

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 212**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C12N 9/94 (2006.01)

A61P 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2014 PCT/IB2014/002583**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15019198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2014 E 14815008 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 3024479**

54 Título: **Métodos para preparar pancreatina**

30 Prioridad:

22.07.2013 US 201361856952 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2020

73 Titular/es:

**ALLERGAN PHARMACEUTICALS
INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)
Clonshaugh Business & Technology Park
Dublin 17, D17 E400, IE**

72 Inventor/es:

**PIRONTI, VINCENZA;
BECKER, ROBERT;
BOLTRI, LUIGI;
GHIDORSI, LUIGI y
ARZUFFI, PAOLA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 743 212 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

Métodos para preparar pancreatina

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas de alta potencia que comprenden enzimas pancreatina de alta actividad (pancreatina HA). La divulgación también se refiere a un proceso de producción de enzimas pancreatina HA y sus composiciones o formas de dosificación, y métodos para su uso. La invención se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

La insuficiencia pancreática exocrina (EPI), de la cual la FDA calcula que la padecen más de 200,000 americanos, implica un trastorno fisiológico en el que los individuos son incapaces de digerir los alimentos adecuadamente debido a la falta de enzimas digestivas producidas por su páncreas. Esta pérdida de enzimas digestivas conduce a trastornos, tales como la mala digestión y la mala absorción de nutrientes, que conducen a desnutrición y a otras afecciones fisiológicas consiguientes e indeseables asociadas con las mismas. Estos trastornos son comunes para quienes padecen fibrosis quística (CF) y otras afecciones, que comprometen la función exocrina del páncreas, tal como el cáncer de páncreas, pancreatectomía y pancreatitis. La malnutrición puede ser mortal si no se trata, especialmente en el caso de los lactantes y los pacientes con CF. El trastorno puede conducir a problemas de crecimiento, una respuesta inmunológica comprometida y una reducción de la esperanza de vida.

Las enzimas digestivas, tal como enzimas pancrelipasa y otros productos de enzimas pancreáticas (PEP) se pueden administrar para remediar al menos parcialmente la EPI. Las enzimas digestivas administradas permiten a los pacientes digerir más eficazmente sus alimentos.

Las enzimas pancrelipasa usadas para tratar la EPI son principalmente una combinación de tres clases de enzimas: lipasa, amilasa y proteasa, junto con otras enzimas que incluyen elastasas, fosfolipasas y colesterasas, entre otras, y varios cofactores y coenzimas con otros cofactores y coenzimas diferentes; se enumeran los niveles o potencia en los productos enzimáticos. Estas enzimas se producen de forma natural en el páncreas y son importantes en la digestión de grasas, proteínas y carbohidratos. Las enzimas catalizan la hidrólisis de grasas en glicerol y ácidos grasos, almidón en dextrina y azúcares, y proteínas en aminoácidos y sustancias derivadas. Sin embargo, la digestión es un proceso complejo que implica a otras muchas enzimas y sustratos que contribuyen a corregir el funcionamiento digestivo y a producir la gama completa de productos digestivos.

Las enzimas pancrelipasa se preparan por lo general a partir de glándulas pancreáticas de porcino. Otras fuentes de pancrelipasa incluyen glándulas pancreáticas o jugos pancreáticos de bovino. La fuente natural de mamíferos de estas enzimas da como resultado un producto con una composición enzimática que es similar a la secretada por el páncreas humano. También se pueden usar otras fuentes no mamíferas, por ejemplo, las que se describen en los documentos U.S. 6.051.220, U.S. 2004/0057944, 2001/0046493, y WO2006044529.

Aunque los productos que contienen pancrelipasa pueden ofrecer una terapia eficaz, existen problemas con ellos. La necesidad de múltiples (4-9) cápsulas relativamente grandes (alta carga de píldoras) con cada comida disminuye la adherencia del paciente a la dosificación. También se observa que la contaminación microbiana y viral potenciales como consecuencia de una alta carga de píldoras son indeseables. Todos estos problemas están relacionados con el extracto enzimático que es menos puro. El problema de la pureza es una consecuencia de los procedimientos de extracción de enzimas que han estado en funcionamiento durante muchos años y que implican la formación de una mezcla o suspensión acuosa gruesa, precipitación con alcohol, centrifugación y filtración. Tales procesos de extracción producen productos finales que pueden consistir en tan solo un 25 % de proteína. La lipasa, una enzima importante en términos de eficacia en estos extractos de pancrelipasa, tiene una actividad que está en la región de 100 UI USP/mg. Esto contrasta con la actividad de la lipasa pura de porcino, que tiene una actividad de aproximadamente 25.000 UI/mg (tal como lipasa pura de porcino disponible en Sigma Aldrich). Usando esta aproximación como base para el cálculo, se puede estimar que los productos contienen menos de un 0,5 % de lipasa activa. Además, la consecuencia adicional de la presencia de material inactivo en exceso es que cualquier contaminación infecciosa puede ser inevitablemente una parte de este volumen y, en consecuencia, también se ingiere junto con los componentes activos deseables de la mezcla. El exceso de materiales inactivos también interfiere con las técnicas destinadas a reducir la carga biológica, por ejemplo, a través de la obstrucción de los filtros de membrana o columnas de filtración y protegiendo el extracto de la radiación ionizante útil para disminuir su carga infecciosa potencial.

Un número de enzimas simples puras y una mezcla de tres enzimas individuales, en un caso, han entrado en desarrollo clínico para el tratamiento de la EPI. Estas son lipasa recombinante estimulada por sales biliares (BSSL) (Exinalda™/Kiobrina®), una lipasa recombinante humana contenida en la leche materna; Merispase®, una lipasa recombinante gástrica canina; MS1819, una lipasa recombinante; y lipotamasa, una mezcla que consiste en una lipasa recombinante bacteriana, químicamente reticulada, una proteasa y una amilasa extraída de fuentes

microbianas. Hasta el momento, todas estas terapias experimentales no han demostrado un nivel de eficacia del tratamiento comparable al de los extractos enzimáticos comerciales de páncreas porcino tales como Zenpep® o Ultresa®. Del mismo modo, una reunión de la junta asesora de la FDA el 12 de enero de 2011 votó en contra de la aprobación de la lipotamasa debido a su menor eficacia, en términos de aumento del coeficiente de absorción de

grasa (CFA) en comparación con el obtenido previamente con los productos de extracto de pancrelipasa.

Existe una clara necesidad de un producto que esté más concentrado y purificado en comparación con los productos que contienen pancrelipasa existentes, pero que mantenga su eficacia para el tratamiento de la EPI, ya que esto podría permitir la producción de productos mejores, más convenientes y potencialmente más seguros. Existen varios

informes bibliográficos que describen el uso de pancrelipasa como material de partida para el aislamiento de proteasas, lipasas o amilasas; sin embargo, no hay informes de pancrelipasa del tipo que se encuentra en las PEP o productos similares que se purifican con el fin de crear un producto mejorado para uso terapéutico. En cada caso, el objetivo antes de la invención que se describe en el presente documento fue purificar una enzima particular o fracción enzimática con respecto a otras o eliminar ciertos componentes sin aumentar sustancialmente la actividad enzimática general. En todos los casos, tampoco ha habido instrucciones para producir un producto de pancreatina HA para su uso como agente terapéutico.

La técnica anterior que describe la purificación de proteínas tiene como objeto extraer y aislar una fracción rica en proteínas simple, como se hacía modo de ejemplo con la pancrelipasa, o separar proteínas individuales o clases de proteínas individuales, por ejemplo, lipasas o proteasas.

Por ejemplo, Hwang (Ind. Eng. Chem. Res. 2007, 46, 4289) desvela una proporción entre la solubilidad de las enzimas pancreáticas y la polaridad del disolvente e informa sobre la eliminación selectiva de lipasa, proteasa y amilasa de las proteínas pancreáticas. Hwang muestra que la precipitación de la pancreatina mejora cuando se usa disolvente con polaridad reducida y que se maximiza cuando el disolvente tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand por debajo de 28 (MPa)^{0.5}; la precipitación selectiva de amilasa y proteasa aumenta con la disminución de la polaridad del disolvente por debajo de 34 (MPa)^{0.5}, mientras que la precipitación selectiva de lipasa es independiente de la polaridad de la solución, no se recupera más de un 65 % de la lipasa presente en la mezcla. A partir de estos resultados, no existe ningún incentivo para purificar la amplia gama de enzimas pancreáticas juntas para obtener una pancreatina HA y no existe ningún incentivo para que los expertos en la materia conserven una mezcla de clases de enzimas durante la purificación. El hecho de que no se haya intentado purificar la pancrelipasa que se ha usado en productos terapéuticos durante más de 60 años es un fuerte indicador de que los beneficios de hacerlo no se han previsto ni apreciado. Todos los intentos de mejorar los productos de pancrelipasa se han centrado en enzimas individuales de fuentes no pancreáticas, enfatizando además que el uso de pancrelipasa como fuente de enzimas más puras y/o más concentradas para la fabricación de productos mejorados no se había apreciado previamente.

No hay ningún incentivo o razón para purificar la pancrelipasa, como se usa actualmente en aplicaciones farmacéuticas y de limpieza varias veces, con el objetivo de producir un producto con un perfil cualitativo y cuantitativo de actividad enzimática sustancialmente similar. De hecho, los productos actuales cumplen sus funciones adecuadamente y, como tales, han permanecido sustancialmente sin cambios durante más de 60 años y parece que no hay descripciones de los productos notablemente mejorados o los procesos de preparación asociados que se describen en el presente documento. Todos esos productos que contienen enzimas puras para el tratamiento de la EPI se han basado en enzimas individuales o, en un caso, en una mezcla de tres enzimas simples puras y químicamente modificadas, de tecnología recombinante o fuentes microbianas. No se han realizado esfuerzos para purificar una mezcla que comprende proteasa, lipasa y amilasa de los extractos sin procesar de glándulas del páncreas que se usan para el tratamiento de la EPI, limpieza y digestión de tejidos. Del mismo modo, no ha habido incentivos ni informes de que las enzimas de una fuente pancreática se purifiquen individualmente y a continuación se recombinen; un enfoque de ese tipo es contrario al objetivo de conseguir una enzima o una clase de enzima aislada.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a enzimas pancreatina HA y a composiciones farmacéuticas de alta potencia o formas de dosificación de las mismas. La invención también se refiere a un proceso de alto rendimiento para producir pancreatina HA y métodos para el uso de un producto de ese tipo.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un producto (pancreatina HA (alta actividad)) que comprende clases de enzimas esenciales que tienen una actividad terapéutica eficaz y significativamente elevada, más particularmente que también tiene una biocarga reducida de componentes biológicos innecesarios y/o componentes potencialmente infecciosos indeseables. La invención también se refiere a un proceso para producir la pancreatina HA, más particularmente con un rendimiento muy elevado. La pancreatina HA también podría permitir la formulación de formas de dosificación más pequeñas y convenientes, en particular formas de dosificación que se pueden administrar como una sola píldora, formas de dosificación de partículas pequeñas para suspensión y formas de dosificación que se podrían

combinar con otros ingredientes terapéuticos o útiles en una sola unidad de dosificación Esta innovación podría ser de valor particular para los pacientes que padecen PEI, tal como los pacientes con fibrosis quística. La invención también podría ser útil para formular formulaciones en las que la edad o el estado del paciente pueden requerir formas de administración alternativas distintas a una cápsula, por ejemplo, suspensión, partículas. Una forma de dosificación, unidad o partícula más concentrada y, por lo tanto, más pequeña podría ser de gran valor para este grupo de pacientes. La invención también permite la aplicación de tecnologías diseñadas para reducir o eliminar componentes biológicos innecesarios o indeseables tales como microbios y cualquier toxina asociada por los motivos que se han descrito anteriormente.

La presente invención se refiere a enzimas pancreatina HA (pancreatina HA) y a su composición farmacéutica de alta potencia. En una realización particular, la pancreatina HA se obtiene a partir de porcino. La pancreatina HA comprende lipasa, proteasas, amilasa y tiene una actividad de lipasa específica de al menos aproximadamente 120, o al menos aproximadamente 150, o al menos aproximadamente 200, o al menos aproximadamente 400, o al menos aproximadamente 500 USP UI/mg.

