

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 157**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/54** (2006.01)  
**A61K 38/46** (2006.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**A61K 38/47** (2006.01)  
**A61P 1/18** (2006.01)  
**A61P 1/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2005** **E 10158639 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016** **EP 2198880**

54 Título: **Composiciones que contienen lipasa, proteasa y amilasa para el tratamiento de la insuficiencia pancreática**

30 Prioridad:

**14.10.2004 US 618764 P**

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

**29.05.2017**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND CO. (100.0%)  
Lilly Corporate Center  
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**MARGOLIN, ALEXEY, L.;  
SHENOY, BHAMI, C.;  
MURRAY, FREDERICK, T. y  
STEVENS, ANTHONY CHRISTOPHER LEE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 614 157 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

Composiciones que contienen lipasa, proteasa y amilasa para el tratamiento de la insuficiencia pancreática

**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento de enfermedades, incluyendo la insuficiencia pancreática. Las composiciones de la presente invención comprenden lipasa, proteasa y amilasa en una proporción especial que proporciona resultados beneficiosos en pacientes tales como los afectados por insuficiencia pancreática. Esta invención se refiere también a tales composiciones para su uso en el tratamiento de la insuficiencia pancreática.

**10 Antecedentes de la invención**

La digestión constituye el proceso fisiológico por el que el alimento ingerido se descompone en componentes nutritivos de fácil absorción. Después de la ingestión, el alimento pasa a través de varios segmentos del tracto gastrointestinal y la digestión se lleva a cabo principalmente por enzimas digestivas. Los tres grupos de enzimas digestivas esenciales para este proceso incluyen lipasas (para la digestión de las grasas), proteasas (para la digestión de las proteínas) y amilasas (para la digestión de los hidratos de carbono).

15 La digestión de los alimentos y la absorción de los nutrientes tienen lugar en el intestino delgado. En este, el alimento ingerido es descompuesto por las enzimas digestivas para su fácil absorción. El páncreas secreta la mayor parte de las enzimas digestivas, que llegan al intestino delgado a través del conducto pancreático.

20 El páncreas efectúa varias acciones exocrinas y endocrinas requeridas para una digestión, nutrición y metabolismo correctos. Las actividades pancreáticas exocrinas incluyen la secreción de proteínas que funcionan como enzimas en el intestino delgado, para catalizar la hidrólisis de las grasas a glicerol y ácidos grasos, de las proteínas a péptidos y aminoácidos y de los hidratos de carbono a dextrinas, disacáridos y monosacáridos, como glucosa. La insuficiencia pancreática exocrina (en adelante, "insuficiencia pancreática") es el resultado de una reducción de la función pancreática y puede estar causada por una serie de trastornos clínicos. Por ejemplo, la insuficiencia pancreática está asociada con la fibrosis quística, la pancreatitis crónica, la pancreatitis aguda, el cáncer de páncreas y el síndrome de Shwachmann-Diamond [E. P. DiMagno y col., en *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*, 2.<sup>a</sup> ed., V. Liang y col., eds., págs. 665-701 (1993)].

30 En los pacientes afectados con insuficiencia pancreática, el páncreas no produce ni/o secreta cantidades de enzimas digestivas suficientes para llevar a cabo los procesos digestivos normales, incluyendo la digestión de las grasas, las proteínas y los hidratos de carbono. Como resultado, estos pacientes sufren malabsorción de nutrientes. Las manifestaciones clínicas de la insuficiencia pancreática incluyen espasmos abdominales, meteorismo, diarrea, esteatorrea, náuseas y pérdida de peso.

35 La insuficiencia pancreática se presenta en el 89% de los pacientes que sufren fibrosis quística [D. Borowitz y col., "Use of Fecal Elastase-1 to Identify Misclassification of Functional Pancreatic Status in Patients with Cystic Fibrosis" *J. Pediatr.*, 145, págs. 322-326 (2004)]. La fibrosis quística es un trastorno genético recesivo autosómico que afecta principalmente a los sistemas gastrointestinal y respiratorio [S. M. Rowe y col., "Mechanisms of Disease: Cystic Fibrosis", *N. Engl. J. Med.*, 352, págs. 1992-2001 (1995)]. Las cantidades anormales y la viscosidad del moco producido en los pacientes de fibrosis quística impiden la secreción de cantidades suficientes de las enzimas pancreáticas. La disminución del volumen de secreciones pancreáticas conduce al espesamiento dentro de los conductos pancreáticos, lo que impide la excreción de las enzimas y el bicarbonato al duodeno. Como resultado, los pacientes de fibrosis quística con insuficiencia pancreática sufren una digestión deficiente y experimentan una malabsorción significativa de grasa y proteína. Por ejemplo, típicamente, estos pacientes absorben menos del 60% de la grasa de la dieta [M. Kraisinger y col., "Clinical Pharmacology of Pancreatic Enzymes in Patients with Cystic Fibrosis and *in vitro* Performance of Microencapsulated Formulations", *J. Clin. Pharmacol.*, 34, págs. 158-166 (1994)]. Sin tratamiento, la mala digestión y la malabsorción en pacientes de fibrosis quística pueden conducir a malnutrición, incapacidad de ganar o mantener el peso y crecimiento reducido, así como al empeoramiento de la enfermedad pulmonar supurativa crónica [K. Gaskin y col., "Improved Respiratory Prognosis in CF Patients with Normal Fat Absorption", *J. Pediatr.*, 100, págs. 857-862 (1982); J. M. Littlewood y col., "Control of Malabsorption in Cystic Fibrosis", *Paediatr. Drugs*, 2, págs. 205-222 (2000)].

50 Hasta la fecha, el tratamiento estándar para la insuficiencia pancreática se basa principalmente en la administración por vía oral de pancreolipasa porcina, que contiene una mezcla de lipasas, tripsina, quimotripsina, elastasa y amilasas. Aunque los suplementos de enzimas pancreáticas porcinas contienen cantidades sustanciales de amilasa, se ha descrito que los pacientes de fibrosis quística tienen niveles normales de amilasa [P. L. Townes y col., "Amylase Polymorphism: Studies of Sera and Duodenal Aspirates in Normal Individuals and in Cystic Fibrosis", *Am. J. Hum. Genet.*, 28, págs. 378-389 (1976)]. En consecuencia, se cree que la amilasa no desempeña ninguna función en el aumento de la digestión de los polisacáridos [E. Leberthal y col., "Enzyme Therapy for Pancreatic Insufficiency: Present Status and Future Needs", *Pancreas*, 9, págs. 1-12 (1994)]. Típicamente, los componentes de lipasa,

proteasa y amilasa de los suplementos pancreáticos porcinos están presentes en una proporción de 1:3,5:3,5.

Los suplementos de enzimas pancreáticas se administran normalmente por vía oral con las comidas. A medida que estos suplementos pasan a través entorno de pH bajo del estómago, su actividad enzimática disminuye rápidamente. Como resultado, se han requerido grandes cantidades de concentrado enzimático (a veces hasta 15 cápsulas o comprimidos por cada comida) para asegurar la presencia de suficiente enzima activa en el intestino proximal para aliviar la insuficiencia pancreática.

Como la proteasa y la lipasa pueden quedar inactivadas irreversiblemente en el ambiente ácido del estómago, se han aplicado tecnologías de recubrimiento entérico a los productos de pancreolipasa con el fin de encerrar las enzimas en microesferas o tratarlas de otra manera con un recubrimiento entérico protector. Mientras que estos recubrimientos entéricos mejoraron el perfil del producto, todavía se requirieron grandes cantidades de suplementos para obtener un beneficio terapéutico [J. H. Meyer, en *Pancreatic Enzymes in Health and Disease*, P. G. Lankisch, ed., págs. 71-78 (1991)]. Con el objetivo de reducir las cantidades de comprimidos o cápsulas necesarias para tratar la insuficiencia pancreática se introdujo una línea de productos de pancreolipasa de alta concentración (Ultrase®). Sin embargo, en 1991, la Fundación para la Fibrosis Quística de los Estados Unidos, conjuntamente con la FDA, describieron múltiples casos de colonopatía fibrosante en niños con fibrosis quística que tomaban tales productos de alta concentración [S. C. Fitzsimmons y col., "High-Dose Pancreatic-Enzyme Supplements and Fibrosing Colonopathy in Children with Cystic Fibrosis", *N. Engl. J. Med.*, 336, págs. 1283-1289 (1997)]. En estos pacientes, la fibrosis del colon causó constricciones que, con frecuencia, requirieron cirugía y, en algunos casos, una colectomía.

Como un medio de reducir las dosis diarias de enzimas pancreáticas, la FDA retiró del mercado los productos de alta concentración (definidos como de más de 2,500 unidades de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) por kg de peso corporal) [D. S. Borowitz y col., "Use of Pancreatic Enzyme Supplements for Patients with Cystic Fibrosis in the Context of Fibrosing Colonopathy", *J. Pediatr.*, 127, págs. 681-684 (1995)]. Además, la Fundación para la Fibrosis Quística de los Estados Unidos, conjuntamente con la FDA, recomendó un examen detallado de la naturaleza compleja de los extractos enzimáticos porcinos [id.]. El Panel de Consenso también recomendó la investigación de lipasas alternativas estables frente a ácidos.

Independientemente de que un suplemento dado de enzimas pancreáticas esté o no recubierto entéricamente, la biodisponibilidad de tales suplementos varía ampliamente, debido a diferencias en la acidificación del intestino entre los pacientes. Como resultado, muchos pacientes toman fármacos que alteran el pH, como bloqueantes del receptor de la histamina-2 (H<sub>2</sub>) e inhibidores de la bomba de protones (IBP), para mejorar la eficacia clínica de los suplementos enzimáticos [P. G. Lankish, "Enzyme Treatment of Exocrine Pancreatic Insufficiency in Chronic Pancreatitis", *Digestion*, 54 (supl. 2), págs. 21-29 (1993); D. Y. Graham, "Pancreatic Enzyme Replacement: the Effect of Antacids or Cimetidine", *Dig. Dis. Sci.*, 27, págs. 485-490 (1982); J. H. Saunders y col., "Inhibition of Gastric Secretion in Treatment of Pancreatic Insufficiency", *Br. Med. J.*, 1, págs. 418-419 (1977); H. G. Heijerman y col., "Omeprazole Enhances the Efficacy of Pancreatin (Pancrease) in Cystic Fibrosis", *Ann. Inter. Med.*, 114, págs. 200-201 (1991); M. J. Bruno y col., "Comparative Effects of Adjuvant Cimetidine and Omeprazole during Pancreatic Enzyme Replacement Therapy", *Dig. Dis. Sci.*, 39, págs. 988-992, (1994)].

La variabilidad en términos de concentración y propiedades farmacéuticas y la falta de estabilidad se han identificado también como factores importantes que contribuyen a la escasa respuesta de algunos pacientes a los suplementos de enzimas pancreáticas convencionales [C. L. Chase y col., "Enzyme Content and Acid Stability of Enteric-Coated Pancreatic Enzyme Products *in vitro*" *Pancreas*, 30, págs. 180-183 (2005); D. S. Borowitz y col., *J. Pediatr.*, 127, *supra*; C. J. Powell y col., "Colonic Toxicity from Pancreatins: a Contemporary Safety Issue", *Lancet*, 353, págs. 911-915 (1999); E. Lebenthal y col., "Enzyme Therapy for Pancreatic Insufficiency: Present Status and Future Needs", *Pancreas*, 9, págs. 1-12 (1994); P. Regan y col., "Comparative Effects of Antacids, Cimetidine and Enteric Coating on the Therapeutic Response to Oral Enzymes in Severe Pancreatic Insufficiency", *N. Eng. J. Med.*, 297, págs. 854-858 (1977)]. Estos incluyen la variación de la actividad enzimática entre lotes, la susceptibilidad a la pérdida de actividad con el tiempo por exposición a la luz solar, el calor o la humedad y un perfil de reacciones adversas escasamente definido [D. S. Borowitz y col., *J. Pediatr.*, 127, *supra*]. Otros factores que complican el tratamiento de la insuficiencia pancreática incluyen la destrucción de las enzimas sustitutivas por el jugo gástrico y/o las proteasas intraluminales, el vaciado gástrico asíncrono del suplemento enzimático y de los nutrientes de la comida y el retraso en la liberación de las enzimas a partir de los preparados con recubrimiento entérico [P. G. Lankish, *Digestion*, 54, *supra*; P. Regan y col., *N. Engl. J. Med.*, 297, *supra*].

Debido a los problemas de potencia, estabilidad y biodisponibilidad que caracterizan a los suplementos de enzimas pancreáticas convencionales, se ha propuesto el uso de enzimas de origen microbiano como alternativas a enzimas de origen porcino. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 6.051.220 describe composiciones que comprenden una o más lipasas estables frente a ácidos y una o más amilasas estables frente a ácidos, las dos preferentemente de origen fúngico. La solicitud de patente de los Estados Unidos 2004/0057944 describe composiciones que comprenden lipasa de *Rhizopus delemar*, proteasa de *Aspergillus melleus* y amilasa de *Aspergillus oryzae*. La solicitud de patente de los Estados Unidos 2001/0046493 describe composiciones que comprenden lipasa bacteriana cristalina reticulada junto con una proteasa fúngica o vegetal y una amilasa fúngica o bacteriana.

A pesar de estos desarrollos, sigue existiendo la necesidad de optimizar las formulaciones de dosificación para mejorar aún más tanto la eficacia de los suplementos de enzimas pancreáticas como el cumplimiento del paciente. El objetivo de un suplemento de enzimas pancreáticas que muestre la máxima eficacia a la mínima dosis y se caracterice por un perfil de seguridad bien definido, sigue siendo de gran importancia para todos los pacientes que sufren insuficiencia pancreática, incluyendo aquellos con fibrosis quística.

### Resumen de la invención

La presente invención se dirige a composiciones y su uso en el tratamiento de enfermedades, incluyendo la insuficiencia pancreática. Según una realización preferida, las composiciones de esta invención se caracterizan por cristales de lipasa microbiana, proteasa microbiana y amilasa microbiana reticulados, en una proporción de aproximadamente 1,0:1,0:0,15 unidades USP de actividad enzimática como se reivindica en la reivindicación 1. Ventajosamente, estas composiciones se caracterizan por componentes enzimáticos estables, que aseguran, a su vez, el suministro *in vivo* de la enzima activa al tracto gastrointestinal y, de este modo, permiten regímenes de tratamiento efectivos a dosis bajas para la insuficiencia pancreática.

### Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 ilustra la variación en el coeficiente de absorción de grasa medio ("CFA"), en comparación con el nivel inicial, en pacientes tratados con composiciones según la presente invención durante un estudio de fase II.

La fig. 2 ilustra la variación en el coeficiente de absorción de nitrógeno medio ("CNA"), en comparación con el nivel inicial, en pacientes tratados con diversas composiciones según la presente invención durante un estudio de fase II.

La fig. 3 ilustra la correlación entre el coeficiente de absorción de grasa ("CFA") y el coeficiente de absorción de nitrógeno ("CNA") iniciales en pacientes tratados con composiciones según la presente invención durante un estudio de fase II.

La fig. 4 ilustra la correlación entre el coeficiente de absorción de grasa ("CFA") y el coeficiente de absorción de nitrógeno ("CNA") en el nivel de tratamiento en pacientes tratados con composiciones según la presente invención durante un estudio de fase II.

La fig. 5 ilustra la diferencia entre la correlación entre el coeficiente de absorción de grasa ("CFA") y el coeficiente de absorción de nitrógeno ("CNA") en los niveles de tratamiento e inicial en pacientes tratados con composiciones según la presente invención durante un estudio de fase II.

La fig. 6 ilustra la variación en el coeficiente de absorción de grasa medio ("CFA"), en comparación con el nivel inicial, en pacientes de fibrosis quística tratados con diversas dosis según la presente invención durante un estudio de fase I.

La fig. 7 ilustra la variación en el coeficiente de absorción de nitrógeno medio ("CNA"), en comparación con el nivel inicial, en pacientes tratados con diversas dosis según la presente invención durante un estudio de fase I.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de que composiciones que comprenden lipasa, proteasa y amilasa en una proporción de aproximadamente 1,0:1,0:0,15 unidades USP de actividad enzimática son efectivas para el tratamiento de enfermedades, incluyendo la insuficiencia pancreática. La proporción única entre lipasa, proteasa y amilasa permite el tratamiento de esas enfermedades en regímenes terapéuticos de dosis bajas, que no son posibles con suplementos de enzimas pancreáticas convencionales de origen porcino. Además, esta proporción entre lipasa, proteasa y amilasa evita una alta concentración de proteasa, de la cual, en los suplementos enzimáticos convencionales, se ha pensado que es responsable de la colonopatía fibrosante [D. S. Borowitz y col., *J. Pediatr.*, 127, *supra*].

Las composiciones de esta invención comprenden lipasa, proteasa y amilasa en una proporción de aproximadamente 1,0:1,0:0,15 unidades USP de actividad enzimática, en las que la lipasa es lipasa de *Burkholderia cepacia* cristalizada reticulada, la proteasa es proteasa de *Aspergillus melleus* cristalizada y la amilasa es amilasa de *Aspergillus oryzae* amorfa.

