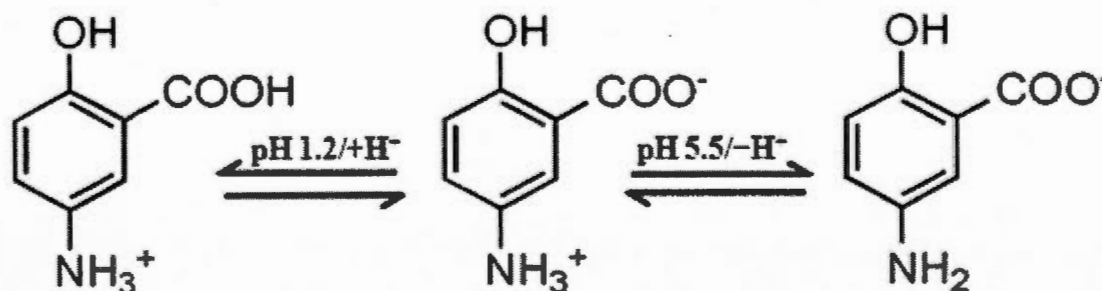


Figure A.2: Ionization processes of MES, cationic, amphoteric and anionic species.

Sucrafate is a complex molecule obtained by mixing sucrose octasulfate sodium salt (NaSOS) with polyaluminum chloride $[\text{Al}(\text{OH})_2\text{Cl}]_n$ followed by precipitation with NaOH. The resulting gel consists in $\text{Al}(\text{OH})_3$ attached to sucrose octasulfate together with free

Al(OH)₃ (Fig. A.2). The addition of hydrochloric acid (approximately 0.06 meq/meq SUC) to a water suspension of SUC under vigorous stirrings induced the interparticulate aggregation of SUC and further addition of acid increased the number of particles, softened them and finally produced a paste (Ochi, 1995).

When MES and SUC are mixed in an aqueous media, unexpectedly the suspension turned into a paste with thixotropic behavior. The consistency of the paste makes the rheological evaluation difficult when standard Brookfield apparatus was used. Color changes were also observed potentially indicating the formation of a new compound. The visual observations on mixed suspensions are presented in Table A.1.

Table A.1: Observations of the Mesalamine&Sucralfate aqueous suspensions mixed at different ratios in distilled water.

Ratio MES:SUC	Observations	
	Time = 0	Time = 30 min
0:100	White suspension	White suspension
25:75	Beige suspension	Increasing viscosity with thixotropic ¹ behavior, light grey
50:50	Beige suspension	Paste with thixotropic behavior, light grey
75:25	Beige suspension	Increasing viscosity with thixotropic behavior, light grey
100:0	Beige suspension	Beige suspension

¹ Thixotropy - under normal conditions the paste is solid, but becomes less viscous when shaken or agitated

Considering that ionization and proton transfer are potential steps involved in the complexation mechanism, pH of MES, and of SUC aqueous suspensions and of their mixtures (5%, w/v) at various ratios was monitored. A delay of 10 min was requested for pH stabilization prior to the first measurement (data not shown). When MES was suspended in distilled water (pH 5.5), hydrogen ions resulting from the dissociation of dipolar species of MES had decreased the suspension pH from 5.5 to 4.18 after 10 minutes under mixing and

then moderately decreasing to 3.95 after 120 min. When Sucralfate was suspended in distilled water, the pH slightly decreased from 5.5 to 4.70 after 120 min of mixing indicating that the sucralfate ionization is lower compared with that of mesalamine. The absorption of atmospheric CO₂ was not considered during the pH measurements but the conditions were similar (open systems and similar duration of 120 min).

The pH values measured on the mixed suspensions have also been monitored. The added amounts of SUC influence the final pH particularly for the ratio 25:75 MES:SUC, when the pH of suspension after 120 min was of 4.81. This could be explained by the simultaneity of two related phenomena occurring in the system i) dissociation of MES at $\text{pH} \geq 5.5$ generating hydrogen ions and ii) their consumption by SUC. The ratio of the two drugs present in the suspending medium will impact the two phenomena and is reflected in the pH variation. The higher decrease of pH values for the ratios 50:50 and 75:25 were associated with the lower amount of SUC in the suspensions, insufficient to consume the hydrogen ions generated by MES dissociation.

3.2. Complex characterization

3.2.1. X-ray diffraction

Figure A.3 presents the XRD patterns of MES, SUC, UNTPM and CD powders. The XRD pattern of MES has two sharp peaks of 2θ at 8 and 18 ° while a large diffused peak between 15 and 32 ° is observed for SUC. The pattern of UNTPM is shown as a combination of individual MES and SUC patterns. However, the CD powder MES:SUC 50:50 has a different pattern where the characteristic peaks of MES disappeared being replaced by two large peaks of 2θ at 12 and 17 °. A new diffused peak was also observed between 26 and 35 ° partially superposed with SUC pattern. The XRD data indicate the presence of a new structure for CD powder. As a general characteristic, the CD (50:50) powder appeared as an amorphous structure, the presence of peaks associated with crystalline MES being not observed.

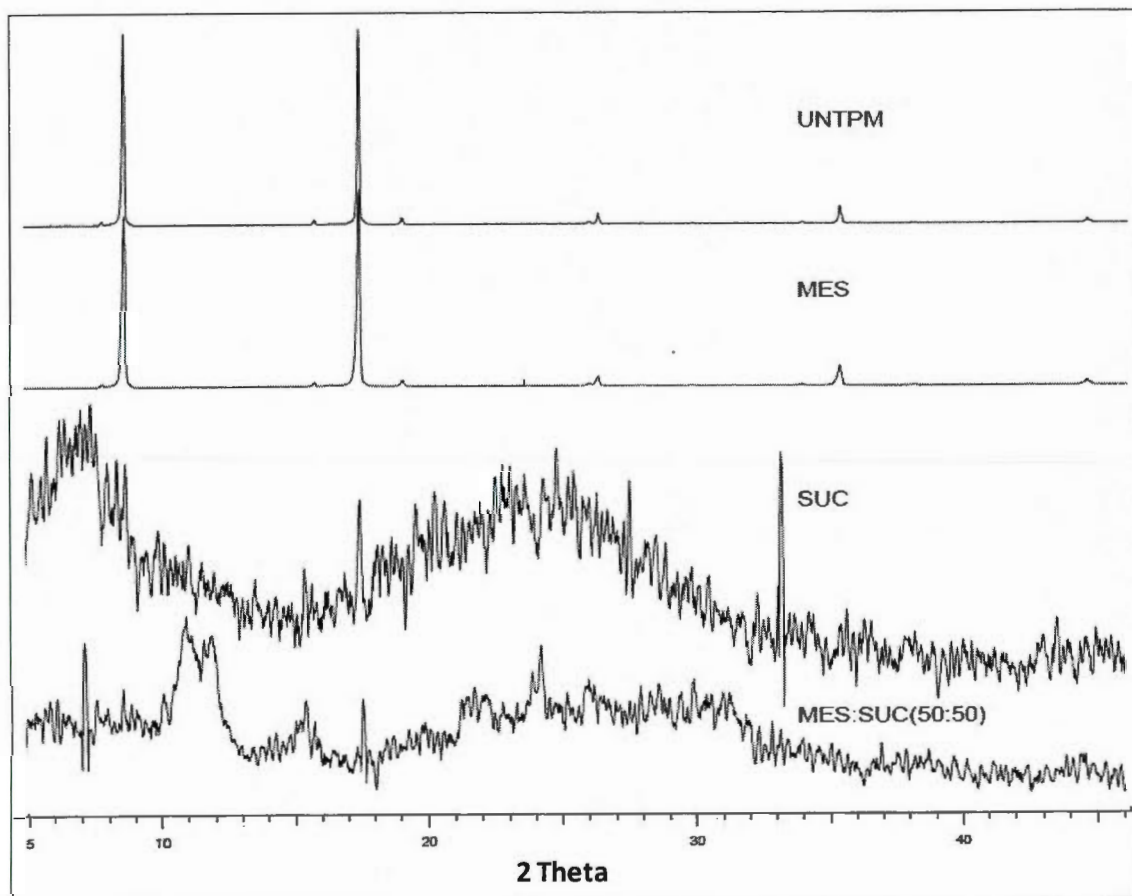


Figure A.3: XRD patterns of Sucralfate, Mesalamine, physical mixture of untreated active agents (UNTPM) and co-spray dried powder (CD) of MES:SUC 50:50.