La expresión "enzima digestiva" usada en el presente documento se refiere a una enzima en el tracto alimentario que descompone los componentes de los alimentos para que el organismo pueda tomarlos o absorberlos. Entre los ejemplos no limitantes de enzimas digestivas se incluyen las enzimas pancrelipasa (también denominadas pancrelipasa o pancreatina), lipasa, colipasa, tripsina, quimotripsina, quimotripsina B, pancreatopeptidasa, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, éster de glicerol hidrolasa, fosfolipasa, éster de esterol hidrolasa, elastasa, quinogenasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, α -amilasa, papaína, quimopapaína, glutenasa, bromelina, ficina, β -amilasa, celulasa, β -galactosidasa, lactasa, sacarasa, isomaltasa y mezclas de las mismas.

La expresión "enzima pancreática" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de los tipos de enzimas presentes en la secreción pancreática, tales como amilasa, lipasa, proteasa o mezclas de las mismas, o cualquier extracto de origen pancreático que tenga actividad enzimática, tal como pancreatina.

Las expresiones "enzimas pancrelipasa" o "pancrelipasa" o "pancreatina" se refieren a una mezcla de varios tipos de enzimas, incluyendo las enzimas amilasa, lipasa y proteasa. La enzima pancrelipasa está disponible en el mercado, por ejemplo en Nordmark Arzneimittel GmbH o Scientific Protein Laboratories LLC.

El término "API" se usa en el presente documento para hacer referencia a "enzimas digestivas" o "enzimas pancrelipasa" o "pancreatina".

El término "lipasa" se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis de los lípidos a glicerol y ácidos grasos simples. Los ejemplos de lipasas adecuadas para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, lipasa animal (por ejemplo, lipasa porcina), lipasa bacteriana (por ejemplo, lipasa de *Pseudomonas* lipasa y/o lipasa de *Burkholderia*), lipasa fúngica, lipasa vegetal, lipasa recombinante (por ejemplo, producida mediante tecnología de ADN recombinante por una célula hospedadora adecuada, seleccionada entre una cualquiera de células hospedadoras de bacterias, levaduras, hongos, plantas, insectos o mamíferos en cultivo, o lipasas recombinantes, que incluyen una secuencia de aminoácidos que es homóloga o sustancialmente idéntica a una secuencia de origen natural, lipasas codificadas por un ácido nucleico que es homólogo o sustancialmente idéntico a un ácido nucleico que codifica lipasa de origen natural, etc.), lipasa sintética, lipasa modificada químicamente y mezclas de las mismas. El término "lípidos" incluye en términos generales moléculas de origen natural que incluyen grasas, ceras, esteroides, vitaminas liposolubles (como las vitaminas A, D, E y K), monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, fosfolípidos, etc.

El término "amilasa" se refiere a las enzimas glicósido hidrolasas que descomponen el almidón, por ejemplo, α -amilasas, β -amilasas, γ -amilasas, ácido α -glucosidasas, amilasas salivales tal como ptialina, etc. Las amilasas adecuadas para su uso en el presente la invención incluyen, pero no se limitan a, amilasas animales, amilasas bacterianas, amilasas fúngicas (por ejemplo, amilasa de *Aspergillus*, por ejemplo, amilasa de *Aspergillus oryzae*), amilasas de plantas, amilasas recombinantes (por ejemplo, producidas mediante tecnología de ADN recombinante por una célula hospedadora adecuada, seleccionada entre cualquiera de las células hospedadoras de bacterias, levaduras, hongos, plantas, insectos o mamíferos en cultivo, o amilasas recombinantes, que incluyen una secuencia de aminoácidos que es homóloga o sustancialmente idéntica a una secuencia de origen natural, amilasas codificadas por un ácido nucleico que es homólogo o sustancialmente idéntico a un ácido nucleico que codifica amilasa de origen natural, etc.), amilasas químicamente modificadas y mezclas de las mismas.

El término "proteasa" se refiere generalmente a enzimas (por ejemplo, proteinasas, peptidasas o enzimas proteolíticas) que rompen los enlaces peptídicos entre los aminoácidos de las proteínas. Las proteasas generalmente se identifican por su tipo catalítico, por ejemplo, peptidasas de ácido aspártico, peptidasas de cisteína (tiol), metalopeptidasas, peptidasas de serina, peptidasas de treonina, proteasas alcalinas o semi alcalinas, neutras y peptidasas de mecanismo catalítico desconocido. Los ejemplos no limitantes de proteasas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen serina proteasas, treonina proteasas, cisteína proteasas, metaloproteasas de ácido aspártico (por ejemplo, plasmepsina) y proteasas de ácido glutámico. Además, las proteasas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, proteasas animales, proteasas bacterianas, proteasas fúngicas (por ejemplo, una proteasa de *Aspergillus melleus*), proteasas vegetales, proteasas recombinantes (por

ejemplo, producidas mediante tecnología de ADN recombinante por un célula hospedadora adecuada, seleccionada entre una cualquiera de las bacterias, levaduras, hongos, células las de plantas, insectos o mamíferos en cultivo, o proteasas recombinantes, que incluyen una secuencia de aminoácidos que es homóloga o sustancialmente idéntica a una secuencia de origen natural, proteasas codificadas por un ácido nucleico que es homólogo o sustancialmente idéntico a un ácido nucleico que codifica proteasas de origen natural, etc.), proteasas modificadas químicamente y mezclas de los mismos.

Las enzimas pancrelipasa de la composición de la presente invención pueden incluir una o más lipasas (es decir, una lipasa, o dos o más lipasas), una o más amilasas (es decir, una amilasa, o dos o más amilasas), una o más proteasas (es decir, una proteasa, o dos o más proteasas), y mezclas de estas enzimas en diferentes combinaciones y proporciones.

Las actividades de lipasa en las composiciones útiles para la presente invención pueden ser de aproximadamente 650 a aproximadamente 100.000 UI (método USP). Puede ser de aproximadamente 675 a aproximadamente 825 UI, de aproximadamente 2.500 a aproximadamente 28.000 UI, de aproximadamente 2.700 a aproximadamente 3.300 UI, de aproximadamente 4.500 a aproximadamente 5.500 UI, de aproximadamente 8.000 a aproximadamente 11.000 UI, de aproximadamente 13.500 a aproximadamente 16.500 UI, y de aproximadamente 18.000 a aproximadamente 22.000 UI, de aproximadamente 22.500 a aproximadamente 27.500 UI, de aproximadamente 36.000 a aproximadamente 44.000 UI, y todos los intervalos y subintervalos entre los mismos.

Las composiciones de la invención contienen preferentemente al menos aproximadamente 650 UI (método USP), al menos aproximadamente 9.000, incluso más preferentemente contienen aproximadamente 20.000, aproximadamente 40.000, aproximadamente 60.000, aproximadamente 80.000, o aproximadamente 100.000 unidades de lipasa USP por unidad de dosificación.

La composición de pancreatina HA de acuerdo con la presente invención puede estar en forma de polvo o puede estar en forma compactada, por ejemplo, un comprimido, o puede comprender una pluralidad de partículas revestidas y/o no revestidas. Las partículas pueden comprender un núcleo revestido con al menos un revestimiento entérico, en el que dicho revestimiento contiene un polímero entérico. La composición anterior además de las partículas revestidas también puede comprender partículas no revestidas de pancrelipasa. En particular, las partículas son minicomprimidos, microcomprimidos, micropartículas, microesferas, microcápsulas, microgránulos. Las partículas pueden tener diámetros de hasta aproximadamente 5 mm. Pueden tener cualquier tamaño o forma de partícula adecuada. Por ejemplo, las partículas pueden tener un intervalo de tamaño de partícula de aproximadamente 25-5.000 μm , por ejemplo, pueden estar en forma de "minicomprimidos" que tienen un diámetro de partícula nominal en el intervalo de aproximadamente 2-5 mm, o pueden ser "microcomprimidos" que tienen diámetros nominales de partículas de menos de aproximadamente 2 mm, por ejemplo, aproximadamente 1-2 mm. Las partículas pueden tener un tamaño medio de partículas de menos de aproximadamente 400 μm , preferentemente menos de 500 μm , más preferentemente menos de 200 μm . Las partículas pueden tener un diámetro de volumen ($d(v,0,1)$) (definido como el diámetro en el que un 10 % de la distribución de volumen está por debajo de este valor y un 90 % está por encima de este valor) de no menos de 400 μm y un diámetro de volumen $d(v,0,9)$, (definido como el diámetro den el que un 90 % de la distribución de volumen está por debajo de este valor y un 10 % está por encima de este valor) de no más de 800 μm .

En las realizaciones en las que los núcleos de pancrelipasa están rodeados por un revestimiento entérico, el revestimiento actúa como una barrera que protege el medicamento del ambiente ácido del estómago y evita sustancialmente la liberación del medicamento antes de que llegue al intestino delgado. Se pueden usar combinaciones adecuadas de composiciones de revestimiento entérico con otras composiciones de revestimiento para proporcionar el tipo deseado de control sobre la liberación del fármaco o los efectos terapéuticos. El revestimiento entérico incluye al menos un polímero entérico y otros excipientes adicionales. La expresión "polímero entérico" se refiere a un polímero que protege las enzimas digestivas del contenido gástrico, por ejemplo, un polímero que es estable a un pH ácido, pero que se puede descomponer rápidamente a un pH más alto o un polímero cuya velocidad de hidratación o erosión es lo suficientemente lenta como para asegurar que el contacto del contenido gástrico con las enzimas digestivas sea relativamente menor mientras está en el estómago, a diferencia del resto del tracto gastrointestinal.

Los ejemplos no limitantes de polímeros entéricos son acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato acetato de polivinilo, copolímeros de ácido metacrílico, ésteres de metacrilato de metilo, copolímeros de metacrilato de metilo, y copolímeros de ácido metacrílico/ metacrilato de metilo, copolímero de ácido metacrílico- acrilato de etilo (1:1), goma laca, y etil celulosa. Estos polímeros están disponibles en el mercado con diferentes nombres de marca, tales como: Cellacefate (acetato ftalato de celulosa), Eudragit® L100, S100, L30D, FS30D, L100-55, L30D55 (copolímeros de ácido metacrílico), Aquateric® (acetato ftalato de celulosa), Acoat® (acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa), y HP55® (ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa). El revestimiento entérico puede comprender además otros excipientes tales como talco. Preferentemente, el revestimiento entérico comprende un 10-20 % en peso de al menos un polímero entérico, en el que cada uno de dicho % en pesos se basa en el peso total de las partículas revestidas. El revestimiento puede comprender además un agente lipofílico, tal como una molécula lipofílica de bajo peso molecular C6 - C30

seleccionada entre los ácidos y alcoholes carboxílicos alifáticos, preferentemente un ácido o alcohol o ácido carboxílico C14 - C18, tal como ácido esteárico, ácido mirístico, alcohol mirístico, o alcohol estearílico. Otros ingredientes opcionales del revestimiento son agentes plastificantes, agentes antiadherentes (tales como talco, estearato de magnesio, dióxido de silicio coloidal y combinaciones de los mismos; además, opcionalmente, una etilcelulosa de baja viscosidad). Los ejemplos no limitantes de agentes plastificantes adecuados incluyen triacetina, citrato de tributilo, citrato de tri-etilo, citrato de acetil tri-n-butilo, ftalato de dietilo, sebacato de dibutilo, polietilenglicol, polipropilenglicol, aceite de ricino, mono- y di-glicéridos acetilados, alcohol cetílico, y mezclas de los mismos. El agente plastificante preferente es un plastificante sin ftalato o mezclas del mismo.