A menos que se indique lo contrario, se entenderá que los términos siguientes tienen los significados siguientes:

El término "amorfo" se refiere a cualquier estado distinto del estado de cristal, cristalino o semicristalino. La materia amorfa incluye sólidos amorfos y líquidos.

El término "cristal" o "cristalino" se refiere a una forma de la materia en estado sólido que comprende átomos dispuestos en un patrón que se repite periódicamente en tres dimensiones [véase, por ejemplo, Barret, *Structure of Metals*, 2.<sup>a</sup> ed., (1952)]. Las formas de cristal o cristalina de una enzima son distintas de las formas amorfa o semicristalina de la misma. Los cristales muestran rasgos característicos, incluyendo una estructura de red, formas características y propiedades ópticas, como por ejemplo, el índice de refracción.

El término “semicristalino” se refiere a un estado sólido de la materia que tiene tanto regiones cristalinas como amorfas.

El término “sujeto”, “paciente” o “individuo” se refiere a cualquier mamífero, incluyendo cualquier animal clasificado como tal, incluyendo humanos y otros primates.

5 El término “mala digestión” se refiere a la descomposición deficiente de los nutrientes (tales como grasas, proteínas e hidratos de carbono) en sus constituyentes absorbibles (mono-, di- u oligosacáridos, aminoácidos, oligopéptidos, ácidos grasos y monoglicéridos). La mala digestión puede ser el resultado de varias enfermedades, incluyendo la insuficiencia pancreática.

10 El término “malabsorción” se refiere a la absorción deficiente de los nutrientes digeridos, incluyendo vitaminas y oligoelementos, desde el intestino delgado o el intestino grueso. La malabsorción puede deberse a una absorción defectuosa a través de la mucosa por parte del revestimiento intestinal o a anomalías particulares de la digestión. La malabsorción intestinal puede producirse para muchos nutrientes o para macronutrientes específicos, concretamente grasas, proteínas o hidratos de carbono, así como para micronutrientes, como calcio, magnesio, hierro y vitaminas. La malabsorción puede ser el resultado de varias enfermedades, incluyendo la insuficiencia pancreática. La malabsorción de las proteínas se denomina “azotorrea”. La malabsorción de los lípidos se denomina “esteatorrea”.

15 El término “lipasa” se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis (es decir, la separación del grupo hidroxilo y el átomo de hidrógeno de los compuestos para dar fragmentos por la adición de agua) de los lípidos a glicerol y ácidos grasos simples. Normalmente, esta reacción enzimática requiere iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Las lipasas secretadas por el páncreas son de extrema importancia para la digestión de grasa (triglicéridos) en la parte superior del intestino delgado. Según la invención, la lipasa útil en las composiciones y su uso de acuerdo con esta invención es lipasa no pancreática, lipasa de *Burkholderia cepacia*.

20 Generalmente las lipasas microbianas pueden aislarse de su fuente microbiana nativa o pueden ser lipasas microbianas recombinantes producidas por medio de la tecnología del ADN recombinante por una célula hospedadora adecuada, seleccionada entre una cualquiera de células hospedadoras de bacterias, levaduras, hongos, plantas, insectos o mamíferos, en cultivo, preferentemente bacterias. Las lipasas recombinantes abarcan o están codificadas por ácidos nucleicos de una secuencia de lipasa de origen natural. Además, las lipasas recombinantes incluyen una secuencia de aminoácidos que es homóloga o sustancialmente idéntica a una secuencia de origen natural, así como aquellas lipasas codificadas por un ácido nucleico que es homólogo o sustancialmente idéntico a un ácido nucleico codificante de lipasa de origen natural.

25 El término “proteasa” se refiere a una proteinasa, enzima proteolítica o peptidasa, que es una enzima que cataliza la escisión de los enlaces peptídicos (amida) internos en una proteína. Específicamente, las proteasas catalizan la conversión de las proteínas en sus componentes aminoácidos por rotura del enlace amida entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro aminoácido. En general, las proteasas 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 semialcalinas, peptidasas neutras y peptidasas de mecanismo catalítico desconocido (véase <http://merops.sanger.ac.uk>). Según la invención, la proteasa útil en las composiciones y su uso de acuerdo con esta invención es proteasa no pancreática, proteasa de *Aspergillus melleus*.

30 Generalmente las proteasas microbianas pueden aislarse de su fuente microbiana nativa o pueden ser proteasas microbianas recombinantes, producidas por medio de la tecnología del ADN recombinante por una célula hospedadora adecuada que se selecciona entre una cualquiera de células hospedadoras de bacterias, levaduras, hongos, plantas, insectos o mamíferos, en cultivo, preferentemente hongos. Las proteasas recombinantes abarcan o están codificadas por ácidos nucleicos de una secuencia de proteasa de origen natural. Además, las proteasas recombinantes incluyen una secuencia de aminoácidos que es homóloga o sustancialmente idéntica a una secuencia de origen natural, así como aquellas proteasas codificadas por un ácido nucleico que es homólogo o sustancialmente idéntico a un ácido nucleico codificante de proteasa de origen natural.

35 El término “amilasa” se refiere a una enzima que se produce en el páncreas y también en las glándulas salivales en seres humanos, pero no en todos los mamíferos. La amilasa salival humana se conoce como ptialina. La amilasa es la enzima digestiva principal, responsable de la digestión de los hidratos de carbono, por ejemplo, polisacáridos, por catálisis de la conversión de los dos componentes del almidón (amilosa y amilopectina) en azúcares simples en el intestino delgado. Más específicamente, la amilasa hidroliza el almidón, el glucógeno y la dextrina para formar glucosa, maltosa y las dextrinas límite. Clínicamente, los niveles de amilasa en sangre se elevan con frecuencia en condiciones de pancreatitis aguda y a veces en condiciones de pancreatitis crónica. El término “amilasas no pancreáticas” se refiere a amilasas que no se purifican a partir de tejido pancreático humano ni animal. Según la presente invención, la amilasa, es amilasa de *Aspergillus oryzae*.

40 Las amilasas microbianas pueden aislarse de su fuente microbiana nativa o pueden ser amilasas microbianas recombinantes, producidas por medio de la tecnología del ADN recombinante por una célula hospedadora adecuada que se selecciona entre una cualquiera de células hospedadora de bacterias, levaduras, hongos, plantas, insectos o

mamíferos, en cultivo, preferentemente hongos. Las amilasas recombinantes abarcan o están codificadas por ácidos nucleicos de una secuencia de amilasa de origen natural. Además, las amilasas recombinantes incluyen una secuencia de aminoácidos que es homóloga o sustancialmente idéntica a una secuencia de origen natural, así como aquellas amilasas codificadas por un ácido nucleico que es homólogo o sustancialmente idéntico a un ácido nucleico codificante de amilasa de origen natural.

Los términos “dosis terapéuticamente efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” se refieren a aquella cantidad de una composición que tiene como resultado la prevención, el retraso del comienzo de los síntomas o la mejora de los síntomas de la enfermedad que ha de tratarse. Una cantidad terapéuticamente efectiva es aquella que es suficiente para tratar, prevenir, reducir la gravedad, retrasar el comienzo o reducir la ocurrencia de uno o más síntomas de la enfermedad que ha de tratarse. Las enfermedades que pueden tratarse usando las composiciones de esta invención incluyen, por ejemplo, la insuficiencia pancreática, la malabsorción y la mala digestión.

El término “unidad USP” se refiere a la unidad de la Farmacopea de los Estados Unidos de la actividad enzimática presente en un agente o composición. Una unidad USP de lipasa, proteasa o amilasa se define en *Pancrelipase*, USP, U. S. Pharmacopeia National Formulary, USP 24, págs. 1254-1255 (2000).

#### 15 Características de las composiciones de esta invención

Ventajosamente, las composiciones de la presente invención mejoran la absorción de la grasa, las proteínas y el almidón en los pacientes que sufren enfermedades como, por ejemplo, la insuficiencia pancreática, lo que lleva a una mejora de la nutrición y el crecimiento. Las composiciones retienen altos niveles de actividad específica en un entorno de ácido y pepsina. Este es el caso porque sus componentes enzimáticos resisten el ambiente ácido de la parte superior del tracto gastrointestinal, incluyendo el pH bajo del estómago y los niveles altos de proteasa del tracto gastrointestinal, lo que permite el suministro de las enzimas al intestino en forma activa. Como resultado, pueden administrarse en menores cantidades por dosis y mediante menos administraciones, en comparación con los suplementos de enzimas pancreáticas porcinas. Esto, a su vez, permite una mejora en el cumplimiento del paciente.

Además, las composiciones de la presente invención pueden administrarse a un sujeto sin necesidad de recubrimientos entéricos o la adición de agentes supresores de la acidez. Este es el caso porque los componentes enzimáticos de origen microbiano usados en diversas realizaciones de las composiciones de esta invención son más estables frente al ácido del estómago que las enzimas pancreáticas porcinas.

#### El componente de lipasa

El componente de lipasa de las composiciones de la presente invención es lipasa de *Burkholderia cepacia*.

Preferentemente, la lipasa es una lipasa estable en un entorno de pH ácido y/o es resistente a la degradación proteolítica. La lipasa se emplea también en una forma que mejore su estabilidad al pH ácido y/o su resistencia a la degradación proteolítica. Con este fin, la lipasa está en forma de cristales reticulados.

#### Cristalización de la lipasa

Los cristales de lipasa útiles en las composiciones de la presente invención pueden formarse usando procedimientos convencionales, como la cristalización por lotes. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 6.541.606. Alternativamente, los cristales de lipasa pueden formarse por precipitación controlada de la proteína a partir de una disolución acuosa o de una disolución acuosa que contiene disolventes orgánicos. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 5.618.710 y la solicitud de patente de los Estados Unidos 2003/0017144. Como apreciarán los expertos en la técnica, las condiciones que han de controlarse durante la cristalización incluyen, por ejemplo, la velocidad de evaporación del disolvente, la presencia de cosolutos y tampones apropiados, el pH y la temperatura.

Los cristales de lipasa pueden producirse por combinación de la enzima lipasa que ha de cristalizarse con un disolvente apropiado o un disolvente acuoso que contiene los agentes precipitantes apropiados, como sales o agentes orgánicos. El disolvente se combina con la lipasa y se somete opcionalmente a agitación a una temperatura que se ha determinado experimentalmente como apropiada para la inducción de la cristalización y aceptable para el mantenimiento de la estabilidad y la actividad de la proteína. Opcionalmente, el disolvente puede contener cosolutos, como cationes divalentes, cofactores o agentes caotrópicos, así como especies tamponantes para controlar el pH. La necesidad de cosolutos y sus concentraciones pueden determinarse experimentalmente para facilitar la cristalización. Para un proceso a escala industrial, la precipitación controlada que conduce a la cristalización puede llevarse a cabo de la mejor manera por la simple combinación de proteína, precipitante, cosolutos y, opcionalmente, tampones, en un proceso por lotes. Alternativamente, pueden usarse también procedimientos de cristalización de laboratorio, como diálisis o difusión de vapor. McPherson y col., *Methods Enzymol.*, 114, págs. 112-120 (1985) y Gilliland, *J. Crystal Growth*, 90, págs. 51-59 (1988) incluyen una lista exhaustiva de condiciones adecuadas en la bibliografía sobre cristalización. Ocasionalmente, la incompatibilidad entre el medio de cristalización y el reticulante puede hacer necesario el cambio del tampón o del disolvente antes de la reticulación.

La lipasa cristaliza en una serie de condiciones, incluyendo un intervalo de pH de aproximadamente 4-9. Los

precipitantes útiles para la preparación del componente de lipasa de las composiciones de la presente invención incluyen isopropanol, *tert*-butanol, 2-metil-2,4-pentadiol (MPD), sulfato de amonio, cloruro de sodio, cloruro de magnesio y otros conocidos por los expertos en la técnica. Las sales útiles incluyen cationes divalentes o monovalentes y sus sales.

- 5 Los cristales de lipasa útiles en las composiciones de esta invención pueden tener una dimensión longitudinal máxima entre aproximadamente 0,01  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ , alternativamente entre aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  o entre aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . Pueden tener una forma seleccionada del grupo compuesto por esferas, agujas, bastones, placas, como hexágonos y cuadrados, romboides, cubos, bipirámides y prismas.

#### 10 Reticulación de los cristales de lipasa

Una vez que los cristales de lipasa se han formado en un medio adecuado, es posible su reticulación. La reticulación resulta en la estabilización de la red cristalina mediante la introducción de enlaces covalentes entre las moléculas de proteína que constituyen el cristal. Esto hace posible la transferencia de la enzima a un entorno alternativo que, de lo contrario, para una enzima dada, podría ser incompatible con la existencia de la red cristalina o de la enzima intacta.

- 15 Como resultado de la reticulación de los cristales de lipasa, pueden alterarse la estabilidad enzimática (por ejemplo, la estabilidad al pH, a la temperatura, mecánica y/o química), el perfil de pH de la actividad lipasa, la solubilidad, la uniformidad del tamaño o del volumen del cristal, la velocidad de liberación de la lipasa del cristal y/o el tamaño y la forma de los poros entre moléculas de enzima individuales en la red cristalina subyacente.

- 20 Ventajosamente, la reticulación se lleva a cabo de tal manera que los cristales reticulados resultantes comprenden una lipasa que muestra al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7% o 99,9% o más de actividad lipasa, en comparación con la lipasa sin modificar. La estabilidad puede aumentarse en al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300% o más, en comparación con la lipasa sin modificar. La estabilidad puede medirse en condiciones de almacenamiento, por ejemplo, como estabilidad al pH, estabilidad a la temperatura, estabilidad frente a proteasas, incluyendo las proteasas gastrointestinales y Pronase™, estabilidad en disolución o como estabilidad biológica *in vivo*.

- 30 En ciertos casos, la reticulación de los cristales de lipasa ralentiza el paso de la lipasa a la disolución, inmovilizando eficazmente las moléculas de enzima en partículas microcristalinas. Con la exposición a un activador en el entorno que rodea a los cristales de lipasa reticulados, tal como condiciones de uso más bien que de almacenamiento, los cristales de lipasa se disuelven, liberando el polipéptido de lipasa y/o aumentando la actividad lipasa. La velocidad de disolución puede ser controlada por uno o más de los factores siguientes: el grado de reticulación, la duración del tiempo de exposición de los cristales de lipasa al agente reticulante, la velocidad de adición del agente reticulante a los cristales de lipasa, la naturaleza del reticulante, la longitud de cadena del reticulante, el pH, la temperatura, la presencia de reactivos sulfhidrilos, como cisteína o glutatión, el área superficial de los cristales de lipasa reticulados, el tamaño de los cristales de lipasa reticulados o la forma de los cristales de lipasa reticulados, por ejemplo.

- 35 Los cristales de lipasa pueden reticularse por medio de un agente reticulante o una combinación de estos, incluyendo agentes reticulantes multifuncionales, incluyendo reactivos bifuncionales, simultáneamente (en paralelo) o secuencialmente. En diversas realizaciones, las reticulaciones entre los cristales de lipasa se reducen o se debilitan con la exposición a un activador en el entorno circundante o en un período de tiempo dado, lo que conduce a la disolución de la lipasa o a la liberación de actividad. Alternativamente, las reticulaciones pueden romperse en el punto de unión, conduciendo a la disolución de la proteína o a la liberación de actividad. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos 5.976.529 y 6.140.475. La reticulación puede llevarse a cabo según cualquier técnica de reticulación convencional.

- 40 La concentración final de reticulante en los cristales de lipasa reticulados debería estar entre aproximadamente 0,001 mM y aproximadamente 300 mM, preferentemente entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 50 mM, lo más preferentemente entre aproximadamente 2,0 mM y aproximadamente 5,0 mM.

- 45 Según una realización preferida de esta invención, el agente reticulante es suberato de bis(sulfosuccinimidilo) ("BS<sup>3n</sup>"). Otros reticulantes útiles incluyen glutaraldehído, succinaldehído, octanodialdehído y glioxal. Agentes reticulantes multifuncionales adicionales incluyen halotriazinas, por ejemplo, cloruro cianúrico; halopirimidinas, por ejemplo, 2,4,6-tricloro/bromopirimidina; anhídridos o haluros de ácidos mono- o dicarboxílicos alifáticos o aromáticos, por ejemplo, anhídrido maleico, cloruro de (met)acrililo, cloruro de cloroacetilo; compuestos de *N*-metilol, por ejemplo, *N*-metilolcloroacetamida; diisocianatos o diisotiocianatos, por ejemplo, fenilen-1,4-diisocianato y aziridinas. Otros reticulantes incluyen epóxidos, como por ejemplo, diepóxidos, triepóxidos y tetraepóxidos. Para una lista representativa de otros reticulantes disponibles véase, por ejemplo, la edición de 2003-2004 del catálogo de la empresa Pierce Chemical. Otros ejemplos de reticulantes incluyen: 3,3'-ditiobispropionimidato de dimetilo · HCl (DTBP); ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP); bismaleimidohexano (BMH); 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DFDNB); suberimidato de dimetilo · 2HCl (DMS); glutarato de disuccinimidilo (DSG); tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST); clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC); etilenglicolbis(succinato de

sulfosuccinimidilo) (sulfo-EGS); éster de *N*-( $\gamma$ -maleimidobutiloxi)succinimida (GMBS); 4-azidobenzoato de *N*-hidroxisulfosuccinimidilo (sulfo-HSAB); 6-[ $\alpha$ -metil- $\alpha$ -(2-piridilditio)toluamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SMPT); disulfuro de bis-[ $\beta$ -(4-azidosalicilamido)etilo (BASED) y NHS-PEG-vinilsulfona (NHS-PEG-VS).