3.2.2. SEM

Knowing that particle size and crystallinity could be modified via spray-drying (Elverson and Millqvist-Fureby, 2005), it was important to discriminate potential changes of the structures induced by the drying process itself. The surface morphology of MES and SUC was analyzed by SEM for untreated powders and treated powders (Figure A.4A-D).

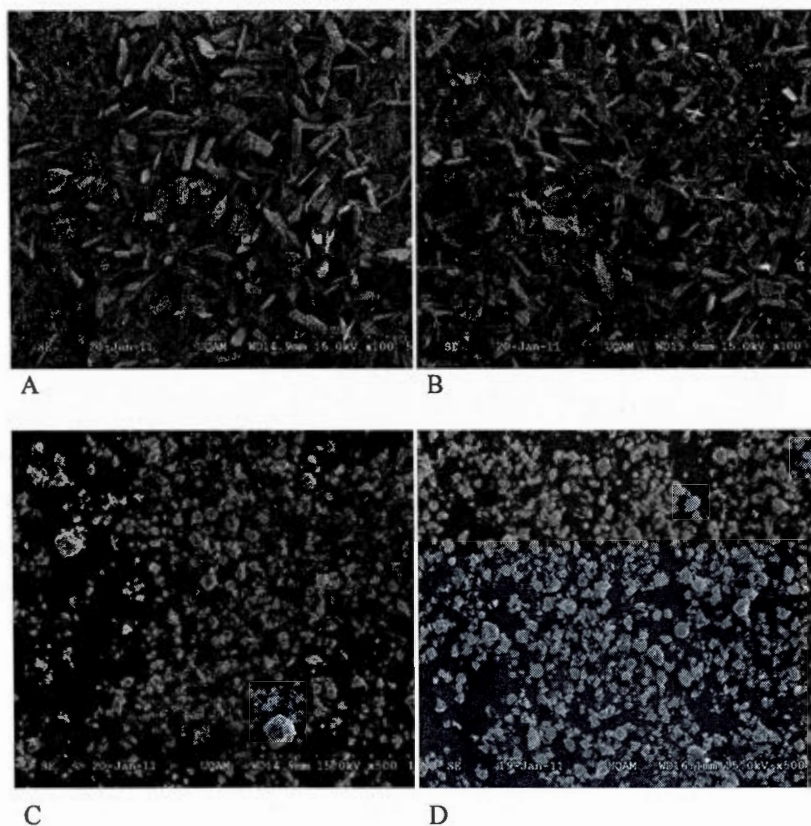


Figure A.4: SEM of Mesalamine untreated (A) and treated (B) powder at X100 magnification and Sucralfate untreated (C) and treated (D) powder at X 500 magnification.

The surface morphology of physical mixture of untreated powders (UNTPM), physical mixture of treated powders (TPM) co-spray dried powders was also analyzed by SEM and results are presented in Figure A.5.

Figures A.5A and A.5B show that the spray-drying did not affect significantly the particle morphology when the two drugs are dried separately. However, the mixing of MES and SUC together in an aqueous suspension followed by spray-drying generated a markedly different structural morphology where the two actives seem intimately bonded (Fig. A.5C). The SEM analysis indicates that the surface morphology observed with CD powders is not related to the drying process but comes from a drug-drug interaction occurring prior the spray-drying.

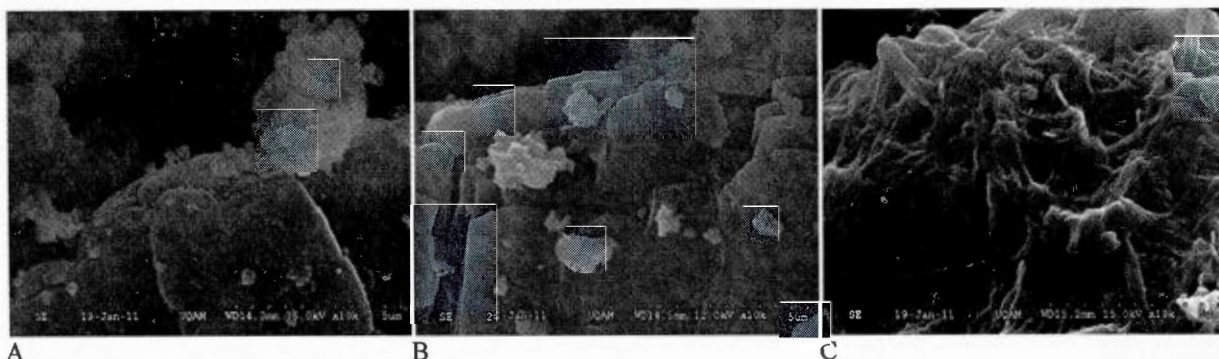


Figure A.5: Comparison of SEM taken for physical mixtures of untreated (A), physical mixture of treated mesalamine and sucralfate powders (B) and co-spray dried MES:SUC powder (C) at 50:50 ratio and magnitude X10000.

3.2.3. DSC analysis

Figure A.6A shows the DSC curves of treated and untreated SUC. These curves show two slow thermal transitions occurring between 50 to 220 °C and 220 to 380 °C. Based on the maximum of the first thermal transition temperature, the treated SUC powders are less thermally stable than the untreated SUC ones. The melting temperature of MES is at 281 °C and the spray-drying did not affect the melting temperature of drug (Figure A.6B).

However, the thermal properties of UNTPM and CD MES:SUC powders are different (Figures A.6C and A.6D). As expected, the DSC curves of UNTPM of MES:SUC powders have two thermal transitions (Fig. A.6C), a large thermal transition related to SUC and a characteristic endothermic thin peak of MES at 281 °C.

The DSC curves of CD powders at various ratios are shown in figure A.6D. The heating curves of CD compounds exhibit a very large transition as found for SUC but the profiles of DSC curves of CD powders are different to that of SUC. The first transition of CD powders (145 °C) is constituted by large transitions; they could be considered as transition of SUC not involved in the complexation and the transition of the complex compound. The second transition (281 °C) corresponding to the melting of MES, was more evident for the ratios 50:50 and 75:25 indicating the presence of free MES not involved in the complexation.

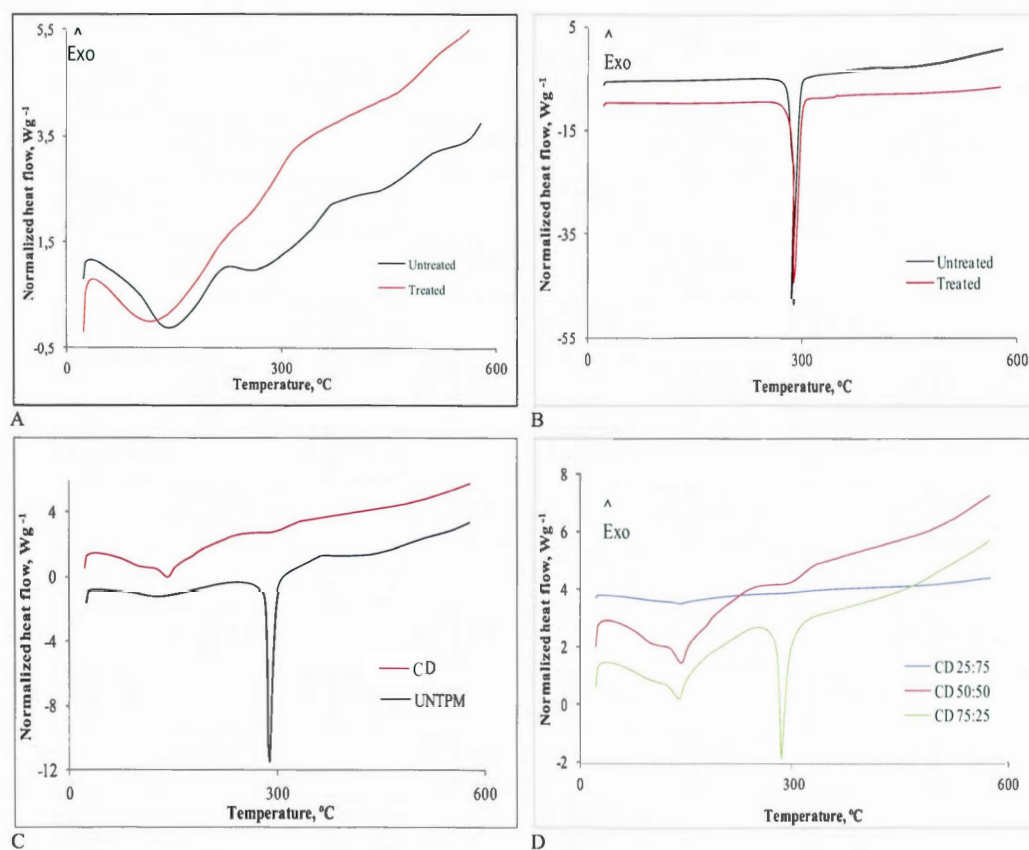


Figure A.6: DSC curves A: untreated and treated SUC; B: untreated and treated MES; C: CD and UNTPM of MES:SUC at 50:50 ratio; D: CD MES:SUC at 25:75, 50:50 and 75:25 ratios.