Las partículas revestidas o no revestidas de pancreatina HA se pueden preparar de acuerdo con procesos conocidos. Por ejemplo, los núcleos de microgránulos se pueden preparar añadiendo un aglutinante adecuado a la pancreatina HA seguido de extrusión en presencia de un disolvente adecuado y posterior esferonización. La esferonización controlada se puede aplicar para generar partículas de pancreatina HA de pequeño tamaño. Las tecnologías de revestimiento por pulverización, estratificación en polvo y lecho fluido se pueden usar para preparar perlas a través del revestimiento de un núcleo inerte. Los procesos de coacervación también pueden ser útiles para la preparación de partículas de pancrelipasa revestidas.

La compresión directa se puede usar para preparar comprimidos compactados sin excipientes. En ciertos casos, el comprimido puede mostrar resistencia gástrica, debido a la formación *in situ* de una capa de revestimiento hidrófoba al entrar en contacto con los fluidos gástricos.

Las composiciones que comprenden la pancreatina HA pueden estar en cualquier forma adecuada para la dosificación de un agente terapéutico que contiene enzimas de digestión, de modo que por ejemplo, pueden estar en forma de polvo, gránulos, microesferas, cápsulas, bolsitas, comprimidos, suspensiones líquidas y soluciones líquidas

En una realización de la presente invención se pueden preparar formas de dosificación que comprenden pancreatina HA, en particular, se pueden preparar formas de dosificación más pequeñas y/o únicas que comprenden pancreatina HA. La disponibilidad de la pancreatina HA permite reducir el tamaño de la cápsula y/o incluso administrar la dosis como un número reducido de cápsulas por comida con respecto a la composición de formulación típica de una cápsula de Zenpep® de tamaño 0 de concentración de 20.000 unidades, que se llena con 250-275 mg de API. Un paciente adulto puede tomar de 4 a 10 cápsulas por comida. Para una dosis diaria total de 200.000 USP U de lipasa, un paciente ahora toma 10 cápsulas y la ingesta del medicamento es de aproximadamente 2.500-2.750 mg. Una purificación de al menos 2 veces constituye una mejora significativa y mayores grados de purificación. De hecho, la forma de dosificación farmacéutica de la pancreatina HA, que adquiere la forma de una cápsula administrada por vía oral, que puede tener un contenido de aproximadamente 100-110 mg de API (con respecto a 250-275 mg) y, por lo tanto, para una dosificación diaria total de 200.000 USP U de lipasa la ingesta de producto farmacológico del paciente es de aproximadamente 1.000-1.100 mg (con respecto a 2.500-2.750 mg). Además, con la cápsula de pancreatina HA se puede usar el tamaño 2 (con respecto al tamaño 0), reduciendo de ese modo drásticamente también el número total de cápsulas a administrar, o como alternativa, manteniendo una cápsula de tamaño 0 y modulando adecuadamente su contenido, reduciendo de forma significativa la ingesta diaria. El tratamiento de la EPI es un tratamiento crónico que frecuentemente comienza en la infancia. La capacidad de formular la pancrelipasa de modo que pueda estar contenida en unidades de dosificación más pequeñas y/o ingerirse como un número reducido de unidades de dosificación por comida constituye un beneficio significativo para los pacientes.

Las nuevas formas de dosificación de la presente invención también pueden incluir formas de dosificación de partículas pequeñas. Un producto de pancrelipasa con una mayor potencia por unidad de volumen podría superar problemas importantes con respecto a la reducción de la dimensión de las perlas. La mayoría de las formas de dosificación comerciales de pancrelipasa son cápsulas que están llenas de perlas de pancrelipasa, que están revestidas con un polímero entérico. El revestimiento se aplica porque la lipasa pancreática se inactiva irreversiblemente en medios ácidos. Las cápsulas se pueden abrir y las perlas se pueden rociar sobre ciertos alimentos y esta es una opción importante para pacientes más jóvenes o aquellos que tienen dificultad para tragar o sobrellevar la alta carga de pastillas. Sin embargo, esta opción no cubre las necesidades de todos los pacientes, ya que las perlas tienen un diámetro apreciable, que puede llegar a ser de hasta 2 mm. Esto significa que las perlas no se pueden suspender fácilmente en líquidos para bebés o pacientes que requieren alimentación por sonda. Los intentos de reducir las dimensiones de las perlas dan como resultado grandes aumentos del área superficial total y, en consecuencia, se necesita mucho más polímero entérico para cubrir eficazmente el área superficial aumentada de las partículas. Esto aumenta en gran medida el volumen de la forma de dosificación y la cantidad de polímero ingerido hasta el punto en que el volumen de la forma de dosificación aumenta aún más la carga de la píldora y los niveles de excipientes de revestimiento pueden exceder los límites establecidos en su ingesta diaria.

La disponibilidad de una pancreatina HA, con un volumen muy reducido, no solo permite que la dosis completa se contenga en una sola unidad de dosificación o en un número reducido de unidades de dosificación, sino que también permite la combinación de pancrelipasa con otros compuestos. Por ejemplo, un agente de tamponamiento antiácido, tal como bicarbonato de sodio y pancreatina HA, se puede combinar en una sola unidad de dosificación, mientras que no sería posible contemplar una combinación de enzimas pancreáticas y un agente que aumente el pH del estómago usando la pancrelipasa actual ya que esto podría aumentar drásticamente la carga de píldoras ya muy alta

ya que se requerirían cápsulas/comprimidos adicionales y/o las cápsulas/comprimidos podrían ser de un tamaño excesivo.

La pancreatina HA también ofrece la opción de proporcionar una forma de dosificación dispersable sin un revestimiento entérico ya que el tampón podría evitar la inactivación ácida del componente de lipasa de la pancreatina. Además, la suplementación con bicarbonato también puede proporcionar un beneficio terapéutico ya que la secreción de bicarbonato generalmente se reduce en pacientes con EPI. Esta nueva forma de dosificación se puede formular para liberación inmediata o retardada y se puede dispersar en un medio líquido. Esta última propiedad proporciona una ventaja significativa para los pacientes que requieren una alimentación líquida ya que los componentes se podrían dispersar fácilmente en la alimentación u otro medio conveniente. Estas combinaciones se pueden proporcionar en varias presentaciones convencionales, tal como cápsulas, comprimidos, bolsitas, perlas y líquidos. Como se ha mencionado anteriormente, la necesidad de revestir las formas de dosificación de pancrelipasa con un polímero entérico es una consecuencia de la inestabilidad de la enzima lipasa en medios ácidos; sin embargo, si se eleva el pH del estómago, mediante el uso de inhibidores de la bomba de protones, entonces se ha demostrado que la lipasa permanece activa, supuestamente porque no está expuesta a niveles de pH lo suficientemente bajos como para inactivar la lipasa. Este enfoque no es conveniente, ni es necesariamente médicamente deseable, ya que aumenta la carga de la píldora y usa un medicamento crónico adicional para superar las desventajas de otro. El pH del estómago se puede neutralizar temporalmente con antiácidos simples como el bicarbonato de sodio y se ha demostrado que es eficaz para proteger medicamentos lábiles al ácido, tal como el omeprazol PPI, que es un componente del medicamento Zegerid®. El nivel de bicarbonato de sodio en este fármaco es de 1,1 g y el nivel de omeprazol es de 20 mg o 40 mg y estos componentes están contenidos en una cápsula de cubierta dura.

En la presente invención también se desvela una forma de dosificación única que contiene una combinación de pancreatina HA y al menos otro compuesto activo, tal como inhibidores de la bomba de protones antagonistas de H₂ o sales biliares.

Con la presente invención se obtiene una mejora del producto. De hecho, la preparación de pancreatina HA da como resultado una reducción en la carga biológica simplemente como resultado de la reducción en la cantidad de material que lleva esta carga biológica. Además, sin embargo, las metodologías usadas para el proceso de preparación también pueden reducir la carga biológica y como resultado se producirá un producto significativamente menos agravado. Además, la eliminación de grandes cantidades de material inactivo del producto permite el uso de las técnicas de esterilización que se usan para las biológicas inyectables que se van a aplicar, por ejemplo, filtración, exposición a la luz ultravioleta (UV). De nuevo, esto representa una mejora significativa e inesperada en las características del producto.

La pancreatina HA presente en las composiciones o formas de dosificación oral de la presente invención se prepara de acuerdo con el siguiente proceso.

El material de partida es la pancreatina. En la presente invención, los inventores también pueden hacer referencia a ella usando los términos "API" o "pancreatina de partida", o "enzimas pancreáticas de partida", o "pancreatina nativa", "pancrelipasa de partida" o "pancrelipasa nativa".

Un material de partida conveniente es la pancrelipasa obtenida a partir de porcino tal como está disponible en el mercado, por ejemplo, en Nordmark Arzneimittel GmbH o Scientific Protein Laboratories LLC. También se pueden usar extractos similares de fuentes bovinas u otras fuentes de mamíferos. El material de partida preferente es la pancrelipasa obtenida a partir de porcino. Los procedimientos de extracción usados para producir el extracto sin profesar se pueden resumir en las siguientes etapas: glándulas de cerdo molidas en húmedo; adición de un "activador" de pancrelipasa; tratamiento de la "suspensión de enzima sin procesar" con isopropanol frío y caliente para precipitar proteínas y eliminar lípidos; etapas de centrifugación y filtración para eliminar fibras y compactar y concentrar; secado al vacío de la "torta húmeda"; eliminar grumos y molienda de la "torta húmeda" para la densidad aparente y el tamaño de partícula. Este producto seco es la pancreatina usada en los productos actuales.

La pancreatina HA de la invención se prepara tratando adicionalmente la pancreatina de partida; preserva aquellos elementos que son fundamentales para la eficacia de los productos basados en enzimas pancreáticas y elimina aquellos elementos que no son esenciales.

El material resultante del proceso de la invención es la pancreatina HA.

La pancreatina HA que tiene actividad de lipasa específica de al menos aproximadamente 120 USP UI/mg se prepara usando un proceso que comprende el tratamiento de la pancreatina con un disolvente, en el que dicho disolvente tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand (SP) comprendido entre 28 y 45 (MPa)^{0.5}, y dicho disolvente es un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos o una mezcla de al menos un disolvente orgánico y disolvente acuoso y el proceso se lleva a cabo a baja temperatura, preferentemente a temperatura inferior a la temperatura ambiente.

En una realización la pancreatina HA que tiene actividad de lipasa específica de al menos aproximadamente 120 USP UI/mg se prepara usando un proceso que comprende el tratamiento de la pancreatina con un disolvente, en el que dicho disolvente tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand (SP) comprendido entre 28 y 38 (MPa)^{0.5}, y dicho disolvente es un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos o una mezcla de al menos un disolvente orgánico y disolvente acuoso y el proceso se lleva a cabo a baja temperatura, preferentemente a temperatura inferior a la temperatura ambiente.

En una realización específica la pancreatina HA que tiene actividad de lipasa específica de al menos aproximadamente 120 USP UI/mg se prepara usando un proceso que comprende el tratamiento de la pancreatina con un disolvente, en el que dicho disolvente tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand (SP) comprendido entre 28 y 34 (MPa)^{0.5}, y dicho disolvente es un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos o una mezcla de al menos un disolvente orgánico y disolvente acuoso y el proceso se lleva a cabo a baja temperatura, preferentemente a temperatura inferior a la temperatura ambiente.

En otra realización específica la pancreatina HA que tiene actividad de lipasa específica de al menos aproximadamente 120 USP UI/mg se prepara usando un proceso que comprende el tratamiento de la pancreatina con un disolvente, en el que dicho disolvente tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand (SP) comprendido entre 34 y 38 (MPa)^{0.5}, y dicho disolvente es un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos o una mezcla de al menos un disolvente orgánico y disolvente acuoso y el proceso se lleva a cabo a baja temperatura, preferentemente a temperatura inferior a la temperatura ambiente.

En otra realización la pancreatina HA que tiene actividad de lipasa específica de al menos aproximadamente 120 USP UI/mg se prepara usando un proceso que comprende el tratamiento de la pancreatina con un disolvente, en el que dicho disolvente tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand (SP) comprendido entre 34 y 45 (MPa)^{0.5}, y dicho disolvente es un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos o una mezcla de al menos un disolvente orgánico y disolvente acuoso y el proceso se lleva a cabo a baja temperatura, preferentemente a temperatura inferior a la temperatura ambiente.