5 También pueden usarse reticulantes reversibles. Tales reticulantes reversibles son reticulantes multifuncionales en los que se incorpora un activador como grupo separado. La funcionalidad reactiva está implicada en enlazar cadenas laterales aminoacídicas reactivas en una proteína y el activador consta de un enlace que puede romperse por alteración de una o más condiciones en el entorno circundante (por ejemplo, el pH, la presencia de un agente reductor, la temperatura o la actividad termodinámica del agua).

10 El reticulante puede ser homofuncional o heterofuncional. La funcionalidad (o fracción) reactiva puede elegirse, por ejemplo, entre uno de los grupos funcionales siguientes (en los que R, R', R'' y R''' pueden ser grupos alquilo, arilo o hidrógeno):

15 I. Donadores de acilo reactivos como, por ejemplo: ésteres de carboxilato RCOOR', amidas RCONHR', acilazidas RCON<sub>3</sub>, carbodiimidas R-N=C=N-R', ésteres de *N*-hidroximida RCO-O-NR', imidoésteres R-C=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>(OR'), anhídridos RCO-C-COR', carbonatos RO-CO-O-R', uretanos RNHCONHR', haluros de ácido RCOHal (donde Hal es un halógeno), acilhidrazidas RCONNR''R'' y *O*-acilisoureas RCO-O-C=NR'(-NR''R''').

II. Grupos carbonilo reactivos como, por ejemplo: aldehídos RCHO y cetonas RCOR', acetales RCO(H<sub>2</sub>)R' y cetales RR'CO<sub>2</sub>R'' (grupos funcionales reactivos que contienen carbonilo conocidos por los expertos en la técnica de inmovilización de proteínas y reticulación (Pierce Catalog and Handbook, empresa Pierce Chemical 2003-2004; S. S. Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, (1991))).

20 III. Donadores de alquilo o arilo como, por ejemplo: haluros de alquilo o arilo R-Hal, azidas R-N<sub>3</sub>, ésteres de sulfato RSO<sub>3</sub>R', ésteres de fosfato RPO(OR'<sub>3</sub>), sales de alquiloxonio R<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, sulfonio R<sub>3</sub>S<sup>+</sup>, ésteres de nitrato RONO<sub>2</sub>, aceptores de Michael RCR'=CR'''COR'', fluoruros de arilo ArF, isonitrilos RN<sup>+</sup>≡C-, haloaminas R<sub>2</sub>N-Hal, alquenos y alquinos.

IV. Grupos que contienen azufre como, por ejemplo: disulfuros RSSR', sulfhidrilos RSH y epóxidos R<sub>2</sub>COCR'<sub>2</sub>.

25 V. Sales como, por ejemplo: sales de alquil- o arilamonio R<sub>4</sub>N<sup>+</sup>, carboxilatos RCOO<sup>-</sup>, sulfatos ROSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, fosfatos ROPO<sub>3</sub> y aminas R<sub>3</sub>N.

30 Los reticulantes reversibles, por ejemplo, comprenden un activador. Un activador incluye un alquilo, arilo u otra cadena con un grupo activador que puede reaccionar con la proteína que se ha de reticular. Estos grupos reactivos pueden ser una diversidad de grupos, como aquellos susceptibles de desplazamiento nucleófilo, por radicales libres o electrófilo, incluyendo haluros, aldehídos, carbonatos, uretanos, xantanos y epóxidos, entre otros. Por ejemplo, los grupos reactivos pueden ser lábiles a ácido, base, fluoruro, enzima, reducción, oxidación, tiol, metal, fotólisis, radical o calor.

35 El cristal de lipasa reticulado puede suministrarse en forma de polvo, por ejemplo, por liofilización o por pulverización en seco. La liofilización o criodesecación permite la separación del agua de la composición, produciendo un cristal que puede almacenarse a temperatura sin refrigeración (ambiente) durante períodos prolongados y que después se reconstituye fácilmente en disolventes acuosos, orgánicos o mixtos acuosos-orgánicos según se elija, sin la formación de suspensiones amorfas y con un riesgo mínimo de desnaturalización. Carpenter y col., *Pharm. Res.*, 14, págs. 969-975 (1997). La liofilización puede llevarse a cabo como se describe en la patente de los Estados Unidos 5.618.710 o por cualquier otro procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, el cristal de lipasa reticulado se congela en primer lugar y después se somete a alto vacío, en el que el agua cristalina se sublima, dejando atrás un cristal de lipasa que solamente contiene las moléculas de agua firmemente unidas.

#### Características de los cristales de lipasa reticulados

45 La actividad enzimática de los cristales de lipasa reticulados puede medirse mediante cualquier procedimiento convencional. Por ejemplo, la actividad lipasa puede determinarse espectrofotométricamente como se describe en el ejemplo 6 de la patente de los Estados Unidos 5.618.710. La actividad lipasa puede evaluarse mediante la monitorización de la hidrólisis del sustrato acetato de *p*-nitrofenilo. La escisión del sustrato se monitoriza por el aumento de la absorbancia a 400 nm, con una concentración inicial de sustrato del 0,005% y una concentración inicial de enzima de 1,5 x 10<sup>-8</sup> M. La enzima lipasa se añade a un volumen de reacción de 5 ml que contiene el sustrato en Tris 0,2 M pH 7,0 a temperatura ambiente. La lipasa cristalina se retira de la mezcla de reacción por centrifugación antes de medir la absorbancia.

50 Alternativamente, la actividad lipasa puede medirse *in vitro* por hidrólisis de aceite de oliva, como se describe en los ejemplos 2-4 de la patente de los Estados Unidos 5.614.189.

La actividad lipasa puede medirse también *in vivo*. Por ejemplo, un pequeño volumen (aproximadamente 3 ml) de aceite de oliva o de aceite de maíz puede marcarse con <sup>99</sup>Tc(V)-tiocianato y la lipasa cristalina puede marcarse con

<sup>111</sup>In. La grasa marcada se mezcla con pienso animal sobre el que se ha rociado la lipasa cristalina marcada. Se obtienen imágenes escintigráficas del estómago y del intestino delgado proximales y distales, hasta que queda menos del 5% de actividad en el estómago. Entonces se determinan las curvas de vaciado para cada uno de los isótopos (por ejemplo, el porcentaje de retención en el estómago a lo largo del tiempo) y las cantidades de los isótopos que entran en el intestino delgado proximal, medio y distal desde las respectivas regiones de interés.

Preferentemente, el componente de lipasa reticulado de las composiciones de la presente invención tiene una alta actividad específica. Típicamente, una lipasa de alta actividad específica es aquella que muestra una actividad específica frente a trioleína (aceite de oliva) superior a 500, 1.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000 o más unidades/mg de proteína.

Preferentemente, el componente de lipasa reticulado de las composiciones de la presente invención también es estable durante un periodo de tiempo prolongado en el duro entorno que se encuentra en las regiones gastrointestinales, es decir, en las regiones gástrica, duodenal e intestinal. Por ejemplo, la lipasa es preferentemente estable durante al menos una hora en pH ácido, por ejemplo, un entorno en el que el pH es inferior a 7, 6, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 o menos. Como se usa en este documento, "estable" significa que el cristal de lipasa es más activo que la forma soluble de la lipasa para una condición y tiempo dados. Así, un cristal de lipasa estable retiene un porcentaje de su actividad inicial mayor que la correspondiente forma soluble de la lipasa. En algunas realizaciones, el cristal de lipasa retiene al menos el 10% de su actividad después de su exposición a las condiciones y el tiempo dados. En otras realizaciones, la lipasa retiene al menos el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de su actividad.

Alternativamente, o adicionalmente, el componente de cristal de lipasa reticulado de las composiciones de esta invención es resistente al calor. Por ejemplo, en diversas realizaciones es estable durante al menos una hora a 30°C, 37°C o 40°C.

#### El componente de proteasa

El componente de proteasa de las composiciones de la presente invención es proteasa de *Aspergillus melleus*. Según una realización preferida, el componente de proteasa de las composiciones de la presente invención está en forma cristalizada, sin reticular. Los cristales de proteasa pueden prepararse según las técnicas de cristalización descritas anteriormente para la lipasa, usando, por ejemplo, etanol como precipitante.

#### El componente de amilasa

El componente de amilasa de las composiciones de la presente invención es *Aspergillus oryzae*, en forma amorfa, o recubierto, o encapsulado o formulado de otra manera de modo que retenga su actividad después de su administración por vía oral.

#### Composiciones que comprenden cristales de lipasa reticulados, una proteasa y una amilasa

Las composiciones según la presente invención incluyen aquellas que comprenden cristales de lipasa microbiana reticulados, una proteasa microbiana y una amilasa microbiana en una proporción de aproximadamente 1,0:1,0:0,15 unidades USP de actividad enzimática como se reivindica en la reivindicación 1, junto con uno o más excipientes. Con la máxima preferencia, la composición comprende cristales de lipasa de *Burkholderia cepacia* reticulados con el reticulante BS<sup>3</sup>, cristales de proteasa de *Aspergillus melleus* y amilasa de *Aspergillus oryzae* amorfa en una proporción de aproximadamente 1,0:1,0:0,15 unidades USP de actividad enzimática.

La reticulación del componente de lipasa de las composiciones de esta invención proporciona una estabilidad añadida a valores de pH extremos y protección frente a proteólisis, mientras que los componentes de proteasa y amilasa mantienen una solubilidad máxima para su disolución eficaz. Más particularmente, la cristalización y la reticulación del componente de lipasa ayudan a proporcionar una composición con una actividad enzimática mejorada a dosis más bajas. La forma de cristal de la proteasa también ayuda a proporcionar una mejora de la estabilidad enzimática, la pureza y la potencia.

E, independientemente de su forma, una o las dos de proteasa y amilasa pueden estar reticuladas.

Ventajosamente, las composiciones de la presente invención conducen a incrementos correlacionados del coeficiente de absorción de grasa y del coeficiente de absorción de nitrógeno en pacientes tratados con ellas. Además, las composiciones de esta invención incluyen un nivel de amilasa que produce un aumento de la digestión de almidón y de la absorción de hidratos de carbono en estos pacientes. Por la presente invención, se ha descubierto que un efecto tal en la digestión de almidón y en la absorción de hidratos de carbono puede conseguirse mediante cantidades mucho menores de amilasa, respecto a las de lipasa y proteasa, que las de los suplementos pancreáticos porcinos. Este descubrimiento se opone a la creencia de la técnica de que la amilasa no es necesaria para el tratamiento de la insuficiencia pancreática, en particular en pacientes de fibrosis quística.

Los excipientes útiles en las composiciones según esta invención actúan como una sustancia de relleno o una combinación de sustancias de relleno, como las usadas en las composiciones farmacéuticas. En una realización

preferida de esta invención, el excipiente comprende celulosa microcristalina, Maltrin, crospovidona, dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio y talco. Otro grupo preferido de excipientes incluye uno o una mezcla de: sacarosa, trehalosa, lactosa, sorbitol, lactitol, manitol, inositol, sales de sodio y potasio como acetato, fosfatos, citratos y borato, glicina, arginina, óxido de polietileno, alcohol polivinílico, polietilenglicol, hexilenglicol, metoxipolietilenglicol, gelatina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, polilisina y poliarginina.

Otros excipientes preferidos pueden ser uno cualquiera o una mezcla de: 1) aminoácidos, como glicina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, asparagina, glutamina, prolina; 2) hidratos de carbono, por ejemplo, monosacáridos como glucosa, fructosa, galactosa, manosa, arabinosa, xilosa, ribosa; 3) disacáridos como lactosa, trehalosa, maltosa, sacarosa; 4) polisacáridos como maltodextrinas, dextranos, almidón, glucógeno; 5) alditoles como manitol, xilitol, lactitol, sorbitol; 6) ácido glucurónico, ácido galacturónico; 7) ciclodextrinas como metilciclodextrina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y similares; 8) moléculas inorgánicas como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, fosfatos de sodio y potasio, ácido bórico, carbonato de amonio y fosfato de amonio; 9) moléculas orgánicas como acetatos, citrato, ascorbato, lactato; 10) agentes emulsionantes o solubilizantes/estabilizantes como goma de acacia, dietanolamina, monoestearato de glicerina, lecitina, monoetanolamina, ácido oléico, alcohol oleílico, poloxámero, polisorbatos, laurilsulfato de sodio, ácido esteárico, monolaurato de sorbitano, monoestearato de sorbitano y otros derivados de sorbitano, derivados de polioxilo, cera, derivados de polioxietileno, derivados de sorbitano; y 11) reactivos de aumento de la viscosidad como agar, ácido alginico y sus sales, goma guar, pectina, alcohol polivinílico, óxido de polietileno, celulosa y sus derivados, carbonato de propileno, polietilenglicol, hexilenglicol, tiloxapol. También pueden usarse sales de estos compuestos.

Otros ejemplos adicionales de excipientes se describen en el manual *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, publicado conjuntamente por la Asociación Farmacéutica Americana y la Sociedad Farmacéutica de Gran Bretaña. Con respecto a las composiciones, según esta invención, los excipientes son ingredientes inactivos y la lipasa, la proteasa y la amilasa son los principios activos. La proporción entre los principios activos y los ingredientes inactivos (p/p) en las composiciones de esta invención puede ser de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 9:1, preferentemente de aproximadamente 1:6 a aproximadamente 6:1.

En una realización alternativa de esta invención, uno cualquiera de los componentes de lipasa, proteasa o amilasa puede estar presente en la composición en asociación con un vehículo polimérico. Esto proporciona una composición resistente a ácidos de liberación controlada que permite la administración de la enzima en cantidades efectivas y a bajas dosis al intestino, es decir, al intestino distal, después de la ingestión por vía oral.

Los vehículos poliméricos útiles incluyen, por ejemplo, polímeros usados para la encapsulación de cristales de proteína para la administración de proteínas, incluyendo la administración biológica de liberación controlada. Tales polímeros incluyen polímeros biocompatibles y biodegradables o mezclas de estos. Preferentemente, el vehículo polimérico es un polímero biodegradable. La velocidad de disolución y, por lo tanto, de administración de las enzimas estará determinada por la técnica de encapsulación particular, la composición del polímero, la reticulación del polímero, el espesor del polímero, la estabilidad del polímero, la geometría del cristal de la enzima y el grado de reticulación de la enzima, dado el caso. Según una realización, las composiciones de esta invención están encapsuladas dentro de una matriz del vehículo polimérico, lo que proporciona una protección adicional para los componentes de lipasa, proteasa y amilasa frente al duro entorno del tracto gastrointestinal.

#### Vías de dosificación de la composición, formas, regímenes y procedimientos de tratamiento

Según una realización preferida, las composiciones de esta invención son útiles para el tratamiento de la insuficiencia pancreática en cualquier sujeto, incluyendo aquellos que sufren fibrosis quística. Según una realización alternativa, las composiciones de esta invención son útiles en métodos para el tratamiento de la malabsorción en un sujeto. Otras realizaciones de esta invención incluyen el uso de las composiciones de esta invención para aumentar el coeficiente de absorción de grasa o para aumentar el coeficiente de absorción de nitrógeno en un sujeto. Otra realización de esta invención incluye el uso de estas composiciones para aumentar tanto el coeficiente de absorción de grasa como el coeficiente de absorción de nitrógeno en un sujeto, opcionalmente en la misma cantidad. En otra realización, las composiciones de esta invención son útiles para aumentar la absorción de hidratos de carbono en un sujeto.

El uso de las composiciones según esta invención comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición tal. Cualquiera de las composiciones de esta invención puede usarse para tratar a cualquier sujeto que sufra insuficiencia pancreática, incluyendo los pacientes de fibrosis quística. De manera similar, cualquiera de estas composiciones puede usarse para tratar a cualquier paciente de fibrosis quística.

El uso de las composiciones según esta invención incluye la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de esta invención, en el que esa cantidad terapéuticamente efectiva aumenta el coeficiente de absorción de grasa en ese sujeto en una cantidad entre aproximadamente el 30% y aproximadamente el 35% sobre el nivel inicial, cuando el coeficiente de absorción de grasa inicial en dicho sujeto es inferior o igual al 40%. Preferentemente, el aumento del coeficiente de absorción de grasa en un sujeto tal es de aproximadamente el 30% sobre el nivel inicial. En una realización alternativa, el uso comprende la administración a

un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de esta invención, en el que esa cantidad terapéuticamente efectiva aumenta el coeficiente de absorción de grasa en ese sujeto en una cantidad entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 25% sobre el nivel inicial, cuando el coeficiente de absorción de grasa inicial en ese sujeto es superior al 40% pero inferior al 85%. Preferentemente, el aumento del coeficiente de absorción de grasa en un sujeto tal es de aproximadamente el 15% sobre el nivel inicial.