3.2.4. FTIR

The XRD, SEM and DSC data suggested that a new product is formed by mixing the aqueous suspensions of MES and SUC followed by the spray-drying. The IR spectra of the TPM are a combination of the IR bands of MES and SUC while IR spectra of CD powder are different in terms of absorption bands and the peak height ratios. Figure A.7 presents the global spectra (3700 to 525 cm^{-1}) of treated MES and SUC, their physical mixture and CD powders at 50:50. FTIR of CD powders given evidence for some potential interactions between the entities present in the system. The IR spectra for untreated (data not shown) and treated SUC

and MES present a large band at about 3500 cm^{-1} which is principally assigned to O-H stretching.

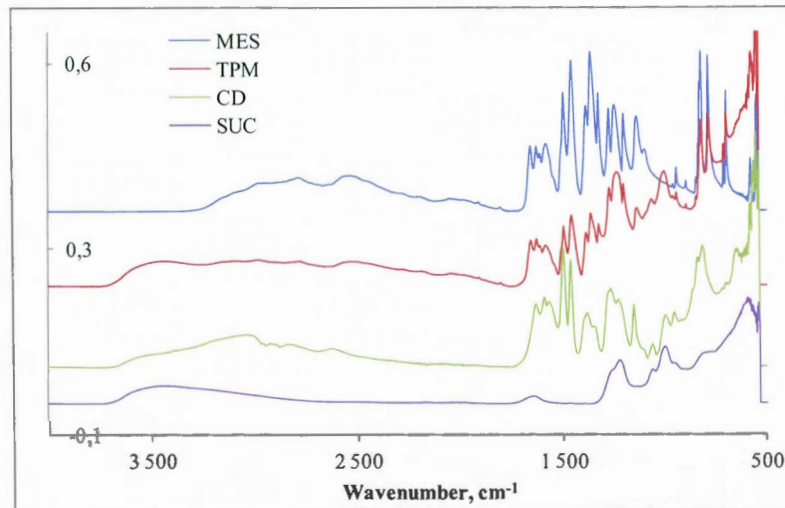


Figure A.7: IR spectra of treated Mesalamine and treated Sucralfate, the physical mixture of treated actives (TPM) and CD powders at 50:50 ratios.

The IR data showed for $3500\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ range increased water quantity for all powders after the spray-drying process. For $1750\text{--}525\text{ cm}^{-1}$ range, the spectra profile are similar for untreated and treated powders suggesting that dispersion in water and its removal by spray-drying are not affecting the structure or morphology of the active agents.

In the $1700\text{--}1515\text{ cm}^{-1}$ range (Fig. A.8A) the CD powders exhibit three bands at 1624 , 1582 and 1557 cm^{-1} . In this range, the MES spectrum has 4 bands: at 1650 cm^{-1} is ascribed to the C = O stretching of carboxylic group (Silverstein and Bassler 1968), at 1620 cm^{-1} related to C = C stretching of aromatic ring and N-H scissoring (Dash and Brittain, 1998) and at 1600 and 1570 cm^{-1} whose assignment is unknown. The SUC has a band at 1636 cm^{-1} and its absorption contribution to the CD compound is small. There is also a minor displacement of the wavenumbers. The band at 1624 cm^{-1} may become from the band at 1620 cm^{-1} of MES and the two bands at 1582 and 1557 cm^{-1} may be formed by the large band at 1570 cm^{-1} of

MES. Worth to note is an important decreasing or disappearing of the absorption band of C = O at 1650 cm^{-1} for the CD MES:SUC.

In the $1515 - 1420\text{ cm}^{-1}$ range (Fig. A.8B) two bands at 1484 and 1445 cm^{-1} are ascribed to the C-C stretching of MES aromatic ring. The C - O stretching of carboxylic group presents a band at 1445 cm^{-1} . The wavenumbers of these bands for the CD powders are shifted to higher values of about 8 cm^{-1} . Considering that the carboxylic group of mesalamine could be involved in interactions with sucralfate, the changes in C - O bond could be considered as indicative for potential changes in mesalamine structure. These changes of C - O bond can be followed by $\text{Abs.}1445\text{ cm}^{-1}/\text{Abs.}1485\text{ cm}^{-1}$ (Table A.2). It was observed that absorptions ratio increased with the percentage of MES in the co-spray dried complex, this increase seems indicative of the participation of C-O bond in the MES:SUC complex.

Table A.2: Variation of C-O absorbance of various ratios of co-spray dried (CD) MES:SUC powders.

CD MES:SUC	$\text{Abs}1445\text{ cm}^{-1}/\text{Abs}1485\text{ cm}^{-1}$
25:75	0.8
50:50	0.9
75:25	1.0
100:0	1.3

In the $1420 - 1300\text{ cm}^{-1}$ range (Fig. A.8C) MES has three bands at 1375 and at 1352 cm^{-1} attributed to O-H deformation of the carboxylic group and a band at 1317 cm^{-1} for the C-N stretching of aromatic ring. The changes in profile and intensity of MES found for CD compounds suggest the participation of these groups in the complex formation.

The $1300 - 600\text{ cm}^{-1}$ range (Fig. A.8D) is difficult to interpret due to the important absorption of SUC. The interesting band at 1188 cm^{-1} assigned to the C-OH stretching of phenol group of MES disappeared in the CD powders. Moreover, the shape of two bands at 810 and 775

cm^{-1} becomes larger and their wavenumbers are shifted to higher values (828 and 805 cm^{-1}) and a new band is formed at 641 cm^{-1} for CD.

In fact the whole IR analysis suggested that all functional groups, carboxylic acid, amino and phenol of MES are involved in the complexation with SUC.