En una realización específica la pancreatina HA que tiene actividad de lipasa específica de al menos aproximadamente 120 USP UI/mg se prepara usando un proceso que comprende el tratamiento de la pancreatina con un disolvente, en el que dicho disolvente tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand (SP) comprendido entre 38 y 45 (MPa)^{0.5}, y dicho disolvente es un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos o una mezcla de al menos un disolvente orgánico y disolvente acuoso y el proceso se lleva a cabo a baja temperatura, preferentemente a temperatura inferior a la temperatura ambiente.

La pancreatina HA puede tener una actividad de lipasa específica de al menos aproximadamente 120, o al menos aproximadamente 150, o al menos aproximadamente 200, o al menos aproximadamente 400, o al menos aproximadamente 500 USP UI/mg.

El parámetro de solubilidad de Hildebrand es un valor numérico que indica al comportamiento de disolución relativa de un disolvente específico. Se obtiene a partir de la densidad de energía cohesiva del disolvente, que a su vez se obtiene a partir del calor de vaporización. Los valores de Hildebrand están disponibles en fuentes bibliográficas, tal como en Barton Handbook of Solubility Parameters, CRC Press, 1983. El disolvente del proceso es un disolvente orgánico o una mezcla de más disolventes orgánicos o una mezcla de al menos un disolvente orgánico y disolvente acuoso; la mezcla de disolvente orgánico y disolvente acuoso puede comprender uno o más disolventes orgánicos y uno o más disolventes acuosos. El disolvente puede tener los siguientes valores de solubilidad: 45, 42, 40, 38, 36, 35, 34, y 28.

El disolvente orgánico se puede elegir entre el grupo de disolventes que comprenden n-pentano, n-hexano, n-heptano, dietiléter, ciclohexano, tetracloruro de carbono, acetato de etilo, tetrahidrofurano, cloroformo, tricloroetileno, acetona, dimetilformamida, n-propanol, isopropanol, etanol, dimetilsulfóxido alcohol butílico, metanol, acetónitrilo, dioxano, y cloruro de metileno. Los disolventes orgánicos preferentes son acetona, isopropanol, y etanol.

El disolvente acuoso se puede elegir entre el grupo que consiste en: agua, o soluciones tampón. Los tampones preferentes tienen pH = 7 o pH = 4, pueden ser respectivamente a pH = 7: tampón fosfato 10 mM y a pH = 4,0: tampón acetato 10 mM.

En una realización de la invención el disolvente es una mezcla que comprende uno o más disolventes orgánicos y un disolvente acuoso, dicha mezcla tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand que varía de 28 a 45 (MPa)^{0.5}. En una realización de la invención el disolvente es una mezcla que comprende uno o más disolventes orgánicos y un disolvente acuoso, dicha mezcla tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand que varía de 28 a 38 (MPa)^{0.5}. En una realización específica el disolvente es una mezcla que comprende uno o más disolventes orgánicos y un disolvente acuoso, dicha mezcla tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand que varía de 28 a 34 (MPa)^{0.5}. En una realización específica el disolvente es una mezcla que comprende uno o más disolventes orgánicos y un disolvente acuoso, dicha mezcla tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand que varía de 34 a 38 (MPa)^{0.5}. En otra realización el disolvente es una mezcla que comprende uno o más disolventes orgánicos y un disolvente

acuoso, dicha mezcla tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand que varía de 34 a 45 (MPa)^{0.5}. En una realización específica el disolvente es una mezcla que comprende uno o más disolventes orgánicos y un disolvente acuoso, dicha mezcla tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand que varía de 38 a 45 (MPa)^{0.5}. El SP de la mezcla de disolventes se calcula usando los parámetros de solubilidad de Hildebrand.

5 En una realización el disolvente tiene un SP de 38 (MPa)^{0.5} y es una mezcla de disolvente orgánico con disolvente acuoso. Algunos ejemplos de un disolvente binario de ese tipo que tiene un SP = 38 son:

10 acetona - tampón: la proporción volumétrica de acetona con respecto al tampón a pH = 7 es 35:65; la proporción volumétrica de acetona con respecto al tampón a pH = 4,0 es 35:65; en la que: SP(acetona) = 20,2, SP(tampón) = 47,9;

15 etanol - tampón: la proporción volumétrica de etanol con respecto al tampón a pH = 7 es 45:55; la proporción volumétrica de etanol con respecto al tampón a pH = 4,0 es 45:55; en la que SP(etanol) = 26,0, SP(tampón) = 47,9;

En otra realización un disolvente binario con SP = 34 (MPa)^{0.5} es: acetona-tampón: la proporción volumétrica de acetona con respecto al tampón a pH = 7 es 50:50; en la que SP(acetona) = 20,2, SP(tampón) = 47,9.

20 Además en otra realización un disolvente binario con SP = 35 (MPa)^{0.5} es acetona-tampón: la proporción volumétrica de acetona con respecto al tampón a pH = 7 tampón es 45:55; en la que SP(acetona) = 20,2, SP(tampón) = 47,9.

25 En una realización de la presente invención (proceso de una sola etapa), el tratamiento de la pancreatina con un disolvente que tiene un SP de 28-45 (MPa)^{0.5} comprende las siguientes etapas: a1) suspensión de la pancreatina en el disolvente con agitación; a2) separación de la parte insoluble (sedimento) de la parte soluble (sobrenadante) de la mezcla de la etapa a2; a3) secado de la parte insoluble obtenida en la etapa a1; y en el que las etapas a1-a3 se llevan a cabo a una temperatura por debajo de la temperatura ambiente. La temperatura adecuada para llevar a cabo el proceso es 4 °C.

30 En una realización de la presente invención (proceso de una sola etapa), el tratamiento de la pancreatina con un disolvente que tiene un SP de 34-38 (MPa)^{0.5} comprende las siguientes etapas: a1) suspensión de la pancreatina en el disolvente con agitación; a2) separación de la parte insoluble (sedimento) de la parte soluble (sobrenadante) de la mezcla de la etapa a2; a3) secado de la parte insoluble obtenida en la etapa a1; y en el que las etapas a1-a3 se llevan a cabo a una temperatura por debajo de la temperatura ambiente. La temperatura adecuada para llevar a cabo el proceso es 4 °C.

35 La etapa 1a se lleva a cabo preferentemente durante aproximadamente 60 minutos; la temperatura preferente es 4 °C. La etapa de separación (etapa a2) se puede llevar a cabo con diferentes métodos tales como centrifugación, sedimentación o filtración. La etapa de secado (a3) se puede llevar a cabo por ejemplo en una secadora de alta eficacia, bomba de vacío, o aparato de liofilización; también se pueden usar otros métodos. La concentración de la pancreatina en disolvente en la etapa a1 es preferentemente una cantidad comprendida entre 0,050 y 0,3 mg/ml, preferentemente entre 0,065 y 0,1 mg/ml, es preferentemente 0,065 o 0,1 mg/ml.

45 En una realización específica del proceso de una sola etapa el disolvente tiene un SP de 38 (MPa)^{0.5} y es una mezcla de acetona y tampón a pH 7 (tal como fosfato 10 mM), y la pancreatina en la etapa a1 está en una concentración de 10 mg/ml.

50 En otra realización de la presente invención (proceso de dos etapas), en la que el disolvente es una mezcla de disolvente orgánico y disolvente acuoso, la pancreatina se dispersa primero en el disolvente acuoso y a continuación el disolvente orgánico se añade en la misma. En esta realización la etapa a1 comprende las siguientes etapas: a1.1 (suspensión) suspensión de la pancreatina en el disolvente acuoso con agitación; a1.2 (precipitación) adición de la suspensión de la etapa 1a el disolvente orgánico o mezcla de los mismos. La mezcla de la etapa a1.1 se mantiene en una condición estática. El periodo de duración de la etapa a1.1 es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 minutos dependiendo de la escala y del equipo; el periodo de duración de la etapa a1.2 es de aproximadamente 30 minutos.

55 La pancreatina en disolvente acuoso está preferentemente en una cantidad comprendida entre 0,050 y 0,3 mg/ml, preferentemente entre 0,1 y 0,3 mg/ml, preferentemente 0,1 o 0,3 mg/ml, el disolvente orgánico es preferentemente cualquiera de etanol o acetona y el disolvente acuoso es preferentemente tampón a pH = 4,0 (tal como tampón acetato 10 mM) o un tampón a pH 7 (tal como fosfato 10 mM).

60 En una realización específica del proceso de una sola etapa el disolvente tiene un SP de 38 (MPa)^{0.5} y es una mezcla de acetona y tampón a pH 7 (tal como fosfato 10 mM), y la pancreatina en la etapa a1 está en una concentración de 0,1 mg/ml.

65 En otra realización específica del proceso de una sola etapa el disolvente tiene un SP de 38 (MPa)^{0.5} y es una

mezcla de acetona y tampón a pH 4 (tal como tampón acetato 10 mM), y la pancreatina en la etapa a1 está en una concentración de 0,1 mg/ml.

Además en otra realización de la invención (proceso de múltiples etapas), cuando el disolvente es una mezcla de disolvente orgánico y disolvente acuoso, la pancrelipasa se dispersa primero en el disolvente acuoso y a continuación el disolvente orgánico se añade a la parte soluble de esta dispersión acuosa. En esta realización da etapa del proceso a1 comprende las siguientes etapas: a1.1) (suspensión) suspensión de la pancreatina en el disolvente acuoso con agitación; a1.2) (separación) separación de la parte soluble (sobrenadante) de la etapa a1.1 de la parte insoluble (sedimento); a1.3) (precipitación) adición a la parte soluble de la etapa a1.2 del disolvente orgánico o mezcla de los mismos.

La Etapa a1.1 se lleva a cabo preferentemente durante aproximadamente 30 minutos; la mezcla de la etapa a1.3 se mantiene en condición estática durante aproximadamente 15 minutos; una temperatura preferente para estas etapas es 4 °C.

La pancreatina en disolvente acuoso está preferentemente en una cantidad comprendida entre 0,05 y 0,3 mg/ml, preferentemente de 0,1 a 0,3 mg/ml, preferentemente 0,1 o 0,3 mg/ml. El SP del disolvente usado es preferentemente 38. El disolvente orgánico es preferentemente cualquiera de etanol o acetona y el disolvente acuoso es preferentemente tampón a pH = 4,0 (tal como tampón acetato 10 mM) o un tampón a pH 7 (tal como fosfato 10 mM).

En una realización específica el proceso de múltiples etapas el disolvente tiene un SP de 38 (MPa)^{0.5} y es una mezcla de acetona y tampón a pH 4,0 (tal como tampón acetato 10 mM), y la pancreatina en la etapa a1 está en una concentración de 0,3 mg/ml.

Además en otra realización del proceso de múltiples etapas el disolvente tiene un SP de 38 (MPa)^{0.5} y es una mezcla de etanol y tampón a pH 4,0 (tal como tampón acetato 10 mM), y la pancreatina en la etapa a1 está en una concentración de 0,3 mg/ml.

Además en otra realización del proceso de múltiples etapas el disolvente tiene un SP de 38 (MPa)^{0.5} y es una mezcla de etanol y tampón a pH 4,0 (tal como tampón acetato 10 mM), y la pancreatina en la etapa a1 está en una concentración de 0,1 mg/ml.

Además en otra realización del proceso de múltiples etapas el disolvente tiene un SP de 38 (MPa)^{0.5} y es una mezcla de acetona y tampón a pH 7 (tal como fosfato 10 mM) y la pancreatina en la etapa 1a está en una concentración de 0,3 mg/ml.

Las etapas de separación (etapa a2 y a1.2) se puede llevar a cabo mediante diferentes métodos tales como centrifugación o filtración. Todas las etapas del proceso del proceso de preparación de pancreatina HA se llevan a cabo con control de temperatura, que siempre es por debajo de la temperatura ambiente, de forma preferente aproximadamente 4 °C; la humedad también se puede controlar.