Adicionalmente, el uso de las composiciones según esta invención incluye aquellos que comprenden la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de esta invención, en el que esa cantidad terapéuticamente efectiva aumenta el coeficiente de absorción de nitrógeno en ese sujeto en una cantidad entre aproximadamente el 30% y aproximadamente el 35% sobre el nivel inicial, cuando el coeficiente de absorción de nitrógeno inicial en dicho sujeto es inferior o igual al 40%. Preferentemente, el aumento del coeficiente de absorción de nitrógeno en un sujeto tal es de aproximadamente el 30% sobre el nivel inicial. En una realización alternativa, los usos comprenden la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de esta invención, en los que esa cantidad terapéuticamente efectiva aumenta el coeficiente de absorción de nitrógeno en ese sujeto en una cantidad entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 25% sobre el nivel inicial, cuando el coeficiente de absorción de nitrógeno inicial en ese sujeto es superior al 40% pero inferior al 85%. Preferentemente, el aumento del coeficiente de absorción de nitrógeno en un sujeto tal es de aproximadamente el 15% sobre el nivel inicial.

En otra realización, el uso de composiciones según esta invención comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de esta invención, en el que esa cantidad terapéuticamente efectiva aumenta la absorción de hidratos de carbono en ese sujeto en un grado superior o igual a aproximadamente el 10% sobre el nivel inicial. En otra realización, tales usos incluyen aquellos en los que la cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de esta invención es aquella que aumenta la absorción de hidratos de carbono en ese sujeto en un grado superior o igual a aproximadamente el 20% sobre el nivel inicial. Como se mide en este documento, un aumento del 10% en la absorción de hidratos de carbono supone 90 calorías (~377 J) más por día. Después de 365 días se habrán absorbido un total de 32.850 calorías (~138 kJ) adicionales por año. Dado que se necesitan aproximadamente 3.500 calorías (~15 kJ) para ganar 450 g, un aumento del 10% en la absorción de hidratos de carbono en un sujeto podría suponer, por lo tanto, la ganancia de algo más de 4 kg por año.

Las composiciones según la presente invención pueden formularse para cualquier vía de administración convencional, incluyendo la administración por vía del tracto gastrointestinal superior, por ejemplo, la boca (por ejemplo en cápsulas, comprimidos, suspensiones, o con el alimento) o el estómago o la parte superior del intestino (por ejemplo, mediante tubo o infusión), vía oral. Preferentemente, las composiciones se formulan para su administración por vía oral. Por consiguiente, la composición puede estar en cualquier forma de dosificación, incluyendo aquellas de un sólido, un líquido, una suspensión o una dispersión como, por ejemplo, una cápsula, un comprimido, un comprimido oblongo, un sobre o una gragea. Para niños y bebés o para cualquier adulto incapaz de tomar comprimidos o cápsulas, las composiciones se administran en forma líquida, en suspensión o en sobres y pueden administrarse con otros alimentos o productos compatibles.

En una realización de esta invención, las composiciones según esta invención se administran a un sujeto en el momento de una comida o tentempié en una o más cápsulas, suspensiones o sobres. Preferentemente, las composiciones de esta invención se administran al sujeto en una o dos cápsulas, suspensiones o sobres por comida o tentempié. Las composiciones pueden administrarse después de haber consumido la mitad de la comida o el tentempié. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición para el tratamiento de la insuficiencia pancreática según la presente invención comprende lipasa, proteasa y amilasa en una proporción de aproximadamente 1:1:0,15 unidades USP de actividad enzimática y, por dosis, comprende: un nivel de lipasa activa de entre aproximadamente 5.000 unidades USP y aproximadamente 100.000 unidades USP, un nivel de proteasa activa de entre aproximadamente 5.000 unidades USP y aproximadamente 100.000 unidades USP y un nivel de amilasa activa de entre aproximadamente 750 unidades USP y aproximadamente 15.000 unidades USP. Más preferentemente, tales composiciones comprenden lipasa, proteasa y amilasa en una proporción de aproximadamente 1:1:0,15 unidades USP de actividad enzimática y, por dosis, comprenden: un nivel de lipasa activa de entre aproximadamente 25.000 unidades USP y aproximadamente 100.000 unidades USP, un nivel de proteasa activa de entre aproximadamente 25.000 unidades USP y aproximadamente 100.000 unidades USP y un nivel de amilasa activa de entre aproximadamente 3.750 unidades USP y aproximadamente 15.000 unidades USP. Lo más preferentemente, tales composiciones comprenden lipasa, proteasa y amilasa en una proporción de aproximadamente 1:1:0,15 unidades USP de actividad enzimática y, por dosis, comprenden: un nivel de lipasa activa de aproximadamente 25.000 unidades USP, un nivel de proteasa activa de aproximadamente 25.000 unidades USP y un nivel de amilasa activa de aproximadamente 3.750 unidades USP.

Para niños, las composiciones según esta invención comprenden lipasa, proteasa y amilasa en una proporción de aproximadamente 1:1:0,15 unidades USP de actividad enzimática y, por dosis, comprenden: un nivel de lipasa activa de entre aproximadamente 12.500 unidades USP y aproximadamente 25.000 unidades USP, un nivel de proteasa activa de entre aproximadamente 12.500 unidades USP y aproximadamente 25.000 unidades USP y un nivel de amilasa activa de entre aproximadamente 1.875 unidades USP y aproximadamente 3.750 unidades USP. Para bebés, estas composiciones comprenden lipasa, proteasa y amilasa en una proporción de aproximadamente 1:1:0,15 unidades USP de actividad enzimática y, por dosis, comprenden: un nivel de lipasa activa de entre

aproximadamente 500 unidades USP y aproximadamente 1.000 unidades USP, un nivel de proteasa activa de entre aproximadamente 500 unidades USP y aproximadamente 1.000 unidades USP y un nivel de amilasa activa de entre aproximadamente 75 unidades USP y aproximadamente 150 unidades USP. Para todos los valores e intervalos de unidades de actividad enzimática discutidos en este documento, una unidad de lipasa, proteasa o amilasa se define según los ensayos expuestos anteriormente para la enzima respectiva. Las cantidades descritas anteriormente son también, respectivamente, cantidades terapéuticamente efectivas para el tratamiento de la malabsorción o la mala digestión en adultos, niños o bebés; o para el aumento de cualquiera de entre el coeficiente de absorción de grasa, el coeficiente de absorción de nitrógeno, la absorción de hidratos de carbono o la digestión de almidón en adultos, niños o bebés.

El modo más efectivo de administración y la pauta posológica de las composiciones según esta invención dependerá del efecto deseado, el tratamiento previo, dado el caso, el estado de salud del sujeto o el estado de la enfermedad misma, la respuesta al tratamiento y el juicio del médico que aplica el tratamiento.

Ante una mejoría del estado del sujeto, puede adoptarse un régimen de mantenimiento, según se necesite. Posteriormente pueden reducirse la dosis o la frecuencia de administración o ambas, en función de los síntomas, hasta un nivel en el que se mantenga el estado de mejoría. Sin embargo, los sujetos pueden requerir un tratamiento intermitente a largo plazo si se produce una reaparición de las enfermedades o de los síntomas de estas.

Con el fin de que esta invención pueda entenderse mejor se exponen los ejemplos siguientes. Estos ejemplos solamente tienen un propósito ilustrativo y no han de interpretarse como limitantes del alcance de la invención en ningún modo.

## 20 Ejemplos

Los ejemplos siguientes se refieren a composiciones según la presente invención, así como a estudios clínicos que evalúan su seguridad y eficacia para el tratamiento de la insuficiencia pancreática. Estos estudios incluyeron ensayos clínicos de fase I y de fase II en pacientes de fibrosis quística con insuficiencia pancreática.

El estudio de fase II evaluó la eficacia de las composiciones según esta invención, medida por los cambios en: el coeficiente de absorción de grasa ("CFA"), el coeficiente de absorción de nitrógeno ("CNA"), la absorción de hidratos de carbono por vía oral, el peso de las deposiciones diarias, el número de deposiciones al día y la calidad de vida, en términos de síntomas gastrointestinales, medidos mediante el Cuestionario de Fibrosis Quística ("CFQ"). El estudio evaluó también la dosificación de estas composiciones que proporciona el máximo grado de mejora clínicamente significativa del coeficiente de absorción de grasa sobre el nivel inicial (sin enzimas) en los sujetos tratados.

Como se demuestra en el estudio de fase II, las composiciones según la presente invención proporcionaron un aumento estadísticamente significativo del CFA y del CNA medios desde el período inicial al período de tratamiento en pacientes de fibrosis quística con insuficiencia pancreática. Se encontró que las composiciones según esta invención fueron eficaces a una dosis mínima de 25.000 unidades USP de lipasa, 25.000 unidades USP de proteasa y 3.750 unidades USP de amilasa por cápsula ("la dosis media" o el "grupo 2" del estudio), y condujeron a un aumento significativo ( $\geq 10\%$ ) tanto del CFA como del CNA en la mayoría de los sujetos. El CFA y el CNA también aumentaron cuando la dosis de tratamiento contuvo lipasa, proteasa y amilasa en una proporción de 100.000:100.000:15.000 unidades USP de actividad enzimática por cápsula ("la dosis superior" del "grupo 3" del estudio). Sin embargo, no se observó una diferencia estadística entre las pautas de dosis media y dosis superior ni con respecto a CFA ni a CNA. Las composiciones según esta invención y usadas en el estudio de fase II incluyen también aquellas administradas a una dosis de 5.000 unidades USP de lipasa, 5.000 unidades USP de proteasa y 750 unidades USP de amilasa por cápsula (la "dosis baja" o el "grupo 1" del estudio).

Ventajosamente, incluso después de considerar los valores iniciales del CFA y el CNA y el género de los sujetos tratados, este efecto de las composiciones según esta invención sobre el CFA y el CNA siguió siendo estadísticamente significativo ( $p = 0,0003$  y  $< 0,0001$ , respectivamente, para los grupos de tratamiento de dosis media y dosis superior). Cuando el CFA y el CNA se examinaron como cuartiles separados (figuras 1 y 2), los mayores cambios se observaron en aquellos sujetos con valores iniciales  $< 40\%$  y cambios proporcionalmente menores se observaron en los sujetos con CFA y el CNA iniciales  $> 40\%$ . Con respecto al CFA, el aumento medio en el grupo de tratamiento de dosis media de los ocho sujetos con un CFA inicial  $\leq 40\%$  fue del 35,3%. El aumento medio en el grupo de dosis superior de 12 sujetos con un CFA inicial  $\leq 40\%$  fue del 30,4%. El aumento global del CFA en 20 sujetos con un CFA inicial  $\leq 40\%$  para los grupos de tratamiento de dosis media y de dosis superior fue del 32,3%.

Las composiciones según esta invención produjeron también un efecto significativo del tratamiento, medido en términos del cambio en el número y peso de las deposiciones diarias en los sujetos tratados. Los sujetos que recibieron la dosis superior mostraron una disminución significativa del número de deposiciones desde el período inicial al período de tratamiento, mientras que la disminución del peso de las deposiciones fue estadísticamente significativa para los grupos de tratamiento de dosis media y de dosis superior. De hecho, hubo una correlación inversa altamente significativa ( $R = -0,7283$ ;  $p < 0,0001$ ) entre el cambio en la absorción de grasa y el cambio en el

peso de las deposiciones. A este respecto, por lo tanto, la dosis superior (grupo 3) del estudio no difirió significativamente de la dosis media (grupo 2).

En todos los sujetos del estudio, aunque no se notaron cambios globales estadísticamente significativos en la prueba de exposición a almidón con y sin enzimas, el efecto observado en los sujetos tratados con la dosis superior, tanto en el cambio máximo del nivel de glucosa como en el área bajo la curva ("AUC") tendieron ( $p < 0,057$ ) en una dirección que sugirió una actividad amilasa. Además, un análisis *ad hoc* mediante la prueba exacta de Fisher mostró que, basándose en una comparación de los períodos de tratamiento sin y con enzimas ( $p = 0,0138$ ), más sujetos experimentaron un aumento  $\geq 10\%$  en el cambio máximo del nivel de glucosa después de la prueba de exposición a almidón en el grupo de dosis media y en el grupo de dosis superior que en el grupo de tratamiento de dosis inferior. Estos resultados demuestran que la amilasa funciona como un componente importante de las composiciones de esta invención, que conduce a la mejora de la digestión del almidón y de la absorción de los hidratos de carbono.

No se describieron sucesos adversos graves en sujetos tratados con las composiciones según esta invención, que se toleraron bien a todos los niveles de dosificación en el estudio de fase II. No se produjo el fallecimiento de ningún sujeto en el curso de este estudio.

#### 15 Ejemplo 1 – Preparación de las composiciones del estudio

Las composiciones usadas en los estudios de fase I y de fase II discutidos en este documento comprendieron lipasa, proteasa y amilasa, cada una de las cuales se preparó separadamente en condiciones controladas a partir de cepas microbianas diferentes antes de su aislamiento, purificación y secado. La preparación se llevó a cabo de modo que se proporcionaran composiciones que fueran estables y mantuvieran una actividad enzimática potente dentro del intestino delgado.

Lipasa: los procedimientos para la producción y la purificación de lipasa a partir de bacterias son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el componente de lipasa de las composiciones se produjo a través de la fermentación de la bacteria *Burkholderia cepacia* (conocida anteriormente como *Pseudomonas cepacia*). La fermentación tuvo lugar en un fermentador de 25.000 litros. La cepa se obtuvo de un banco de células patrón congeladas y liofilizadas, se hizo crecer en superficie inclinada, se incubó en ocho litros de cultivo de siembra, después se dejó fermentar en un fermentador de siembra de 2.500 litros y, por último, se realizó la producción en el fermentador de 25.000 litros. Después de la fermentación, los organismos viables se destruyeron mediante tratamiento térmico y se eliminaron por centrifugación. La proteína se concentró por evaporación, seguida de precipitación con etanol y lavado con etanol en una centrifuga de cesta.

Una lipasa más purificada se generó por precipitación con sulfato de amonio, adsorción y elución con DEAE-celulosa y posterior refinado, concentración y desalinización por ultrafiltración. El material resultante se purificó adicionalmente por tratamiento con acetona y CM-celulosa y después se le añadió glicina como agente estabilizante. El material resultante se filtró por membrana y después se liofilizó. Entonces, el material se tamizó y se analizó su actividad específica, su pureza y la ausencia de patógenos.

La lipasa purificada se procesó posteriormente por diafiltración con el fin de eliminar el estabilizante de glicina. Después se precipitó y se cristalizó en *tert*-butanol al 25%, a lo que siguió la reticulación con BS<sup>3</sup> con los intervalos de concentración descritos anteriormente, preferentemente de modo que la concentración final de reticulante en los cristales de lipasa reticulados estuviera en el intervalo entre aproximadamente 2,0 mM y aproximadamente 5,0 mM. Los cristales de lipasa reticulados se lavaron con cinco volúmenes de tampón de etanol al 15%, a lo que siguió un lavado adicional con cinco volúmenes de tampón de etanol al 15% (con acetato de calcio 1,5 mM, pH 5,0), con el fin de reducir la cantidad residual de reticulante y *tert*-butanol. El material resultante se liofilizó y envasó para su envío en botellas de HPDE cerradas con cinta, empaquetadas en una bolsa de PE con un desecante de gel de sílice. Cada lote se analizó específicamente en cuanto a la contaminación microbiológica con *Burkholderia cepacia* además de otros microorganismos y debió dar un resultado negativo para *Burkholderia cepacia* y microorganismos patógenos antes de autorizarse su uso clínico.

Proteasa: los procedimientos para la producción y la purificación de proteasa son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la proteasa se produjo por fermentación sólida de *Aspergillus melleus*. El cultivo de siembra se hizo crecer en disolución y luego se transfirió al salvado de trigo. Una vez que el cultivo de siembra hubo recubierto el salvado esterilizado, los sólidos se cargaron en bandejas para su fermentación en salas de fermentación. Después de finalizar la fermentación, la enzima se extrajo de la biomasa sólida por perfusión de agua a través de tanques de extracción de gran tamaño.

Después, el extracto que contenía la proteasa se hizo pasar a través de lechos de carbón y se filtró para eliminar las partículas en suspensión. La disolución se concentró luego y se trató con carbón una segunda vez. La proteasa se precipitó con etanol y después se secó al vacío para su purificación final.

