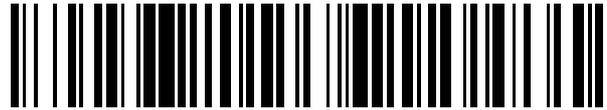


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 756**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/46** (2006.01)

**C12Q 1/34** (2006.01)

**G01N 33/15** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2012 E 12768900 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2741766**

54 Título: **Método para la prueba de disolución de composiciones sólidas que contienen enzimas digestivas**

30 Prioridad:

**08.08.2011 US 201161521227 P**

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

**08.02.2016**

73 Titular/es:

**APTALIS PHARMA LIMITED (100.0%)  
The Yard House, Killruddery Estate, Southern  
Cross Road  
Bray, County Wicklow, IE**

72 Inventor/es:

**LATINO, MASSIMO;  
GHIDORSI, LUIGI y  
ORTENZI, GIOVANNI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 558 756 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método para la prueba de disolución de composiciones sólidas que contienen enzimas digestivas

## 5 Campo de la invención

La invención se dirige a un proceso para medir la cantidad de enzimas digestivas liberadas de una composición sólida de pancrelipasa en un medio de disolución mediante espectroscopía de fluorescencia. La invención también se dirige a un método combinado para medir la disolución y la gastro-resistencia de una composición sólida que comprende pancrelipasa.

## Antecedentes de la invención

Una composición farmacéutica sólida o forma de dosificación, tal como un comprimido o cápsula, se compone generalmente de una mezcla de ingredientes activos y excipientes. La reproductibilidad de la adsorción de un ingrediente activo (fármaco) de una forma de composición sólida después de la administración oral depende de varios factores tales como la liberación del fármaco de la composición y la disolución o solubilización del fármaco en condiciones fisiológicas. Debido a la naturaleza crítica de la liberación del fármaco de la composición y la disolución o solubilización del fármaco, una prueba de disolución es altamente relevante para la predicción del rendimiento in vivo de un fármaco. Autoridades que aprueban fármacos tales como la FDA y EMA a menudo exigen que las compañías farmacéuticas determinen las características de liberación de fármaco de cualquier composición farmacéutica nueva para otorgar su aprobación. Estas pruebas también pueden ser requeridas como un parámetro de calidad de la USP, para evaluar la calidad de lote a lote de una composición farmacéutica, para aceptar productos, exonerando requisitos de bioequivalencia o apoyando solicitudes para otros requisitos de bioequivalencia que no sean los recomendados.

Varios protocolos se han desarrollado para llevar a cabo las pruebas de disolución in vitro y se aplican de manera rutinaria para el desarrollo del producto y control de calidad. La prueba de disolución de fármacos se lleva a cabo principalmente utilizando métodos y aparatos de compendios recomendados, tales como la Farmacopea de los Estados Unidos y la Farmacopea Europea por ejemplo USP 34 <711> y EP 7.2, 2.9.3. Los medios de disolución típicamente utilizados en dichas pruebas son por ejemplo agua y soluciones amortiguadoras tales como soluciones amortiguadoras de fosfato o soluciones amortiguadoras de citrato. Diferentes tipos de aparatos de disolución, en base a diferentes métodos de agitación están disponibles comercialmente y son reconocidos por los métodos de compendios. Estos aparatos incluyen: paleta, canasto, flujo y cilindro alternativo. Si bien los procedimientos exactos (protocolos) y aparatos varían, todos los métodos de prueba de disolución de fármacos implican colocar la composición farmacéutica o forma de dosificación en un medio de disolución y aplicar un poco de agitación al medio de disolución para promover la desintegración y disolución del fármaco a prueba.

El medio de disolución y el método de detección para determinar la cantidad del fármaco liberado en el medio de disolución dependen de (se eligen de acuerdo con) la naturaleza química del fármaco, y las consideraciones físicas y de estabilidad también son de gran importancia al realizar las elecciones apropiadas.

La prueba contenida en la cápsula de liberación retardada de pancrelipasa, la monografía de la USP para la determinación de la liberación de enzimas digestivas de formas de dosificación orales farmacéuticas, tales como cápsulas de liberación retardada de pancrelipasa, se basa en la medición específica de la actividad de lipasa. Dicho método requiere un prolongado tiempo de análisis y se ve afectado por varias desventajas. La principal desventaja es la inestabilidad de la lipasa marcadora en el medio de disolución, más precisamente en el medio de disolución amortiguador de etapa entérica (pH 6.0); necesita establecerse el alcance de la degradación de lipasa y se introduce entonces un factor de corrección en el cálculo de disolución para dar cuenta de la pérdida de la actividad de lipasa durante la prueba. Más aún, la complejidad del método (en la preparación del reactivo/sustratos y la determinación analítica) aumenta significativamente la variabilidad de los resultados y empeora la reproductibilidad de los resultados de intra/inter laboratorios. Más aun, el ensayo de lipasa tiene un rango de linealidad estrecho (8-16 unidades USP/mL): esto representa una limitación importante ya que el ensayo cubre sólo las potencias de la cápsula en el rango entre 6,400 y 12,800 UI USP/cápsula y, por lo tanto, no puede realizarse el abordaje de la evaluación de una sola unidad. El prolongado tiempo de análisis en el método actual limita la posibilidad de utilizarlo para determinar un perfil de disolución de multipuntos.

No existe método/procedimiento que describa cómo superar estas desventajas para determinar la liberación de enzimas digestivas de una composición sólida. El documento de Aloulou A. *et al.* (2008), *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 27, págs. 283-292, describe un método en el que se mide la densidad óptica a 280 nm.

Las enzimas digestivas, tales como pancrelipasa y otros productos de enzimas pancreáticas (PEP) pueden administrarse a pacientes que sufren de insuficiencia pancreática exócrina (IPE); la administración de complementos de la enzima digestiva permite a los pacientes digerir de forma más efectiva sus alimentos.

65

La insuficiencia pancreática exócrina (IPE), de la cual la FDA estima que hay más de 200,000 estadounidenses que la sufren, implica un trastorno fisiológico en donde los individuos son incapaces de digerir adecuadamente los alimentos debido a una falta de enzimas digestivas producidas por el páncreas. Esta pérdida de enzimas digestivas conduce a trastornos tales como mala digestión y mala absorción de nutrientes, lo que conduce a desnutrición y otras afecciones fisiológicas indeseables consiguientes asociadas con la misma. Estos trastornos son comunes para quienes sufren de fibrosis quística (FQ) y otras afecciones que comprometen la función exócrina del páncreas, tales como cáncer pancreático, pancreatocoma y pancreatitis. La desnutrición puede poner en riesgo la vida si no se trata, en particular, en el caso de bebés y pacientes con FQ, y el trastorno puede conducir a un crecimiento insuficiente, una respuesta inmune comprometida y una esperanza de vida más corta.

Las enzimas digestivas, como la pancrelipasa y otros productos de enzimas pancreáticas (PEP), pueden administrarse para paliar al menos parcialmente la IPE. Las enzimas digestivas administradas permiten a los pacientes digerir los alimentos más eficazmente.

Hace más de 60 años que se utilizan las enzimas pancreáticas en el tratamiento de la IPE para compensar la pérdida de la función digestiva. Hasta hace poco, su uso no estaba supeditado a las pautas reguladoras modernas que rigen la aprobación de fármacos en base a la seguridad, la eficacia y controles de fabricación. Recientemente, las terapias de reemplazo de enzimas pancreáticas han sido objeto de iniciativas de las autoridades reguladoras estadounidenses y europeas que exigen que los productos de enzimas pancreáticas comercializados se sometan a los actuales procesos de aprobación de fármacos para poder permanecer en el mercado. Zenpep®, Creon® y Pancreaze® son tres productos que se sometieron con éxito a los procesos establecidos por la FDA y fueron aprobados para su comercialización en los Estados Unidos. En otros territorios/países en los que se están desarrollando o aún no se han implementado iniciativas similares aún se encuentran disponibles varios productos a base de enzimas pancreáticas.

Se han desarrollado cápsulas que contienen enzimas digestivas tales como pancrelipasa para su administración oral. Sin embargo, si un paciente no puede tragar las cápsulas, cada cápsula puede abrirse y su contenido esparcirse sobre una pequeña cantidad de comida, a menudo una comida ácida blanda (tal como una salsa de manzana comercialmente disponible) y administrarse oralmente al paciente con una cuchara. Alternativamente, dichos medicamentos pueden administrarse oralmente a bebés y niños utilizando un dispositivo de jeringa con el contenido suspendido en un medio agradable para su administración de este modo.

Generalmente se indica que los productos de pancrelipasa contienen tres clases de enzimas, lipasa, amilasa y proteasa, y se enumeran los niveles o potencia de cada una. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de grasas en glicerol y ácidos grasos, almidón en dextrina y azúcares y proteínas en aminoácidos y sustancias derivadas. Sin embargo, la digestión es un proceso complejo que implica muchas otras enzimas y sustratos que contribuyen al correcto funcionamiento digestivo y la producción de la totalidad de los productos digestivos. Otras enzimas que se encuentran en la pancrelipasa incluyen tripsina, carboxipeptidasas, elastasas, fosfolipasas y colesterasas, entre otros muchos cofactores y coenzimas. Estas sustancias se producen naturalmente en el páncreas y también contribuyen a un correcto funcionamiento digestivo.

La pancrelipasa se prepara típicamente a partir de glándulas pancreáticas porcinas, aunque pueden utilizarse otras fuentes, como por ejemplo las descritas en los documentos de los Estados Unidos 6,051,220, 2004/0057944, 2001/0046493 y WO2006044529.

Las enzimas pancreáticas muestran actividad óptima en condiciones casi neutras y levemente alcalinas. En condiciones gástricas, las enzimas pancreáticas pueden inactivarse con la resultante pérdida de actividad biológica. Por lo tanto, las enzimas administradas exógenamente generalmente se protegen de la inactivación gástrica y permanecen intactas durante su tránsito por el estómago y hacia el duodeno. Por lo tanto, es deseable recubrir las enzimas pancreáticas. Las lipasas pancreáticas son las más sensibles a la inactivación gástrica y son enzimas clave en el tratamiento de la mala absorción. La actividad de las lipasas generalmente se monitorea para determinar la estabilidad de una composición enzimática que contiene lipasa. La totalidad del contenido del documento de los Estados Unidos 7,658,918 de Ortenzi et al. se incorpora expresamente a modo de referencia en su totalidad para todos los fines y describe composiciones de enzimas digestivas estables y explica que ciertos medicamentos particulados, administrados oralmente, están diseñados para pasar por el estómago del paciente y luego para liberarse en el intestino. La administración de una dosificación adecuada de dichos medicamentos particulados a los pacientes, en particular bebés y niños, debe ser lo más exacta posible.

Desafortunadamente, no se ha descrito ningún proceso para medir la cantidad de enzimas digestivas liberadas de una composición farmacéutica sólida o forma de dosificación con buena precisión y buena sensibilidad, y que esté pronta para implementarse en diferentes laboratorios.

Breve compendio de la invención

La invención se dirige a un proceso para medir la cantidad de enzimas digestivas liberadas de una composición sólida de pancrelipasa en un medio de disolución mediante espectroscopía de fluorescencia, según se describe en

las reivindicaciones. La invención también se dirige a un método combinado para medir la disolución y la gastro-resistencia de una composición sólida que comprende pancrelipasa, según se describe en las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

5 Figura 1. Perfil de disolución de perlas de pancrelipasa (minicomprimidos Zenpep®) - ensayo de proteasa (curva media).

10 Figura 2. Perfil de disolución de perlas de pancrelipasa (minicomprimidos Zenpep®) - ensayo de lipasa (curva media).

Figura 3. Perfil de disolución de perlas de pancrelipasa (minicomprimidos Zenpep®) - ensayo total de proteínas mediante espectroscopía de fluorescencia (curva media).

15 Figura 4a. Perfiles de disolución de perlas de pancrelipasa (minicomprimidos Zenpep®): mediciones específicas de enzima con respecto a la determinación fluorométrica del contenido total de proteínas.

20 Figura 4b. Perfiles de disolución de perlas de pancrelipasa (minicomprimidos Zenpep®): ensayo de lipasa con respecto a la determinación fluorométrica del contenido total de proteínas.

Figura 4c. Perfiles de disolución de perlas de pancrelipasa (minicomprimidos Zenpep®): ensayo de proteasa con respecto a la determinación fluorométrica del contenido total de proteínas.

25 Figura 5. Perfil de disolución de composiciones de pancrelipasa (Zenpep® y Creon®).

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se dirige a un proceso para medir la cantidad de enzimas digestivas liberadas de una composición sólida de pancrelipasa en un medio de disolución mediante espectroscopía de fluorescencia, según se describe en las reivindicaciones. La cantidad se mide como % de enzimas digestivas liberadas de la composición sólida o forma de dosificación o única forma unitaria.

35 En otra realización del proceso de la invención, la composición sólida es una composición de pancrelipasa con recubrimiento entérico que comprende excipientes farmacéuticamente inactivos.

En otra realización el proceso comprende las etapas de: (a) permitir que la composición de pancrelipasa sólida libere las enzimas digestivas en un medio de disolución, (b) leer la fluorescencia para medir la cantidad de enzimas digestivas en el medio.

40 En otra realización de la invención el medio de disolución es agua, solución de HCl, fluido gástrico simulado, solución amortiguadora, fluido intestinal simulado o solución acuosa o amortiguadora que contiene al menos un tensioactivo.