El proceso de la invención también puede incluir esterilización e inactivación viral o reducción de la carga viral de la pancreatina HA, que se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante filtración, calentamiento, irradiación (radiación ultravioleta, radiación X, radiación beta y radiación gamma), tratamiento de presión elevada y/o alquilación de ácidos nucleicos el uso de beta-propiolactona (BPL). El calentamiento a temperaturas superiores a 85 °C, preferentemente entre 85 °C y 100 °C durante un periodo de tiempo adecuado, tal como superior a 18 horas y especialmente entre 18 y 48 horas, incluso más preferentemente entre 18 y 30 horas también es eficaz para reducir los contaminantes virales. El calentamiento a temperatura más baja (84 °C, preferentemente 80 °C) se puede llevar a cabo en pancreatina HA sólida con una humedad residual de un 0,5 % en peso o menos.

A partir de lo mencionado anteriormente es evidente que hay muchas ventajas para el enfoque que se desvela en la presente invención. Conserva el espectro natural y la fuente natural de enzimas digestivas que están presentes en los jugos digestivos y mantiene el comportamiento de digestión del material de partida. Elimina aquellos materiales que no son necesarios para la digestión que quedan como resultado del proceso de extracción en bruto, disminuyendo de ese modo la mayor parte de la API. Permite la reducción o eliminación de contaminantes bacterianos o virales. Permite un control de las proporciones de las clases de enzimas mixtas entre sí. Además, permite que la API se formule en una serie de formas de dosificación con alta potencia.

La invención que se describe en el presente documento da como resultado un producto que es superior a los productos actuales y representa un avance notable en la terapia por los motivos que se han descrito anteriormente.

Parte experimental

Materiales

La *pancrelipasa* (API, pancrelipasa de partida o pancreatina, pancrelipasa nativa o pancreatina) es proporcionada por Nordmark. Se extrae de páncreas porcino y por lo general contiene aproximadamente un 30 % de proteínas (cuantificadas con el método de Bradford) y tiene una actividad de lipasa de 94,4 UI/mg, actividad de proteasa de 253,2 UI/mg, actividad de amilasa de 420,3 UI/mg; la proporción P/L es 2,7, la proporción A/L es 4,5; el contenido de agua es 0,3. Este material se analiza mediante electroforesis mono y bidimensional, seguido por la caracterización de Maldi Tof con el fin de identificar los componentes de la pancrelipasa (Instituto Mario Negri, Milán, Italia). La electroforesis bidimensional en este extracto muestra que hay al menos 50 puntos de proteína/péptido en una fracción que aparentemente es fácilmente soluble en agua y 30 puntos de proteína/péptido en una fracción que aparentemente es menos fácilmente soluble en agua. Las determinaciones de solubilidad se confunden por el hecho de que las enzimas activas pueden ser adsorbidas o atrapadas por los componentes insolubles en agua de la pancrelipasa. La solubilidad también será una función del pH. Los puntos, que corresponden a proteínas individuales en la mezcla, y las imágenes de geles preparados usando las fracciones más solubles y menos solubles se analizan después de cortar y digerir los puntos principales con tripsina bovina y analizarlos usando el tiempo de desorción/ionización láser asistida por matriz de espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) y zimografía. Las huellas de la masa peptídica se comparan con las de las referencias de biblioteca y se identifican amilasa, lipasa, colipasa, carboxipeptidasa A1 y B, elastasa 2A y 1, quimotripsina, tripsina y fosfolipasa A2. Claramente el extracto está tanto relativamente en bruto como conteniendo muchas proteínas extrañas además de una serie de especies enzimáticas activas.

Fórmula enteral: Peptamen® Junior 1.0 Cal (Nestlé, paquete de 250 ml): contenido de grasa: 3,8 g/100 ml, contenido de proteína: 3 g/100 ml, contenido de grasa y carbohidratos: 20,4 g/Ml.

Métodos

Actividad lipolítica: la medición se lleva a cabo con un método basado en el procedimiento resumido del ensayo de lipasa que se describe en la monografía de USP de enzimas pancrelipasa, que se basa en la titulación, mediante el método de pH-estat, de los ácidos grasos libres formados a partir de la hidrólisis de ácidos grasos esterificados en el sustrato usado (aceite de oliva). Se basa en el siguiente principio: la lipasa cataliza la hidrólisis de los triglicéridos, lo que conduce a la formación de ácidos grasos libres (FFA). La titulación de los FFA formados de acuerdo con el tiempo proporciona la determinación de la actividad enzimática de la lipasa, que se puede expresar en unidades: 1U = 1 µmol de FFA formado por minuto. La reacción se produce al mantener un valor de pH constante a través de un sistema experimental que proporciona la adición de NaOH (agente de titulación) cuando el valor de pH cambia en comparación con un valor fijo (método pHestat). La cantidad de agente de trituración añadido de acuerdo con el tiempo corresponde a la cantidad de FFA formado por la acción de la lipasa sobre los triglicéridos. La pendiente de la curva {agente de titulación añadido = f (volumen (ml)/ tiempo (minutos))} proporciona la actividad enzimática de lipasa.

La actividad de lipasa (LA) informada en lo sucesivo el presente documento siempre se expresa como UI USP.

La actividad específica de lipasa (LSA) informada en lo sucesivo en el presente documento siempre se expresa como UI USP/mg.

Actividad proteolítica y amilolítica: las mediciones se llevan a cabo de acuerdo con el procedimiento resumido descrito en la monografía USP de enzimas pancrelipasa. La actividad enzimática específica (SA) informada a continuación se expresa siempre como UI USP/mg.

El *contenido de agua* se mide por TGA a 80 °C durante 4 horas (muestras 18, 19 y 20) o con el método de Karl Fisher (muestras 26, 27 y 28).

Los *triglicéridos* se extraen con hexano: isopropanol (3:2) usando palmitato de colesterilo como patrón interno y se analizan por HPLC; los picos se identifican comparando todos los tiempos de retención con una solución patrón de trioleína.

Análisis de proteínas: el contenido total de proteínas se cuantifica con un ensayo de Bradford.

Análisis de carbohidratos: 1) Los azúcares de cadena corta se analizan por HPLC usando xilitol como patrón interno; los picos se identifican comparando todos los tiempos de retención con los patrones de azúcares, es decir, maltosa. 2) Las maltodextrinas se extraen en presencia de Carrez I y Carrez II y se analizan por HPLC; los picos se identifican comparando todos los tiempos de retención con los patrones de maltodextrinas, es decir, monohidrato de maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexosa y maltoheptaosa.

Ejemplos

Ejemplo 1 Preparación de pancreatina HA; 0,1 g/ml; múltiples etapas: suspensión, separación, precipitación; (SP = 38: acetona: disolvente acuoso = 35: 65; etanol: disolvente disolvente acuoso = 45: 55)

Etapa a1.1 - Suspensión: la pancrelipasa de partida se dispersa en disolvente acuoso a una concentración de 0,1 g/ml a 4 °C y se mantiene con agitación durante 30 minutos. Los experimentos se llevan a cabo a escala de laboratorio usando cualquiera de 650 mg (cuando el disolvente orgánico es acetona) o 550 mg (cuando el disolvente orgánico es etanol) de la pancrelipasa de partida. Para la suspensión de pancrelipasa se someten a ensayo cuatro disolventes a cursos diferentes: 1) tampón a pH = 4,0 (tampón acetato 10 mM); 2) tampón a pH = 7,0 (fosfato 10 mM); 3) agua desionizada (DW); 4) tampón a pH = 4,0 (acetato 10 mM) con NaCl (0,5 M).

Etapa a1.2 - Separación: la suspensión de la etapa a1.1 se centrifuga (10 minutos, 4 °C, aproximadamente 11.000 g) y el sobrenadante (SN) se separa del sedimento.

Etapa a1.3 - Precipitación: el disolvente orgánico se añade al sobrenadante de la etapa a1.2 y la mezcla se mantiene a 4 °C durante 15 minutos en condiciones estáticas. El disolvente orgánico es cualquiera de acetona o etanol. La acetona se añade en una cantidad de 35 partes (volumen) por cada 65 partes (volumen) de disolvente acuoso; el etanol se añade en una cantidad de 45 partes (volumen) por cada 55 partes (volúmenes) de disolvente acuoso.

Etapa a2 - Separación: la mezcla se centrifuga (10 minutos, 4 °C, aproximadamente 11.000 g) para separar el sobrenadante del sedimento, que contiene las enzimas pancrelipasa. El sedimento se vuelve suspender en el disolvente acuoso usado en la etapa a1.1 (LA en los sedimentos después de la nueva suspensión, precipitación).

Los materiales de las diferentes etapas se analizan. La cantidad de pancrelipasa, expresada como actividad de lipasa (LA) se mide:

- en suspensión de la etapa a1 (LA en suspensión; LA-Sa1.1);
- el sobrenadante obtenido en la etapa a2 (LA en SN, precipitación, LA-SN);
- en los sedimentos obtenidos en la etapa a2 y que a continuación se vuelven a suspender en el medio de partida (LA en los sedimentos, precipitación, LA-P).

Los resultados se informan en las Tablas 1, 2, 3, y 4.

Tabla 1

Muestra	Condiciones experimentales		Suspensión (Etapa a1.1)	Separación (Etapa a2)				Rendimiento
	Medio	Disolvente	LA-Sa1.1	Sobrenadante (SN)		Sedimento (P)		
				LA-SN	% de LA-SN/LA-Sa1.1	LA-P	% de LA-P/LA-Sa1.1	
1	pH 4,0	A	33528,2	5820,0	17,4	25376,4	75,7	93,1
2	Agua	A	31974,0	8105,5	25,4	22659,2	70,9	96,3
3	pH 4,0	E	35388,9	3464,3	9,8	27417,6	77,5	87,3
4	Agua	E	30369,8	4301,0	14,2	20835,1	68,6	82,8
5	pH 4,0 + NaCl	A	47761,0	9408,0	19,7	34543,3	72,3	92,0
6	pH 4,0 + NaCl	E	40364,0	10410,4	25,8	27101,5	67,1	92,9
7	pH 7,0	A	40388,9	9798,8	24,3	30178,8	74,7	99,0
LA = actividad de lipasa (UI USP); A = acetona. E = etanol; S = suspensión; SN = sobrenadante; P = sedimento								

La Tabla 1 muestra que la precipitación de la pancrelipasa (etapa a1.3) permite una buena recuperación de la actividad de lipasa en la parte precipitada (sedimento), que varía de aproximadamente un 67 a aproximadamente un 77 %. El rendimiento es el % de la actividad de lipasa total de la etapa a2 (sedimento y sobrenadante) con respecto a la actividad de lipasa de la pancrelipasa suspendida inicial, expresado como actividad de lipasa en la suspensión de la etapa a1.1 (Sa1.1): $(LA-SN + LA-P)/(LA-Sa1.1)$.

Tabla 2

Muestra	Condiciones experimentales			Separación (Etapa a2)				Rendimiento
	Medio	Disolvente	LA Teór. en la Etapa a1.1	Sobrenadante (SN)		Sedimento (P)		
				LA-SN	% de LA-SN/ LA-Sa1.1 teor.	LA-P	% de LA-P / LA-Sa1.1 teór.	
1	pH 4,0	A	61605,4	5820,0	9,4	25376,4	41,2	50,6
2	Agua	A	61458,2	8105,5	13,2	22659,2	36,9	50,1
3	pH 4,0	E	51940,8	3464,3	6,7	27417,6	52,8	59,5
4	Agua	E	51894,0	4301,0	8,3	20835,1	40,1	48,4
5	pH 4,0 + NaCl	A	61452,0	9408,0	15,3	34543,3	56,2	71,5
6	pH 4,0 + NaCl	E	52031,5	10410,4	20,0	27101,5	52,1	72,1
7	pH 7,0	A	61470,4	9798,8	15,9	30178,8	49,1	65,0

LA = actividad de lipasa (UI USP); A = acetona. E = etanol; S = suspensión; SN = sobrenadante; P = sedimento
Teór. = teórico.