La proteasa se disolvió y después se pasó a través de una resina de intercambio iónico. El material se filtró a continuación antes de transferirlo a los tanques de cristalización, donde se cristalizó con adiciones múltiples de etanol. Una vez finalizada la cristalización, los cristales se recuperaron en una centrifuga de cesta y se lavaron con más etanol. Los cristales se recuperaron de la centrifuga de cesta y se secaron con aire forzado, seguido de secado

al vacío. Una vez seco, el polvo se transfirió a contenedores graneleros para su tamizado y envasado final.

**Amilasa:** los procedimientos para la producción y la purificación de amilasa son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la amilasa se produjo por fermentación sólida de *Aspergillus oryzae*. El cultivo de siembra se hizo crecer en disolución y luego se transfirió al salvado de trigo. Una vez que el cultivo de siembra hubo recubierto el salvado esterilizado, los sólidos se cargaron en bandejas para su fermentación. Después de haber finalizado la fermentación, la enzima se extrajo de la biomasa sólida por perfusión de agua a través de tanques de extracción. Luego, el extracto filtrado se concentró y se diafiltró. A esta diafiltración le siguió un tratamiento térmico y un ajuste del pH, seguidos de otra diafiltración y concentración. Después, antes del secado por pulverización, se añadió gelatina de pescado al material como estabilizante, que representa hasta el 30% del peso total del producto. Una vez seco, el material se tamizó, se mezcló con dextrina y se envasó. La dextrina se utilizó como estabilizante para el almacenamiento a largo plazo y podría representar hasta el 30% del peso total del producto final. La proteína en los principios farmacéuticamente activos resultantes fue de una pureza superior al 90% según determinación por SEC HPLC, con detección a 280 nm. Este 90% no tiene en cuenta la presencia de gelatina o dextrina como excipientes; ninguno de los excipientes tuvo una absorbancia significativa a 280 nm. Después de haberse purificado y procesado, la lipasa, la proteasa y la amilasa se formularon conjuntamente como cápsulas. Más en particular, las enzimas secas se mezclaron en seco (con excipientes) y se introdujeron en cápsulas de gelatina. Las composiciones se denominaron TheraCLEC™.

**Ejemplo 2 – El estudio de fase II**

**Dosis de tratamiento**

Las composiciones usadas en el estudio de fase II comprendieron principios activos de cristales de lipasa reticulados de *Burkholderia cepacia*, cristales de proteasa de *Aspergillus melleus* y amilasa soluble de *Aspergillus oryzae* y los siguientes ingredientes inactivos: celulosa microcristalina, Maltrin, crospovidona, dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio y talco. Dichas composiciones contenían lipasa, proteasa y amilasa en una proporción de 1:1:0,15 unidades USP de actividad enzimática.

Las composiciones se administraron en forma de cápsulas de dos concentraciones diferentes. La formulación de mayor concentración, denominada “TCT20”, se introdujo en cápsulas de gelatina dura, blancas y opacas del tamaño 2, con una concentración de 20.000 unidades USP de lipasa, 20.000 unidades USP de proteasa y 3.000 unidades USP de amilasa. La formulación de menor concentración, denominada “TCT5”, se introdujo en cápsulas de gelatina dura, blancas y opacas del tamaño 5, con una concentración de 5.000 unidades USP de lipasa, 5.000 unidades USP de proteasa y 750 unidades USP de amilasa. La proporción entre los ingredientes activos e inactivos (p/p) fue de 3:4 para TCT20 y de 2:5 para TCT5.

En el estudio de fase II se usaron cápsulas de placebo de tamaños 2 y 5 para enmascarar la dosis de TheraCLEC™. Las cápsulas de placebo contenían los mismos ingredientes inactivos que las cápsulas de TheraCLEC™ y tenían el mismo aspecto que las cápsulas de TheraCLEC™, de modo que la identidad de las cápsulas (activa frente a placebo) era desconocida. Se administró el número y el tipo de cápsulas de TheraCLEC™ y de placebo adecuados para conseguir el nivel de dosis enmascarado para el que el sujeto se había aleatorizado.

Durante el estudio de fase II, aproximadamente a la mitad de la comida o tentempié durante un período de tratamiento de 28 días, los sujetos tomaron un total de seis cápsulas, que eran una combinación de cápsulas de TheraCLEC™ y de placebo, de las que una era una cápsula del tamaño 5 y cinco eran cápsulas del tamaño 2, como se describe a continuación:

**Tabla 1. Distribución del tratamiento de estudio frente a placebo, por grupo de tratamiento**

Grupo de estudio	Número de cápsulas por comida/tentempié	
	Cápsulas del tamaño 5	Cápsulas del tamaño 2
Grupo 1	1 TCT5	5 placebo
Grupo 2	1 TCT5	1 TCT20 4 placebo
Grupo 3	1 placebo	5 TCT20

**Selección y ritmo de las dosis**

La dosis máxima fijada del estudio de fase II de 100.000 unidades USP de lipasa por comida fue equivalente a 1.250 unidades USP de lipasa por kg para un sujeto de 80 kg y 2.500 unidades USP de lipasa por kg para un sujeto de 40 kg.

**Tabla 2. Dosis del fármaco de estudio TheraCLEC™**

	Unidades USP por comida o tentempié
	TheraCLEC™

Principio activo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Lipasa	5.000	25.000	100.000
Proteasa	5.000	25.000	100.000
Amilasa	750	3.750	15.000

#### Otros parámetros del estudio de fase II

5 El estudio de fase II fue un ensayo aleatorizado, con doble ciego y búsqueda de rango de dosis en paralelo. El estudio incluyó un total de 129 sujetos de género masculino y femenino de aproximadamente 26 localidades de los EE.UU. y tres niveles de dosis de TheraCLEC™ (aproximadamente 42 sujetos por grupo). El estudio se separó en cuatro periodos diferentes de observación y evaluación: cribado, inicial, tratamiento y seguimiento.

#### La población del estudio de fase II

10 Las composiciones preparadas como se describe anteriormente se ensayaron en tres poblaciones de sujetos. La población con intención de tratar modificada ("mITT") incluyó todos los sujetos elegibles que se sometieron a mediciones en el periodo inicial (sin enzimas), recibieron al menos una dosis aleatorizada, y para los que se llevaron a cabo evaluaciones de la seguridad en el periodo de tratamiento y una recogida de deposiciones entre marcadores. Se ensayaron otras poblaciones de sujetos y los resultados fueron coherentes con los de la población mITT.

#### Período de cribado (día S1 - período inicial)

En el día uno de la consulta de cribado (día S1), se entrevistó a los sujetos para determinar su elegibilidad para participar en el estudio. Los sujetos se sometieron también a un examen físico completo.

15 Se pidió a los sujetos que ingirieran una dieta rica en grasa durante todo el período del estudio. Se les permitió tomar la medicación requerida para el tratamiento y manejo de su fibrosis quística subyacente y otras enfermedades afines. Los sujetos no debían recibir productos de suplementación enzimática o complementos dietéticos que podrían haberse interpretado como suplementación enzimática durante los periodos hospitalarios inicial (días B1 a B3) y de tratamiento (días T1 a T28) del estudio.

20 Los sujetos se aleatorizaron para una de las tres dosis enmascaradas de TheraCLEC™.

#### Período inicial (días B1 a B3)

25 En un plazo de 10 a 14 días desde la consulta de cribado, se requirió de los sujetos aleatorizados que ingresaran en el centro hospitalario en estado de ayuno y antes de la primera comida del día (desayuno). El período inicial comenzó con la primera comida del día (desayuno) el día B1. Antes del desayuno, se determinó el peso corporal. Después, el sujeto comenzó un período de dieta controlada de 72 horas sin suplementación de enzimas pancreáticas. Al principio de la primera comida el día B1 se tomó un marcador de deposiciones (500 mg de colorante azul FD&C n° 2). La ingestión de grasa y proteína se registró en función del consumo real. La recogida de deposiciones para la evaluación de la grasa y el nitrógeno fecales comenzó una vez expulsado el primer marcador (la deposición que contenía el primer marcador se descartó) y se finalizó cuando se empezó a observar el segundo marcador en la deposición (la deposición que contenía el segundo marcador se recogió).

Cada día del período inicial se evaluaron los sujetos en cuanto a sucesos adversos y medicaciones concomitantes, se registraron las constantes vitales y se realizó un breve examen físico.

#### Período de tratamiento (días T1 a T28)

35 La primera dosis del fármaco de estudio se administró a cada sujeto el día uno del período de tratamiento (T1), aproximadamente a la mitad de la primera comida después de haber finalizado los procedimientos predosis y la prueba de exposición a almidón el día T1 (almuerzo). Los sujetos se observaron entonces durante al menos 30 minutos después de la administración de la primera dosis. En caso de haber tolerado bien el fármaco, los sujetos tomaron luego la misma dosis del fármaco de estudio aproximadamente a la mitad de cada una de las tres comidas y dos tentempiés desde el día T1 hasta el día T28 del período de tratamiento. En este estudio, la mitad de una comida se definió como el momento en el que los sujetos habían consumido aproximadamente la mitad de la comida o el tentempié.

El día T29, los sujetos interrumpieron la toma del fármaco de estudio. Durante la consulta ambulatoria al final del tratamiento el día T29 se realizó un examen físico completo. Los sujetos se evaluaron también en cuanto a sucesos adversos.

#### Período de seguimiento (día F7 ± 2)

45 Durante el período de seguimiento, los sujetos se mantuvieron con una dieta rica en grasa y con las enzimas de la medicación usual según prescripción de su médico. La consulta ambulatoria al final del período de seguimiento (día F7 ± 2) se planificó para tener lugar 7 ± 2 días después de la consulta de finalización del período de tratamiento (día

T29). En esta consulta, los sujetos se sometieron a un breve examen físico y se evaluaron en cuanto a sucesos adversos y medicaciones concomitantes.

#### Análisis de grasa y nitrógeno en las deposiciones

5 Durante la consulta de cribado se recogieron deposiciones para una prueba de elastasa fecal puntual con el fin de evaluar la elegibilidad para el estudio. Las deposiciones de cada sujeto se analizaron en varios momentos durante el estudio para determinar la presencia de sangre oculta y leucocitos.

10 Durante el período inicial hospitalario y el período de tratamiento hospitalario se suministró un marcador indicador (500 mg de colorante azul FD&C n° 2) al principio de la primera comida de la dieta controlada (desayuno), que consistió en aproximadamente 100 g de grasa y un mínimo de aproximadamente 2 g de proteína por kg de peso corporal por día. La ingestión real de grasa y proteína debería registrarse en función de la comida consumida.

15 Después de 72 horas con la dieta controlada, se suministró un segundo marcador indicador azul a los sujetos en ayunas con la comida de prueba para la prueba de exposición a almidón. La recogida de deposiciones para la evaluación de grasa y nitrógeno fecales comenzó después de haber expulsado el primer marcador azul y se finalizó después de haber expulsado el segundo marcador azul. Se determinó el peso de las deposiciones recogidas y se analizó el contenido de grasa y nitrógeno. Seligson, D. (ed.), *Standard Methods of Clinical Chemistry*, volumen II, Fatty Acids in Stool, 1985, Academic Press, págs. 34-39; Veldee M. S., *Nutritional Assessment, Therapy and Monitoring* en Burtis, C. A., Ashwood, E.R. (eds.), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3.ª edición, 1999, W. B. Sanders Co., págs. 1385-86.

El coeficiente de absorción de grasa (% CFA) se calculó manualmente mediante dos puntos de datos:

- 20 1) el consumo de grasa en g/24 horas, suministrado por el dietista de investigación central y  
2) la excreción de grasa en g/24 horas, suministrada por los servicios de laboratorio de la Clínica Mayo.

El CFA se calculó manualmente de la manera siguiente:

$$\frac{\text{promedio de gramos de grasa consumida en 24 h} - \text{promedio de gramos de grasa excretada en 24 h}}{\text{promedio de gramos de grasa consumida en 24 h}} \times 100$$

El coeficiente de absorción de nitrógeno (% CNA) se calculó manualmente mediante dos puntos de datos:

- 25 1) el consumo de nitrógeno en g/24 horas, suministrado por el dietista de investigación central y  
2) la excreción de nitrógeno en g/24 horas, suministrada por los servicios de laboratorio de la Clínica Mayo.

El CNA se calculó manualmente de la manera siguiente:

$$\frac{\text{promedio de gramos de nitrógeno consumido en 24 h} - \text{promedio de gramos de nitrógeno excretado en 24 h}}{\text{promedio de gramos de nitrógeno consumido en 24 h}} \times 100$$

#### Evaluación de la eficacia - Coeficiente de absorción de grasa

30 El coeficiente de absorción de grasa en el período inicial, en el período de tratamiento y el cambio desde el período inicial al de tratamiento se resumió por grupo de tratamiento. El coeficiente de absorción de grasa descrito fue la media de dos cálculos del CFA independientes, usando dos resultados de grasa fecal a partir de una recogida de deposiciones. La diferencia en el coeficiente de absorción de grasa medio durante el período de tratamiento entre los tres grupos de tratamiento se analizó mediante un análisis de la varianza de un factor. Con el fin de evaluar las tres comparaciones de parejas posibles, a la vez que se consideraba una tasa de error global de tipo I del 5%, se usó la prueba del rango estudentizado de Tukey. La variable dependiente incluyó las mediciones durante el tratamiento.

40 También se realizó un análisis de regresión lineal que examinaba los efectos simultáneos del grupo de tratamiento y del CFA inicial medio. De nuevo, la variable dependiente incluyó las mediciones durante el período de tratamiento. Otros factores adicionales analizados en el modelo incluyeron las siguientes determinaciones en el período inicial: edad, género, raza e índice de masa corporal (IMC). Para estos factores adicionales se usó un proceso de eliminación progresiva para eliminar los factores no significativos ( $p > 0,10$ ) del modelo. En este análisis de regresión lineal también se realizaron comparaciones por parejas mediante la prueba del rango estudentizado de Tukey.

45 El coeficiente de absorción de grasa (CFA) en el período inicial, en el período de tratamiento y el cambio desde el período inicial al de tratamiento para la población mITT se resume a continuación en la tabla 3 por grupo de tratamiento. En las tres poblaciones de tratamiento se observó un aumento significativo en el CFA medio desde el período inicial al período de tratamiento. El CFA durante el período de tratamiento fue significativamente mayor en los dos grupos de tratamiento 2 (la dosis media) y 3 (la dosis superior) que en el grupo de tratamiento 1 (la dosis baja). Además, los grupos de tratamiento 2 y 3 presentaron un mayor aumento medio del CFA entre el período sin

enzimas y con enzimas que el grupo de tratamiento 1. Mientras que el grupo de tratamiento 3 mostró una ventaja numérica consistente sobre el grupo de tratamiento 2, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

**Tabla 3. Coeficiente de absorción de grasa medio - Análisis de la varianza**

	Grupo 1 (N=39)	Grupo 2 (N=41)	Grupo 3 (N=37)	Total (N=117)	valor de p*
<b>Período inicial</b>					
N	39	41	36	116	
Media (DE)	55,0 (17,54)	55,6 (20,29)	52,2 (19,14)	54,4 (18,94)	
<b>Tratamiento **</b>					
N	39	41	37	117	
Media (DE)	56,2 (18,16)	67,0 (18,08)	69,7 (17,86)	64,3 (18,81)	0,0032
<b>Cambio desde el período inicial al de tratamiento</b>					
N	39	41	36	116	
Media (DE)	1,2 (14,77)	11,4 (19,10)	17,3 (18,37)	9,8 (18,59)	0,0005
<b>Porcentaje de cambio (%) desde el período inicial al de tratamiento</b>					
N	39	41	36	116	
Media (DE)	5,6 (32,15)	42,7 (95,46)	45,9 (53,51)	31,2 (68,69)	0,0153

\* Valor de p global del análisis de la varianza.

- 5 \*\* Resultados en el período de tratamiento (mediante la prueba del rango estudentizado de Tukey para comparaciones por parejas):

Grupo de tratamiento 1 frente a grupo de tratamiento 2, valor de p de mITT = 0,0229.

Grupo de tratamiento 2 frente a grupo de tratamiento 3, valor de p de mITT = 0,7874.

Grupo de tratamiento 1 frente a grupo de tratamiento 3, valor de p de mITT = 0,0041.

- 10 Si el CFA inicial se divide en quintiles del 0 al 100%, resulta claro que todos los grupos de tratamiento mostraron un aumento mayor sobre el nivel inicial para un CFA del 0 al 40% que en caso de un CFA inicial superior al 40% (véase la figura 1). Además, cuanto más bajo era el CFA inicial, mayor fue la respuesta al tratamiento.

Evaluación de la eficacia - Coeficiente de absorción de nitrógeno

- 15 El coeficiente de absorción de nitrógeno (CNA) en los períodos inicial (B1 a B3) y de tratamiento para la población mITT se resume a continuación en la tabla 4 por grupo de tratamiento. El coeficiente de absorción de nitrógeno descrito fue la media de dos cálculos del CNA independientes, usando dos resultados de nitrógeno fecal a partir de una recogida de deposiciones. La diferencia en el CNA medio entre los tres grupos de tratamiento se analizó de la misma manera que el CFA.