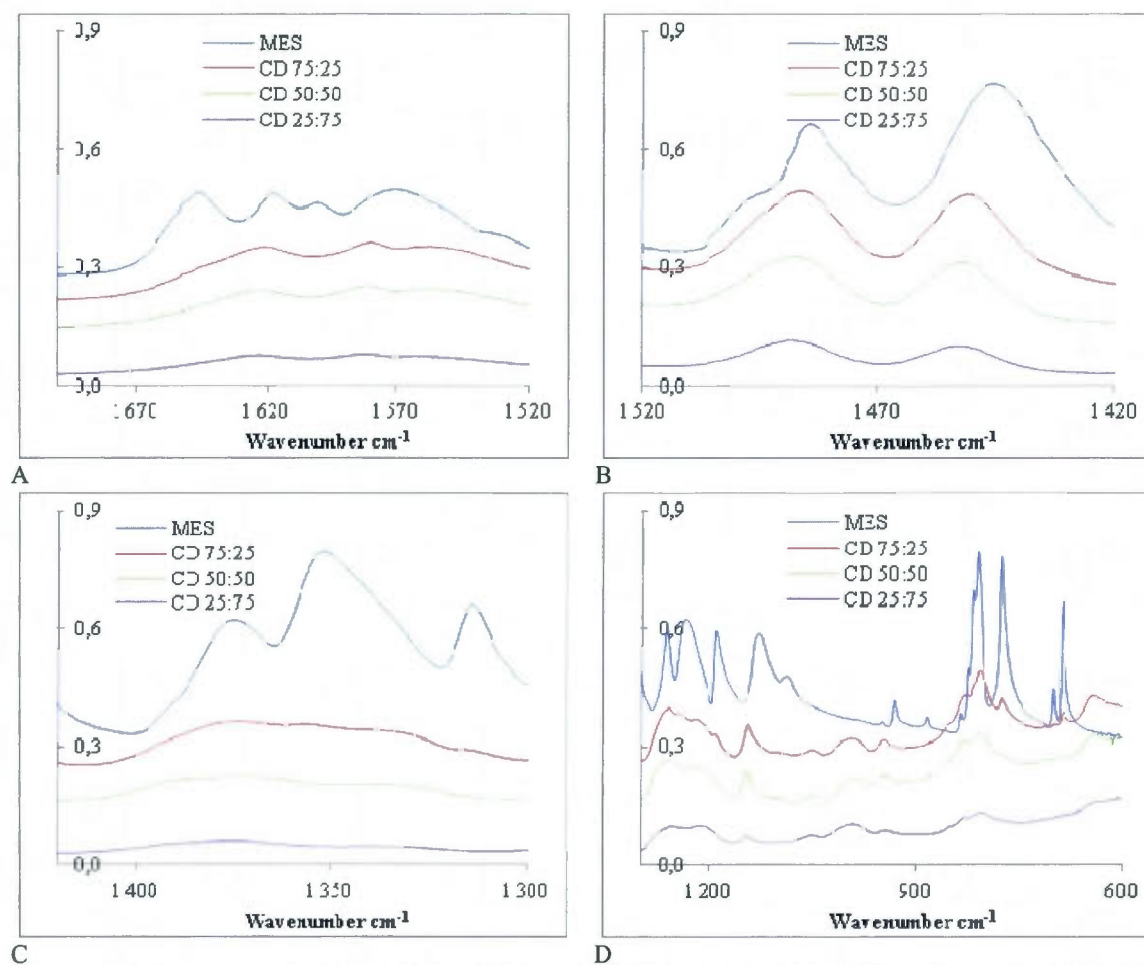


Figure A.8: IR spectra A: $1700\text{-}1515 \text{ cm}^{-1}$; B: $1515\text{-}1420 \text{ cm}^{-1}$; C: $1420\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$ and D: $1300\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$ range of treated MES and of CD MES:SUC at 25:75, 50:50, 75:25 ratios.

3.2.6. $^1\text{H-NMR}$

To confirm our hypothesis regarding functional groups of the two active molecules involved in the complexation, we continued our investigation with NMR technique known as a

sensitive method to follow such structure changes. Figure A.9A illustrates the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of treated MES in $\text{NaCl/D}_2\text{O}$ showing three bands at 7.75, 7.4 and 7.0 ppm which are attributed to the proton attached to C_1 , C_3 and C_4 of aromatic ring (numbering scheme for assignments bands of treated mesalamine is show in the insert). The bands associated to protons of amino, hydroxyl and carbonyl groups linked to C_2 , C_5 and C_7 were not observed in D_2O due to the fast exchange of their ^1H to ^2H (D). These bands appear when dimethyl sulfoxide was used as reported by Dash and Brittain (1998). Figures A.9B-D present the $^1\text{H-NMR}$ spectra of treated SUC, TPM and CD MES:SUC at 50:50 ratio.

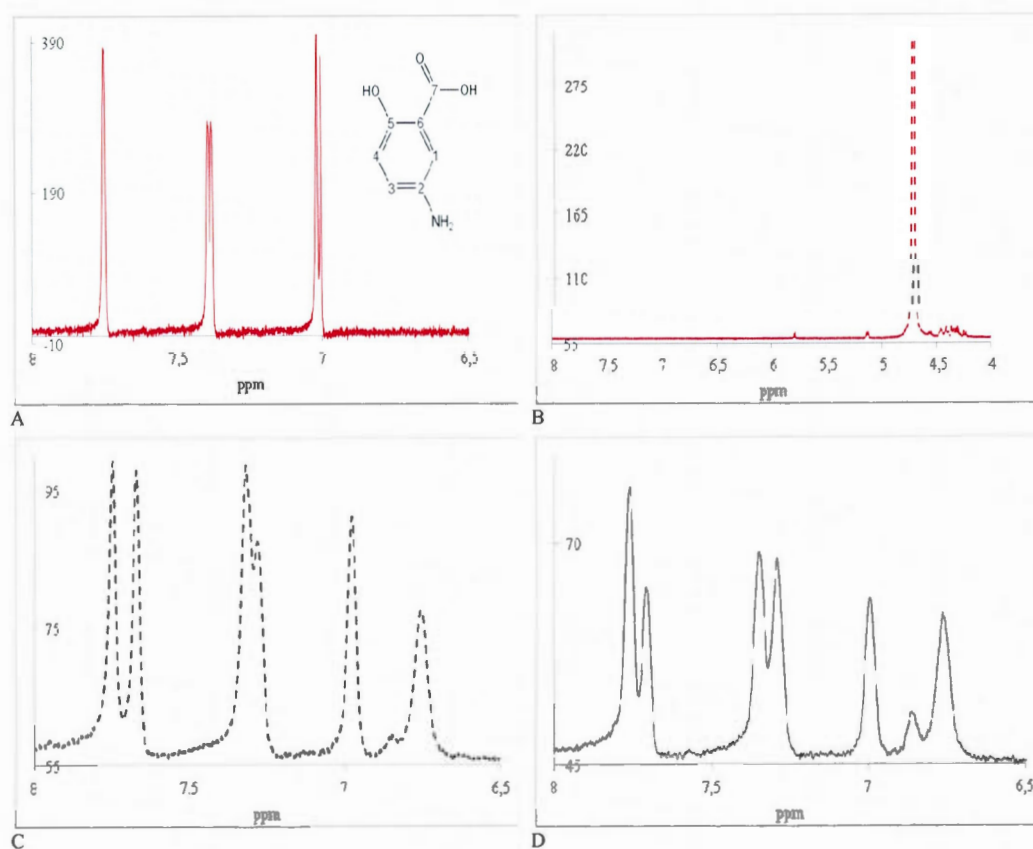


Figure A.9: $^1\text{H-NMR}$ spectrum **A:** treated Mesalamine; **B:** treated Sucralfate; **C:** TPM of MES:SUC (50:50); **D:** CD MES:SUC (50:50) in $\text{NaCl/D}_2\text{O}$.

The changes of the MES part in the $^1\text{H-NMR}$ spectra of MES:SUC complex were used to follow the eventual modifications induced by different treatments. The $^1\text{H-NMR}$ spectra of TPM and CD MES:SUC are different to spectrum of treated MES: new bands were observed and chemical shifts of mentioned spectra are presented in Table A.3.

Table A.3: Chemical shifts of PM and CD MES:SUC 50:50 in NaCl/D₂O.

Treated MES	TPM and CD MES:SUC	Notes
7.75	7.75, 7.67	New band observed at 7.67 ppm
7.39, 7.38	7.32, 7.29	Bands of treated PM and CD shifted to lowers chemical shifts
7.00	6.98	Small shift
Absent	6.86, 6.76	New bands
Absent	5.78	Proton of SUC glucose part
Absent	5.12	Proton of SUC furan part

Despite of unmodified chemical shifts of the resonance bands between treated PM and CD MES:SUC, the MES band ratios modification can be observed for these compounds. The band at 5.78 ppm (corresponding to SUC) was chosen to normalize all ratios and the normalized resonance bands of MES are presented in Table A.4.

Table A.4: Variation of the normalized resonance bands of MES for TPM and CD MES:SUC powders suspended in NaCl/D₂O.

ppm	TPM	CD
7.75	4.2	2.8
7.67	4.1	1.8
7.32	4.3	2.2
7.29	3.2	2.1
6.98	3.6	1.7
6.85	0.3	0.5
6.76	2.2	1.6

As previously shown, the complexation of the two active agents occurred at the stage of preparation when the two aqueous suspensions were mixed in NaCl/D₂O solution. This translates in slight modifications observed between PM and CD MES:SUC.

The standardized peak ratios of PM were, in most of the cases, higher than those of co-spray dried complex suggesting that the MES-SUC complex (CD) was more stable i.e. less soluble in water than the complex freshly formed during the mixing step with NaCl/D₂O. Further studies using NMR technique will allow a better understanding of the complexation kinetics of the two drugs.

3.2.5. *Complexation mechanism*

Based on visual observations and structural characterization, it was hypothesized that a complex is formed when aqueous suspensions of MES and SUC are mixed. In order to understand the contribution of different moieties (i.e. Al³⁺, SOS and MES) on the complex formation, some additional trials were run. In a series of tests, aqueous suspensions of MES were mixed with solution of NaSOS (same structure as sucralfate but without Al moiety). In another series, MES suspensions were mixed in the same conditions with aluminum hydroxide or aluminum chloride (no sucrose, nor sucralfate moieties). No viscosity changes were observed for these series of suspensions and this was indicative of sucralfate role in the complexation. The ionization phenomena occurring in aqueous media involving interactions between MES and SUC charged species appear as the driving force in the complex formation.

Based on our IR results, the -COOH, -NH₂ and -OH groups are participating in the complexation. The complex could be formed via two types of associations: (i) ionic bond between COO⁻/-OH groups and Al (dotted line framed Figure A.10) and (ii) coordination bond between -NH₂ groups and Al (continuous line framed Figure A.10). This hypothesis of complex formation is schematically presented in Figure A.10.