45 En otra realización el medio de disolución consiste en al menos dos medios que se aplican secuencialmente. Una prueba de disolución de dos etapas también puede llevarse a cabo con el presente proceso. La primera etapa es una etapa de ácido y el medio de disolución es un medio acuoso que tiene un pH ácido, tal como pH en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 4.5 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 o de aproximadamente 1.2. La segunda etapa se realiza en un segundo medio de disolución que es una solución amortiguadora acuosa que tiene un pH por encima de 5, o entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.8 o aproximadamente 6.

50 En el método de acuerdo con la invención la técnica utilizada para detectar las enzimas digestivas liberadas de una composición en un medio de disolución es espectroscopía de fluorescencia.

55 Las moléculas tienen varios estados denominados niveles de energía. La espectroscopía de fluorescencia está principalmente unida a estados electrónicos y vibracionales. Generalmente, la especie que se examina tiene un estado electrónico fundamental y un estado electrónico excitado de mayor energía. Dentro de cada uno de estos estados electrónicos hay varios estados vibracionales. En espectroscopía de fluorescencia la especie se excita primero, mediante la absorción de un fotón, de su estado electrónico fundamental a uno de los diversos estados vibracionales en el estado electrónico excitado. La molécula desciende entonces a uno de los diversos niveles vibracionales del estado electrónico fundamental nuevamente, emitiendo un fotón en el proceso. Dado que las moléculas pueden descender a cualquiera de varios niveles vibracionales en el estado fundamental, los fotones emitidos tendrán diferentes energías, y, por lo tanto, frecuencias. La respuesta de fluorescencia de una proteína es debido a la presencia de los aminoácidos que contienen un resto aromático (triptófano, tirosina o fenilalanina). La respuesta de fluorescencia de una proteína se obtiene generalmente con una longitud de onda de excitación de 280 nm. La mayoría de las emisiones de fluorescencia en las proteínas son debido a la excitación de residuos de triptófano, con una menor contribución de tirosina y fenilalanina.

El proceso fluorométrico divulgado en la presente se basa en la medición del contenido total de proteínas de enzimas digestivas (pancrelipasa, API) liberadas en un medio de disolución de una composición o forma de dosificación que comprende dichas enzimas. La frase "total de proteínas" utilizada en la presente identifica todas las proteínas liberadas por el producto de fármaco, es decir todas las proteínas presentes en la composición sólida de partida tales como lipasas, proteasas y amilasas. Para conseguir un valor directo del API liberado, el estándar preferiblemente utilizado en este método se prepara con la misma cantidad del producto de fármaco evaluado, pero triturándolo y vertiéndolo en el mismo medio de disolución para obtener el 100% de API disuelto. La disolución del lote evaluado se mide como porcentaje de fracción hacia la preparación estándar.

El proceso de la presente invención puede aplicarse a composiciones sólidas de pancrelipasa que pueden comprender excipientes farmacéuticamente inactivos, tales como cualquier forma de dosificación oral adecuada que contiene enzimas digestivas. Ejemplos no limitativos de formas de dosificación adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, sachets o unidades únicas. En una realización particular, la forma de dosificación es una cápsula. Cada forma de dosificación contiene perlas de enzimas digestivas (también denominadas unidades) de API (fármaco). Para la presente invención, las perlas de enzimas digestivas son cualquier tipo de particulado. El término "perla" incluye gránulo, partícula, comprimido, esfera, minicomprimido, microcomprimido, micropartícula, microesfera, minimicroesfera, microcápsula y microperla. La perla puede ser de cualquier tamaño o forma de partícula adecuada, particularmente con un tamaño en el rango de aproximadamente 50 a aproximadamente 5,000  $\mu\text{m}$ , más particularmente pueden tener un diámetro de partícula nominal (por ejemplo, medio) en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 mm, o menor que aproximadamente 2 mm, por ejemplo, aproximadamente 1-2 mm. La "minimicroesfera" que tiene el tamaño medio más pequeño de 1.15 mm o el "microcomprimido" que tiene el tamaño medio más grande de 2.63 mm también son adecuados para el presente proceso. Las partículas pueden tener un tamaño promedio menor que aproximadamente 800  $\mu\text{m}$ , preferiblemente menor que aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 600  $\mu\text{m}$  o de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ . Estas perlas pueden tener un diámetro de volumen  $d(v,0.1)$  (definido como el diámetro en donde 10% de la distribución del volumen está por debajo de este valor y 90% está por encima de este valor) no menor que 400  $\mu\text{m}$  y un diámetro de volumen  $d(v,0.9)$ , (definido como el diámetro en donde 90% de la distribución del volumen está por debajo de este valor y 10% está por encima de este valor) de no más de 900  $\mu\text{m}$ .

Todas las perlas de enzimas digestivas, más particularmente las perlas de enzimas de pancrelipasa, adecuadas para la preparación de productos farmacéuticos pueden recubrirse con un recubrimiento entérico. En realizaciones donde los núcleos de pancrelipasa son rodeados por un recubrimiento entérico, el recubrimiento actúa como una barrera protegiendo el fármaco del ambiente ácido del estómago y previniendo sustancialmente la liberación de la medicación antes de que alcance el intestino delgado. Pueden utilizarse combinaciones adecuadas de composiciones de recubrimiento entérico con otras composiciones de recubrimiento para proporcionar el tipo deseado de control sobre la liberación del fármaco o sobre los efectos terapéuticos. El recubrimiento entérico incluye al menos un polímero entérico y otros excipientes. La expresión "polímero entérico" significa un polímero que protege las enzimas digestivas del contenido gástrico, por ejemplo, un polímero que es estable con un pH ácido pero que puede desintegrarse rápidamente en un pH más alto, o un polímero cuya tasa de hidratación o erosión es lo suficientemente lenta como para asegurar que el contacto del contenido gástrico con las enzimas digestivas sea relativamente menor mientras están en el estómago y no en el resto del tracto gastrointestinal. Ejemplos no taxativos de polímeros gastro-resistentes son acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de polivinilacetato, copolímeros de ácido metacrílico, ésteres de metilmetacrilato y goma laca. Estos polímeros están comercialmente disponibles con diferentes marcas, tales como: Cellacafate<sup>®</sup> (acetato ftalato de celulosa), Eudragit<sup>®</sup> L100, S100, L30D, FS30D, L100-55 (copolímeros de ácido metacrílico), Aquateric<sup>®</sup> (acetato ftalato de celulosa), Aqoat<sup>®</sup> (acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa), HP55<sup>®</sup> (ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa). Preferiblemente el recubrimiento entérico comprende: 10-20%p de al menos un polímero entérico; en donde cada %p se basa en el peso total de las partículas recubiertas. El recubrimiento puede comprender además un agente lipofílico, tal como una molécula de bajo peso molecular lipofílica C6-C30 seleccionada de los ácidos y alcoholes carboxílicos alifáticos, preferiblemente un ácido o alcohol carboxílico C14-C18, tal como ácido esteárico, ácido mirístico, alcohol mirístico o alcohol estearílico. Otros ingredientes opcionales del recubrimiento son plastificantes, agentes antiadherentes (tales como talco, estearato de magnesio, dióxido de silicio coloidal y combinaciones de los mismos; opcionalmente además una etilcelulosa de viscosidad baja). Ejemplos no taxativos de plastificantes adecuados incluyen triacetina, citrato de tributilo, citrato de trietilo, citrato de acetil tri-n-butilo, ftalato de dietilo, sebacato de dibutilo, polietilenglicol, polipropilenglicol, aceite de ricino, mono y diglicéridos acetilados, alcohol cetílico, alcohol mirístico y mezclas de los mismos. El plastificante preferido es un plastificante que no es ftalato o mezclas de los mismos.

Las partículas de enzimas digestivas estabilizadas recubiertas pueden entonces formularse en cápsulas. Una forma de dosificación particular de partículas de enzimas digestivas estabilizadas es una cápsula rellena con perlas de enzimas de pancrelipasa con recubrimiento entérico. Las cápsulas que contienen las enzimas con recubrimiento entérico que comprenden hidroxipropilmetilcelulosa que tienen un contenido de agua de aproximadamente 6%p o menos son una realización particular para una dosificación; más particularmente, tienen un contenido de agua de

aproximadamente 4 %p o menos; más particularmente tienen un contenido de agua de aproximadamente 2 %p o menos.

La expresión "enzima digestiva" utilizada en la presente denota una enzima en el tubo digestivo que degrada los componentes de los alimentos para que puedan ser tomados o absorbidos por el organismo. Ejemplos no taxativos de enzimas digestivas incluyen pancrelipasa (también denominada pancreatina), lipasa, co-lipasa, tripsina, quimotripsina, quimotripsina B, pancreatopeptidasa, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, glicerol éster hidrolasa, fosfolipasa, esteroil éster hidrolasa, elastasa, quininogenasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa,  $\alpha$ -amilasa, papaína, quimopapaína, glutenasa, bromelaína, ficina,  $\beta$ -amilasa, celulasa,  $\beta$ -galactosidasa, isomaltasa y mezclas de los mismos. Las mismas se obtienen mediante la extracción de páncreas o secreciones pancreáticas producidas artificialmente u obtenidas de fuentes distintas del páncreas, tales como microorganismos, bacterias, moho, hongos, plantas u otros tejidos animales, microorganismos, hongos o plantas genéticamente modificados.

Las expresiones "pancrelipasa" o "enzimas de pancrelipasa" o "pancreatina" denotan una mezcla de varios tipos de enzimas, incluidas las enzimas amilasa, lipasa y proteasa o mezcla de las mismas de origen pancreático. La pancrelipasa se encuentra disponible en el mercado, por ejemplo comercializada por Nordmark Arzneimittel GmbH, Scientific Protein Laboratories LLC o Sigma Aldrich; y pueden utilizarse extractos similares de fuentes porcinas, bovinas o de otros mamíferos. Ejemplos de formulaciones de pancrelipasa comercial incluyen Zenpep, Viokace, Ultrase, Creon, Pancreaze y Panzytrat; más particularmente, la cápsula Zenpep para administración oral contiene perlas con recubrimiento entérico (1.8-1.9 mm para 750, 3,000, 5,000 unidades USP de lipasa, 2.2-2.5 mm para 10,000, 15,000, 20,000, 25,000 y 40,000 unidades USP de lipasa).

El término "lipasa" denota una enzima que cataliza la hidrólisis de lípidos en glicerol y ácidos grasos simples. Ejemplos de lipasas adecuadas para la presente invención incluyen, a modo no taxativo, lipasa animal (por ejemplo, lipasa porcina), lipasa bacteriana (por ejemplo, lipasa de *Pseudomonas* y/o lipasa de *Burkholderia*), lipasa fúngica, lipasa vegetal, lipasa recombinante (por ejemplo, producida vía tecnología de ADN recombinante por parte de una célula huésped adecuada, seleccionada de cualquiera de microorganismos, bacterias, levadura, hongos, plantas, insectos o células huésped de mamíferos en cultivo, o lipasas recombinantes que incluyen una secuencia de aminoácidos que es homóloga o básicamente idéntica a una secuencia natural, lipasas codificadas por un ácido nucleico que es homólogo o básicamente idéntico a un ácido nucleico que codifica lipasas natural, etc.), lipasa sintética, lipasa químicamente modificada y mezclas de las mismas. El término "lípidos" incluye, en líneas generales, moléculas naturales tales como grasas, ceras, esteroides, vitaminas solubles en grasa (tales como las vitaminas A, D, E y K), monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, fosfolípidos, etc.

El término "amilasa" se refiere a enzimas glicósido hidrolasas que degradan almidón, por ejemplo  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas,  $\gamma$ -amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas ácidas, amilasas salivales tales como ptilina, etc. Amilasas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, a modo no taxativo, amilasas animales, amilasas bacterianas, amilasas fúngicas (por ejemplo, amilasa de *Aspergillus*, amilasa de *Aspergillus oryzae*), amilasa vegetal, amilasa recombinante (por ejemplo, producida vía tecnología de ADN recombinante por parte de una célula huésped adecuada, seleccionada de cualquiera de microorganismos, bacterias, levadura, hongos, plantas, insectos o células huésped de mamíferos en cultivo, o amilasas recombinantes que incluyen una secuencia de aminoácidos que es homóloga o básicamente idéntica a una secuencia natural, amilasas codificadas por un ácido nucleico que es homólogo o básicamente idéntico a un ácido nucleico que codifica amilasa natural, etc.), amilasas químicamente modificadas y mezclas de las mismas.

El término "proteasa" se refiere, en general a enzimas (por ejemplo, proteinasas, peptidasas o proteolíticas) que rompen los enlaces peptídicos entre aminoácidos de proteínas. Las proteasas generalmente se identifican por su tipo catalítico, por ejemplo, peptidasas de ácido aspártico, peptidasas de cisteína (tiol), metalopeptidasas, peptidasas de serina, peptidasas de treonina, proteasas alcalinas o semi-alcalinas, neutras y peptidasas de mecanismo catalítico desconocido. Ejemplos no taxativos de proteasas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen proteasas de serina, proteasas de treonina, proteasas de cisteína, proteasas de ácido aspártico (por ejemplo, plasmepsina), metaloproteasas y proteasas de ácido glutámico. Además, proteasas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, a modo no taxativo, proteasas animales, proteasas bacterianas, proteasas fúngicas (por ejemplo, una proteasa de *Aspergillus melleus*), proteasas vegetales, proteasas recombinantes (por ejemplo, producidas vía tecnología de ADN recombinante por parte de una célula huésped adecuada, seleccionada de cualquiera de bacterias, levadura, hongos, plantas, insectos o células huésped de mamíferos en cultivo, o proteasas recombinantes que incluyen una secuencia de aminoácidos que es homóloga o básicamente idéntica a una secuencia natural, proteasas codificadas por un ácido nucleico que es homólogo o básicamente idéntico a un ácido nucleico que codifica proteasas natural, etc.), proteasas químicamente modificadas y mezclas de las mismas.