- 20 De manera similar a las mediciones del CFA, las tres poblaciones de tratamiento mostraron un aumento significativo del CNA medio desde el período inicial al período de tratamiento. En las tres poblaciones de tratamiento, el CNA en el período de tratamiento fue significativamente mayor en los grupos de tratamiento 2 y 3 que en el grupo de tratamiento 1. Además, los grupos de tratamiento 2 y 3 presentaron un mayor aumento medio del CNA entre el período sin enzimas y con enzimas que el grupo de tratamiento 1. Mientras que el grupo de tratamiento 3 mostró una ventaja numérica consistente sobre el grupo de tratamiento 2, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.
- 25

**Tabla 4. Coeficiente de absorción de nitrógeno medio - Análisis de la varianza**

	Grupo 1 (N=39)	Grupo 2 (N=41)	Grupo 3 (N=37)	Total (N=117)	valor de p*
<b>Período inicial</b>					

N	39	41	36	116	
Media (DE)	60,6 (16,38)	58,8 (17,88)	56,8 (16,36)	58,8 (16,84)	
<b>Tratamiento **</b>					
N	39	41	37	117	
Media (DE)	61,6 (15,46)	71,3 (16,38)	74,6 (13,51)	69,1 (16,05)	0,0009
<b>Cambio desde el periodo inicial al de tratamiento</b>					
N	39	41	36	116	
Media (DE)	1,1 (14,89)	12,5 (18,37)	17,5 (18,00)	10,2 (18,33)	0,0002
<b>Porcentaje de cambio (%) desde el periodo inicial al de tratamiento</b>					
N	39	41	36	116	
Media (DE)	9,0 (48,83)	37,6 (96,72)	40,6 (45,04)	29,0 (69,74)	0,0883

\* Valor de p global del análisis de la varianza.

\*\* Resultados en el período de tratamiento (mediante la prueba del rango estudentizado de Tukey para comparaciones por parejas):

Grupo de tratamiento 1 frente a grupo de tratamiento 2, valor de p de mITT = 0,0145.

5 Grupo de tratamiento 2 frente a grupo de tratamiento 3, valor de p de mITT = 0,6130.

Grupo de tratamiento 1 frente a grupo de tratamiento 3, valor de p de mITT = 0,0009.

10 Si el CNA inicial se divide en quintiles del 0 al 100%, resulta claro en la figura 2 que todos los grupos de tratamiento mostraron un aumento mayor sobre el nivel inicial cuando el CNA inicial era del 40% o inferior que cuando el CNA inicial era superior al 40%. Los grupos de tratamiento 2 y 3 fueron aparentemente más efectivos que el grupo de tratamiento 1. Además, cuanto más bajo era el CNA inicial, mayor fue la respuesta al tratamiento.

#### Mejoras en el CFA y el CNA y correlación entre estos

15 El estudio reflejó un aumento significativo del CFA y el CNA medios desde el período inicial al periodo de tratamiento en los grupos de tratamiento de dosis media y superior en las tres poblaciones de tratamiento. Además, el grupo de tratamiento 3 (el grupo de tratamiento de dosis superior) mostró el mayor aumento medio del CFA y el CNA en este período, aunque la diferencia entre las dosis media y alta no fue estadísticamente significativa. Incluso después de considerar los valores iniciales del CFA y el CNA y el género, este efecto del tratamiento en el CFA y el CNA siguió siendo estadísticamente significativo ( $p = 0,0003$  y  $< 0,0001$ , respectivamente).

20 La correlación entre los aumentos del CFA y el CNA también fue estadísticamente significativa. Las figuras 3 y 4 ilustran la correlación entre el CFA y el CNA en los pacientes mITT tratados con todas las composiciones dosificadas según la presente invención en el nivel inicial y en el nivel de tratamiento, respectivamente. La figura 5 ilustra la diferencia entre la correlación entre el CFA y el CNA en los niveles inicial y de tratamiento en esos pacientes.

#### Evaluación de la eficacia - Análisis del cambio desde el período inicial - Muestreo de deposiciones

25 Los cambios en la media del número de deposiciones y del peso de las deposiciones entre los períodos inicial y de tratamiento frente al valor final del período de tratamiento relevante se representan separadamente para cada grupo de tratamiento del estudio en las tablas 5 y 6, respectivamente.

30 En los tres grupos de tratamiento hubo una disminución del número de deposiciones desde el período inicial al período de tratamiento ( $p = 0,0968$ ,  $p = 0,0975$  y  $p = 0,1807$ , respectivamente). En particular, el grupo de tratamiento 3 mostró la mayor disminución media (-2,6 en la población mITT) en el número de deposiciones desde el período inicial al período de tratamiento ( $p = 0,0003$ ). Sin embargo, una comparación del cambio en el número de deposiciones entre grupos no reveló ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de tratamiento.

También se observó una disminución significativa del peso de las deposiciones desde el período inicial al período de tratamiento en los grupos de tratamiento de dosis media y superior de las tres poblaciones de tratamiento ( $p = 0,0001$ ). Mientras que el grupo de tratamiento 3 de las tres poblaciones mostró la mayor disminución del peso de las

deposiciones desde el período inicial al período de tratamiento ( $p < 0,0001$ ), las comparaciones por parejas mediante la prueba del rango estudentizado de Tukey no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento de dosis media y superior.

**Tabla 5. Cambio en el número de deposiciones desde el período inicial al período de tratamiento**

	Grupo 1 (N=39)	Grupo 2 (N=41)	Grupo 3 (N=37)	Total (N=117)	valor de p*
<b>Período inicial</b>					
N	39	41	37	117	
Media (DE)	7,7 (3,04)	8,2 (3,49)	8,8 (4,56)	8,3 (3,73)	
<b>Tratamiento</b>					
N	39	41	37	117	
Media (DE)	6,9 (3,06)	7,4 (4,37)	6,2 (3,01)	6,9 (3,56)	
<b>Cambio desde el período inicial al de tratamiento</b>					0,0968
N	39	41	37	117	
Media (DE)	-0,8 (3,39)	-0,9 (4,52)	-2,6 (4,04)	-1,4 (4,07)	
prueba t por parejas**	0,1393	0,2211	0,0003	0,0003	

5 \* Valor de p global del análisis de la varianza.

\*\* Prueba t por parejas.

Nota: cambio respecto a los resultados del período inicial (mediante la prueba del rango estudentizado de Tukey para comparaciones por parejas):

Grupo de tratamiento 1 frente a grupo de tratamiento 2, mITT, valores de  $p = 0,5502$ .

10 Grupo de tratamiento 2 frente a grupo de tratamiento 3, mITT, valores de  $p = 0,4842$ .

Grupo de tratamiento 1 frente a grupo de tratamiento 3, mITT, valores de  $p = 0,2040$ .

**Tabla 6. Cambio en el peso de las deposiciones (g) desde el período inicial al período de tratamiento**

	Grupo 1 (N=39)	Grupo 2 (N=41)	Grupo 3 (N=37)	Total (N=117)	valor de p*
<b>Período inicial</b>					
N	38	41	36	115	
Media (DE)	1234,0 (529,46)	1251,8 (474,14)	1396,8 (613,79)	1291,3 (539,16)	
<b>Tratamiento</b>					
N	38	41	37	116	
Media (DE)	1174,1 (565,34)	937,3 (539,91)	869,2 (448,92)	993,2 (533,10)	
<b>Cambio desde el período inicial al de tratamiento</b>					0,0001
N	38	41	36	115	
Media (DE)	-59,9 (399,46)	-314,5 (455,89)	-514,2 (428,37)	-292,9 (463,44)	
prueba t por parejas**	0,3612	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

\* Valor de p global del análisis de la varianza.

\*\* Prueba t por parejas.

15 Nota: cambio respecto a los resultados del período inicial (mediante la prueba del rango estudentizado de Tukey para comparaciones por parejas):

Grupo de tratamiento 1 frente a grupo de tratamiento 2, mITT, valor de p = 0,8842.

Grupo de tratamiento 2 frente a grupo de tratamiento 3, mITT, valor de p = 0,2415.

Grupo de tratamiento 1 frente a grupo de tratamiento 3, mITT, valor de p = 0,1971.

Evaluación de la eficacia - Digestión de almidón y absorción de hidratos de carbono, medidas por la respuesta de glucosa en sangre

En la prueba de exposición a almidón, sujetos que habían ayunado por la noche durante al menos 8 horas ingirieron una comida de prueba estándar que comprendía 100 g de pan de harina blanca (50 g de hidratos de carbono) durante el período inicial hospitalario y durante el período de tratamiento hospitalario. Los sujetos debían descansar durante 30 minutos antes de comenzar la prueba de exposición a almidón y su actividad durante la evaluación debía ser limitada. Los niveles de glucosa en sangre se midieron con un glucómetro (Accucheck, Bayer). Inmediatamente antes de la comida de prueba se tomó una medida. Se administró TheraCLEC™ al haber ingerido aproximadamente la mitad del pan. Durante un período de 4 horas se tomaron medidas seriadas con el glucómetro. Los valores calculados incluyen el máximo cambio en el nivel de glucosa desde el nivel de ayuno y el máximo cambio en el nivel de glucosa entre los períodos con y sin enzimas (T17-T1). La prueba de exposición a almidón no se llevó a cabo con los sujetos con diabetes mellitus en los que la medida de glucosa en ayunas había sido inferior a 75 mg/dl.

La respuesta de glucosa en sangre en la población mITT se midió por las variables siguientes:

Variación en el nivel de glucosa desde el tiempo 0: la variación en el nivel de glucosa en cada uno de los puntos temporales desde el tiempo 0.

Máxima respuesta de glucosa: el máximo valor de glucosa después del tiempo 0.

Variación máxima en la respuesta de glucosa: definida como la respuesta máxima menos el valor de glucosa a tiempo 0.

Tiempo hasta alcanzar la máxima respuesta de glucosa (T<sub>max</sub>): definido como las horas desde el tiempo 0 hasta la variación máxima en el nivel de glucosa.

Para cada una de estas variables se presenta una estadística descriptiva por grupo de tratamiento para lo siguiente:

1. Sin TheraCLEC™
2. Con TheraCLEC™
3. Con TheraCLEC™ menos sin TheraCLEC™
4. Relación con TheraCLEC™: sin TheraCLEC™ (R)

Esta estadística descriptiva se presenta tanto para todos los sujetos como solamente para los sujetos sin diabetes. Se consideró que un sujeto tenía diabetes relacionada con la fibrosis quística si tenía un historial médico de diabetes conocida, tomaba insulina o medicación oral relacionada con la diabetes o si tenía una medida del nivel de glucosa en ayunas ≥ 126 mg/dl o un nivel de glucosa postprandial ≥ 200 mg/dl.

En la tabla 7, se han eliminado del análisis los 25 sujetos con diabetes mellitus relacionada con la fibrosis quística para reducir la variabilidad procedente tanto del alto nivel de glucosa inicial como de las disminuciones en el nivel de glucosa después de la prueba de exposición a almidón como resultado de las inyecciones matinales de insulina. La dosis TCT5 parece tener significativamente (p = 0,0053) un número menor de sujetos con aumentos en el cambio máximo en el nivel de glucosa entre los períodos con y sin enzimas ≥ 10 mg/dl que la dosis TCT25. Además, los resultados de la tabla 7 sugieren que la dosis media de amilasa en el grupo de tratamiento 2 es igualmente eficaz que la dosis superior en el grupo de tratamiento 3.

**Tabla 7. Prueba de exposición a almidón en pacientes no diabéticos con fibrosis quística -- cambio máximo en el nivel de glucosa con y sin tratamiento enzimático**

Variación máxima de glucosa entre con y sin enzimas	Grupo de tratamiento 1: TCT5	Grupo de tratamiento 2: TCT25	Grupo de tratamiento 3: TCT100
< 10 mg/dl	21	14	15
> 10 mg/dl	4	16	11
> 20 mg/dl	3	8	8

\* Prueba de exactitud de Fisher (global); p = 0,0138

TCT5 frente a TCT25, p = 0,0053

TCT5 frente a TCT100, p = 0,0644

TCT25 frente a TCT100, p = 0,4357

5 En conjunto, este estudio demostró que los sujetos tratados con composiciones según esta invención lograron un aumento de la digestión de almidón y de la absorción de hidratos de carbono, medido por la respuesta de glucosa en sangre, en que los sujetos en el grupo de tratamiento de dosis superior requirieron menos tiempo para dicho logro.

Ejemplo 3 - El estudio de fase I

Antes del estudio de fase II, las composiciones según esta invención se evaluaron también en cuanto a su seguridad y eficacia preliminar en un ensayo de fase I en pacientes de fibrosis quística con insuficiencia pancreática.

10 Se llevó a cabo un estudio de búsqueda de dosis sin enmascaramiento para determinar la seguridad y la tolerabilidad a corto plazo, así como la actividad clínica de TheraCLEC™ en 23 pacientes de fibrosis quística con insuficiencia pancreática. Los sujetos tomaron 100, 500, 1.000, 2.500 o 5.000 unidades de lipasa por kg y comida de TCT durante tres días. Se monitorizaron los parámetros de seguridad clínicos y de laboratorio y los sucesos adversos.

15 No hubo sucesos adversos graves ni muertes en el estudio de fase I. La mayoría de los sucesos adversos fueron leves, aunque las molestias gastrointestinales fueron frecuentes. TheraCLEC™ aumentó el coeficiente de absorción de grasa y el coeficiente de absorción de nitrógeno en todos los grupos, excepto en aquellos que recibieron 100 unidades de lipasa por kg y comida. Para todos los sujetos a todos los demás niveles de dosificación, el aumento del CFA medio fue del 20,6 ± 23,5, el aumento del CNA medio fue del 19,7 ± 12,2% y la disminución del peso medio de las deposiciones fue del 425 ± 422 g.

20 TheraCLEC™ se toleró bien en este estudio de exposición a corto plazo en dosis de hasta 5.000 unidades de lipasa por kg y comida. Los datos de eficacia preliminar demostraron un efecto beneficioso en la absorción de grasa y nitrógeno. Ventajosamente, estos efectos se observaron con una dosis de 500 unidades de lipasa por kg y comida y no pareció haber necesidad de incrementar la dosis por encima de este nivel para conseguir estos resultados. Estos datos apoyaron un ensayo aleatorizado mayor de fase II.

25 1. El diseño del estudio de fase I

30 Se llevó a cabo un estudio de búsqueda de dosis sin enmascaramiento y multicéntrico, con el objetivo principal de determinar la seguridad y tolerabilidad a corto plazo de cinco niveles de dosificación de TheraCLEC™ en pacientes de insuficiencia pancreática con fibrosis quística. Los objetivos secundarios fueron determinar el efecto de TheraCLEC™ en la absorción de grasa y nitrógeno por vía oral, en los síntomas intestinales y en el número y peso de las deposiciones. TheraCLEC™ tiene proporciones fijas de lipasa, amilasa y proteasa. Las cohortes de dosificación se basaron en la dosis de lipasa por kg y comida, como se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8. Cohortes de dosificación**

Principio activo	Unidades USP/kg/comida				
	Cohorte 1	Cohorte 2	Cohorte 3	Cohorte 4	Cohorte 5
Lipasa	500	1.000	2.500	5.000	100
Proteasa	500	1.000	2.500	5.000	100
Amilasa	75	150	375	750	15

Suministrado como cápsulas con las enzimas siguientes en proporciones fijas: 20.000 unidades USP de lipasa + 20.000 unidades USP de proteasa + 3.000 unidades USP de amilasa por cápsula.

35 Para este estudio se reclutaron sujetos con fibrosis quística asistidos por uno de los once centros acreditados por la Fundación para la Fibrosis Quística. Todos los individuos firmaron un formulario de consentimiento aprobado por el comité de revisión institucional local y, en el caso de los pacientes pediátricos, también se contó con consentimiento. Se incluyeron sujetos que tenían de ≥ 13 a ≤ 45 años de edad, con un diagnóstico de fibrosis quística basado en los criterios estándar [B. J. Rosenstein y col., "The Diagnosis of Cystic Fibrosis: A Consensus Statement", *J. Pediatr.*, 132, págs. 589-595 (1998)], sufrían insuficiencia pancreática basada en un nivel de elastasa fecal, medido en un cribado ambulatorio mediante el ensayo ELISA monoclonal ScheBo (BioTech EE. UU.), < 100 mg/g, y tenían un coeficiente de absorción de grasa, medido en un cribado hospitalario, ≤ 80%, tenían un volumen espiratorio forzado en un segundo (VEF<sub>1</sub>) ≥ 30% del predicho, tenían un índice de masa corporal mayor que el décimo percentil y eran clínicamente estables, sin evidencia de infecciones agudas del tracto respiratorio superior o inferior. Se excluyeron los sujetos en estado de embarazo o lactancia, los que habían tenido un episodio de síndrome de obstrucción intestinal distal que requirió atención médica en la sala de urgencias o en el hospital en los seis meses previos, habían estado tomando medicamentos que alteran el pH gástrico (por ejemplo, antagonistas del receptor de histamina 2, inhibidores de la bomba de protones o antiácidos) en la semana previa y no serían capaces de interrumpir esta medicación durante el estudio, tenían un historial de colonopatía fibrosante, aspergilosis broncopulmonar alérgica o una enfermedad hepática, definida por los criterios siguientes: un nivel doble del normal

de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) o fosfatasa alcalina; un historial de sangrado de varices; evidencia de cirrosis o una enfermedad hepática grave en una biopsia de hígado; trasplante de hígado; o los sujetos que habían tomado ácido ursodeoxicólico en el año anterior. También se excluyeron los sujetos incapaces de interrumpir la alimentación por tubo entérico durante las partes hospitalarias del protocolo del estudio, aquellos con hipersensibilidad conocida a aditivos alimentarios o aquellos que habían participado en el mes anterior en otro estudio de investigación de un fármaco, producto biológico o dispositivo no aprobado actualmente.