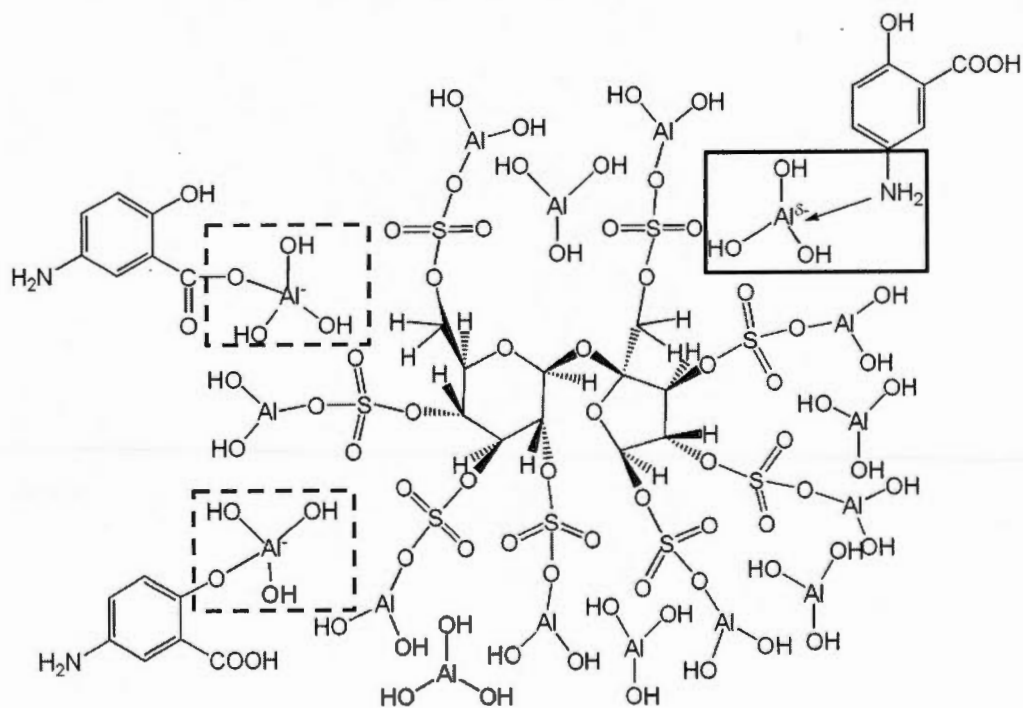


Figure A.10: Schema of the mechanism of MES and SUC complexation.

Preliminary *in vitro* dissolution tests were performed using tablets based on UNTPM, TPM of MES and SUC and CD powders. The same MES:SUC ratio (50:50 and 75:25), tablet size, loading and dissolution conditions were used for all tests. From these series of dissolution experiments using MES as a tracer, it appeared that the particle size of the two actives is not a critical element of the dissolution profile of MES; thus tablets containing individually dried powders (treated active agents) have similar MES release profile as the formulations based on physical mixture of untreated active ingredients (data not shown).

The dissolution tests showed a marked difference in release profiles of MES when liberated from tablets based on the complex versus physical blend of the two actives. The release kinetics of MES from tablets formulated with complex powder was near to zero-order which is an interesting feature for further utilization in formulation of delayed release to ensure the topic action at the targeted site for an extended period of time. The profile of complex MES:SUC (ratio 75:25) dried from water was evaluated as similar to the ratio 50:50. This

result is of interest, showing that a higher loading in MES is generating the same near to linear release profile. All formulations and dissolution aspects of MES released from various CD complexes are in preparation as a distinct publication.

4. Conclusion

This exploratory study was focused on preparation of a new series of complexes between MES and SUC resulting from the dispersion of MES and SUC in aqueous media followed by co-spray drying. It was found, that without chemical alterations, it is possible to obtain such a complex by suspending the two drugs in water followed by the spray-drying of their combination. The formation of a thixotropic paste was unexpectedly observed following the mixing of the two suspensions. The obtained paste could be considered by its-self a potential pharmaceutical product able to exert anti-inflammatory and tissue/mucosa healing properties. The study represents also an interest being a pioneer in the field of drug-drug co-processing.

The data obtained via different characterization techniques support our hypothesis of formation of MES:SUC complex and showed the role of different functional groups in this (poly)electrolytic association. Based on structural analysis (SEM, X-Ray, DSC, FTIR and ¹H-NMR) a new compound, different from the physical mixture of the two drugs, is formed when the two molecules are processed together in water and co-spray dried. The fact that the complex was maintained after the spray-drying is an important aspect that can open interesting avenues and needs for further exploration. Preliminary dissolution tests have shown that MES release profile from co-processed powder is different compared to physical mixture of untreated powder. The MES:SUC complex could be considered as a new entity able to ensure MES controlled release at its site of action i.e. in the colon for more than 8 hours.

Acknowledgements

Thanks are due to Dr Van Huu Tra for the valuable advice and also to Mr Michel Preda and Mr Raynald Lapointe for the assistance with the X-ray diffraction and Scanning Electron Microscopy analyses respectively.

BIBLIOGRAPHIE

- Aggarwal, S., Singh, P. N., Mishra, B., 2002. «Studies on solubility and hypoglycemic activity of gliclazide beta-cyclodextrin-hydroxypropyl methylcellulose complexes». *Pharmazie*, vol. 57, p. 191-193.
- Ahnfelt-Ronne I., Nielsen O.H., Christensen A., Langholz E., Binder V., Riis P., 1990. «Clinical evidence supporting the radical scavenger mechanism of 5-aminosalicylic acid». *Gastroenterology*, vol. 98, p. 1162-1169.
- Aleem, O., Kuchekar, B., Pore, Y., Late, S., 2008. «Effect of beta-cyclodextrin and hydroxypropyl beta-cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir». *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 47, p. 535-540.
- Allgayer H., 2003. «Review article: mechanisms of action of mesalazine in preventing colorectal carcinoma in inflammatory bowel disease». *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 18, p. 10-14.
- Appelqvist I.A.M. et Debet M.R.M., 1997. «Starch – biopolymer interactions – a review». *Food Reviews International*, vol. 13, p. 163-224.
- Ashford M., Fell J.T., Attwood D., Sharma H. et Woodhead P.J., 1993. «An in vivo investigation into the suitability of pH-dependent polymers for colonic targeting». *Int. J. Pharm.*, vol. 95, p. 193-199.
- Assaad E., Mateescu M.A., 2010. «The influence of protonation ratio on properties of carboxymethyl starch excipients at various substitution degrees: Structural insights and drug release kinetics». *Int. J. Pharm.*, vol. 394, p. 75-84.
- Assaad E., Wang Y.J., Zhu X.X., Mateescu M.A., 2011. «Polyelectrolyte complex of carboxymethyl starch and chitosan as drug carrier for oral administration». *Carbohydr. Polym.*, vol. 84, p. 1399-1407.
- Azad Khan K.A., Piris J., Truelone S.C., 1977. «An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine». *Lancet*, vol. 2, p. 892-895.
- Barnes P.J., Karin M., 1997. «Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases» *N. Engl. J. Med.*, vol. 336, p. 1066-1071.
- Basit A., Bloor J. 2003. «Perspectives on colonic drug delivery». *Drug Delivery Business briefing: Pharmatech*. p. 185-190.

- Baumgart D.C., Sandborn W.J. 2007. «Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies». *Lancet*, vol. 369, p. 1641-1657.
- Biliaderis C.G., 1991. «The structure and interactions of starch with food constituents». *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 69, p. 60-78.
- Brouillet F., Bataille B., Cartilier L., 2008. «High-amylose sodium carboxymethyl starch matrices for oral, sustained drug-release: formulation aspects and in vitro drug-release evaluation». *Int. J. Pharm.*, vol. 356, p. 52-60.
- Buléon A., Colonna P., Planchot V., Ball S., 1998. «Starch granules: structure and biosynthesis». *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 23, p. 85-112.
- Calinescu C., Mulhbacher J., Nadeau E., Fairbrother J.M., Mateescu M.A., 2005. «Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipients for Escherichia coli oral formulations». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 60, p. 53-60.
- Calinescu C., Nadeau E., Mulhbacher J., Fairbrother J.M., Mateescu M.A., 2007. «Carboxymethyl high amylose starch for F4 fimbriae gastro-resistant oral formulation». *Int. J. Pharm.*, vol. 343, p. 18-25.
- Calinescu C., Mateescu M.A., 2008. «Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 70, p. 582-589.
- Canty D.J. and Zeisel S.H., 1994. «Lecithin and choline in human health and disease». *Nutr. Rev.* vol. 52, p. 327-339.
- Carter M.J., Lobo A.J., Travis S.P., 2004. «Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults». *Gut*, vol. 53, p. 1-16.
- Cartilier L., Mateescu M. A., Dumoulin Y., Lenaerts V., 1994. «Cross-Linked amylose as a binder/disintegrant in tablets». International Patent PCT/CA94/00 163.
- Chan R.P., Pope D.J., Gilbert A.P., Sacra P.J., Baron J.H., Lennard-Jones J.E., 1983. «Studies of two novel sulfasalazine analogs, ipsalazide and balsalazide». *Dig. Dis. Sci.*, vol. 28, p. 609-615.