El rendimiento del proceso varía de aproximadamente un 37 a aproximadamente un 56 %. El % del rendimiento es la actividad de lipasa total en el sedimento y en el sobrenadante de la etapa a2 con respecto a la actividad de lipasa teórica de la pancrelipasa usada en la etapa a1.1, que se calcula haciendo la factorización de la actividad específica del material sin procesar sin tratar (es decir, 94,4 UI USP/mg tal como se determina de acuerdo con el método de USP resumido) y su peso inicial.

Tabla 3

Muestra	Condiciones experimentales		Separación (Etapa a2)		EF
	Medio	Disolvente	Sobrenadante (SN)	Sedimento (P)	
			LSA	LSA	
1	pH 4,0	A	10,7	239,4	2,5
2	Agua	A	14,5	233,6	2,5
3	pH 4,0	E	10,1	179,2	1,9
4	Agua	E	11,5	145,7	1,5
5	pH 4,0 + NaCl	A	14,7	101,3	1,1
6	pH 4,0 + NaCl	E	18,2	80,9	0,9
7	pH 7,0	A	18,7	181,8	1,9

LSA = actividad específica de lipasa (UI USP/mg); A = acetona. E = etanol; SN = sobrenadante; EF = factor de enriquecimiento = LSA en el sedimento de la etapa a2/ actividad teórica específica de lipasa en la etapa 1.1a es decir, 94,4 UI USP/mg tal como se determina de acuerdo con el método de USP resumido.

El factor de enriquecimiento (independiente del pH) se determina calculando la proporción entre la actividad de lipasa en el sedimento de la etapa a2 y la actividad de lipasa de la pancreatina de partida (que es 94,4 UI/mg). El factor de enriquecimiento hasta 2,5 se obtiene con este proceso. El enriquecimiento se confirma también mediante análisis de perfiles por HPLC.

Con respecto a las otras enzimas digestivas, el contenido de amilasa en el sedimento final (precipitado de la etapa a2) es inferior que el contenido de amilasa en la pancrelipasa de partida.

Ejemplo 2 Preparación de pancreatina HA; 0,3 g/ml; múltiples etapas: suspensión, separación, precipitación (SP = 38: acetona: disolvente acuoso = 35: 65; etanol: disolvente acuoso = 45: 55)

Etapa a1.1 - Suspensión: la pancrelipasa (API) se dispersa en disolvente acuoso a una concentración de 0,3 g/ml a 4 °C y se agita durante 30 minutos. Los experimentos se llevan a cabo a escala de laboratorio usando cualquiera de 650 mg (cuando el disolvente orgánico es acetona) o 550 mg (cuando el disolvente orgánico es etanol) de la pancrelipasa de partida. Cada uno de dos experimentos se desarrolla en un disolvente acuoso diferente: 1) tampón a pH = 4,0 (tampón acetato 10 mM); 2) tampón a pH = 7,0 (fosfato 10 mM).

Etapa a1.2 - Separación: la suspensión de la etapa a1 se centrifuga (10 minutos, 4 °C, aproximadamente 11.000 g) y el sobrenadante (SN) se separa del sedimento.

Etapa a1.3 - Precipitación: el disolvente orgánico se añade al sobrenadante de la etapa a1.2 y la mezcla se mantiene a 4 °C durante 15 minutos en condición estática. El disolvente orgánico es cualquiera de acetona o etanol. La acetona se añade en una cantidad de 35 partes (volumen) por cada 65 partes (volumen) de disolvente acuoso. El etanol se añade en una cantidad de 45 partes (volumen) por cada 55 partes (volúmenes) de disolvente acuoso.

Etapa a2 - Separación: la mezcla se centrifuga (10 minutos, 4 °C, aproximadamente 11.000 g) para separar el sobrenadante del sedimento, que contiene las enzimas pancrelipasa. El sedimento se vuelve a suspender en el disolvente acuoso de partida (LA en los sedimentos después de la nueva suspensión, precipitación).

Etapa a3 - Secado: el sedimento de la etapa a2 se seca.

Los materiales de las diferentes etapas se analizan. La cantidad de pancrelipasa se expresa como actividad de lipasa (LA) y se mide:

- en la suspensión de la etapa a1.1 (LA en suspensión; LA-Sa1.1);
- en el sobrenadante obtenido en la etapa a2 (LA en SN, precipitación, LA-SN);
- en los sedimentos obtenidos en la etapa a2 y a continuación se vuelve a suspender en el medio acuoso de partida (LA en los sedimentos, precipitación, LA-P).

Los resultados se informan en las Tablas 4, 5, y 6.

Tabla 4

Tabla 4								
Muestra	Condiciones experimentales		Suspensión (Etapa a1.1)	Separación (Etapa a2)				Rendimiento
	Medio	Disolvente	LA (Sa1.1)	Sobrenadante (SN)		Sedimento (P)		
				LA-SN	% de LA-SN/LA-Sa1.1	LA-P	% de LA-P/LA-Sa1.1	
8	pH 4,0	A	139968,7	11856,6	8,5	112830,4	80,6	89,1
9	pH 4,0	E	107348,7	5035,2	4,7	99146,6	92,4	97,0
10	pH 4,0	A	137050,4	8778,9	6,4	108734,7	79,3	85,7
11	pH 4,0	E	115965,7	5097,9	4,4	88019,7	75,9	80,3
12	pH 7,0	A	137267,4	10535,3	7,7	108038,6	78,7	86,4
13	pH 7,0	E	118929,3	11340,9	9,5	86636,2	72,8	82,4
LA = actividad de lipasa (UI USP); A = acetona. E = etanol; S = suspensión; SN = sobrenadante; P = sedimento								

La Tabla 4 muestra que la recuperación después de la precipitación es muy buena (73-92 %).

Tabla 5

Muestra	Condiciones experimentales			Separación (Etapa a2)				Rendimiento
	Medio	Disolvente	LA Teór. en la Etapa a1.1	Sobrenadante (SN)		Sedimento (P)		
				LA	% de LA-SN/ LA-Sa1.1 teor.	LA	% de LA- P/LA-Sa1.1 teór.	
8	pH 4,0	A	184080,0	11856,6	6,4	112830,4	61,3	67,7
90	pH 4,0	E	155760,0	5035,2	3,2	99146,6	63,7	66,9
10	pH 4,0	A	184080,0	8778,9	4,8	108734,7	59,1	63,8
11	pH 4,0	E	155760,0	5097,9	3,3	88019,7	56,5	59,8
12	pH 7,0	A	184080,0	10535,3	5,7	108038,6	58,7	64,4
13	pH 7,0	E	155760,0	11340,9	7,3	86636,2	55,6	62,9
LA = actividad de lipasa (UI USP); A = acetona. E = etanol; S = suspensión; SN = sobrenadante; P = sedimento Teór. = teórico.								

El rendimiento global del proceso de múltiples etapas llevado a cabo en una concentración de 0,3 g/ml de pancrelipasa varía de aproximadamente 56 a aproximadamente 64.

5

Tabla 6

Muestra	Condiciones experimentales		Separación (Etapa a2)		EF
	Medio	Disolvente	Sobrenadante (SN)	Sedimento (P)	
			LSA	LSA	
8	pH 4,0	A	6,2	197,9	2,1
9	pH 4,0	E	5,3	250,4	2,7
10	pH 4,0	A	7,5	284,6	3,0
11	pH 4,0	E	5,5	185,7	2,0
12	pH 7,0	A	8,4	248,9	2,6
13	pH 7,0	E	11,1	180,9	1,9
LSA = actividad específica de lipasa (UI USP/mg); A = acetona. E = etanol; SN = sobrenadante; EF = factor de enriquecimiento = LSA en el sedimento de la etapa a2 (UI USP/mg)/ actividad teórica de lipasa en la etapa a1.1 (UI USP/mg).					

El factor de enriquecimiento se determina calculando la proporción entre la actividad de lipasa en el sedimento de la etapa a2 y la actividad de lipasa de la pancrelipasa de partida de la etapa a1.1 (que es 94,4 U/mg). El factor de enriquecimiento varía de 1,9 a 3,0.

10

Ejemplo 3 Preparación de pancreatina HA; 0,1 g/ml; dos etapas: suspensión, precipitación (SP = 38: acetona: disolvente acuoso = 35: 65; etanol: disolvente acuoso = 45: 55, en el que SP (acetona) = 20,2, SP (etanol) = 26,0, SP (tampón) = 47,9)

15

Etapa a1.1 - Suspensión: la pancrelipasa se dispersa en disolvente acuoso a una concentración de 0,1 g/ml a 4 °C y se mantiene con agitación durante 30 minutos. Los experimentos se llevan a cabo a escala de laboratorio usando cualquiera de 650 mg (cuando el disolvente orgánico es acetona) o 550 mg (cuando el disolvente orgánico es etanol) de la pancrelipasa de partida. Cada uno de dos experimentos se desarrolla en un disolvente acuoso diferente: 1) pH = 4,0, tampón acetato 10 mM; 2) pH = 7,0, tampón fosfato 10 mM.

20

Etapa a1.2 - Precipitación: el disolvente orgánico se añade a la suspensión de la etapa a1.1 y esta mezcla se mantiene a 4 °C durante 15 minutos. El disolvente orgánico es cualquiera de acetona o etanol. La acetona se añade en una cantidad de 35 partes (volumen) por cada 65 partes (volumen) de disolvente acuoso. El etanol se añade en una cantidad de 45 partes (volumen) por cada 55 partes (volúmenes) de disolvente acuoso.

25

Etap a2 - Separación: la mezcla se centrifuga (10 min, 4 °C, aproximadamente 11.000 g) para separar el sobrenadante del sedimento, que contiene las enzimas pancreáticas. El sedimento se vuelve a suspender en el disolvente acuoso de partida (LA en los sedimentos después de la nueva suspensión, separación).

- 5 Los materiales de las diferentes etapas se analizan. La cantidad de pancrelipasa, expresada como actividad de lipasa, se mide a lo largo de todo el proceso:
- en la suspensión de la etapa a1.1 (LSA en suspensión; LA-Sa1.1);
- 10
- en el sobrenadante obtenido en la etapa a2 (LA en SN, separación, LA-SN);
 - en los sedimentos obtenidos en la etapa a2 y que a continuación se vuelven a suspender en el medio de partida (LA en los sedimentos, precipitación, LA-P).
- 15 Los resultados se informan en las Tablas 7, 8, y 9.

Tabla 7

Muestra	Condiciones experimentales		Suspensión (Etapa a1.1)	Separación (Etapa a2)				Rendimiento
	Medio	Disolvente	LA (Sa1.1)	Sobrenadante (SN)		Sedimento (P)		
				LA	% de LA-SN/LA-Sa1.1	LA	% de LA-P/LA-Sa1.1	
14	pH 4,0	A	48960,7	4688,0	9,6	45021,4	92,0	101,5
15	pH 4,0	E	41428,3	1394,3	3,4	40656,7	98,1	101,5
16	pH 7,0	A	56936,9	4750,9	8,3	46955,0	82,5	90,8
17	pH 7,0	E	48177,4	2316,1	4,8	41808,2	86,8	91,6
LA = actividad de lipasa (UI USP); A = acetona. E = etanol; S = suspensión; SN = sobrenadante; P = sedimento								

- 20 La recuperación después de la precipitación es elevada, con el proceso de dos etapas se consigue una recuperación casi completa.

Tabla 8

Muestra	Condiciones experimentales			Separación (Etapa a2)				Rendimiento
	Medio	Disolvente	LA Teór. Etapa a1.1	Sobrenadante (SN)		Sedimento (P)		
				LA	% de LA-SN/ SL-S1a teor.	LA	% de LA- P/LA-S1a teór.	
14	pH 4,0	A	61605,4	4688,0	7,6	45021,4	73,1	80,7
15	pH 4,0	E	51940,8	1394,3	2,7	40656,7	78,3	81,0
16	pH 7,0	A	61421,4	4750,9	7,7	46955,0	76,4	84,2
17	pH 7,0	E	51971,9	2316,1	4,5	41808,2	80,4	84,9
LA = actividad de lipasa (UI USP); A = acetona. E = etanol; S = suspensión; SN = sobrenadante; P = sedimento Teór. = teórico.								