Los sujetos que cumplieron los criterios en la consulta de cribado inicial ingresaron en un centro de investigación clínica. El tratamiento enzimático prescrito para estos sujetos se interrumpió, se les administró un colorante marcador indicador (azul FD&C n° 2, 500 mg) por vía oral y se les sometió a una dieta especial consistente en 100 g de grasa y un mínimo de 2 g de proteína por kg de peso corporal y por día, dividida en tres comidas y dos tentempiés. La ingestión real de grasa y proteína se registró en función de la cantidad de comida consumida. Después de 72 horas con la dieta especial, la dieta se interrumpió y se administró un segundo marcador indicador. En este momento, los pacientes reanudaron su tratamiento enzimático normal. La recogida de deposiciones para la evaluación de grasa y nitrógeno fecales comenzó después de la primera deposición en la que se observó el colorante azul y se finalizó una vez que se hubo expulsado el segundo marcador, incluyendo esta deposición en la recogida. Se calculó el CFA y en caso de ser  $\leq 80\%$ , el sujeto se consideró elegible para la fase de tratamiento del estudio.

Los sujetos volvieron a ingresar en un centro de investigación clínica y se interrumpió el suplemento de enzimas pancreáticas de rutina. Se suministraron el colorante marcador y la dieta especial y los sujetos tomaron la medicación del estudio con cada una de las tres comidas y dos tentempiés durante las 72 horas siguientes, con las dosis por cohorte como se ha descrito anteriormente. Se instruyó a los sujetos para que tomaran la medicación del estudio antes de cada comida. Después de 72 horas, la dieta especial se interrumpió y se administró un segundo marcador indicador. En este momento, los pacientes reanudaron su tratamiento enzimático normal. El procedimiento para la recogida de deposiciones fue el mismo que se ha descrito anteriormente. Dentro de los tres días después del alta del centro de investigación clínica se realizó una llamada telefónica de seguimiento y entre tres a siete días después del alta tuvo lugar una consulta de seguimiento.

La monitorización de la seguridad incluyó la incidencia de sucesos adversos, determinada mediante la formulación de preguntas abiertas a los sujetos del estudio durante las consultas ambulatorias y la asistencia hospitalaria y durante la llamada telefónica planificada, la frecuencia de pruebas de laboratorio anormales, incluyendo perfiles rutinarios hematológicos, de la química del suero y de coagulación, análisis de orina, excreción de ácido úrico urinario y ensayos de detección de hemoglobina y leucocitos en las deposiciones. También se monitorizó la frecuencia de síntomas gastrointestinales, medida mediante un Cuestionario de Fibrosis Quística (CFQ) modificado, específico para el tracto gastrointestinal [A. Quittner y col., "CFQ Cystic Fibrosis Questionnaire, a Health Related Quality of Life Measure", versión inglesa 1.0 (2000)].

El Comité de Monitorización de Datos y Seguridad (DSMB) de la Red de Desarrollo de Tratamientos de la Fundación para la Fibrosis Quística se ocupó de la supervisión de este ensayo. El DSMB monitorizó los datos de seguridad de las cohortes de dosificación ascendente durante el ensayo, requiriéndose una evaluación formal de la seguridad antes de que los sujetos pudieran formar parte de la cohorte de 5.000 unidades de lipasa por kg y comida, dado que esta dosis excede las recomendaciones actuales. Al DSMB le correspondió también la responsabilidad de interrumpir el ensayo en cualquier momento en interés de la seguridad de los sujetos.

## 2. La composición del estudio de fase I

Los tres componentes enzimáticos de TheraCLEC™, lipasa, proteasa y amilasa, se prepararon independientemente. La lipasa se obtuvo por fermentación a partir de la bacteria *Burkholderia cepacia* (anteriormente conocida como *Pseudomonas cepacia*) y después se procesó para formar cristales de lipasa que posteriormente se reticularon, creando una forma enzimática estable frente al ácido y las proteasas, sin recubrimiento entérico (denominada lipasa de TheraCLEC™). Todos los lotes se cultivaron específicamente para detectar una contaminación microbiológica con *Burkholderia cepacia* y debieron ser negativos en cuanto a la presencia de *Burkholderia cepacia* para la aprobación del lote para su uso clínico. El componente de proteasa se obtuvo de *Aspergillus melleus*; el componente de amilasa se obtuvo de *Aspergillus oryzae* por fermentación. De manera similar, estos productos se sometieron a múltiples etapas de purificación, después de las cuales se cultivaron para detectar mohos y levaduras totales.

Los tres componentes enzimáticos que forman TheraCLEC™ se formularon como una cápsula rellena de polvo. Los estudios preclínicos de eficacia demostraron que la lipasa y la proteasa eran eficaces a las dosis de  $\geq 500$  unidades de lipasa por kg y comida y  $\geq 1.000$  unidades de proteasa por kg y comida en el modelo canino de insuficiencia pancreática. Se realizaron estudios *in vitro* de la amilasa derivada de *Aspergillus* en TheraCLEC™ mediante la metodología de la USP (Farmacopea de los EE. UU.) y el FCC (Código de Sustancias Químicas Alimenticias) (que es equivalente a la metodología de la USP para el ensayo de fármacos). La amilasa fúngica tiene un perfil de pH diferente de la amilasa de origen porcino. La amilasa fúngica es veinte veces más activa a pH 4,8 que la amilasa porcina. Por lo tanto, para TheraCLEC™ se eligió una dosis de amilasa veinte veces menor que la que se encontraría, respecto a lipasa, en una cápsula de pancreolipasa estándar.

3. Análisis de los datos en el estudio de fase I

El coeficiente de absorción de grasa se calculó de la manera siguiente:

$$\frac{(\text{gramos de grasa consumida} - \text{gramos de grasa excretada})}{\text{gramos de grasa consumida}} \times 100$$

5 La misma ecuación usando el número de gramos de nitrógeno se usó para calcular el coeficiente de absorción de nitrógeno (CNA).

10 Los investigadores planificamos resumir las características demográficas y de pronóstico, incluyendo la edad, el género, la raza, el genotipo, la función pulmonar y la elastasa fecal puntual por cohorte de dosificación y globales. El tamaño de la muestra para este estudio de fase I se estimó en 20 sujetos, cuatro sujetos por cohorte de dosificación. El estudio no se diseñó para la aplicación de pruebas estadísticas formales. Los investigadores planificamos agrupar los sucesos adversos mediante un sistema de clasificación estándar. La frecuencia de valores de laboratorio anormales se tabuló por período del estudio, punto temporal y cohorte de dosificación.

4. Resultados del estudio de fase I

15 Participaron 23 sujetos (14 M) de once centros de fibrosis quística. La edad media de los sujetos fue 23,5 ± 7,8 (DE) (intervalo = 15,2 a 44,5 años) (tabla 9). Un sujeto adicional se añadió a las cohortes 1, 3 y 5, como resultado de que varios centros reclutaron pacientes simultáneamente.

**Tabla 9. Demografía del estudio**

Número de pacientes		Edad (n = 23)	
Planificados	20	<b>Parámetro</b>	<b>Años</b>
Participaron	23	Media	23,5
Interrupción del fármaco de estudio 0		Desviación estándar	7,8
		Min-Max	15,2-44,5
Raza (n = 23)		Género (n = 23)	
<b>Parámetro</b>	<b>N (%)</b>	<b>Parámetro</b>	<b>N (%)</b>
Caucásicos	22 (95,7%)	Hombres	14 (61%)
Negros	0 (0,0%)	Mujeres	9 (39%)
Asiáticos	0 (0,0%)		
Hispanos	0 (0,0%)		
Otros	1 (4,3%)		

5. Seguridad

20 TheraCLEC™ se toleró bien a todos los niveles de dosificación. No se documentaron sucesos adversos graves ni muertes y no se retiraron pacientes durante el estudio. Durante el período pretratamiento sin tratamiento enzimático, el sistema corporal afectado más frecuentemente fue el tracto gastrointestinal, en que 14 sujetos de un total de 23 describieron sucesos adversos pretratamiento. Los sucesos adversos gastrointestinales pretratamiento más frecuentes fueron molestias abdominales (cuatro sujetos describieron cinco sucesos), dolor abdominal superior (cuatro sujetos describieron cuatro sucesos) y flatulencia (cuatro sujetos describieron cuatro sucesos). El sistema corporal más frecuentemente afectado en segundo lugar fue el sistema respiratorio, en que cinco sujetos describieron ocho sucesos adversos pretratamiento. El suceso adverso respiratorio pretratamiento más frecuente fue la tos (cuatro sujetos describieron cuatro sucesos).

25 Los sucesos adversos de aparición con el tratamiento que comenzaron después del día 2 tuvieron lugar en 18 (78,3%) de los 23 sujetos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cohortes en la incidencia de los sucesos adversos de aparición con el tratamiento (p = 0,6196). Hubo once sujetos (47,8%) con sucesos adversos relacionados (definidos como sucesos clasificados por el investigador como posible o probablemente relacionados con la medicación del estudio).

30 Seis sujetos experimentaron aumentos de la alanina aminotransferasa (ALT) y/o de la aspartato aminotransferasa (AST) durante el estudio. Cuatro sujetos presentaron niveles altos de las enzimas que comenzaron después del tratamiento con el fármaco del estudio. Un sujeto (cohorte 1) presentó un alto nivel de ALT en la consulta de finalización del estudio y un sujeto (cohorte 5) presentó un nivel alto de AST en la evaluación de seguimiento en la consulta de seguimiento.

6. Eficacia

Como se resume en la tabla 10 y en las figuras 6 y 7, los datos preliminares de actividad clínica en las cohortes 1 a 4

5 demuestran que el tratamiento con TheraCLEC™ aumentó el CFA y el CNA en comparación con el período sin cualquier suplementación de enzimas pancreáticas. Para todos los sujetos en las cohortes 1 a 4, el aumento medio del CFA fue del  $20,6 \pm 23,5\%$  y el CNA medio aumentó en el  $19,7 \pm 12,2\%$ . El peso de las deposiciones también disminuyó después del tratamiento con TheraCLEC™ en estas cohortes, con una disminución media de  $425 \pm 422$  g. El CFA y el CNA aumentaron mínimamente sobre los niveles sin enzimas con la dosis inferior de TheraCLEC™ (cohorte 5: 100 unidades USP de lipasa por kg y comida, 100 unidades USP de proteasa por kg y comida y 15 unidades USP de amilasa por kg y comida).

**Tabla 10. Actividad clínica de TheraCLEC™: cambio desde el período de cribado al período de tratamiento**

Cambio desde el período inicial	Cohorte 1 (N=5)	Cohorte 2 (N=4)	Cohorte 3 (N=5)	Cohorte 4 (N=4)	Cohorte 5 (N=5)	Total (N=23)
CFA <sup>1</sup> medio (DE)	22,7% (19,4)	17,7% (25,9)	18,9% (11,9)	17,2% (42,3)	1,2% (20,3)	15,4% (23,8)
CNA <sup>2</sup> medio (DE)	20,3% (14,2)	14,4% (18,0)	15,8% (5,7)	20,6% (16,5)	0,1% (4,1)	14,0% (13,7)
N° medio deposiciones (DE)	-1,2 (1,5)	-0,8 (1,7)	-2,6 (1,7)	-2,8 (2,6)	0,2 (3,3)	-1,4 (2,4)
Peso de deposiciones medio (g) de deposiciones (DE)	-311,4 (371,7)	-308,8 (367,5)	-613,2 (423,3)	-836,0 (284,7)	-116,8 (373,2)	-425,5 (422,2)

DE = desviación estándar

10 <sup>1</sup>Coeficiente de absorción de grasa =  $100 \times (\text{número de gramos de grasa consumida} - \text{número de gramos de grasa obtenida}) / (\text{número de gramos de grasa consumida})$ .

<sup>2</sup>Coeficiente de absorción de nitrógeno =  $100 \times (\text{número de gramos de nitrógeno consumido} - \text{número de gramos de nitrógeno obtenido}) / (\text{número de gramos de nitrógeno consumido})$ .

Resultados del estudio de fase I

15 Aparentemente, TheraCLEC™ fue seguro y bien tolerado en este estudio de exposición de tres días. No se observó una relación entre la dosis y los sucesos adversos de aparición con el tratamiento. Durante este estudio fueron frecuentes las molestias gastrointestinales, tanto al tomar los sujetos la medicación usual, como al no recibir enzimas o al tomar TheraCLEC™, aunque se presentaron con la menor frecuencia durante el período ambulatorio al tomar los sujetos la medicación habitual. Durante las partes hospitalarias del estudio, se preguntó regularmente a los  
20 sujetos acerca de sus molestias gastrointestinales y, dado que el estudio se realizó sin enmascaramiento, se generó un sesgo. El aumento de las enzimas hepáticas y la presencia de hemoglobina y leucocitos en las deposiciones no fueron más frecuentes al tomar los sujetos TheraCLEC™ que al no recibir enzimas o tomar la medicación habitual.

25 Hubo una mejora de la absorción de grasa y de nitrógeno al tomar TheraCLEC™ en comparación con el período inicial, lo que demuestra la eficacia de los componentes de lipasa y proteasa de TheraCLEC™. No pareció haber una curva de respuesta a la dosis para las dosis superiores a 500 unidades de lipasa por kg y comida. Aunque se observó una tendencia hacia un menor peso fecal al aumentar las dosis, el intervalo era amplio. Los valores de CFA en este estudio parecen ser inferiores a los de la bibliografía publicada. Algunas explicaciones posibles incluyen un sesgo de selección, la dieta, las recogidas totales y el momento de administración de las enzimas.

30 Todos los sujetos en este estudio sufrían una insuficiencia pancreática grave, según se determinó por cribado de la elastasa fecal y se corroboró por el CFA sin enzimas. Otros estudios han incluido pacientes sin insuficiencia pancreática, los cuales desplazarán más hacia arriba los CFA medios [R. C. Stern y col., "A Comparison of the Efficacy and Tolerance of Pancrelipase and Placebo in the Treatment of Steatorrhea in Cystic Fibrosis Patients with Clinical Exocrine Pancreatic Insufficiency", *Am. J. Gastroenterol.*, págs. 1932-1938 (2000); M. P. Francisco y col., "Ranitidine and Omeprazole as Adjuvant Therapy to Pancrelipase to Improve Fat Absorption in Patients with Cystic  
35 Fibrosis", *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr.*, 35, págs. 79-83 (2002)].

En este estudio, los sujetos ingirieron al menos 100 g de grasa al día. Los CFA descritos en la bibliografía que se determinaron en función de la dieta rutinaria del paciente, probablemente se basaron en una ingestión de grasa inferior, dado que muchos pacientes ambulatorios ingieren menos de 100 g de grasa al día [P. Durie y col., "Uses and Abuses of Enzyme Therapy in Cystic Fibrosis", *J. Royal Soc. Med.* 91, supl. 34, págs. 2-3 (1998); D. A. Kawchak

y col., "Longitudinal, Prospective Analysis of Dietary Intake in Children with Cystic Fibrosis", *J. Pediatr.*, 129, págs. 119-129 (1996)]. Una menor carga de grasa puede ser manejada más fácilmente por la lipasa lingual compensatoria residual observada en pacientes con fibrosis quística [B. Fredrikzon y col., "Lingual Lipase: an important Lipase in the Digestion of Dietary Lipids in Cystic Fibrosis?", *Pediatr. Res.*, 14, págs. 1387-1390 (1980)].