- Chourasia M.K. et Jain S.K. 2003. «Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems». *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, vol. 6, p. 33-66.
- Chuong M.C., Christensen J.M., Ayres J.W., 2008. «New Dissolution Method for Mesalamine Tablets and Capsules». *Dissolution Technol.*, vol. 15, p. 7-14.
- Collier H.O., Francis A.A., McDonald-Gibson W.J., Saeed S.A., 1976. «Inhibition of prostaglandin biosynthesis by sulphasalazine and its metabolites». *Prostaglandins*, vol. 11, p. 219-225.
- Collins J.R., 1968. «Adverse reactions to salicylazosulfapyridine (azulfidine) in the treatment of ulcerative colitis». *South. Med. J.*, vol. 61, p. 354-358. (cité par Taffet et Das, 1983)
- Colombo P, Bettini R, Santi P, Peppas NA. 2000. «Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance». *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 3, p. 198-204.
- Das K.M., Eastwood M.A., McManus J.P.A., Sircus W., 1973. «Adverse reactions during salicylazosulfapyridine therapy and the relation with drug metabolism and acetylator phenotype». *N. Engl. J. Med.*, vol. 289, p. 491-495. (cité par Taffet et Das, 1983)
- Dash, A. K., Brittain, H. G., 1998. « Mesalamine» In *Analytical profiles of drug substances and excipients Volume 25*, (Brittain H.G., editor) 209-242. Academic Press.
- Davis S.S., Hardy J.G., Taylor M.J., Stockwell A., Whalley D.R., Wilson C.G., 1984. «The in vivo evaluation of an osmotic device (osmet) using gamma scintigraphy». *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 36, p. 740-742.
- Dew M.J., Ryder R.E., Evans N., Evans B.K., Rhodes J., 1983. «Colonic release of 5-amino salicylic acid from an oral preparation in active ulcerative colitis». *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 16, p. 185-187.
- Dua, K., Pabreja, K., Ramana, M. V., Lather, V., 2011. «Dissolution behavior of β -cyclodextrin molecular inclusion complexes of aceclofenac». *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 3, p. 417-25.
- Dumoulin Y., Clément P., Mateescu M.A., Cartilier L.H., 1994. «Cross-linked amylose as a new binder/disintegrant in compressed tablets». *S.T.P. Pharma Sciences*, vol. 4, p. 329-335.
- Edge S., Belu A.M., Potter U.J., Steele D.F., Young P.M., Price R., Staniforth J.N., 2002. «Chemical characterisation of sodium starch glycolate particles». *Int. J. Pharm.*, vol. 240, p. 67-78.

Elversson, J., Millqvist-Fureby, A., 2005. « Particle size and density in spray drying—effects of carbohydrate properties. *J. Pharm. Sci.*, vol. 94, p. 2049-2060.

Elworthy P.H., Saunders L., 1956. «The physical chemistry of the lecithins». *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 8, p. 1001-1018.

Englyst H.N., Hay S., MacFarlane G.T., 1987. «Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria». *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 45, p. 163-171.

Evans D.F., Pye G., Bramley R., Clark A.G., Dyson T.J., Hardcastle J.D., 1988. «Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects». *Gut*, vol. 29, p. 1035-1041.

Exarhopoulos S., Raphaelides S.N., 2012. «Morphological and structural studies of thermally treated starch-fatty acid systems». *J. Cereal. Sci.*, vol. 55, p. 139-152.

Fallingborg J., Christensen L.A., Jacobson B.A., Rasmussen S.N., 1993. «Very low intraluminal colonic pH in patients with active ulcerative colitis». *Dig. Dis. Sci.*, vol. 38, p. 89-93.

Fiocchi C., 1998. «Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis». *Gastroenterology*, vol. 115, p. 182-205.

Fiocchi C., 2005. «Inflammatory bowel disease pathogenesis: therapeutic implications». *Chin. J. Dig. Dis.*, vol. 6, p. 6-9.

Folkman J., Szabo S., Stovroff M., McNeil P., Li W., Shing Y., 1991. «Duodenal ulcer. Discovery of a new mechanism and development of angiogenic therapy that accelerates healing». *Ann. Surg.*, vol. 214, p. 414-425.

French D. 1984. «Organization of starch granules». In *Starch, chemistry and technology*, 2nd edition, (Whistler R.L., BeMiller J.N., Paschall E.F., eds), 184-247. Orlando: Academic Press Inc.

French D.L., Mauger J.W., 1993. «Evaluation of the physicochemical properties and dissolution characteristics of mesalamine: relevance to controlled intestinal drug delivery». *Pharm. Res.*, vol. 10, p. 1285-1290.

- French, D. L., Himmelstein, K.J., Mauger, J. W., 1995. «Physicochemical aspects of controlled release of substituted benzoic and naphthoic acids from Carbopol gels». *J. Control. Release*, vol. 37, p. 281-289
- Friend D.R. et Chang G.W., 1984. «A colon-specific drug-delivery system based on drug glycosides and the glycosidases of colonic bacteria». *J. Med. Chem.*, vol. 27, p. 261-266.
- Gidley M.G., 1989. «Molecular mechanism underlying amylose aggregation and gelation». *Macromolecules*, vol. 22, p. 351-357.
- Godet M.C., Tran V., Delage M.M., Buléon A., 1993. «Molecular modelling of the specific interactions involved in the amylose complexation by fatty acids». *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 15, p. 11-16.
- Goebell H., Klotz U., Nehlsen B., Layer P., 1993. «Oroileal transit of slow release 5-aminosalicylic acid». *Gut*, vol. 34, p. 669-675.
- Gorbach S.L., 1971. «Intestinal microflora». *Gastroenterology*, vol. 60, p. 1110-1129.
- Goyanes A., Souto C., Martínez-Pacheco R., 2011. «Co-processed MCC-Eudragit® E excipients for extrusion-spheronization». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 79, p. 658-663.
- Green J.R.B., 1993. «The treatment of ulcerative colitis with balsalazide sodium». *Inflammopharmacology*, vol. 2, p. 289-295.
- Green J.R.B., Lobo A.J., Holdsworth C.D., Leicester R.J., Gibson J.A., Kerr G.D., Hodgson H.J, Parkins K.J., Taylor M.D., 1998. «Balsalazide is more effective and better tolerated than mesalamine in the treatment of acute ulcerative colitis». *Gastroenterology*, vol. 114, p 15-22.
- Gregoriadis G., Florence A.T., 1993. «Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential». *Drugs*, vol. 45, p. 15-28.
- Hanauer S.B., 1996. «Inflammatory bowel disease». *N. Engl. J. Med.*, vol. 334, p. 841-848.
- Hebden J.M., Wilson C.G., Spiller R.C., Gilchrist P.J., Blackshaw E., Frier M.E., Perkins A.C., 1999. «Regional differences in quinine absorption from the undisturbed human colon assessed using a timed release delivery system». *Pharm. Res.*, vol. 16, p. 1087-1092.
- Higo, S., Takeuchi, H., Yamamoto, H., Hino, T., Kawashima, Y., 2004. «The acidic complexation of tetracycline with sucralfate for its mucoadhesive preparation». *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, vol. 30, p. 715-724.