Las enzimas de pancrelipasa de las composiciones o formas de dosificación oral analizadas en la presente invención pueden incluir una o más lipasas (es decir, una lipasa o dos o más lipasas), una o más amilasas (es decir, una amilasa o dos o más amilasas), una o más proteasas (es decir, una proteasa o dos o más proteasas), así como mezclas de estas enzimas en diferentes combinaciones y relaciones.

Las actividades de las lipasas en las composiciones o formas de dosificación a analizar por el proceso de la presente invención pueden ser de aproximadamente 650 a aproximadamente 45,000 UI (método de la USP), de aproximadamente 675 a aproximadamente 825 UI, de aproximadamente 2,700 a aproximadamente 3,300 UI, de aproximadamente 4,500 a aproximadamente 5,500 UI, de aproximadamente 9,000 a aproximadamente 11,000 UI, de aproximadamente 13,500 a aproximadamente 16,500 UI, de aproximadamente 18,000 a aproximadamente 22,000 UI, de aproximadamente 22,500 a aproximadamente 27,500 UI, de aproximadamente 36,000 a aproximadamente 44,000 UI y todos los rangos y subrangos entre ellas. Las actividades de las lipasas pueden ser de aproximadamente 750, aproximadamente 3,000, aproximadamente 4,200, aproximadamente 5,000, aproximadamente 6,000, aproximadamente 10,000, aproximadamente 10,500, aproximadamente 15,000, aproximadamente 16,800, aproximadamente 20,000, aproximadamente 21,000, aproximadamente 24,000 o aproximadamente 25,000 o aproximadamente 40,000 UI (método de la USP) o múltiplo de las mismas. Las actividades de las amilasas en las composiciones o formas de dosificación pueden ser de aproximadamente 1,600 a aproximadamente 6,575 UI (método de la USP), de aproximadamente 6,000 a aproximadamente 225,000 UI, por ejemplo, de aproximadamente 6,400 a aproximadamente 26,300 UI, de aproximadamente 10,700 a aproximadamente 43,800 UI, de aproximadamente 21,500 a aproximadamente 87,500 UI, de aproximadamente 32,100 a aproximadamente 131,300 UI, de aproximadamente 42,900 a aproximadamente 175,000 UI, de aproximadamente 53,600 a aproximadamente 218,700 UI y todos los rangos y subrangos entre ellas. Las actividades de las proteasas en las composiciones o formas de dosificación pueden ser de aproximadamente 1,250 a aproximadamente 3,850 UI (método de la USP), de aproximadamente 5,000 a aproximadamente 130,000 UI, por ejemplo de aproximadamente 5,000 a aproximadamente 15,400 UI, de aproximadamente 8,400 a aproximadamente 25,700 UI, de aproximadamente 16,800 a aproximadamente 51,300 UI, de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 77,000 UI, de aproximadamente 33,500 a aproximadamente 102,600 UI, de aproximadamente 41,800 UI a aproximadamente 128,300 UI y todos los rangos y subrangos entre ellas. Las composiciones de enzimas combinadas incluyen lo siguiente: (A) la actividad de la lipasa puede estar en el rango de aproximadamente 675 a aproximadamente 825 UI, la actividad de la amilasa de aproximadamente 1,600 a aproximadamente 6,575 UI, y la actividad de la proteasa de aproximadamente 1,250 a aproximadamente 3,850 UI (método de la USP); (B) la actividad de la lipasa puede estar en el rango de aproximadamente 2,700 a aproximadamente 3,300 UI, la actividad de la amilasa de aproximadamente 6,400 a aproximadamente 26,300 UI y la actividad de la proteasa de aproximadamente 5,000 a aproximadamente 15,400 UI (método de la USP); (C) la actividad de la lipasa puede estar en el rango de aproximadamente 4,500 a aproximadamente 5,500 UI, la actividad de la amilasa de aproximadamente 10,700 a aproximadamente 43,800 UI y la actividad de la proteasa de aproximadamente 8,400 a aproximadamente 25,700 UI (método de la USP); (D) la actividad de la lipasa puede estar en el rango de aproximadamente 9,000 a aproximadamente 11,000 UI, la actividad de la amilasa de aproximadamente 21,500 a aproximadamente 87,500 UI y la actividad de la proteasa de aproximadamente 16,800 a aproximadamente 51,300 UI (método de la USP); (E) la actividad de la lipasa de aproximadamente 13,500 a aproximadamente 16,500 UI, la actividad de la amilasa de aproximadamente 32,100 a aproximadamente 131,300 UI y la actividad de la proteasa de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 77,000 UI (USP); (F) la actividad de la lipasa puede estar en el rango de aproximadamente 18,000 a aproximadamente 22,000 UI, la actividad de la amilasa de aproximadamente 42,900 a aproximadamente 175,000 UI y la actividad de la proteasa de aproximadamente 33,500 a aproximadamente 102,600 UI (USP); y (G) la actividad de la lipasa puede estar en el rango de aproximadamente 22,500 a aproximadamente 27,500 UI, la actividad de la amilasa de aproximadamente 53,600 a aproximadamente 218,700 UI y la actividad de la proteasa de aproximadamente 41,800 UI a aproximadamente 128,300 UI (USP). También la actividad de la lipasa en las composiciones o formas de dosificación a analizar por el proceso de la invención pueden estar en el rango de aproximadamente 5,000 unidades PhEur de lipasa a aproximadamente 40,000 unidades PhEur de lipasa, puede ser aproximadamente 5,000 o aproximadamente 10,000 o aproximadamente 15,000 o aproximadamente 20,000 o aproximadamente 30,000 o aproximadamente 40,000 unidades PhEur de lipasa.

En otra realización de la presente invención también pueden analizarse con el presente procedimiento unidades únicas que contienen una fracción de las actividades de las amilasas enumeradas anteriormente.

En otra realización de la presente invención también pueden analizarse con el presente proceso unidades únicas que contienen una fracción de las actividades de las amilasas enumeradas anteriormente.

La relación entre las actividades de amilasas/lipasas en las composiciones o formas de dosificación puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, tal como de aproximadamente 2,38 a aproximadamente 8,75 (el ensayo enzimático se lleva a cabo de acuerdo con la USP). Esta relación puede estar en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 8, tal como de aproximadamente 1.86 a aproximadamente 5.13 (el ensayo enzimático se lleva a cabo de acuerdo con la USP), o la relación puede ser aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10.

Los ingredientes inactivos del producto incluyen croscarmelosa sódica, aceite de ricino hidrogenado, dióxido de silicio coloidal, celulosa microcristalina, estearato de magnesio, ftalato de hipromelosa, talco y citrato de trietilo. Cada dosis de las preparaciones de Aptalis Pharma brinda a los pacientes y a los médicos una cantidad constante de las principales enzimas pancreáticas, es decir, lipasa, proteasa y amilasa, debido a su formulación altamente estable. Las cápsulas pueden abrirse y su contenido esparcirse para titular individualmente la dosis.

En otra realización de la invención, el proceso comprende las etapas de: (a) permitir que la composición de pancrelipasa sólida libere las enzimas digestivas en un medio de disolución, (b) leer la fluorescencia para detectar las enzimas y medir la cantidad de enzimas digestivas en el medio. La prueba de disolución se lleva a cabo utilizando los equipos de disolución descritos en el método de los compendios USP o EMA o utilizando todos los requerimientos y protocolos que son conocidos y aplicados por los expertos en la técnica. El medio de disolución se elige de entre diferentes soluciones adecuadas para la prueba de la disolución total de proteínas tales como agua, soluciones de HCl, fluidos gástricos simulados, soluciones amortiguadoras, fluidos intestinales simulados, soluciones acuosas o amortiguadoras que contienen tensioactivos. Las soluciones amortiguadoras pueden ser, por ejemplo, soluciones amortiguadoras de fosfato o soluciones amortiguadoras de citrato.

En una realización particular, el medio de disolución consiste en al menos dos medios de disolución que se utilizan secuencialmente (dos etapas). El primer medio de disolución es un medio acuoso que tiene un pH ácido entre aproximadamente 1 y 4.5, particularmente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2, más particularmente un pH de aproximadamente 1.2 (etapa ácida) y el segundo medio de disolución es una solución acuosa que tiene un pH por encima de aproximadamente 5.0, particularmente entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.8, más particularmente un pH de aproximadamente 6 (etapa entérica de solución amortiguadora).

En otra realización de la invención el primer medio de disolución es un medio acuoso que tiene un pH entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4.5 y el segundo medio de disolución es una solución amortiguadora acuosa que tiene un pH por encima de aproximadamente 5.

En otra realización el primer medio de disolución es un medio acuoso que tiene un pH entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4.5 y el segundo medio de disolución es una solución amortiguadora acuosa que tiene un pH entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.8.

En otra realización de la invención el primer medio de disolución es un medio acuoso que tiene un pH entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 y el segundo medio de disolución es una solución amortiguadora acuosa que tiene un pH por encima de aproximadamente 5.

En otra realización de la invención el primer medio de disolución es un medio acuoso que tiene un pH entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 y el segundo medio de disolución es una solución amortiguadora acuosa que tiene un pH entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.8.

En otra realización de la invención el primer medio de disolución es un medio acuoso que tiene un pH de aproximadamente 1.2 y el segundo medio de disolución es una solución amortiguadora acuosa que tiene un pH de aproximadamente 6.

En una realización adicional el proceso comprende las etapas de a) agregar la composición de pancrelipasa sólida en el primer medio de disolución (etapa ácida), b) transferir la suspensión al segundo medio de disolución (etapa entérica), c) permitir la liberación de las enzimas digestivas, d) tomar muestras de alícuotas del medio de disolución, e) leer la fluorescencia a 346 nm, f) calcular la cantidad de enzimas digestivas liberadas. El cálculo se realiza como se informó en los Ejemplos.

Cuando se aplican las pruebas de disolución a un producto de fármaco, la USP requiere el cálculo de valores "Q". Estos valores Q se correlacionan con las potencias etiquetadas y los criterios de aceptación actuales se fijan como 75% de la actividad etiquetada lipasa.

El proceso fluorométrico de la presente invención, aunque no es específico para la medición de actividad enzimática, muestra una completa correlación con perfiles de disolución enzimáticos, demostrando así que la liberación total de proteínas se correlaciona estrictamente con la liberación de enzimas. Por lo tanto el valor "Q" puede calcularse para el presente método de la siguiente forma: valor "Q" en el método de disolución con medición fluorométrica:

$$Q = \frac{\% \text{ de disolución} \times \text{ensayo de lipasa en lote (USP-U/cps)}}{\text{Actividad de la lipasa etiquetada (UPS-U/cps)}}$$

dónde: el % de disolución es el % de API liberado, calculado como se indicó en el procedimiento analítico; ensayo de lipasa de lote es la actividad de lipasa de lote; actividad de la lipasa etiquetada: actividad de la lipasa indicada en la etiqueta del producto de fármaco.

Si bien el método fluorométrico divulgado en la presente mostró una completa correlación con la medición de la actividad enzimática mientras se llevaba a cabo la prueba de disolución de etapa entérica de solución amortiguadora de composiciones de pancrelipasa y se propone entonces como método sustituir la prueba enzimática de actividad de la lipasa, este método no puede detectar ningún problema con la gastro-resistencia que ocurre durante la disolución en la etapa ácida, ya que la medición fluorométrica total de proteínas no se ve afectada por la penetración ácida a través de la membrana ya que es un ensayo de lipasa. La actividad de la lipasa disminuye fuertemente

cuando penetra jugo ácido a través de la membrana protectora. La prueba USP actual (medición de actividad de la lipasa) acumula al final de la disolución en la etapa entérica de solución amortiguadora los efectos de gastro-resistencia débil potencial en la etapa ácida con disolución de lipasa y fenómenos de degradación que ocurren en la etapa entérica de solución amortiguadora.

Por lo tanto, otra realización de la presente invención es un proceso para medir la cantidad (%) de enzimas digestivas liberadas de una composición de pancrelipasa sólida en un medio de disolución mediante espectroscopía de fluorescencia combinada con una prueba de gastro-resistencia, en donde la gastro-resistencia se mide mediante la determinación de la actividad de la lipasa residual del producto por el método de ensayo de lipasa específica, después de la exposición al medio ácido (etapa ácida). En esta realización las dos pruebas (prueba FL de disolución y prueba GR gastro-resistente) pueden llevarse a cabo en cada orden.

Prueba FL: la prueba de disolución realizada en dos etapas (ácida y entérica). En la primera etapa ácida el medio de disolución es un medio acuoso que tiene un pH ácido de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4.5, preferiblemente un pH entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2, preferiblemente un pH de aproximadamente 1.2 (etapa ácida); en la segunda etapa entérica el medio de disolución es una solución amortiguadora acuosa que tiene un pH por encima de aproximadamente 5, preferiblemente un pH entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.8, preferiblemente un pH de aproximadamente 6 (etapa entérica de solución amortiguadora). La prueba de gastro-resistencia se realiza en un medio acuoso que tiene un pH ácido entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4.5, preferiblemente un pH entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2, preferiblemente un pH de aproximadamente 1.2. La prueba fluorométrica mide las enzimas digestivas (API o fármaco) liberadas al final de la etapa entérica; para los criterios de aceptación, el valor Q puede calcularse mediante la relación entre la actividad de la lipasa liberada en lote y la actividad de la lipasa etiquetada.