- 25 El rendimiento global del proceso varía de 73,1 a 84,5, que es más elevado que el obtenido con el proceso de múltiples etapas. El % del rendimiento es la actividad de lipasa total en el sedimento y en el sobrenadante de la etapa a2 con respecto a la actividad de lipasa teórica de la pancreatina usada en la etapa a1.1, que se calcula haciendo la factorización de la actividad específica del material de partida (i.e., 94.4 UI USP/mg tal como se determina de acuerdo con el método de USP resumido) y su peso inicial.

Tabla 9

Muestra	Condiciones experimentales		Separación (Etapa a2)		EF
	Medio	Disolvente	Sobrenadante (SN)	Sedimento (P)	
			LSA	LSA	
14	pH 4,0	A	10,1	247,4	2,6
15	pH 4,0	E	4,0	204,3	2,2
16	pH 7,0	A	10,1	276,2	2,9
17	pH 7,0	E	6,7	193,6	2,1
LSA = actividad específica de lipasa (UI USP/mg); A = acetona. E = etanol; SN = sobrenadante; EF = factor de enriquecimiento = LSA en el sedimento de la etapa a2 (UI USP/mg)/ actividad teórica de lipasa en la etapa a1.1 (UI USP/mg).					

Los resultados muestran que el uso del tampón acuoso a pH = 7 y acetona en el proceso de dos etapas proporcionan un rendimiento interesante (rendimiento global del proceso de aproximadamente un 76 %) y el factor de enriquecimiento varía de 2,1 a 4,2.

Ejemplo 4 Preparación de pancreatina HA; 0,1 g/ml; dos etapas: suspensión, precipitación; aumento de escala (SP = 38: acetona: disolvente acuoso = 35:65)

Etapa a1.1 - Suspensión: 6,5 g de la pancrelipasa de partida (61.400 U de lipasa) se dispersan en 45 ml de solución tampón a pH = 7,0 (tampón fosfato 10 mM) a 4 °C y se agita (Ultraturrax, 3 ciclos) durante 1 minuto para cada ciclo, el agitador se lava dos veces con 10 ml de tampón frío con el fin de recuperar la pancrelipasa residual.

Etapa a1.2 - Precipitación: se añaden 35 ml de acetona a la suspensión de la etapa a1.1 y la mezcla se mantiene a 4 °C durante 30 minutos en condición estática.

Etapa a2 - Separación: la mezcla se centrifuga (15 minutos, 4 °C, aproximadamente 2.700 g) para separar el sobrenadante del sedimento, que contiene las enzimas pancreáticas.

Etapas a3 - Secado: el sedimento se seca de acuerdo con dos protocolos diferentes y la media ponderada del sedimento seco es de 1,5 g, la actividad de lipasa (LA) es 365.000 UI de lipasa, y la actividad específica (LSA) es 235 UI USP/mg.

La Tabla 10 informa de actividades específicas de lipasa (L), proteasa (P), y amilasa (A) medidas para cada material obtenido con los dos protocolos. La actividad de lipasa en los sedimentos (medida después de su suspensión en 1 ml de tampón) también se mide antes del tratamiento desecado. Representa una cantidad de 233,7 UI USP/mg.

Tabla 10

Muestra	Protocolos	LSA	PSA	ASA	Proporción P/L	Proporción A/L	Contenido de agua (%)
18	72 h 6-8 °C 20 Pa (0,2 mbar)	234,2	226,5	149,5	0,97	0,64	7,4
19	72 h 6-8 °C 20 Pa (0,2 mbar)	254,0	217,7	130,7	0,86	0,51	6,5
20	24 h 6-8 °C 20 Pa (0,2 mbar)	216,3	230,1	129,8	1,06	0,60	7,4
Media		234,8	224,8	136,7	0,96	0,58	7,10
Ds		18,9	6,4	11,1			
% de cv		8 %	3 %	8 %			
LSA = actividad específica de lipasa (UI USP/mg); PSA = actividad específica de proteasa (UI USP/mg); ASA = actividad específica de amilasa (UI USP/mg).							

El análisis muestra que el propio proceso de secado no influye en LSA y que los diferentes protocolos conducen a materiales con las mismas actividades enzimáticas. El factor de enriquecimiento calculado como en los ejemplos

previos también es siempre superior a 2 y es constante entre los diferentes protocolos, es decir: 2,5 (muestra 18), 2,7 (muestra 19); 2,3 (muestra 10), el valor medio es 2,5. La actividad de lipasa en los sedimentos, medida antes del tratamiento de secado, representa una cantidad de 233,7 UI USP/mg (muestra 18).

Tabla 11

Muestra	P de bandeja de partida	P de sedimento	LA inicial	PA inicial	AA inicial	LA recuperado	PA recuperado	AA recuperado	LY	PY	AY
18	6,5113	1,5325	614666,7	1648661,2	2736699,4	358911,5	347111,25	229108,75	58	21	8
19	6,4997	1,7084	613571,7	1645724,0	2731823,9	369526,92	393102,84	221750,32	60	24	8
20	6,5137	1,3673	614893,3	1649268,8	2737708,1	347294,2	297661,21	178706,11	56	18	7

L = lipasa; P = proteasa; A = amilasa; A = actividad; Y = rendimiento (%); P = peso (g) medido después de secado.

Los perfiles de HPLC de las muestras obtenidas con los diferentes protocolos son superponibles. No se observó diferencia cualitativa relevante con el perfil de HPLC del material de partida.

Ejemplo 5 Preparación de pancreatina HA; 0,1 g/ml; dos etapas: suspensión, precipitación; aumento de escala (SP = 38: etanol: disolvente acuoso (pH = 7) = 45: 55, muestra 21); (SP = 34: acetona: disolvente acuoso (pH = 7) = 50: 50 muestra 22); (SP = 35: acetona: disolvente acuoso (pH = 7) = 45: 55, muestra 23). El proceso de preparación del Ejemplo 4 se aplica en el presente documento en una cantidad diferente de la pancrelipasa de partida, volumen diferente de solución tampón y volumen diferente de acetona (HS = 34 o 35) o volumen de etanol (HS = 38). El protocolo de secado es de 24 h, 6-8 °C, 20 Pa (0,2 mbar), los demás parámetros y condiciones son los mismos que en el Ejemplo 4.

Tabla 12

Muestra	HS	Pancrelipasa (g)	Tampón (ml)	Acetona (ml)	Etanol (ml)
21	38	5,5	55	no	45
22	34	5,0	50	50	no
23	35	5,5	55	45	no

Los resultados se informan en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13

Muestra	LSA	PSA	ASA	Proporción P/L	Proporción A/L
21	150,2	-	-	-	-
22	123,3	351,7	436,0	2,85	3,54
23	158,7	388,9	241,9	2,45	1,52

LSA = actividad específica de lipasa (UI USP/mg); PSA = actividad específica de proteasa (UI USP/mg); ASA = actividad específica de amilasa (UI USP/mg).

Los datos muestran que el propio proceso de secado no influye en LA y que los diferentes protocolos conducen a materiales con las mismas actividades enzimáticas. El factor de enriquecimiento calculado con los Ejemplos previos es: 1,6 (muestra 21), 1,3 (muestra 22), 1,7 (muestra 23).

Tabla 14 muestra las actividades enzimáticas del material purificado final obtenido con el proceso de aumento de escala aplicado en el presente documento y el rendimiento enzimático.

Muestra	P de bandeja de partida	P de sedimento	LA inicial	PA inicial	AA inicial	LA recuperado	PA recuperado	AA recuperado	LY	PY	AY
21	5,5197	1,6826	514988,0	-	-	252390,0	-	-	49	-	-
22	5,5183	2,0255	520927,5	1397233,6	2319341,5	321446,85	787716,95	489968,45	62	56	21
23	4,9986	2,7464	471867,8	1265645,5	2100911,6	338631,12	965908,88	1197430,4	72	76	57
L = lipasa, P = proteasa, A = amilasa, A = actividad, Y = rendimiento (%); P = peso (g) medido después de secado.											

Los perfiles de HPLC de las muestras obtenidas con los diferentes protocolos de liofilización son superponibles. No se observa una diferencia cualitativa relevante con el perfil de HPLC del material de partida.

Las muestras 25 y 26 obtenidas con un protocolo diferente muestran una LA específica más baja y PA y AA más elevadas con respecto a la muestra 24 producidas con el protocolo (HS = 38).

Ejemplo 6 Preparación de pancreatina HA; 0,065 y 0,1 g/ml; una sola etapa; escala de laboratorio (SP = 38-acetona: disolvente acuoso = 35: 65)

Etapa a1 - Suspensión - precipitación: 650 mg (muestra 24) o 1000 mg (muestra 25) de pancrelipasa nativa se dispersan en 10 ml de una mezcla a 65:35 de tampón (fosfato 10 mM a pH = 7) y acetona (65 volúmenes de tampón y 35 volúmenes de acetona) con agitación durante 30 minutos a 4 °C.

Etapa a2 - Separación: la mezcla de la etapa a1 se centrifuga (10 min a 10,000 g a 4 °C) para separar el sobrenadante del sedimento, que contiene las enzimas pancreáticas.

Etapa a3) - Secado: los sedimentos se secan con una bomba de alta eficacia a 20 Pa (0,2 mbar).

El material se analiza. La cantidad de pancrelipasa, expresada como actividad de lipasa se mide a lo largo de todo el proceso en:

- en el sobrenadante obtenido en la etapa a2 (LA en SN, separación, LA-SN);
- en los sedimentos obtenidos en la etapa a2 y que a continuación se vuelven a suspender en el medio de partida (LA en los sedimentos, precipitación, LA-P);
- la LA de la etapa a1 de suspensión - precipitación (LA en suspensión; LA-SN) se expresa como valor teórico.

Los resultados se informan en las Tablas 15 y 16.

Tabla 15

Tabla 10								
Muestra	Condiciones experimentales			Separación (Etapa a2)				Rendimiento
	Medio	Disolvente	LA Teór. Inicial Etapa a1	Sobrenadante (SN)		Sedimento (P)		
				LA	% de LA-SN/ SL-Sa1 teor.	LA	% de LA-P/LA-Sa1 teor.	
24	pH 7,0	A	-	2834,7	-	47807,9	-	-
25	pH 7,0	A	-	3360,4	-	71997,8	-	-
LA = actividad de lipasa (UI USP); A = acetona. E = etanol; S = suspensión; SN = sobrenadante; P = sedimento Teór. = teórico.								

Tabla 16

Muestra	Condiciones experimentales		Separación (Etapa a2)		EF
	Medio	Disolvente	Sobrenadante (SN)	Sedimento (P)	
			LSA	LSA	
24	pH 7,0	A	5,4	237,9	2,5
25	pH 7,0	A	5,7	265,7	2,8
LSA = actividad específica de lipasa (UI USP/mg); A = acetona. E = etanol; SN = sobrenadante; EF = factor de enriquecimiento = LSA en el sedimento de la etapa a2 (UI USP/mg)/ actividad teórica de lipasa en la etapa a1.1 (UI USP/mg).					

El proceso de una sola etapa proporciona un buen rendimiento y un factor de mejora más elevado que el proceso de dos etapas. Es interesante para la industrialización ya que la ejecución es fácil y sencilla.

Ejemplo 7 Preparación de pancreatina HA; 0,1 g/ml; una sola etapa; escala piloto (SP = 38-acetona: disolvente acuoso = 35: 65)

Etapa a1 - Suspensión- precipitación: 10 g de pancrelipasa nativa se dispersan en 100 ml de una mezcla de disolventes de tampón (pH = 7, fosfato 10 mM) y acetona (65 volúmenes de tampón y 35 volúmenes de acetona) con agitación durante 60 minutos a 4 °C.

- 5 Etapa a2 - Separación: la mezcla de la etapa a1 se centrifuga (10 min a 2.700 g a 4 °C) para separar el sobrenadante del sedimento, que contiene las enzimas pancreáticas.

- 10 Etapa a3) - Secado, los sedimentos de la muestra 26 se vierten en placas de Petri, mientras que el sedimento de las muestras 28 y 29 se mantiene en los tubos de centrifugación y se seca directamente usando una bomba de alta eficacia a 20 Pa (0,2 mbar).

El material se analiza. La cantidad de pancrelipasa, expresada como actividad de lipasa se mide a lo largo de todo el proceso en:

- 15 - en el sobrenadante obtenido en la etapa a2 (LA en SN, separación, LA-SN);
- en los sedimentos obtenidos en la etapa a2 y que a continuación se vuelven a suspender en el medio de partida (LA en los sedimentos, separación, LA-P);
- 20 - la LA de la etapa a1 de suspensión - precipitación (LA en suspensión; LA-SN) se expresa como valor teórico.

Los resultados se informan en las Tablas 17 y 18.

Tabla 17

Muestra	LSA	PSA	ASA	Proporción P/L	Proporción A/L
26	207,8	249,4	155,20	1,20	0,75
27	222,7	249,2	158,90	1,12	0,71
28	219,1	285,0	167,50	1,30	0,76

25

Se obtiene una buena reproducibilidad en términos de actividad de lipasa, proteasa, y amilasa.

Tabla 18

Muestra	P de bandeja de partida	P de SEDIMENTO	LY	PY	AY
26	10,02	3,94	87	39	15
27	10,01	4,22	100	42	16
28	10,02	4,28	99	48	17
L = lipasa; P = proteasa; A = amilasa; A = actividad; Y = rendimiento (%); P = peso (g) medido después de secado.					

- 30 Se obtiene un rendimiento de lipasa muy elevado, el factor de enriquecimiento también es elevado (superior a 2): es: 2,2 (Muestra 26), 2,4 (Muestra 27), 2,3 (Muestra 28).

El proceso de una sola etapa proporciona buenos rendimientos. Se obtienen 4,2 g de pancreatina HA (42 % de la pancrelipasa de partida), las unidades totales de lipasa son 940.000 UI USP (99-100 % de la LA inicial). La pancreatina HA obtenida tiene una actividad específica de 221 UI USP/mg.

35

Ejemplo 8 Preparación de pancreatina HA; 0,1 g/ml; múltiples etapas: suspensión, precipitación, separación; ejemplo comparativo (SP = 38- acetona: agua = 35: 65)

- 40 Etapa a1.1 - Suspensión: la pancrelipasa dispersa en disolvente acuoso (agua destilada a una concentración de 0,045 mg/ml a 4 °C (muestra 29), durante aproximadamente 30 minutos con agitación.

- 45 Etapa a1.2 - Precipitación: se añaden 80 ml de la mezcla de disolventes (acetona: agua = 35:45) a 20 ml de la suspensión de la etapa a1.1 (para obtener SP = 38 (MPa)^{0.5} en la mezcla de disolventes final); la mezcla se mantiene a 25 °C durante 60 minutos en condición estática.

Etapa a2 - Separación: la mezcla se centrifuga (10 min a 3.000 g a 25 °C) para separar el sobrenadante del sedimento, que contiene las enzimas pancreáticas.

- 50 Los materiales de las diferentes etapas se analizan. La cantidad de pancrelipasa, expresada como actividad de

lipasa se mide a lo largo de todo el proceso:

- en la suspensión de la etapa a1.1 (LA en suspensión; LA-Sa1.1);
 - 5 - en el sobrenadante obtenido en la etapa a2 (LA en SN, precipitación, LA-SN);
 - en los sedimentos obtenidos en la etapa a2 y a continuación se vuelve a suspender en el agua destilada de partida (LA en los sedimentos, precipitación, LA-P).
- 10 Los resultados se informan en las Tablas 19-20. Los resultados obtenidos con los métodos de dos etapas y de una etapa en los Ejemplos previos también se informa en el presente documento para fines de comparación directa.

Tabla 19

Muestra	Condiciones experimentales			Separación (Etapa a2)				Rendimiento
	Medio	Disolvente	LA Teór. Inicial Etapa a1.1	Sobrenadante (SN)		Sedimento (P)		
				LA	% de LA-SN/ SL-Sa1.1 teór.	LA	% de LA-P/LA- Sa1.1 teór.	
16	pH 7,0	A	56936,9	4750,9	8,3	46955,0	82,5	90,8
18	pH 7,0	A	-	2834,7	-	47807,9	-	-
19	pH 7,0	A	-	3360,4	-	71997,8	-	-
29	Agua	A	66313,9	7928,8	12,0	24082,9	36,3	48,3

LA = actividad de lipasa (UI USP); A = acetona. E = etanol; S = suspensión; SN = sobrenadante; P = sedimento
Teór. = teórico.

15

Tabla 20

Muestra	Condiciones experimentales		Precipitación (Etapa a2)		EF
	Medio	Disolvente	Sobrenadante (SN)	Sedimento (P)	
			LSA	LSA	
16	pH 7,0	A	10,1	276,2	2,9
18	pH 7,1	A	5,4	237,9	2,5
19	pH 7,0	A	5,7	265,7	2,8
29	Agua	A	9,7	27,1	0,3

LSA = actividad específica de lipasa (UI USP/mg); A = acetona. E = etanol; SN = sobrenadante; EF = factor de enriquecimiento = LSA en el sedimento de la etapa a2 (UI USP/mg)/ actividad teórica de lipasa en la etapa a1 (UI USP/mg).

Este proceso de la técnica anterior proporciona un escaso rendimiento, la inactivación enzimática es pronunciada y por lo tanto no se obtiene enriquecimiento de lipasa.

20 **Ejemplo 9** Caracterización de pancreatina HA purificada (Muestra 20)

El material de HA se somete ensayo para su capacidad de gestión y se compara con la pancrelipasa de partida. 20 mg de pancreatina HA y 50 mg de la pancrelipasa de partida (que corresponde a 2300 UI USP de lipasa) se suspenden cada uno en 1 ml de agua desionizada y se añade a 50 ml de la fórmula enteral Peptamen® Junior 1.0 a 37 °C y se agita a 100 rpm durante 60, 120 y 240 minutos. Los ensayos de digestión se llevan a cabo después de 1, 2 y 4 horas. El ensayo se repitió 6 veces para cada muestra de pancrelipasa.

Los nutrientes lipídicos se monitorizan mediante la medición de la digestión de la trioleína (disminución del pico de trioleína). La digestión total de proteína se monitorizar con el método de Bradford. El proceso amilolítico se monitorizar mediante la medición de la formación de azúcares de cadena corta. La diferencia del alcance de la digestión se obtiene por comparación del rendimiento de la digestión de los materiales nativos y de HA después de 4 horas de digestión

Tabla 21

Muestra	P	Lipasa	Proteasa	Amilasa
N	50	4.720	12.660	21.015
H	20	4.142	4.354	2.614
Diferencia de actividad (%)		-12	-66	-88
Diferencia de digestión (%)		-10 %	6	-33
H = pancreatina HA; N = pancreatina nativa; P = peso (mg)				

La diferencia de actividad se calcula con la fórmula:

$$5 \quad (\text{actividad de pancreatina nativa} - \text{actividad de pancreatina HA}) / \text{actividad de pancrelipasa nativa}$$

La diferencia de digestión se calcula con la siguiente fórmula:

$$10 \quad (\% \text{ de digestión de pancreatina nativa} - \% \text{ de digestión de pancreatina HA})$$

Este ensayo *in vitro* permite analizar la digestión de lipasa, proteína y carbohidratos de la pancreatina HA. La digestión de lipasa es extremadamente sensible a la diferencia de las actividades enzimáticas presentes en los recipientes de reacción y por lo tanto un 10 % de diferencia en la actividad corresponde a un 10 % cantidad de digestión. La cinética de digestión muestra tendencias similares. Estos resultados sugieren que la pancreatina nativa y la pancreatina HA tienen un patrón de digestión lipídica similar.

Los perfiles de digestión de proteína son casi superponibles lo que sugiere que la actividad de proteasa de la pancreatina HA mantiene la digestión al mismo nivel de la pancrelipasa nativa. Una diferencia de aproximadamente un 60 % de actividad para la proteasa no produce ningún efecto en el alcance de la digestión de proteína.

Los perfiles de digestión de carbohidratos son diferentes ya que la producción de maltosa es menor en la pancreatina HA. La comparación de la diferencia de la actividad de amilasa y de la cantidad de los productos digeridos muestra que en la pancreatina HA también se produce el proceso amilolítico.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de pancreatina HA que tiene una actividad de lipasa específica de al menos aproximadamente 120 USP UI/mg, en el que la pancreatina es de origen mamífero y comprende lipasa, proteasa y amilasa, comprendiendo el proceso el tratamiento de la pancreatina de mamífero con un disolvente que tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand comprendido entre 28 y 45 (MPa)^{0,5}, en donde dicho disolvente es una mezcla de al menos un disolvente orgánico y disolvente acuoso, y en donde el proceso comprende las siguientes etapas:
 - a1) suspensión de pancreatina en la mezcla de al menos un disolvente orgánico y disolvente acuoso; o
 - a1.1) suspensión de pancreatina en disolvente acuoso con agitación;
 - a1.2) adición del un disolvente orgánico a la suspensión de la etapa a.1.1, y
 - a2) separación de la parte insoluble de la parte soluble de la mezcla de la etapa a1; en donde dichas etapas del proceso se llevan a cabo a aproximadamente 4 °C;
 - y
 - a3) secado de la parte insoluble obtenida en la etapa a2,
- y recuperación de la pancreatina HA que comprende lipasa, proteasa y amilasa, y que tiene una actividad de lipasa específica de al menos aproximadamente 120 USP UI/mg.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que la mezcla de disolventes tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand comprendido entre 28 y 38 (MPa)^{0,5}; 28 y 34 (MPa)^{0,5}; 34 y 38 (MPa)^{0,5}; o 38 y 45 (MPa)^{0,5}.
3. El proceso de la reivindicación 1, en el que la mezcla de disolventes tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand comprendido entre 34 y 45 (MPa)^{0,5}.
4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de pancreatina que tiene actividad de lipasa específica de al menos aproximadamente 150 USP UI/mg, 200 USP UI/mg, o 250 USP UI/mg.
5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa a1.1 se lleva a cabo durante aproximadamente 10 a 30 minutos.
6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la pancreatina de la etapa a1.1 o a1 está en una cantidad comprendida entre 0,05 y 0,3 mg/ml.
7. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la mezcla de disolventes tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand de 38 (MPa)^{0,5}.
8. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el disolvente orgánico se elige entre el grupo de: n-pentano, n-hexano, n-heptano, dietiléter, ciclohexano, tetracloruro de carbono, acetato de etilo, tetrahidrofurano, cloroformo, tricloroetileno, acetona, dimetilformamida, n-propanol, isopropanol, etanol, dimetilsulfóxido, alcohol butílico, metanol, acetonitrilo, dioxano y cloruro de metileno.
9. El proceso de la reivindicación 8, en el que el disolvente orgánico se elige entre el grupo de acetona y etanol.
10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el disolvente acuoso es solución tampón, en donde la solución tampón tiene opcionalmente pH = 7 o pH = 4.
11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el disolvente orgánico es acetona y el disolvente acuoso es solución tampón con pH = 7.
12. El proceso de la reivindicación 1, en el que la mezcla de disolventes tiene un parámetro de solubilidad de Hildebrand de 38 (MPa)^{0,5} y en el que la mezcla de disolventes es una mezcla de acetona y solución tampón con pH = 7 y la pancreatina en la etapa a1 o en la etapa a1.1 está en una concentración de 0,1 mg/ml.
13. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende la etapa de reducción de la carga microbiana y/o viral, en el que la reducción de la carga microbiana y/o viral opcionalmente se lleva a cabo mediante filtración, calentamiento, radiación ionizante, presión elevada o mediante alquilación.