- Hoover R., Hadziyev D., 1981. «Characterization of Potato Starch and Its Monoglyceride Complexes». *Starch – Stärke*, vol. 33, p. 290–300.
- Hoover R., 2001. «Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A review». *Carbohydr. Polym.*, vol. 45, p. 253–267.
- Imberty A., Buléon A., Tran V., Pérez S., 1991. «Recent advances in knowledge of starch structure». *Starch – Stärke*, vol. 43, p. 375–384.
- Immel S., Lichtenthaler F.W., 2000. «The Hydrophobic Topographies of Amylose and its Blue Iodine Complex». *Starch – Stärke*, vol. 52, p. 1–8.
- Ispas-Szabo P., De Koninck P., Calinescu C., Mateescu M.A., 2007. «Novel carboxymethyl starch excipients for oral dosage forms». *Proceedings of the 34th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society*.
- Ispas-Szabo P., Ravenelle F., Hassan I., Preda M., Mateescu M.A., 2000. «Structure-properties relationship in cross-linked high amylose starch for use in controlled drug release». *Carbohydr. Res.*, vol. 323, p. 163–175.
- Jackson K., Young D., Pant S., 2000. «Drug–excipient interactions and their affect on absorption». *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 3, p. 336–345.
- Joshi A., Paratkar S.G. and Thorat, B.N., 2006. «Modification of lecithin by physical, chemical and enzymatic methods». *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 108, p. 363–373.
- Jouppila K., Kansikas J., Roos Y.H., 1998. «Factors affecting crystallization and crystallization kinetics in amorphous corn starch». *Carbohydr. Polym.*, vol. 36, p. 143–149.
- Jung, Y.J., Lee, J.S., Kim, Y.M., 2001. «Colon-specific prodrugs of 5-aminosalicylic acid: synthesis and *in vitro/in vivo* properties of acidic amino acid derivatives of 5-aminosalicylic acid». *J. Pharm. Sci.*, vol. 90, p. 1767–1775.
- Juppo A.M., Boissier C., Khoo C., 2003. «Evaluation of solid dispersion particles prepared with SEDS». *Int. J. Pharm.*, vol. 250, p. 385–401
- Katikanenia, P.R., Upadrashta, S.M., Neaua, S.H., Mitra, A.K., 1995. «Ethylcellulose matrix controlled release tablets of a water-soluble drug». *Int. J. Pharm.*, vol. 123, p. 119–125.

- Kawai K., Takatob S., Sasakic T., Kajiwara K., 2012. «Complex formation, thermal properties, and in-vitro digestibility of gelatinized potato starch-fatty acid mixtures». *Food Hydrocolloid*, vol. 27, p. 228-234.
- Kornbluth A., Sachar D.B., Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology, 2004. «Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology Practice Parameters Committee». *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 99, p. 1371-1385.
- Le Tien C., Lacroix M., Ispas-Szabo P., Mateescu M.A., 2003. «N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release». *J. Control. Release*, vol. 93, p. 1-13.
- Lemieux M., Gosselin P., Mateescu M.A., 2009. «Carboxymethyl high amylose starch as excipient for controlled drug release: Mechanistic study and the influence of degree of substitution». *Int. J. Pharm.*, vol. 382, p. 172-182.
- Lemieux M., Gosselin P., Mateescu M.A., 2010. «Influence of drying procedure and of low degree of substitution on the structural and drug release properties of carboxymethyl starch». *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, vol. 11, p. 775-785.
- Lenaerts V., Dumoulin Y. et Mateescu M. A. 1991. «Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets». *J. Control. Release*, vol. 15, p. 39-46.
- Leopold C.S., 1999. «Coated dosage forms for colon-specific drug delivery». *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 2, p. 197-204.
- Levina M, Rajabi-Siahboomi A.R., 2004. «The influence of excipients on drug release from hydroxypropyl methylcellulose matrices». *J. Pharm. Sci.*, vol. 93, p. 2746-2754.
- Li, P., Hynes, S. R., Haefele, T. F., Pudipeddi, M., Royce, A. E., Serajuddin, A.T., 2009. «Development of clinical dosage forms for a poorly water-soluble drug II: formulation and characterization of a novel solid microemulsion concentrate system for oral delivery of a poorly water-soluble drug». *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, p. 1750-1764.
- Lichtenstein G.R., Kamm M.A., 2008. «Review article: 5-aminosalicylate formulations for the treatment of ulcerative colitis - methods of comparing release rates and delivery of 5-aminosalicylate to the colonic mucosa». *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 28, p. 663-673.
- Liu B., Du J., Zeng J., Chen C., Niu S., 2009. «Characterization and antioxidant activity of dihydromyricetin-lecithin complex». *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 230, p. 325-331.

Maggi, L., Conte, U., Giunchedi, P., Colombo, P., 1993. «Press-coated tablets for the sequential pulsed administration of two different drugs». *Int. J. Pharm.*, vol. 99, p. 173-179.

Mahida Y.R., Lamming C.E., Gallagher A., Hawthorne A.B., Hawkey C.J., 1991. «5-aminosalicylic acid is a potent inhibitor of interleukin 1 beta production in organ culture of colonic biopsy specimens from patients with inflammatory bowel disease». *Gut*, vol. 32, p. 50-54.

Majid G., Zhu J.B., 1998. «Ibuprofen release kinetics from controlled-release tablets granulated with aqueous polymeric dispersion of ethylcellulose II: Influence of several parameters and coexcipients». *J. Control. Release*, vol. 56, p. 127-134.

Masuda, T., Yoshihashi, Y., Yonemochi, E., Fujii, K., Uekusa, H., Terada, K., 2012. «Cocrystallization and amorphization induced by drug-excipient interaction improves the physical properties of acyclovir». *Int. J. Pharm.*, vol. 422, p. 160-169.

Mateescu M.A., Lenaerts V., Dumoulin Y., 1994. «Cross-linked material for controlled release of biologically active compounds». Canadian Patent 2,041,774.

McClements D.J., 1999. In *Food emulsion: principles, practices and techniques*, p. 1-5, Boca Raton CRC Press LLC.

McLeod A.D., Friend D.R., Tozer T.N., 1994. «Glucocorticoid-dextran conjugates as potential prodrugs for colon-specific delivery: hydrolysis in rat gastrointestinal tract contents». *J. Pharm. Sci.*, vol. 83, p. 1284-1288.

Milallos, G., Alexander, K., Riga, A., 2008. «Investigation of the interaction between acidic, basic, neutral, and zwitterionic drugs with poly- L -lactic acid by thermal and analytical methods». *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 93, p. 289-294.

Miles M.J., Morris V.J., Orford P.D., Ring S.G., 1985. «The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch». *Carbohydr. Res.*, vol. 135, p. 271-281.

Milojevic S., Newton J.M., Cummings J.H., Gibson G.R., Botham R.L., Ring S.G., Stockham M. et Allwood M.C., 1996. «Amylose as a coating for drug delivery to the colon: Preparation and in vitro evaluation using 5-aminosalicylic acid pellets». *J. Control. Release*, vol. 38, p. 75-84.

Miroshnyk, I., Mirza, S., Sandler, N., 2009. «Pharmaceutical co-crystals an opportunity for drug product enhancement». *Expert. Opin. Drug Deliv.*, vol. 6, p. 333-341.

- Morrison W., Law R.V., Snape C.E., 1993. «Evidence for Inclusion Complexes of Lipids with V-amylose in Maize, Rice and Oat Starches». *J. Cereal. Sci.*, vol. 18, p. 107-109.
- Mulhbacher J., Ispas-Szabo P., Mateescu M.A., 2004a. «Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release. II. Swelling properties and mechanistic study». *Int. J. Pharm.*, vol. 278, p. 231–238.
- Mulhbacher, J., Mateescu, M.A., Calinescu, C., 2004b. Composition comprising polymeric material and uses thereof. US Patent Application, priority 60/542,299.
- Nabais T., Brouillet F., Kyriacos S., Mroueh M., Amores da Silva P., Bataille B., Chebli C., Cartilier L., 2007. «High-amylose carboxymethyl starch matrices for oral sustained drug-release: in vitro and in vivo evaluation». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 65, p. 371-378.
- Nagashima R., 1981, «Mechanism of action of sucralfate». *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 3, p. 117–127.
- Ng S.C., Kamm M.A., 2009. «Therapeutic strategies for the management of ulcerative colitis». *Inflamm. Bowel. Dis.*, vol. 15, p. 935-950.
- Niwa K., Takaya T., Morimoto T., Takada K., 1995. Preparation and evaluation of a time-controlled release capsule made of ethylcellulose for colon delivery of drugs. *J. Drug Target*, vol. 3, p. 83-89.
- Oates C.G., 1997. «Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis». *Trends. Food Sci. Technol.*, vol. 8, p. 375-382.
- Ochi K., 1995. «Chemistry of Sucralfate». In *Sucralfate From Basic Science to the Bedside* (Hollander, D. and Tygat G. Eds.), 47-58. Plenum Publishing Co.
- Osler W. 2007. «The pharmacodynamic basis of therapeutics». In *Desk Reference of Clinical Pharmacology, 2nd Edition*, (Ebadi M. editor), 17-19. Boca Raton: CRC Press.
- Pérez S., Bertoft E., 2010. «The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review». *Starch – Stärke*, vol. 62, p. 389–420.
- Philip A.K. et Philip B., 2010. «Colon Targeted Drug Delivery Systems: A Review on Primary and Novel Approaches». *Oman Med. J.*, vol. 25, p. 79–87.