Prueba GR: la prueba de gastro-resistencia se realiza en las condiciones de la etapa ácida de la prueba de disolución (el medio de disolución es una solución acuosa que tiene un pH ácido entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4.5, particularmente un pH entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2, más particularmente un pH de aproximadamente 1.2, donde el % de gastro-resistencia se mide mediante la determinación de actividad de la lipasa residual del producto, después de la exposición al medio ácido; con el método de ensayo de lipasa, los criterios de aceptación serán aquellos indicados para la etapa ácida de formas de dosificación de liberación retardada en USP.

A partir de la descripción precedente y la parte experimental, puede verse que el presente proceso fluorométrico de análisis proporciona varias ventajas importantes.

La invención proporciona un procedimiento simple y rápido debido a que el tiempo requerido para la preparación de reactivos se reduce significativamente y no se requiere experiencia analítica específica en el ensayo de enzimas. Por lo tanto, la transferencia analítica es muy fácil. El método propuesto es más fácil y más rápido de realizar que el ensayo de lipasa y el tiempo requerido para la preparación de reactivos se reduce significativamente.

El marcador (total de proteínas) es estable en el medio de disolución y, por lo tanto, no se necesita ningún factor de corrección de compensación por degradación (requerido en el método de ensayo de lipasa) en el cálculo. De hecho, el marcador sometido a prueba en la medición fluorométrica (total de proteínas) muestra menos de 3% de degradación después de 30 min en el medio amortiguador de la etapa entérica pH 6, a 37°C; mientras que la actividad enzimática de la lipasa medida con el método actual muestra aproximadamente 11% de degradación en el medio amortiguador de la etapa entérica pH 6, a 37°C.

El nuevo método es también preciso y tiene buena sensibilidad de modo que el límite de cuantificación/rango de linealidad es adecuado para una prueba de una sola unidad. El método fluorométrico exhibe características de mejor desempeño que el ensayo enzimático de lipasa en términos de concentración de trabajo, que es 0.3 unidades USP de lipasa  $\approx$  3  $\mu$ g pancrelipasa/mL; que es aproximadamente 1/50 de la concentración de trabajo del ensayo de lipasa; el rango de linealidad es 10-200% de concentración de trabajo; la precisión es no mayor que 2,0% para la repetibilidad y precisión intermedia (como se midió en los resultados de la disolución de seis lotes diferentes de formulaciones de pancrelipasa, Zenpep®).

Más aun, con dicho proceso puede obtenerse un perfil de disolución de multipuntos (>3) de prueba. También se muestra en la parte experimental que el procedimiento de detección de contenido total de proteínas es equivalente, en términos de desempeño, a los dos ensayos específicos de enzimas en base a la actividad de la proteasa y la actividad de la lipasa (método de compendios actual), en base a la comparación de perfiles de disolución obtenidos utilizando los tres métodos de medición.

Debe comprenderse que tanto la descripción general precedente como la siguiente descripción detallada son ejemplares y no limitan la invención.

**Ejemplos**Equipos, materiales y métodos

- 5 Equipo: Espectrómetro de fluorescencia LS 50B (Perkin Elmer), Espectrómetro de fluorescencia LS 55 (Perkin Elmer), Espectrómetro Lambda 20 UV-VIS (Perkin Elmer), Sistema de titulación potenciométrica 786 Titrand (Metrohm), baño de disolución VK-7025 (Vankel), baño de disolución Premier 5100 (Distek), Aparato USP 1-canasto (para etapa ácida); Aparato USP 2-paleta (para etapa entérica).
- 10 Reactivos para la prueba de disolución. Medio de la etapa ácida (pH 1.2): Colocar 2.00 g del cloruro de sodio en 800 mL de agua purificada y agitar hasta completar la solubilización. Agregar 7 mL de 37% HCl y mezclar. Ajustar el pH de la solución a  $1.20 \pm 0.05$  con HCl 1 N o NaOH 1 N. Diluir hasta 1000 mL con agua purificada; verificar el pH y ajustar a  $1.20 \pm 0.05$  con HCl 1 N o NaOH 1 N si es necesario.
- 15 Reactivos para la prueba de disolución. Medio de etapa entérica (pH 6.0): Colocar 9.20 g de fosfato de potasio monobásico y 2.00 g de cloruro de sodio en 800 mL de agua purificada y revolver hasta completar la solubilización. Ajustar el pH de la solución a  $6.00 \pm 0.05$  con NaOH 1 N. Diluir hasta 1000 mL con agua purificada; verificar el pH y ajustar a  $6.00 \pm 0.05$  con HCl 1 N o NaOH 1 N si es necesario.
- 20 Todos los ejemplos se llevan a cabo utilizando perlas de pancrelipasa con recubrimiento entérico, ya sea minicomprimidos (MC) o microcomprimidos (MCC) de pancrelipasa, que son una mezcla de materia prima de pancrelipasa y excipientes (por ejemplo, croscarmelosa sódica, aceite de ricino hidrogenado, dióxido de silicio coloidal, celulosa microcristalina y estearato de magnesio) recubiertos con el polímero entérico ftalato de hipromelosa (HP55); estos MC y MCC se encuentran en cápsulas de HPMC y se comercializan con el nombre Zenpep®. El experto en la técnica reconocerá que pueden utilizarse polímeros entéricos y excipientes alternativos en las perlas de pancrelipasa recubiertas entéricamente.

La medición de la actividad lipolítica se lleva a cabo con un método en base al procedimiento de los compendios del ensayo de lipasa descrito en la monografía de la USP sobre pancrelipasa, que se basa en la titulación, mediante el método de pH-stat, de los ácidos grasos libres formados a partir de la hidrólisis de ácidos grasos esterificados en el sustrato utilizado (aceite de oliva). Se basa en el siguiente principio: la lipasa cataliza la hidrólisis de los triglicéridos que conduce a la formación de ácidos grasos libres (AGL). La titulación de los AGL formados de acuerdo con el tiempo permite la determinación de la actividad enzimática de la lipasa, que puede expresarse en unidades: 1 U = 1  $\mu$ mol de AGL formado por minuto. La reacción se produce manteniendo un pH constante a través de un sistema experimental que prevé la adición de NaOH (titulante) cuando el valor del pH cambia en comparación con un valor fijo (método pHstat). La cantidad de titulante agregado de acuerdo con el tiempo corresponde a la cantidad de AGL formado por la acción de la lipasa en los triglicéridos. Proporcionada para trabajar con una cantidad adecuada de sustrato y en condiciones experimentales en las que la enzima es estable, puede obtenerse una cinética lineal para la formación de AGL de acuerdo con el tiempo. La pendiente de la curva {titulante agregado = f (volumen (mL)/tiempo, (minutos))} proporciona la actividad enzimática de la lipasa.

La medición de la actividad proteolítica se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento de los compendios descrito en la monografía de pancrelipasa de la USP.

**Ejemplo 1.** Preparación de solución estándar del producto de fármaco

La solución estándar se prepara con el mismo lote de producto de fármaco presente en la forma de dosificación bajo análisis. Una cantidad de perlas de pancrelipasa (minicomprimidos o microcomprimidos Zenpep®) equivalente a 7,000 unidades USP de lipasa, se pesa de forma precisa, en un mortero. Agregar 5-6 mL de medio de la etapa entérica y triturar hasta que se obtiene una completa dispersión del producto. La suspensión se transfiere en un matraz volumétrico de 500 mL. El mortero se enjuaga 2-3 veces con pocos mL del medio de la etapa entérica y el líquido se transfiere en el matraz volumétrico de 500 mL. Se agrega el medio de la etapa entérica en el matraz volumétrico hasta el total final 500 mL y la mezcla se agita durante 10 minutos. Las alícuotas que se muestrean del medio de disolución se diluyen adicionalmente 1:50 con el medio de etapa entérica. Con esta dilución la concentración final de API es de aproximadamente 0.3 unidades USP de lipasa (aproximadamente 3  $\mu$ g de pancrelipasa/mL). Esta última dilución se lleva a cabo solamente en el punto final de la prueba de disolución y en multipuntos de la prueba de disolución (perfil de disolución).

**Ejemplo 2.** Prueba de disolución

Se agregan 800 mL del medio de la etapa ácida en cada recipiente del baño de disolución equipado con un aparato de canastos; el medio de disolución se equilibra a 37°C. Una cantidad de perlas de pancrelipasa (minicomprimidos o microcomprimidos Zenpep) equivalente a 11,200 unidades USP de lipasa (14 unidades USP de lipasa/mL) se pesa y seis muestras independientes se preparan de este modo y se colocan en los canastos. El aparato se opera a 100 rpm. Después de 1 hora, los canastos se retiran del medio, se enjuagan con unos pocos mililitros de agua y el contenido de cada canasto se transfiere en un recipiente correspondiente que contiene 800 mL del medio de la

etapa entérica a 37°C del baño de disolución equipado con un aparato de paletas. El aparato se opera a 100 rpm. Después de 30 minutos una alícuota del medio de disolución de cada recipiente se muestrea para medir API liberado. En la determinación del perfil de disolución, 2.5 mL de alícuotas del medio de disolución en la etapa entérica se muestrean a los 10, 12, 15, 18, 30 minutos; no se realiza ningún reemplazo del medio durante la prueba, la pérdida de volumen se toma en cuenta en el cálculo mediante los factores de corrección a continuación.

Tabla 1. Factores de corrección (FC) para el cálculo del perfil de disolución

Punto temporal (minutos)	Volumen de alícuotas (mL)	Volumen del medio (mL)	Factor de corrección
10	2.5	800.0	1.00000
12	2.5	797.5	0.99688
15	2.5	795.0	0.99375
18	2.5	792.5	0.99063
30	2.5	790.0	0.98750

**Ejemplo 3.** Determinación de las enzimas digestivas (API, ingrediente activo) liberadas en la prueba de disolución mediante espectroscopía de fluorescencia (ensayo total de proteínas)

Cada alícuota del medio de disolución muestreada de cada canasto según se describió en el Ejemplo 2 se diluye 1:50 con el medio de etapa entérica. Las soluciones diluidas se leen en el espectrómetro de fluorescencia con los siguientes parámetros operativos: cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud; longitud de onda de excitación: 280 nm; longitud de onda de emisión (medición): 346 nm, rendija de excitación: 6.0. La concentración objetivo del marcador (API = pancrelipasa; 100% liberado) en el punto final: 0.3 unidades USP de lipasa/mL o aproximadamente 3 µg de pancrelipasa/mL; se obtienen con el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{Unidades USP de lipasa en el recipiente}}{\text{Potencia de producto de fármaco (USP de lipasa U/mg)}} \times \frac{0.72 (\% \text{ de API en formulación DP})}{\text{Dilución (ml)}} \times 1000 (\mu\text{g/mg})$$

La cantidad de API liberado se determina contra una solución estándar preparada con el mismo lote del producto de fármaco como se describió en el Ejemplo 1.

Para el punto final de la prueba de disolución el cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de API liberado} = \frac{E_{\text{SMP}} \times W_{\text{STD}} \times V_{\text{SMP}}}{E_{\text{STD}} \times W_{\text{SMP}} \times V_{\text{STD}}} \times 100$$

Para los multipuntos de la prueba de disolución (perfil de disolución) el cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de API liberado} = \frac{E_{\text{SMP}} \times W_{\text{STD}} \times V_{\text{SMP}}}{E_{\text{STD}} \times W_{\text{SMP}} \times V_{\text{STD}}} \times 100 \times \text{FC}$$

en donde:  $E_{\text{SMP}}$  es lectura de fluorescencia (emisión a 346 nm) de la muestra, restado del blanco;  $E_{\text{STD}}$  es lectura de fluorescencia (emisión a 346 nm) del estándar, restado del blanco;  $W_{\text{SMP}}$  es el peso de la muestra (mg);  $W_{\text{STD}}$  es el peso estándar (mg);  $V_{\text{SMP}}$  es el volumen de dilución de la muestra (mL);  $V_{\text{STD}}$  es el volumen de dilución del estándar (mL); FC es el factor de corrección (ver Tabla 1).

$$\frac{\text{Unidades USP de lipasa en el recipiente}}{\text{Potencia de producto de fármaco (USP de lipasa U/mg)}} \times \frac{0.72 (\% \text{ de API en formulación DP})}{\text{Dilución (ml)}} \times 1000 (\mu\text{g/mg})$$

**Ejemplo 4.** Estudio de validación del ensayo total de proteínas mediante espectroscopía de fluorescencia

Las características de desempeño de la determinación fluorométrica del contenido total de proteínas en API liberado de la composición de pancrelipasa (formulación Zenpep®) en la prueba de disolución se evalúa mediante los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de cuantificación, estabilidad de la muestra y solución estándar, demostración de la extracción completa en la preparación de una solución estándar y los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Datos de validación del método fluorométrico

Parámetro	Descripción de la prueba	Resultado	Comentarios
Especificidad	Interferencia de los excipientes de la formulación: matriz excipiente vs lecturas API	1.6%	Tres muestras independientes por cada grupo, 100% de concentración objetivo. Los resultados se expresan como (lectura de excipientes /lectura de API) x 100
Linealidad	0.3 – 6.7 µg de pancrelipasa/mL (0.03 – 0.65 USP de lipasa U/mL)	Ecuación de regresión: $y = 5.52 + 68.75x$ $r^2 = 0.9992$	Seis niveles de concentración, dos muestras independientes cada nivel: 10-25-50-100-150-200% de la concentración objetivo (~3 µg API/mL).
Exactitud	0.3 – 6.6 µg de pancrelipasa/mL	Nivel de concentración % de recuperación 0.3 µg/mL 107.8 1.6 µg/mL 106.8 3.3 µg/mL 104.8 4.9 µg/mL 103.1 6.6 µg/mL 104.5	Cinco niveles de concentración, tres muestras independientes cada nivel: 10-50-100-150-200% de concentración objetivo (~3 µg API/mL)
Precisión: repetibilidad	Prueba de disolución se realiza en seis lotes de formulaciones de pancrelipasa, n=6 cada lote	CV en el rango de 1.1-2.0% para todos los lotes evaluados	
Precisión: Precisión intermedia	Prueba de disolución se realiza en seis lotes de formulaciones Zenpep®, n=6 cada lote; 2 pasadas cada lote	CV en el rango de 1.0-1.9% para todos los lotes evaluados	Sin diferencias estadísticas importantes en los datos de las dos pasadas (prueba t)
Límite de cuantificación	0.3 µg de pancrelipasa/mL; Precisión de las lecturas de seis solns independientes.	CV = 1.8%	Valor LOQ se determina mediante ecuación de regresión
Extracción completa en la preparación de la solución estándar	Determinación de la recuperación de STD preparado con un lote de cada formulación Zenpep®, tres muestras/lotés independientes	Recuperación de minicomprimidos STD: 99.3% Recuperación de microcomprimidos STD: 102.4%	La recuperación se determina contra la misma materia prima API que se encuentra en las formulaciones evaluadas
Estabilidad de la muestra en condiciones de prueba de disolución (= estabilidad del marcador)	Seis preparaciones independientes de muestra artificial (API + excipientes de formulación), en las condiciones de prueba de disolución (solución amortiguadora de etapa entérica, 37°C, 100 rpm).	Después de 30 minutos: -2.7% Después de 60 minutos: -4.5%	Comparación con respuesta inicial (tiempo 0 = después de 5 minutos desde el comienzo de la prueba de disolución)
Estabilidad de la muestra al final de la prueba de disolución, soluciones almacenadas a t.a.	Seis muestras independientes de ambas formulaciones Zenpep®, soluciones en solución amortiguadora de etapa entérica se retiran en el punto final de la prueba de disolución y se almacenan a t.a. antes de la dilución final 1:50	Después de 2 horas: SMP <sub>MINICOMPRIMIDOS</sub> = -0.9% SMP <sub>MICROCOMPRIMIDOS</sub> = -1.7% Después de 6 horas: SMP <sub>MINICOMPRIMIDOS</sub> = -1.7% SMP <sub>MICROCOMPRIMIDOS</sub> = -2.4%	Comparación con respuesta inicial (tiempo 0 = punto final de la prueba de disolución)
Estabilidad de la solución estándar	Soluciones estándar preparadas con ambas formulaciones Zenpep®; tres muestras independientes/formulación	Después de 2 horas: STD <sub>MINICOMPRIMIDOS</sub> = -0.9% STD <sub>MICROCOMPRIMIDOS</sub> = -1.0 % Después de 6 horas: STD <sub>MINICOMPRIMIDOS</sub> = -1.6% STD <sub>MICROCOMPRIMIDOS</sub> = -1.4%	Comparación con respuesta inicial (tiempo 0)

5 Con la validación de datos obtenida, se muestra aquí que el método fluorométrico propuesto para la determinación total de proteínas en la prueba de disolución de formas de dosificación de pancrelipasa (formulación Zenpep®) es adecuado para el uso pretendido.

**Ejemplo 5.** Perfil de disolución de las perlas de pancrelipasa (minicomprimidos Zenpep®) con tres métodos de medición: contenido total de proteínas mediante espectroscopía de fluorescencia (ensayo no específico), la actividad proteolítica mediante ensayo de proteasa (ensayo específico de enzimas) y la actividad lipolítica mediante ensayo de lipasa (ensayo específico de enzimas)

La prueba de disolución se realiza de acuerdo con el método descrito anteriormente (ver Ejemplo 2), mediante muestreo de 2.5 mL de alícuotas a los: 10, 12, 15, 18 y 30 min. No se realiza ningún reemplazo de medio durante la prueba. La comparación de los tres procesos se realiza de acuerdo con el abordaje SUPAC (Guía para la Industria "SUPAC MR: Formas de dosificación oral sólidas de liberación modificada. Cambios de ampliación y post aprobación: química, fabricación y controles, pruebas de disolución in vitro y documentación de bioequivalencia in vivo" Centro de evaluación e investigación de fármacos (CDER), Setiembre 1997) para la demostración de la similitud de los perfiles de disolución por medio de la prueba f2; para generar la cantidad requerida de datos para cada uno de los tres métodos de medición se analizan doce muestras independientes (muestra = cantidad de perlas de pancrelipasa, minicomprimidos Zenpep® equivalentes a 11,200 UI), en grupos de tres muestras por pasada, cuatro pasadas en total.

**Ejemplo 5.1** Perfil de disolución de las perlas de pancrelipasa (minicomprimidos de Zenpep®) mediante ensayo de proteasa

Los valores de disolución individuales y el promedio general en cada punto de tiempo evaluado se resumen en la Tabla 3; la curva media se muestra en la Figura 1

Tabla 3. Datos del perfil de disolución (ensayo de proteasa)

min	% de disolución (n = 12)												Media	DE	CV (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
10	0	5	7	2	6	5	3	1	3	4	2	3	3	2	66.7
12	3	10	13	14	18	13	6	10	9	14	10	14	11	4	36.4
15	32	36	54	56	46	49	37	41	37	49	40	49	44	8	18.2
18	61	69	70	83	79	79	71	74	78	85	71	77	75	7	9.3
30	100	95	100	106	106	105	107	101	108	105	103	101	103	4	3.9

**Ejemplo 5.2.** Perfil de disolución de las perlas de pancrelipasa (minicomprimidos de Zenpep®) mediante ensayo de lipasa

Los valores de disolución individuales y el promedio general en cada punto de tiempo evaluado se resumen en la Tabla 4; la curva media se muestra en la Figura 2. Se utiliza el factor de corrección de 1.125 en el cálculo para compensar la degradación de lipasa durante la prueba de disolución.

Tabla 4. Datos del perfil de disolución (ensayo de lipasa)

tiempo (min)	% de disolución (n = 12)												Media	DE	CV (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
10	9	5	5	6	6	6	3	6	6	2	3	0	5	2	40.0
12	23	14	15	12	14	11	12	14	15	9	14	9	13	4	30.8
15	55	36	46	38	44	33	41	43	52	41	44	40	42	6	14.3
18	81	70	75	61	73	61	77	78	81	72	75	72	73	7	9.6
30	102	99	101	90	96	96	92	96	101	98	98	98	97	4	4.1

**Ejemplo 5.3** Perfil de disolución de las perlas de pancrelipasa (minicomprimidos de Zenpep®) mediante determinación fluorométrica del contenido total de las proteínas

Los valores de disolución individuales y el promedio general en cada punto de tiempo evaluado se resumen en la Tabla 5; la curva media se muestra en la Figura 3.

Tabla 5. Datos del perfil de disolución (ensayo de proteínas totales mediante espectroscopía de fluorescencia)

tiempo (min)	% de disolución (n = 12)												Media	DE	CV
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
10	5	3	4	8	4	6	7	4	5	5	3	5	5	2	40.0%
12	12	10	11	14	11	16	19	15	15	16	9	12	13	3	23.1%
15	46	42	45	50	41	51	57	47	45	50	37	37	45	6	13.3%

18	74	69	71	77	74	80	80	74	72	77	67	65	74	5	6.8%
30	99	96	96	99	99	97	98	96	95	95	93	93	96	2	2.1%

**Ejemplo 5.4** Comparación de los perfiles de disolución obtenidos con los tres métodos de medición

Los datos de disolución promedio de las perlas de pancrelipasa (minicomprimidos de Zenpep®), medida en cada punto de tiempo con los tres métodos de ensayo se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Datos de disolución promedio de las perlas de pancrelipasa (minicomprimidos de Zenpep®) obtenidos con ensayo de lipasa, ensayo de proteasa y determinación fluorométrica de las proteínas totales

Prueba	% de disolución (promedio ± DE de n = 12 muestras independientes)				
	10 min	12 min	15 min	18 min	30 min
ensayo de proteasa	3±2 CV =67%	11±4 CV =36%	44±8 CV =18%	75±7 CV =9%	103±4 CV =4%
ensayo de lipasa	5±2 CV =40%	13±4 CV =31%	42±6 CV =14%	73±7 CV =10%	97±4 CV =4%
Ensayo de proteínas totales mediante espectroscopía de fluorescencia	5±2 CV =40%	13±3 CV =23%	45±6 CV =13%	74±5 CV =7%	96±2 CV =2%

Los tres perfiles de disolución muestran una superposición casi completa, tal como se ilustra en la comparación gráfica de las Figuras 4a-c; en particular, las curvas medias de ensayo de lipasa y ensayo fluorométrico pueden superponerse completamente, mientras que la curva media de proteasa sólo difiere en el punto final que muestra un valor > 100%. También los CV de cada serie de datos son bastante similares entre los tres métodos de medición, con los valores más bajos exhibidos por el ensayo fluorométrico.

El abordaje SUPAC utilizado para evaluar la equivalencia del rendimiento de un producto de fármaco después y antes de los cambios (pruebas de similitud f2 en los perfiles de disolución de los productos a comparar) se utiliza para mostrar la equivalencia del nuevo método propuesto para la determinación fluorométrica de las proteínas totales en la prueba de disolución de la formulación de Zenpep® con la que se utiliza actualmente (ensayo de lipasa) y con la otra medición específica de enzimas (ensayo de proteasa).

Para aplicar la prueba de similitud f2 en los perfiles de disolución, los lineamientos de la FDA (Guía para la Industria "SUPAC MR: Formas de dosificación oral sólidas de liberación modificada. Cambios de ampliación y post aprobación: química, fabricación y controles, pruebas de disolución in vitro y documentación de bioequivalencia in vivo" Centro de evaluación e investigación de fármacos (CDER), setiembre de 1997; Guía para la industria - pruebas de disolución de Formas de Dosificación Oral Sólida de Liberación Inmediata, Centro de evaluación e investigación de fármacos (CDER), agosto 1997) indican algunas condiciones que deben cumplirse:

- a. usar los valores de disolución media (n = 12) de ambas curvas en cada intervalo de tiempo,
- b. sólo una medición debería considerarse más allá del 85% del punto de disolución,
- c. la diferencia promedio en cualquier punto de tiempo de muestreo no debería ser mayor que 15% entre los perfiles de disolución,
- d. para permitir el uso de los datos medios, el coeficiente porcentual de variación en el punto de tiempo anterior no debería ser mayor que 20%, y en otros puntos de tiempo no debería ser mayor que 10%.

Los requisitos a, b y c se cumplen en los presentes datos de disolución; sin embargo, los valores de CV mayores que aquellos permitidos (d) se observaron en los tres primeros puntos de tiempo (10, 12, 15 min) para todos los métodos de medición evaluados. La alta variabilidad observada de estos puntos de tiempo puede explicarse con la concentración muy baja del analito en el primer tiempo de muestreo (10 min) y con la variabilidad intrínseca de la formulación en el rango más reducido de tiempo transcurrido para los demás puntos de tiempo a los 12 y 15 minutos, tomando en cuenta que se obtiene 100% de liberación de la formulación en tiempo muy corto (30 minutos) en las condiciones de prueba de disolución.

En base a la consideración anterior, la prueba f2 se aplica de cualquier modo, asumiendo que la variabilidad similar observada en los tres métodos de medición no alteró considerablemente las curvas promedio obtenidas, lo que muestra una superposición completa. Luego se realiza otra evaluación tomando en cuenta los últimos tres puntos de tiempo (15-18-30 min), para verificar si la prueba f2 pasaría incluso con los datos que cumplen completamente con los requisitos de SUPAC.

**Ejemplo 5.4.1.** Comparación: contenido de determinación fluorométrica con respecto al ensayo de lipasa

La prueba f2 para los perfiles de disolución de la determinación fluorométrica con respecto al ensayo de lipasa (referencia) mostraron una similitud de 87.4% entre las dos curvas cuando se consideran todos los puntos de tiempo, mientras que la similitud fue de 83.3% cuando se hace el cálculo en los últimos tres puntos de tiempo.

**Ejemplo 5.4.2.** Comparación: determinación fluorométrica del contenido total de proteínas con respecto al ensayo de proteasa

La prueba f2 para los perfiles de disolución de la determinación fluorométrica con respecto al ensayo de proteasa (referencia) mostró una similitud de 72.3% entre las dos curvas cuando se consideraron todos los puntos de tiempo, mientras que la similitud fue de 68.6% cuando se hizo el cálculo en los últimos tres puntos de tiempo. En general, los valores de f2 mayores que 50 (50-100) aseguran igualdad o equivalencia de las dos curvas y, de esta forma, del rendimiento de la prueba. De acuerdo con los resultados obtenidos en la comparación de los perfiles de disolución por medio de la prueba f2 es posible, por lo tanto, decir que la determinación fluorométrica del contenido total de proteínas es, en todo sentido, equivalente a los métodos específicos de enzimas en la medición de la liberación de API de las formulaciones de pancrelipasa (formulaciones de Zenpep®).

**Ejemplo 6.** Comparación de datos de validación

Para completar la comparación entre la nueva prueba fluorométrica y el ensayo enzimático de actividad de lipasa aceptado conocido (método USP), se incluye la Tabla 7.

Tabla 7 Comparación de los datos de validación

	ensayo de lipasa	Método fluorométrico
Especificidad (hacia los excipientes de formulación)	% de recuperación de DS+mezcla de excipiente en el ensayo de DS teor. = 101.8-103.5%	% de interferencia en la lectura de FL (excipientes/DS) = 1.6%
Rango	9.6-14.4 unidades USP de lipasa/mL (a)	0.03–0.65 Unidades de lipasa/mL (0.3–6.7 µg DS/mL) (b)
Linealidad	$y = 0.0123 + 0.0075x$ $R^2 = 0.9969$	$y = 5.52 + 68.75x$ $R^2 = 0.9992$
Exactitud	102.4% (nivel 80% de conc. objetivo) 101.0% (nivel 100% de conc. objetivo) 97.6% (nivel 120% de conc. objetivo)	107.8% (nivel 10% de conc. objetivo) 104.8% (nivel 100% de conc. objetivo) 104.5% (nivel 200% de conc. objetivo)
Precisión	Repetibilidad CV = 1.6% (c) Intermedio CV = 1.6% (c)	Repetibilidad CV = 1.1-2.0% (d) Intermedio CV = 1.0-1.9% (d)
Estabilidad del marcador en el medio de etapa entérica a 37°C	Después de 30 minutos: 88-90% del ensayo de lipasa inicial	Después de 30 minutos: 97% de la lectura inicial de FL

(a): concentración objetivo para el ensayo de lipasa = 12 unidades de lipasa/mL; (b): concentración objetivo para el ensayo de FL = 0.3 unidades de lipasa/mL (3 µg DS/mL); (c): 1 lote de DP, seis muestras independientes/pasada; (d): 6 lotes de DP, seis muestras independientes/pasada para cada lote

**Ejemplo 7.** Prueba de disolución mediante espectroscopía fluorométrica sobre perlas de pancrelipasa.

El método fluorométrico tal como se describe en los ejemplos anteriores se lleva a cabo con otras formulaciones de pancrelipasa presentes en el mercado con el nombre Creon® que tienen diferentes potencias de dosificación. Los resultados se comparan con aquellos obtenidos para perlas de pancrelipasa comercializadas como Zenpep® y se informan en la Figura 5. Las diferencias en el comportamiento están de acuerdo con las diferentes potencias de las formulaciones y las diferentes áreas de superficie de las partículas de las dos formulaciones (Zenpep®, Creon®). Se utilizan dos tamaños de perlas para diferentes potencias de Zenpep®, las más pequeñas (aproximadamente 1.8 mm de diámetro promedio), que muestran perfiles de disolución más rápidos, se utilizan para cargar cápsulas de 5,000 UI, mientras que las más grandes (aproximadamente 2.4 de diámetro promedio) se utilizan para cargar cápsulas de 20,000 UI. Las perlas de Creon® tienen aproximadamente 1 mm de diámetro promedio, pero son considerablemente más irregulares que las perlas Zenpep®, proporcionando así perfiles de disolución más rápida que Zenpep®, pero menos reproducibles de lote a lote (todas las potencias de Creon® usan los mismos gránulos).

**Ejemplo 8.** Prueba de disolución combinada con una prueba de gastro-resistencia: prueba FL más prueba GR  
Prueba FL: prueba de disolución con medición fluorométrica

## ES 2 558 756 T3

Se colocan 800 mL del medio de etapa ácida en cada recipiente del baño de disolución equipado con un aparato de canastos (Aparato USP 1-canasto); el medio de disolución (etapa ácida) es equilibrado a 37°C. Una cantidad de perlas de pancrelipasa que corresponde a 11,200 de unidades de lipasa USP (10 cápsulas de minicomprimidos o microcomprimidos Zenpep®) se pesa y se transfiere a cada canasto del Aparato 1. El aparato es operado a 100 rpm. Después de 1 hora, los canastos se quitan del medio, se enjuagan con unos pocos mililitros de agua y el contenido de cada canasto se transfiere a recipientes de disolución que contienen 800 mL del medio de etapa entérica a 37°C del baño de disolución equipado con un aparato de paleta (Aparato USP 2). El aparato es operado a 100 rpm. Después de 30 min, se retira una porción de 10 mL de la solución que se somete a prueba se transfiere a un tubo de ensayo y se equilibra a t.a. Otra dilución con medio de etapa entérica se hace para obtener la concentración apropiada (aproximadamente 0.3 unidades USP/mL). Las soluciones se almacenan en un baño de hielo/agua y se agitan manualmente antes de la lectura. Las soluciones diluidas se leen en el espectrómetro de fluorescencia con los siguientes parámetros operativos: cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud; longitud de onda de excitación:= 280 nm; longitud de onda de emisión (medición) = 346 nm; rendija de excitación: = 6.0.

La concentración objetivo del marcador (API = pancrelipasa; 100% liberada) en la solución de prueba diluida es 0.3 unidades de lipasa USP/mL.

La solución estándar se prepara tal como se describe en el Ejemplo 1 y se almacena en un baño de hielo/agua bajo agitación hasta su lectura.

La cantidad de liberación del fármaco de la composición sólida de pancrelipasa se calcula de la siguiente forma. Los cálculos se realizan para minicomprimidos/microcomprimidos a granel.

$$\% \text{ disolución} = \frac{LC \times PS \times VC}{LS \times PC \times VS} \times 100$$

Los cálculos se realizan para cápsulas.

$$\% \text{ disolución} = \frac{LC \times PS \times VC}{LS \times PC \times VS} \times \frac{US \times PM}{UL} \times 100$$

en donde: LC es la lectura de fluorescencia (emisión a 346 nm) de la muestra; LS: lectura de fluorescencia (emisión a 346 nm) del estándar; PS es el peso estándar (mg); PC es el peso de la muestra (mg); US es la potencia del estándar (unidades USP de lipasa/mg, ensayo de lipasa de lote); PM es el peso medio del contenido de la cápsula (mg/cápsula); UL es el contenido etiquetado de la lipasa en la unidad de dosificación individual (unidades USP/cápsula); VC es el volumen de dilución de la muestra (mL); VS es el volumen de dilución del estándar (mL).  
Prueba GR: Prueba de gastro-resistencia (con ensayo de lipasa)

Se colocan 800 mL del medio ácido en cada recipiente (Aparato USP 1-canasto) del baño de disolución equipado con un aparato de canasto y luego el medio de disolución es equilibrado a 37°C. Una cantidad de perlas de pancrelipasa que corresponde 11,200 unidades de lipasa USP (10 cápsulas de minicomprimidos o microcomprimidos Zenpep®) se pesa y se transfiere a cada canasto del Aparato 1. El aparato es operado a 100 rpm. Después de 1 hora, los canastos se retiran del medio y las muestras se enjuagan empapando brevemente (durante aproximadamente 5 segundos) los canastos en un vaso de precipitados de 1,000 mL que contiene 900 mL de agua purificada fría a 4°C, y este proceso se repite tres veces, sin cambiar el medio de enjuague. El contenido de cada canasto se transfiere cuantitativamente a un mortero de cerámica, se agregan 5-6 mL de agua purificada fría. La muestra se tritura hasta que se haya obtenido una dispersión completa de la misma, se recolecta cuantitativamente en un matraz volumétrico de 200 mL y el pocillo del mortero se enjuaga. Esta operación se repite 2-3 veces. Se agrega agua purificada a un volumen total final. Se realiza otra dilución con agua purificada fría para obtener la concentración apropiada (aproximadamente 14 unidades USP/mL, que es la concentración máxima teórica disponible asumiendo un 100% de gastro-resistencia del producto). La solución de la muestra se prepara inmediatamente antes de la titulación y se mantiene bajo agitación en un baño de hielo/agua.

La solución estándar se prepara de la siguiente forma: una cantidad de USP Pancreatina lipasa RS, o estándar de trabajo de pancrelipasa, que corresponde a 6,000 Unidades USP se pesa con exactitud y se agrega a un mortero de cerámica, se agregan aproximadamente 5-6 mL de agua purificada y posteriormente se tritura. El líquido del mortero se vuelca en un matraz volumétrico de 500 mL y el mortero también se enjuaga. Esta operación se repite 2-3 veces. Se agrega agua purificada a un volumen total final. La solución estándar se prepara inmediatamente antes de la titulación y se mantiene bajo agitación en un baño de hielo/agua.

La concentración final de la solución estándar es aproximadamente 12.0 Unidades USP de lipasa/mL.

Para el ensayo de lipasa: 30 mL de la emulsión de sustrato (a 37° ± 0.1°C) se vuelcan en el recipiente forrado del titulador, y se agitan con un agitador magnético, manteniendo la temperatura a 37° ± 0.1°C. Se agrega 0.1N de

## ES 2 558 756 T3

NaOH para ajustar el pH a 9.20-9.23 potenciométricamente. Se agrega 1.0 mL de la solución de muestra o estándar y posteriormente se agrega 0.1N de NaOH durante 5 minutos para mantener el pH en 9.0.

Los cálculos se hacen con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de gastroresistencia} = \frac{VMC \times DC}{AVMS \times DS} \times \frac{PS \times US}{PC \times UC} \times 100$$

5  
10 donde: VMC es el volumen de 0.1N de NaOH consumido por min por la muestra (mL/min); AVMS es el volumen promedio de 0.1 N de NaOH consumido por min por el estándar (mL/min); PC es el peso de la muestra (mg), PS es el peso del estándar (mg); DC es la dilución de la muestra (mL); DS es la dilución del estándar (mL); US es la potencia del estándar (Unidades USP de lipasa/mg); UC es el ensayo de lipasa por lotes (unidades USP de lipasa/mg).

Los criterios de aceptación de acuerdo con USP, <711> disolución – Formas de liberación retardada (etapa ácida), Tabla de Aceptación 3 son:

15 Nivel 1 de criterios de aceptación: GR% será mayor o igual a 90% para cada unidad individual;  
Nivel 2 de criterios de aceptación: el valor promedio de GR de las 12 unidades (6 unidades en el nivel 1, 6 unidades en el nivel 2) es no menor que 90% y ninguna unidad individual es menor que 75%;  
Nivel 3 de criterios de aceptación: el valor promedio de GR de las 24 unidades (6 unidades en el nivel 1, 6 unidades en el nivel 2, 12 unidades en el nivel 3) es no menor que 90%, y ninguna unidad individual es menor que 75%.

20 En base a todos los datos y consideraciones reportados anteriormente, la medición fluorométrica del contenido total de proteínas como marcador de las enzimas digestivas liberadas en las pruebas de disolución de las perlas de pancrelipasa es una alternativa confiable y ventajosa al método de medición de los compendios actualmente aceptados en base al ensayo de la actividad de lipasa.

25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un proceso para medir una cantidad de enzimas digestivas liberadas de una composición sólida de pancrelipasa en un medio de disolución que comprende utilizar espectroscopía de fluorescencia para medir la cantidad de enzimas digestivas liberadas de la composición en el medio de disolución.
2. El proceso de la reivindicación 1, en donde la composición sólida de pancrelipasa es una composición de pancrelipasa con recubrimiento entérico.
- 10 3. El proceso de la reivindicación 1, en donde el medio de disolución es agua, solución de HCl, fluido gástrico simulado, solución amortiguadora, fluido intestinal simulado, solución acuosa o amortiguadora que contiene al menos un tensioactivo.
- 15 4. El proceso de la reivindicación 1, 2 o 3 que comprende las etapas de: (a) permitir que la composición de pancrelipasa sólida libere las enzimas digestivas en el medio de disolución, (b) leer la fluorescencia para medir la cantidad de enzimas digestivas en el medio.
- 20 5. El proceso de la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en donde el medio de disolución consiste en al menos dos medios que se aplican secuencialmente.
- 25 6. El proceso de la reivindicación 5 que comprende las etapas de: a) agregar la composición de pancrelipasa sólida en un primer medio de disolución, b) transferir la suspensión en un segundo medio de disolución, c) permitir la liberación de las enzimas digestivas, d) tomar muestras de alícuotas del medio de disolución, e) leer la fluorescencia a 346 nm, d) calcular la cantidad de enzimas digestivas liberadas.
- 30 7. El proceso de la reivindicación 6, en donde el primer medio de disolución es un medio acuoso que tiene un pH entre 1 y 4.5 y el segundo medio de disolución es una solución amortiguadora acuosa que tiene un pH por encima de 5.
- 35 8. El proceso de la reivindicación 6 o 7, en donde el primer medio de disolución es un medio acuoso que tiene un pH entre 1 y 2.
9. El proceso de la reivindicación 6, 7 u 8, en donde el segundo medio de disolución es una solución amortiguadora acuosa que tiene un pH entre 5.5 y 6.8.
- 40 10. El proceso de la reivindicación 6, 7, 8 o 9, en donde el primer medio de disolución es un medio acuoso que tiene un pH de 1.2 y el segundo medio de disolución es una solución amortiguadora acuosa que tiene un pH de 6.
- 45 11. El proceso de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, en donde las composiciones de pancrelipasa tienen un total de 750, 3,000, 4,200, 5,000, 6,000, 10,000, 10,500, 15,000, 16,800, 20,000, 21,000, 24,000 o 25,000 o 40,000 unidades USP de lipasa o múltiplo de las mismas, o 5,000 o 10,000 o 15,000 o 20,000 o 30,000 o 40,000 unidades PhEur de lipasa o múltiplo de las mismas.
- 50 12. El proceso de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 combinado con una prueba de gastrorresistencia, en donde la actividad de la lipasa residual de la composición en un medio acuoso que tiene un pH entre 1 y 4.5 se mide mediante el método de ensayo de lipasa específico.
- 55 13. El proceso de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 combinado con una prueba de gastro-resistencia, en donde la actividad de la lipasa residual de la composición en un medio acuoso que tiene un pH entre 1 y 2 se mide mediante el método de ensayo de lipasa específico.
14. El proceso de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 combinado con una prueba de gastro-resistencia, en donde la actividad de la lipasa residual de la composición en un medio acuoso que tiene un pH de 1.2 se mide mediante el método de ensayo de lipasa específico.
15. El proceso de la reivindicación 12, 13 o 14, en donde la medición de la cantidad de enzimas digestivas liberadas de la composición sólida en el medio de disolución mediante espectroscopía de fluorescencia se lleva a cabo antes o después de la prueba de gastro-resistencia.

Figura 1

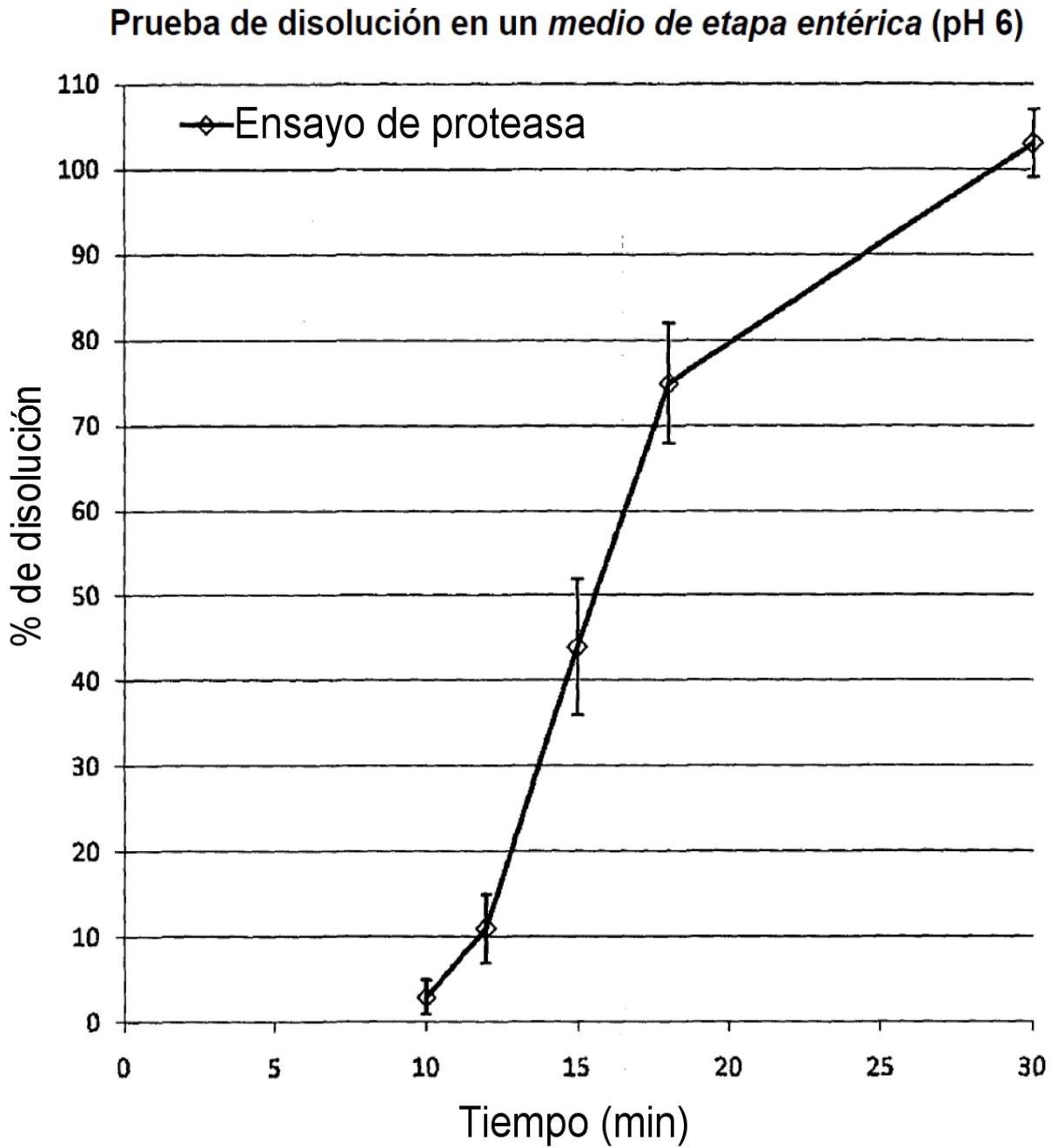


Figura 2

Prueba de disolución en un *medio de etapa entérica* (pH 6)

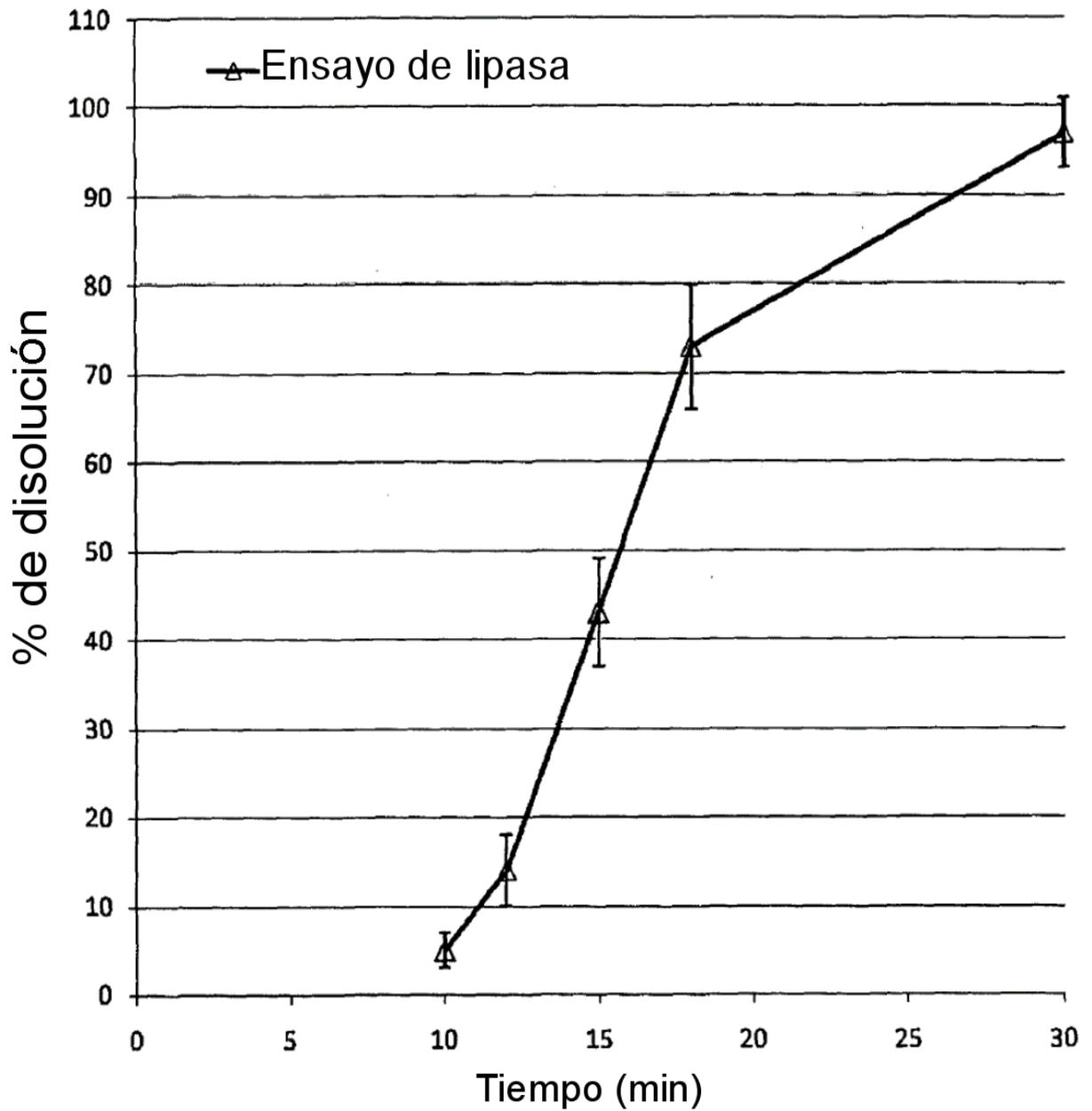


Figura 3

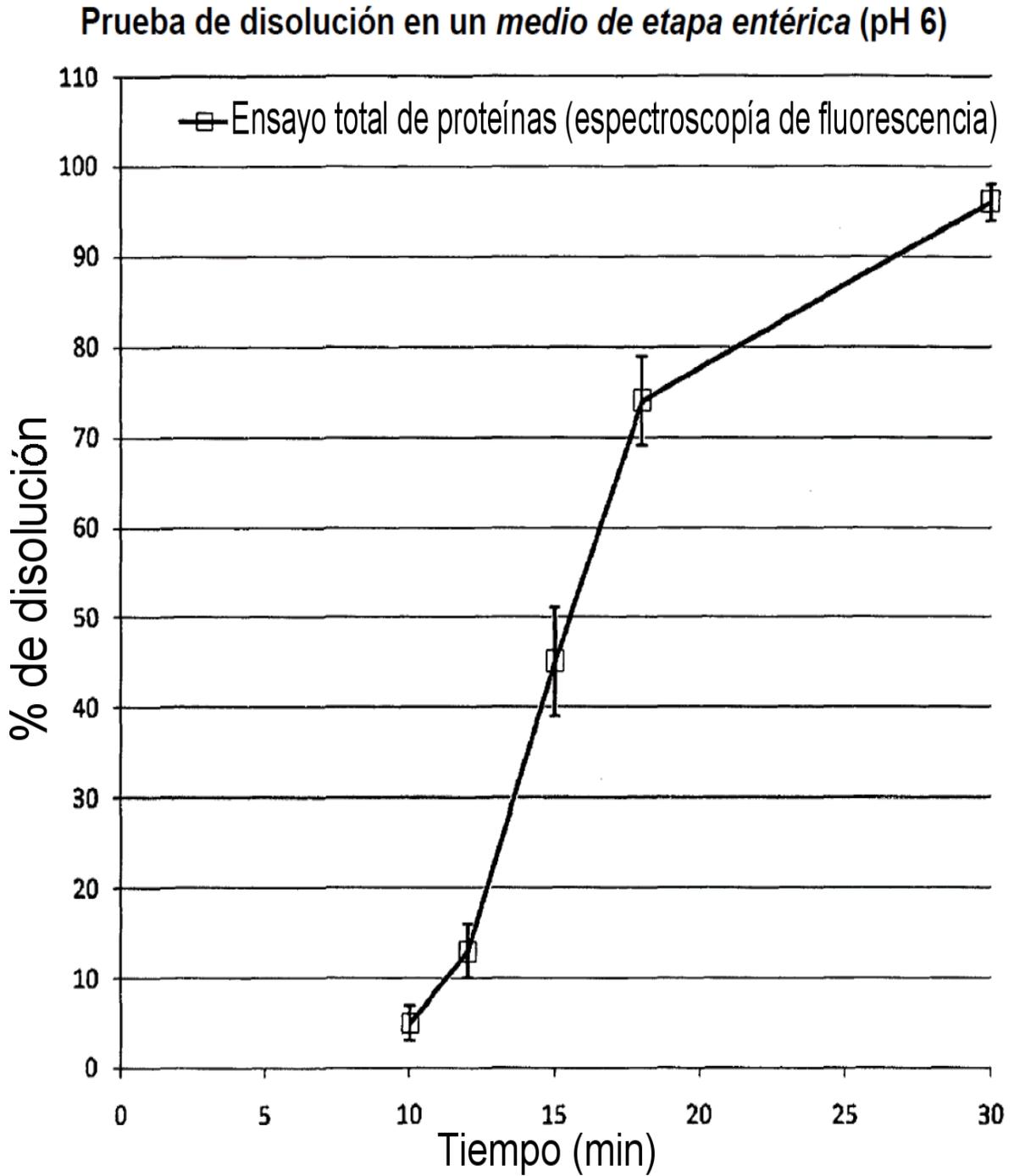


Figura 4a

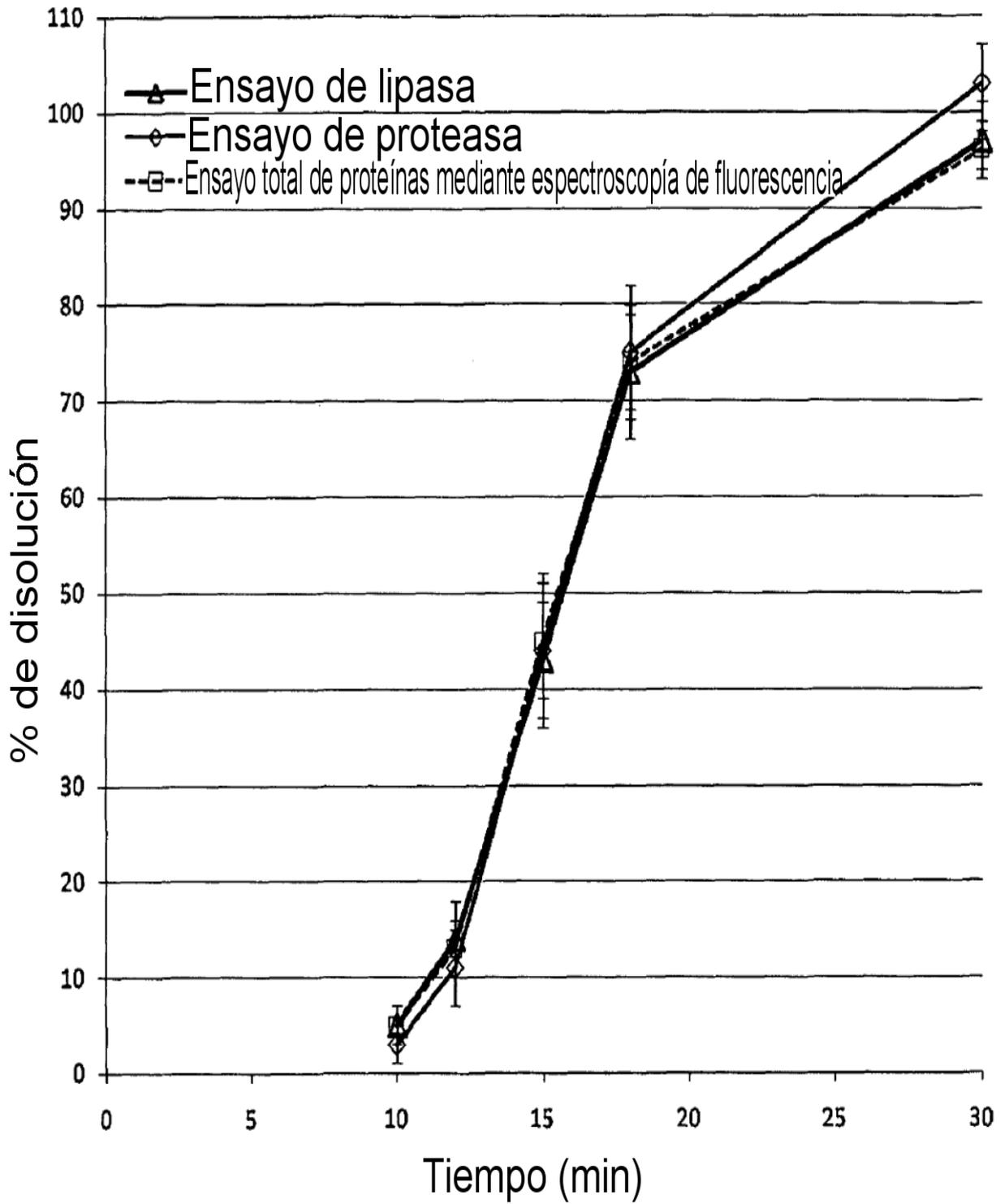


Figura 4b

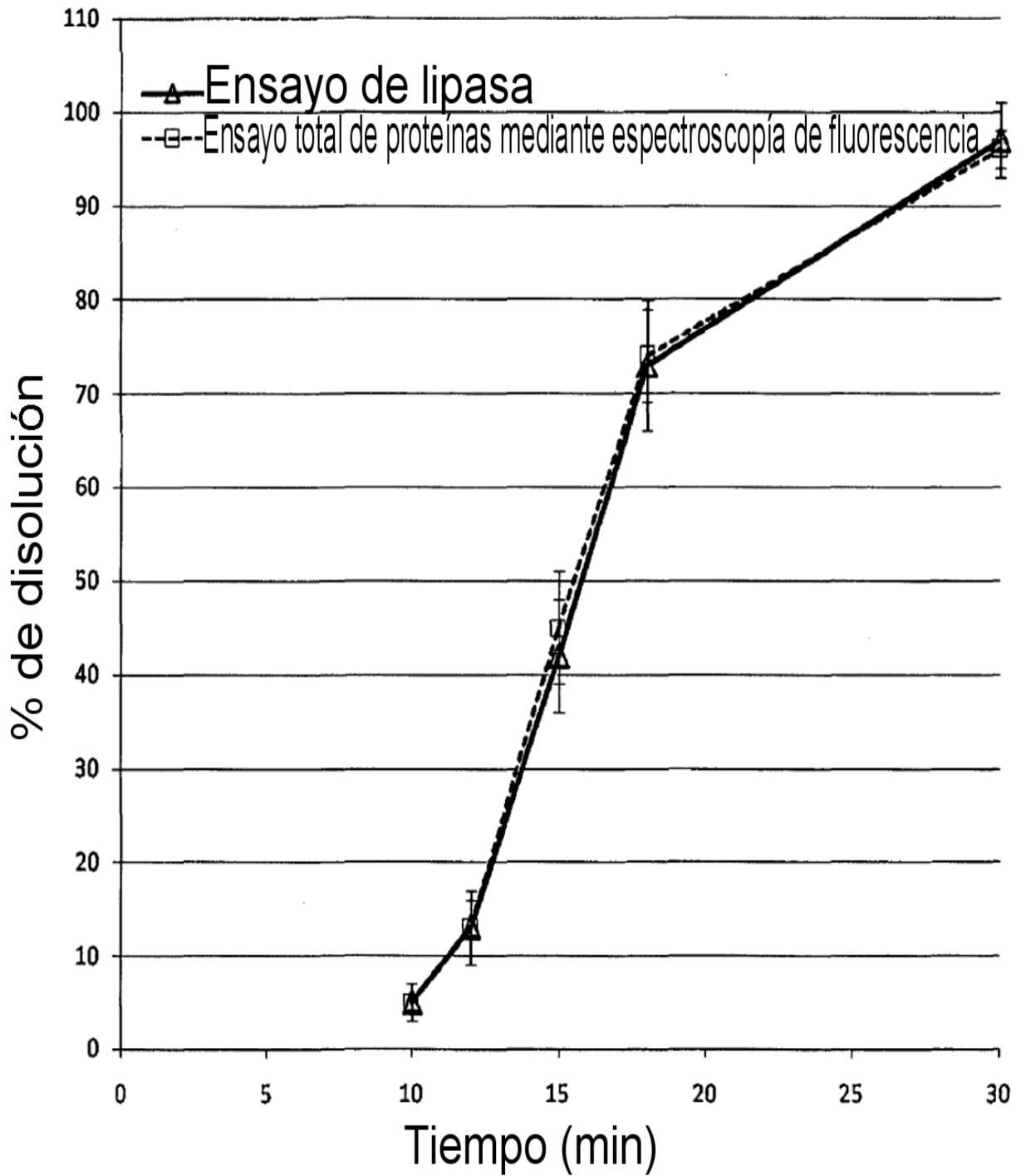
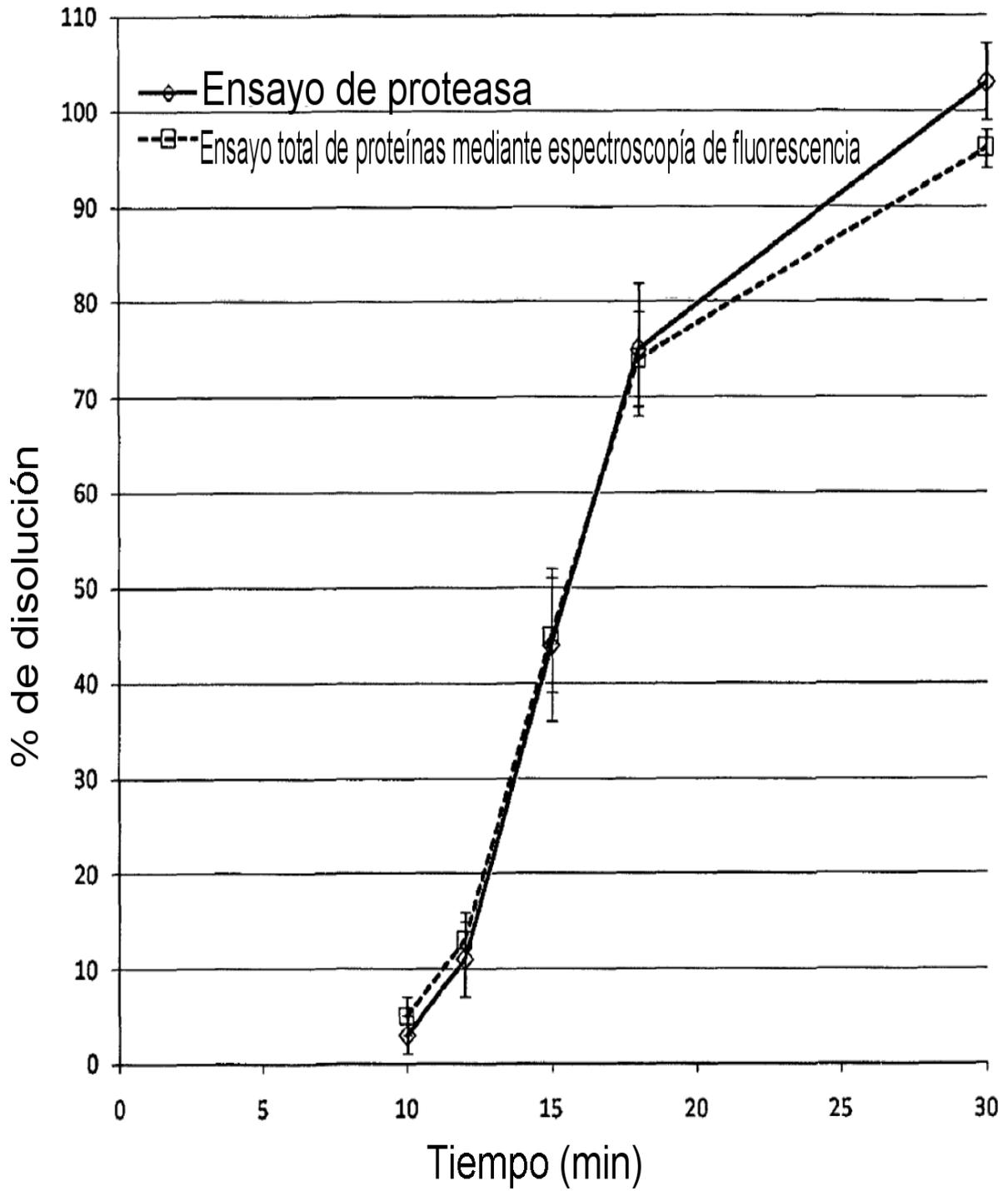


Figura 4c



**Perfil de disolución ZENPEP vs CREON**  
 Medición fluorométrica del contenido total de proteínas liberado  
 (pH 6 en medio a 37°C, después 1 h etapa en pH en 1.2 medio a 37°C)

% de disolución (en ensayo de lote - como contenido total de proteínas)

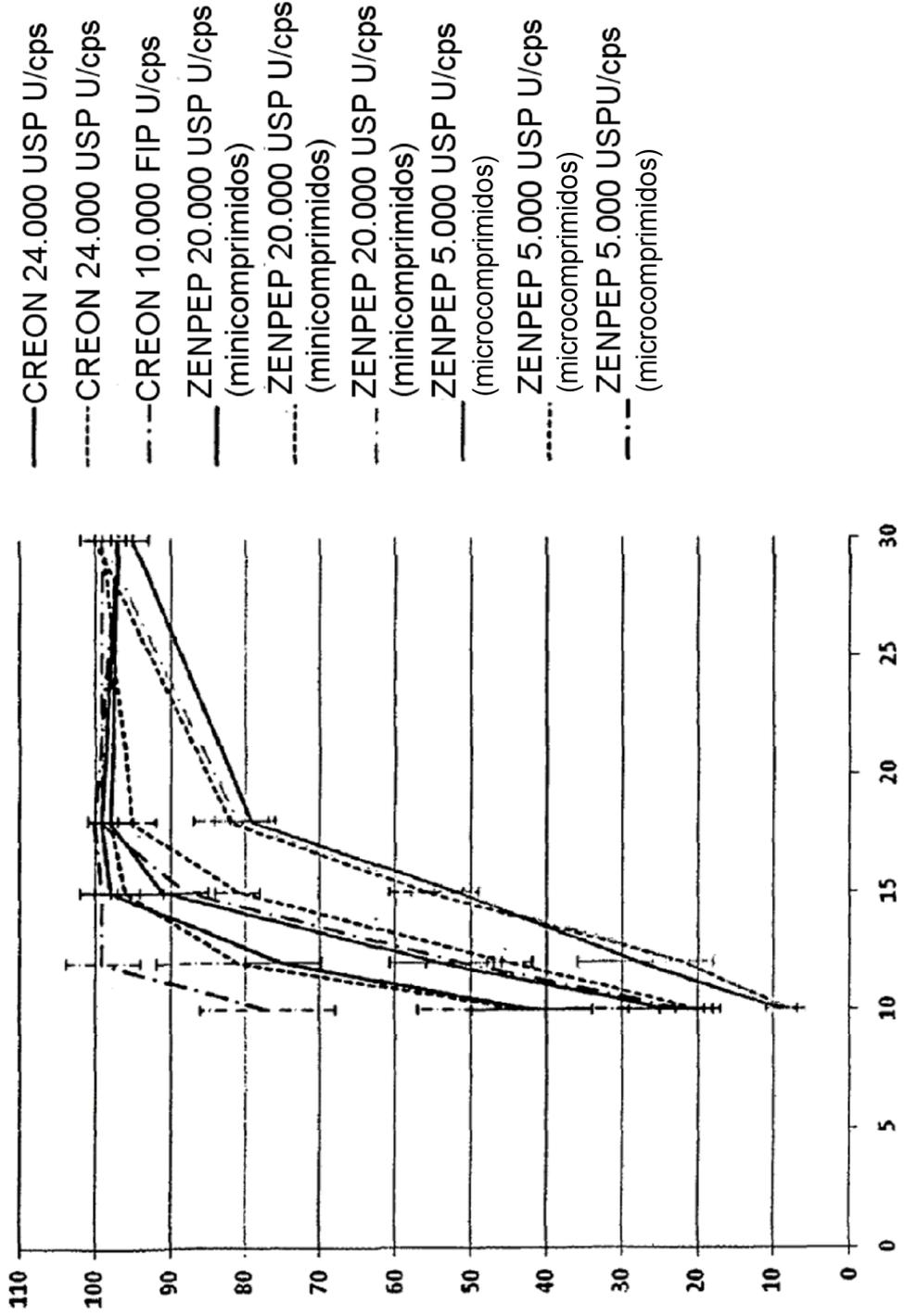


Figura 5