- 5 Para el marcaje de la recogida de deposiciones se usó un colorante alimentario azul. Como anécdota, las enfermeras de los centros de investigación clínica han descrito que los marcadores rojo carmín o carbón pueden ser difíciles de identificar en las deposiciones. El azul FD&C n° 2, a una dosis de 500 mg por vía oral es fácilmente visible cuando se expulsa en las deposiciones y demarca claramente el comienzo y el final de la recogida de deposiciones. Una recogida de deposiciones abreviada resultará en menos grasa en la recogida de deposiciones total, lo que conducirá a un CFA erróneamente alto. Los estudios anteriores pueden haber obtenido valores del CFA erróneamente superiores por la dificultad en la identificación del comienzo y el final de la recogida. Dado que la recogida de deposiciones es desagradable, existe una tendencia humana a finalizar la recogida lo más pronto posible.
- 10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que comprende lipasa, proteasa y amilasa, en la que la proporción de lipasa, proteasa y amilasa en dicha composición es aproximadamente de 1:1:0,15 unidades USP, en la que la lipasa es lipasa de *Burkholderia cepacia* cristalizada reticulada, la proteasa es proteasa de *Aspergillus melleus* cristalizada y la amilasa es amilasa de *Aspergillus oryzae* amorfa.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que los cristales de lipasa se reticulan con un reticulante multifuncional.
3. Composición según la reivindicación 2, en la que el reticulante multifuncional es suberato de bis(sulfosuccinimidilo).
- 10 4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición está en una forma de dosificación por vía oral seleccionada del grupo que consiste en comprimidos, cápsulas, suspensiones espesas, sobres, suspensiones y grageas.
- 15 6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de la malabsorción en un mamífero.
7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de la insuficiencia pancreática en un mamífero.
8. Composición según la reivindicación 6 ó 7, en la que el mamífero sufre fibrosis quística.

20

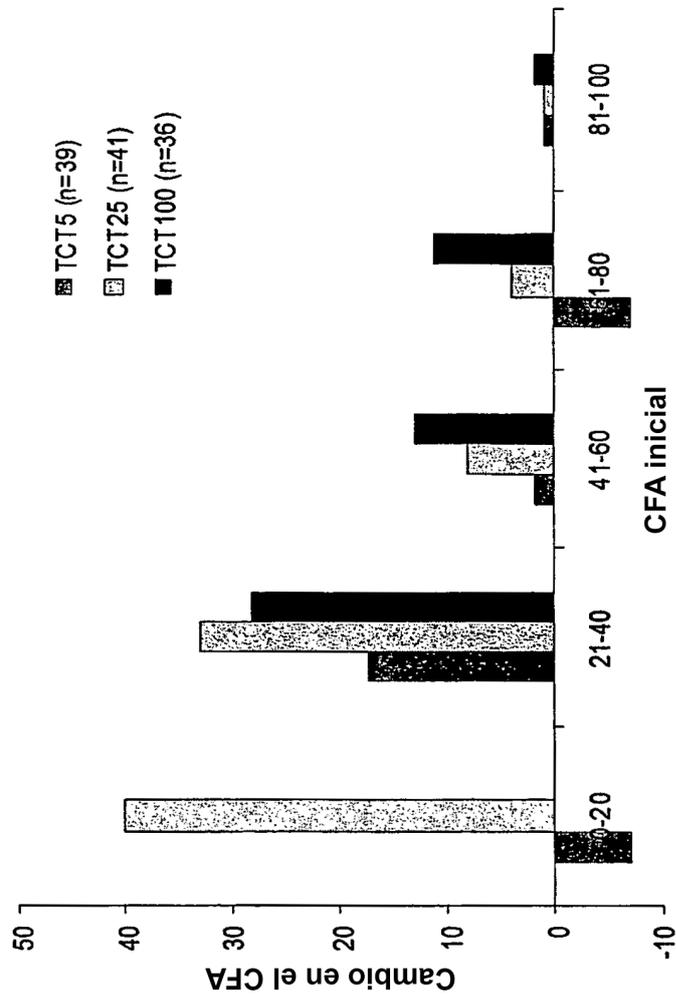


FIG. 1

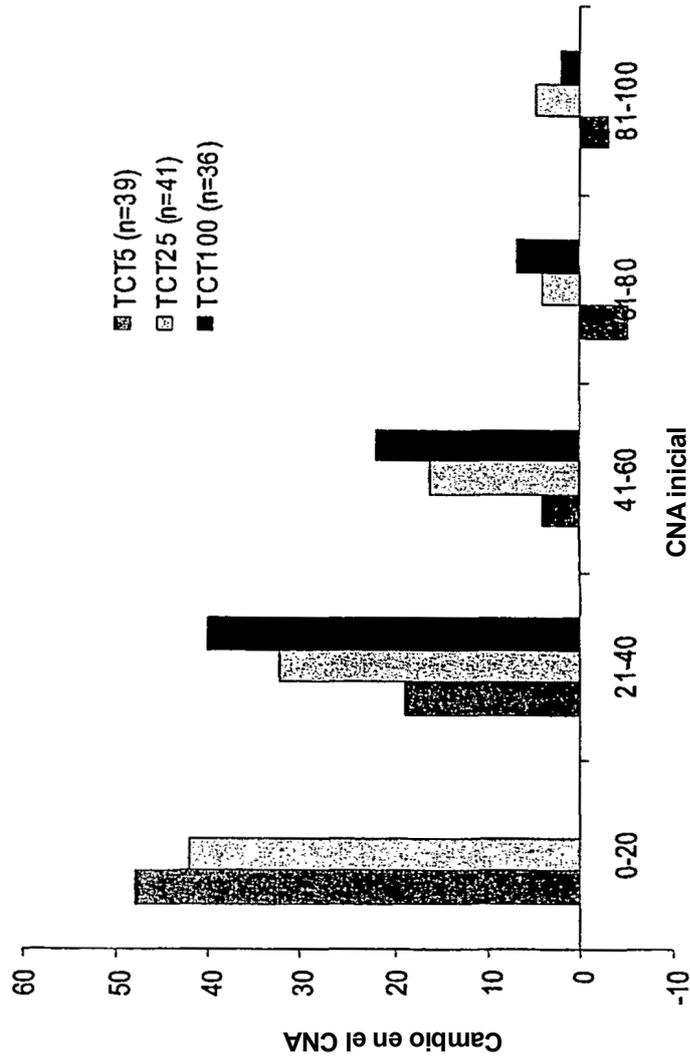


FIG. 2

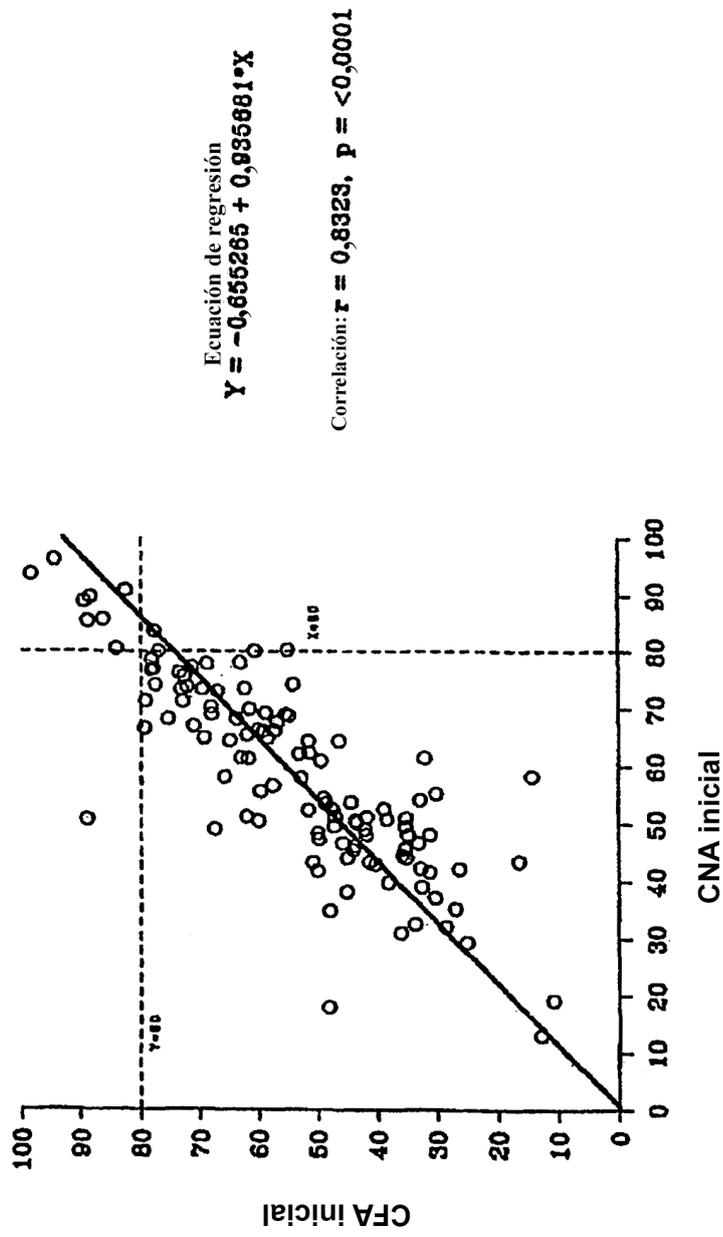


FIG. 3

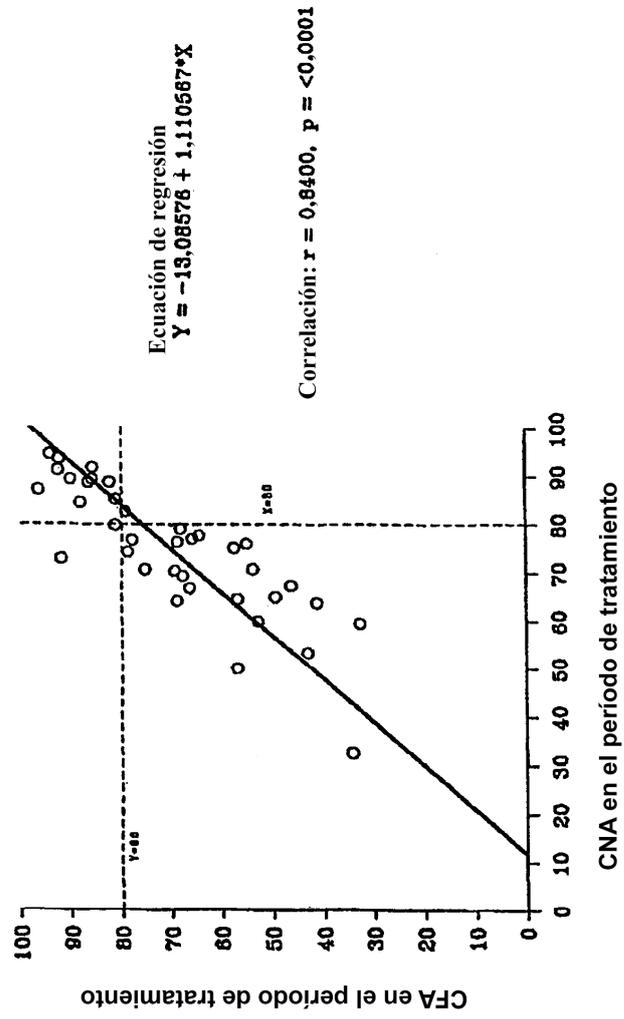


FIG. 4

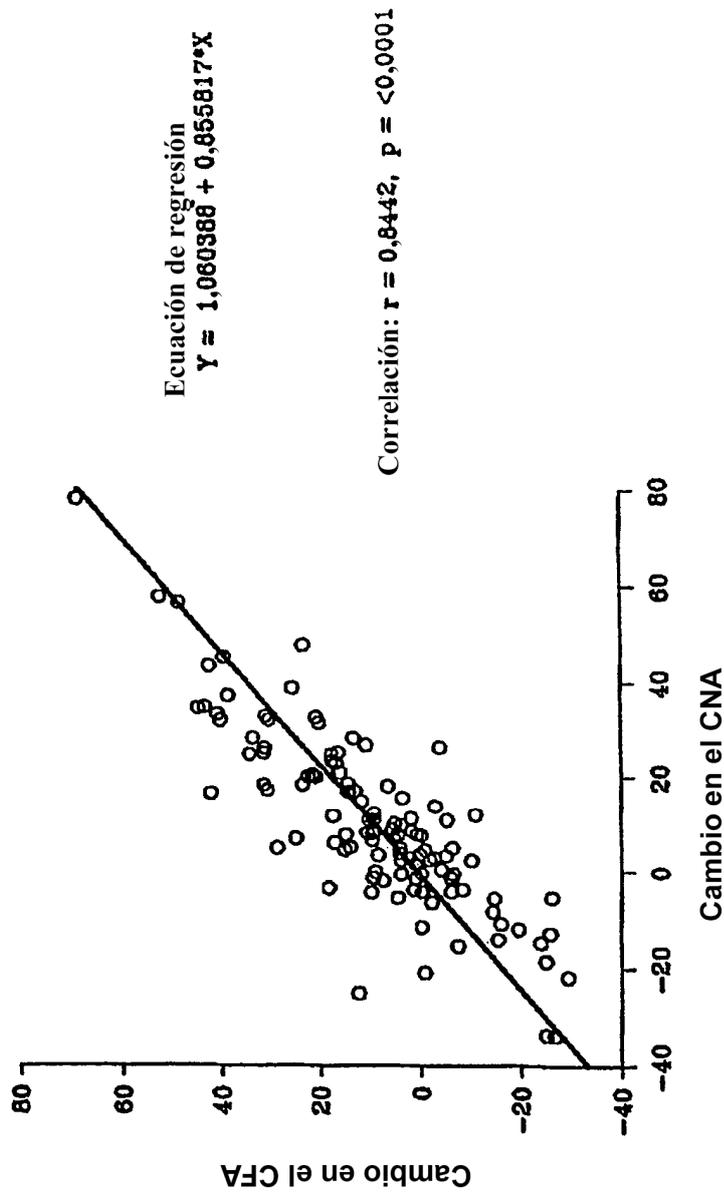


FIG. 5

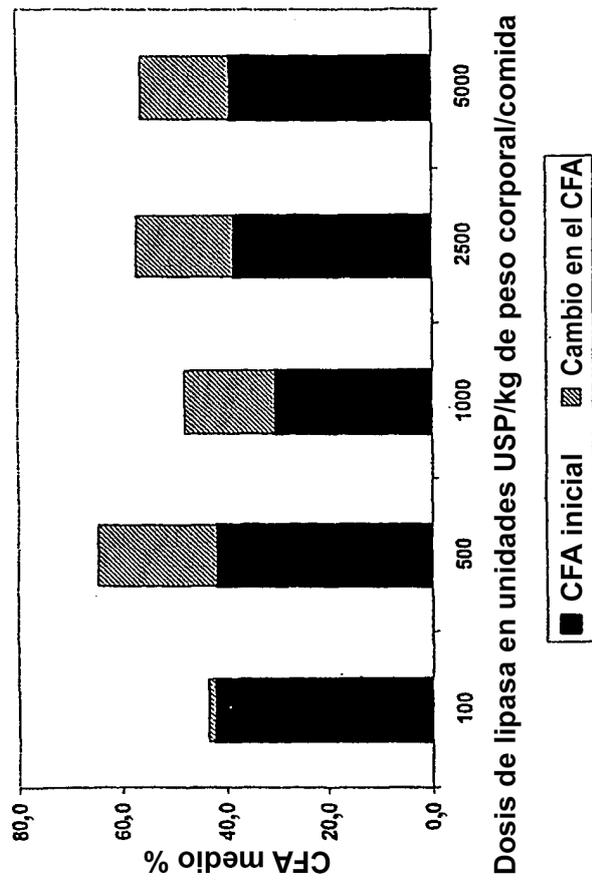


FIG. 6

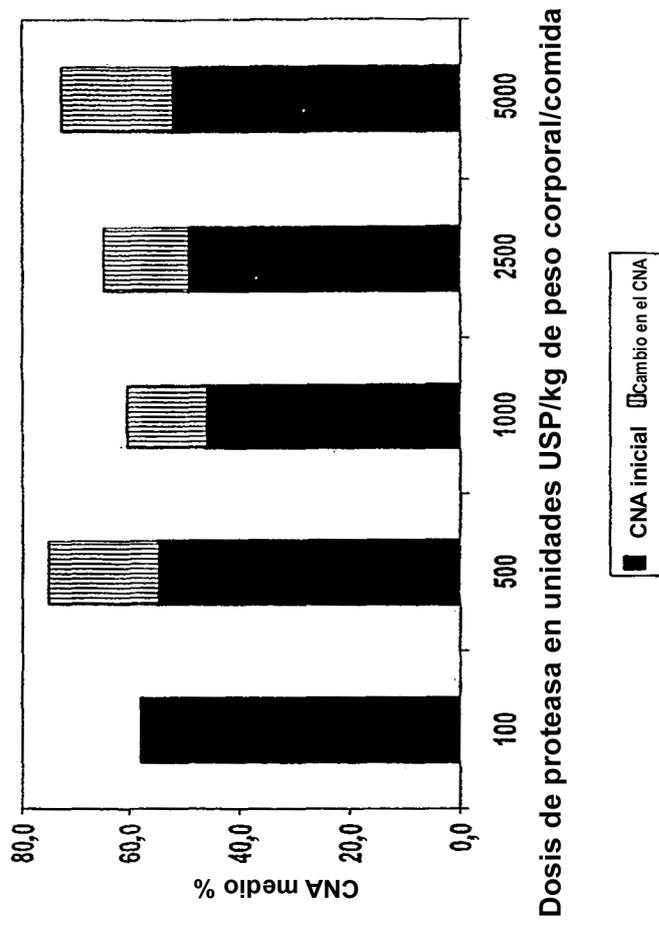


FIG. 7