- Kedia P., Cohen R.D., 2007. «Once-daily MMX mesalamine for the treatment of mild-to-moderate ulcerative colitis». *Ther. Clin. Risk. Manag.*, vol. 3, p. 919–927.
- Prakash A., Markham A., 1999. «Oral delayed-release mesalazine: a review of its use in ulcerative colitis and Crohn's disease». *Drugs*, vol. 57, p. 383-408.
- Putseys J.A., Lamberts L., Delcour J.A., 2010. «Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties». *J. Cereal Sci.*, vol. 51, p. 238-247.
- Qureshi A.I., Cohen R.D., 2005. «Mesalamine delivery systems: do they really make much difference?». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, p. 281-302.
- Raimundo A.H., Patil D.H., Frost P.G., Silk D.B., 1991. «Effects of olsalazine and sulphasalazine on jejunal and ileal water and electrolyte absorption in normal human subjects». *Gut*, vol. 32, p. 270–274.
- Rachmilewitz D., Karmeli F., Schwartz L.W., Simon P.L., 1992. «Effect of aminophenols (5-ASA and 4-ASA) on colonic interleukin-1 generation». *Gut*, vol. 33, p. 929–932.
- Rees W.D., 1991. «Mechanisms of gastroduodenal protection by sucralfate». *Am. J. Med.*, vol. 91, p. 58-63.
- Rijk M.C., van Schaik A., van Tongeren J.H., 1988. «Disposition of 5-aminosalicylic acid by 5-aminosalicylic acid-delivering compounds». *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 23, p. 107-112.
- Rogler G., Brand K., Vogl D., Page S., Hofmeister R., Andus T., Knuechel R., Baeuerle P.A., Scholmerich J., Gross V., 1998. «Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa». *Gastroenterology*, vol. 115, p. 357–369.
- Roveda S., Colombo P., Pulvirenti A., Pini G., Germogli R., Molteni R., Lattuada V., 1991. «Evaluation of the analgesic activity of a new ketoprofen-sucralfate combination». *Boll. Chim. Farm.*, vol. 130, p. 1-5.
- Saffran, M., Kumar, G.S., Savariar, C., Burnham, J.C., Williams, F., Neckers, D.C., 1986. «A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs». *Science*, vol. 233, p. 1081–1084.
- Salyers A.A., West S.E., Vercellotti J.R. et Wilkins T.D., 1977. «Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon». *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 34, p. 529–533.

Sandborn W.J. et Hanauer S.B., 2003. «Systematic review: the pharmacokinetic profiles of oral mesalazine formulations and mesalazine pro-drugs used in the management of ulcerative colitis». *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 17, p. 29-42.

Sandborn W.J., 2008. «Oral 5-ASA therapy in ulcerative colitis: what are the implications of the new formulations»? *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 42, p. 338-344.

Sandri G., Bonferoni M.C., Chetoni P., Rossi S., Ferrari F., Ronchi C., Caramella C., 2006. «Ophthalmic delivery systems based on drug-polymer-polymer ionic ternary interaction: in vitro and in vivo characterization». *Eur. J. Pharm. Biopharm.* vol. 62, p. 59-69.

Scaldaferri F. et Fiocchi C., 2007. «Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis». *J. Dig. Dis.*, vol. 8, p. 171-178.

Schirbel A. et Fiocchi C., 2010. «Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy». *J. Dig. Dis.*, vol. 11, p. 266-276.

Sharon P., Ligumsky M., Rachmilewitz D., Zor U., 1978. «Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine». *Gastroenterology*, vol. 75, p. 638-640.

Shirwaikar A., Shirwaikar A., Prabu S.L., Kumar G.A., 2008. «Herbal excipients in novel drug delivery systems». *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 70, p. 415-422.

Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.J., 2005. *Spectrometric identification of organic compounds*, 7th edition, 82-110. John Willey & Sons.

Sinha V.R. et Kumria R., 2001. «Polysaccharides in colon-specific drug delivery». *Int. J. Pharm.*, vol. 224, p. 19-38.

Stenson W.F., 1990. «Role of eicosanoids as mediators of inflammation in inflammatory bowel disease». *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 172, p. 13-18.

Svartz N., 1988. «Sulfasalazine: II. Some notes on the discovery and development of salazopyrin». *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 83, p. 497-503.

Taffet S.L. et Das K.M., 1983. «Review Article: Sulfasalazine Adverse effects and desensitization». *Dig. Dis. Sci.*, Vol. 289, p. 833-842.

Takaya T., Ikeda C., Imagawa N., Niwa K., Takada K., 1995. «Development of a colon delivery capsule and the pharmacological activity of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CFS) in beagle dogs». *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 47, p. 474–478.

Takaya T., Niwa K., Muraoka M., Ogita I., Nagai N., Yano R., Kimura G., Yoshikawa Y., Yoshikawa H., Takada K., 1998. «Importance of dissolution process on systemic availability of drugs delivered by colon delivery system». *J. Control. Release*, vol. 50, p. 111–122.

Tamai H., Kachur J.F., Grisham M.B., Gaginella T.S., 1991. «Scavenging effect of 5-aminosalicylic acid on neutrophil-derived oxidants. Possible contribution to the mechanism of action in inflammatory bowel disease». *Biochem. Pharmacol.*, vol. 41, p. 1001–1006.

Tester R.F., Karkalas J et Qi X., 2004. «Starch—composition, fine structure and architecture». *J. Cereal. Sci.*, vol. 39, p. 151–165.

Truelove S.C., Hambling M.H., 1958. «Treatment of ulcerative colitis with local hydrocortisone hemisuccinate sodium; a report on a controlled therapeutic trial». *Br. Med. J.*, vol. 14, p. 1072–1077.

Tuleu C., Adrieux C., Cherbuy C., Darcy-Vrillon B., Duee P. H. et Chaumeil J. C. 2001. «Colonic delivery of sodium butyrate via oral route: acrylic coating design of pellets and in vivo evaluation in rats». *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, vol. 23, p. 245–253.

Vandamme Th.F., Lenourry A., Charrueau C., Chaumeil J.C., 2002. «The use of polysaccharides to target drugs to the colon». *Carbohydr. Polym.*, vol. 48, p. 219–231.

Van Nieuwenhuyzen W. and Tomás M.C., 2008. «Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies». *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 110, p. 472–486.

Wadworth A.N., Fitton A., 1991. «Olsalazine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in inflammatory bowel disease». *Drugs*, vol. 41, p. 647–664.

Walstra P., 1993. «Principles of emulsion formation». *Chem. Eng. Sci.*, vol. 48, p. 333–350.

Wang L., Khor E., Lim L-Y., 2001. «Chitosan–alginate–CaCl₂ system for membrane coat application». *J. Pharm. Sci.*, vol. 90, p. 1134–1142.

Wang Y.J., Assaad E., Ispas-Szabo P., Mateescu M.A., Zhu X.X., 2011. «NMR imaging of chitosan and carboxymethyl starch tablets: swelling and hydration of the polyelectrolyte complex». *Int. J. Pharm.*, vol. 419, p. 215-221.

Wendel A. «Lecithin». In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, éd. 2000.

Winter, W.T., Sarko, A., 1974. Crystal and molecular structure of V-anhydrous amylose. *Biopolymers*, vol. 13, p. 1447-1460.

Zeisel S.H., 2000. «Choline: needed for normal development of memory». *J. Am. Coll. Nutr.*, vol. 19, p. 528-531.

Zerrouk N., Ginès Dorado J.M., Arnaud P., Chemtob C., 1998. «Physical characteristics of inclusion compounds of 5-ASA in α and β cyclodextrins». *Int. J. Pharm.*, vol. 171, p. 19-29.

Zoldakova A., Srokova I., Sasinkova V., Hirsch J., Ebringerova A., 2005. «Biosurfactants based on partially esterified O-(carboxymethyl)starch». *Chemical Papers*, vol. 59, p. 362-367.

US Pharmacopeia-National Formulary, 2010. United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD