

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

FORMES PHARMACEUTIQUES À BASE D'ENZYMES SANS EXCIPIENTS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

INGRY JANET BUSTOS

MAI 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement le professeur Mircea Alexandru Mateescu, qui en tant que Directeur de mémoire, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce projet, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Mes remerciements s'adressent également au Dr. Pompilia Ispas-Szabo, responsable de projets, Axcan Pharma/Aptalis Pharma, professeure associée à l'Université du Québec à Montréal et au Dr. Yves Dumoulin, Vice-president R&D Axcan Pharma/Aptalis Pharma, maintenant Vice-président R&D chez UMAN Pharma Inc, qui m'ont guidé dans mon travail et m'ont aidé à trouver des solutions pour avancer.

J'adresse mes remerciements au MITACS, au programme FARE (UQÀM) et à la société Axcan Pharma pour le soutien financier qui m'a permis de me consacrer à mes travaux tout au long de ce cycle d'études.

Merci au Dr Hong Phuong Nguyen, Ph. D., pour son aide précieuse et pour le temps qu'elle a bien voulu me consacrer pour bien mener à terme les expériences FTIR et SDS-PAGE.

J'adresse toute ma gratitude aux Dr. Tien Canh, Dr. Nicolas Normandie et Dr. Elias Assaad pour les appuis scientifiques qu'ils m'ont procurés, leur disponibilité et les moyens techniques qu'ils m'ont fournis.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille et à mes amis, qui m'ont aidé et toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

TABLE DE MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS DES SIGLES ET DES ACRONYMES	x
LISTE DES SYMBOLES	xi
RÉSUMÉ	xii
PREMIÈRE PARTIE – INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
LES ENZYMES PANCRÉATIQUES ET L'INSUFFISANCE PANCRÉATIQUE EXOCRINE	2
1.1 Les enzymes pancréatiques	3
1.1.1 L'alpha-amylase pancréatique	5
1.1.2 La lipase pancréatique	5
1.1.3 Les protéases pancréatiques	7
1.2 L'insuffisance pancréatique exocrine	8
1.2.1 Les enzymes de remplacement: Formes commerciales	9
CHAPITRE II	
FORMULATION DES AGENTS BIOACTIFS À ADMINISTRATION ORALE	13
CHAPITRE III	
LA STRUCTURE DES PROTÉINES ET L'IMPACT DE LA COMPRESSION SUR LEURS PROPRIÉTÉS	17
3.1 Compression de poudres - aspects généraux	17
3.2 Les effets de la compression sur la structure et sur les propriétés des protéines	19
CHAPITRE IV	
PRÉSENTATION DU PROJET	23
4.1 Concept	23
DEUXIÈME PARTIE - PARTIE EXPÉRIMENTALE	26

CHAPITRE V MATÉRIEL ET MÉTHODES

5.1	Matériel	27
5.1.1	Enzymes pancréatiques d'origine porcine (EPP)	27
5.1.2	Comprimés de référence	27
5.1.3	Standards	27
5.1.4	Réactifs	27
5.1.5	Alpha-amylase d'origine porcine (extraite du pancréas de porc)	28
5.2	Méthodes	28
5.2.1	Préparation des comprimés d'EPP sans excipients	28
5.2.2	Détermination de l'activité enzymatique	29
5.2.3	Stabilité d'EPP dans l'Int des comprimés après incubation	31
5.2.4	Stabilité d'EPP mesurée dans les comprimés entiers (Int + Ext)	31
5.2.5	Livraison de lipase dans FIS en conditions que miment le passage par le tractus digestif	32
5.2.6	Dureté et friabilité des comprimés d'EPP	32
5.2.7	Évaluation de l'écoulement des poudres	33
5.2.8	Préparation des comprimés d'alpha-amylase sans excipients	33
5.2.9	Détermination de l'activité d'alpha-amylase	33
5.2.10	La stabilité des comprimés d'alpha-amylase dans FGS	34
5.2.11	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide-sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE)	34
5.2.12	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	34

CHAPITRE VI

RÉSULTATS	36	
6.1	Stabilité des comprimés d'EPP	36
6.1.1	Stabilité d'EPP dans l'Int des comprimés après incubation	37
6.1.2	Stabilité d'EPP mesurée dans les comprimés entiers (Int + Ext)	38
6.1.3	Stabilité des comprimés d'EPP fait à différentes forces de compression	39
6.2	Évaluation d'écoulement des poudres	39
6.3	Évaluation de la friabilité et de la dureté des comprimés d'EPP	40
6.4	Effet du temps d'incubation et de la taille du comprimé dans la stabilité gastrique	40
6.5	Livraison de lipase dans fluide intestinal simulé (FIS) en conditions que miment le passage gastro-intestinal	41

6.6	L'effet de la force de compression sur la structure d'alpha-amylase	43
6.6.1	Étude de la structure secondaire d'alpha amylase par FTIR	43
6.6.2	L'effet de la force de compression sur l'activité enzymatique	45
6.7	L'effet de l'acide et de la pepsine sur la structure d'alpha-amylase	46
6.7.1	Étude structurale par la méthode SDS/PAGE	46
6.7.2	Étude de la structure secondaire d'alpha-amylase par analyse FTIR	50
 CHAPITRE VII		
	DISCUSSION	51
7.1	Stabilité des comprimés d'EPP	51
7.1.1	Stabilité d'EPP dans l'Int des comprimés après incubation	51
7.1.2	Stabilité d'EPP mesurée dans les comprimés entiers (Int + Ext)	52
7.1.3	Stabilité des comprimés d'EPP faites à différentes forces de compression	52
7.2	Évaluation d'écoulement des poudres	53
7.3	Évaluation de la friabilité et de la dureté des comprimés d'EPP	53
7.4	Effet du temps d'incubation et de la taille du comprimé dans la stabilité gastrique	54
7.5	Livraison de lipase dans FIS en conditions que miment le passage gastro-intestinal	54
7.6	L'effet de la force de compression sur la structure d'alpha-amylase	55
7.6.1	Étude de la structure secondaire d'alpha amylase par FTIR	55
7.6.2	L'effet de la force de compression sur l'activité enzymatique	58
7.7	L'effet de l'acide et de la pepsine sur la structure d'alpha-amylase	59
7.7.1	Étude structurale par la méthode SDS/PAGE	59
7.7.2	Étude de la structure secondaire d'alpha-amylase par analyse FTIR	62
 CHAPITRE VIII		
	CONCLUSIONS	64
 ANNEXES		
	Demande de brevet	
	COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES GASTRO - RÉSISTANTES À BASE D'ENZYMES	
	co-inventeurs: MATEESCU Mircea Alexandru, BUSTOS Ingrid Janet, DUMOULIN Yves,	
	SZABO Pompilia Ispas	69
 BIBLIOGRAPHIE		
		95

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
3.1	Représentation schématique des principales étapes dans le processus d'obtention des comprimés 17
3.2	Schéma de la déformation typique avant, pendant et après application d'une force de compression 18
4.1	Schéma des types d'interactions intra-ou inter-chaînes entre protéines 23
4.2	Présentation schématique des différentes étapes du projet 25
6.1	Coupe transversale des comprimés d'EPP sans excipients avant et après 60 min d'incubation dans fluide gastrique simulé (FGS) sans pepsine 36
6.2	Cinétique d'hydratation du comprimé de 9.7 mm dans FGS en fonction de la force de compression 37
6.3	Effet du temps d'incubation et de la taille du comprimé sur l'activité enzymatique résiduelle après 30, 60 et 120 min d'incubation dans FGS 41
6.4	Profil de dissolution des comprimés d'EPP de diverses tailles 42
6.5	Comparaison de l'activité de la lipase qui reste dans les comprimés d'EPP après incubation de 60 min dans FGS et l'activité libérée dans FIS pendant 15 min 42
6.6	Spectre FTIR de la poudre d'alpha-amylase 43
6.7	Le profil de la dérivée seconde de la bande d'amide I de la poudre d'alpha-amylase 44
6.8	La structure secondaire (a) et compositions relatives de la structure secondaire (b) de la poudre et des comprimés d'alpha amylase 45
6.9	L'effet de la pression de compaction sur l'activité enzymatique de l'alpha-amylase dans l'Ext du comprimé (a) et dans l'Int du comprimé (b) 45
6.10	Coupe transversale des comprimés d'alpha-amylase sans excipients avant incubation (droite) et après 120 min d'incubation (gauche) dans FGS..... 46
6.11	SDS-PAGE de la poudre et de l'Int et de l'Ext des comprimés d'alpha- amylase après incubation pendant 2 h dans FGS avec et sans pepsine à 37°C et 100 rpm. Standard (1). Poudre témoin (2). Poudre incubée (3) et comprimés: 1 kbar (4), 4 kbar (5), 8 kbar (6), 11 kbar (7) 47

6.12	Intensité des bandes en SDS/PAGE du standard et de la poudre d'alpha-amylase	48
6.13	Stabilité structurale relative de la structure primaire de la poudre, de l'Int et de l'Ext des comprimés d'alpha-amylase après incubation pendant 120 min dans FGS avec et sans pepsine à 37 °C et 100 rpm	49
6.14	Intensité de la bande 1617 cm ⁻¹ du profile de la dérivée seconde de la bande amide I de la poudre (témoin) et de l'Ext des comprimés incubées pendant 120 min dans FGS	50

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Action de certaines enzymes secrétées par le système digestif des mammifères	4
1.2	Formulations d'enzymes pancréatiques disponibles sur le marché	11
5.1	Activités de lipase, amylase et protéase dans les comprimés de 500 mg	29
5.2	Équivalences des forces de compression utilisées pour l'élaboration des comprimés d'alpha-amylase	33
6.1	Cinétique d'hydratation de comprimés d'EPP sans excipients dans FGS sans pepsine	37
6.2	Évaluation comparative de l'activité de lipase Int des comprimés sans excipients versus comprimés de référence	38
6.3	Évaluation comparative de l'activité de protéase Int des comprimés sans excipients versus comprimés de référence	38
6.4	Évaluation comparative de l'activité d'amylase Int des comprimés sans excipients versus comprimés de référence	38
6.5	Activité de lipase dans les comprimés d'EPP après incubation dans FGS sans pepsine	39
6.6	Évaluation comparative de l'activité de lipase dans les comprimés d'EPP sans excipients et comprimés de référence	39
6.7	L'écoulement de poudre d'EPP avec et sans acide stérique	39
6.8	Evaluation de la friabilité et la dureté des comprimés d'EPP	40
6.9	Caractéristiques de comprimés d'EPP sans excipient de diverses tailles et leurs % d'activité de lipase lorsqu'ils sont incubés dans FGS sans pepsine pendant différent temps	40
6.10	Activité de lipase libérée dans FIS par des comprimés d'EPP sans excipients de diverses tailles	41
6.11	Nombres d'onde de la bande amide I pour la poudre et pour des comprimés d'alpha-amylase	43

6.12	Compositions de la structure secondaire d'alpha-amylase de la poudre et des comprimés	44
6.13	Composition relative de la structure secondaire d'alpha-amylase de la poudre et des comprimés	44
6.14	Effet du FGS avec et sans pepsine sur la stabilité structurale relative de la structure primaire des échantillons d'alpha-amylase en fonction de la pression	49
7.1	Échelle de l'écoulement: valeurs théoriques USP<1174>	53
7.2	Attribution des bandes caractéristiques du FTIR d'alpha-amylase	55
7.3	Nombres d'onde et conformations des pics de la bande d'amide I obtenus à partir du spectre de la dérivée seconde d'alpha-amylase	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

EPP	Enzymes pancréatiques d'origine porcine
Ext	Partie extérieure des comprimés
FGS	Fluide gastrique simulé
FIS	Fluide intestinal simulé sans pancréatine
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GI	Gastro-intestinal
Int	Partie intérieure des comprimés
IPE	Insuffisance pancréatique exocrine
SDS-PAGE	"Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis"
UV	Ultra violet

LISTE DES SYMBOLES

kp	Kilopound
kbar	Kilobar
MPa	MégaPascal
rpm	Rotation par minute
T	Tonne

RÉSUMÉ

Les enzymes pancréatiques de remplacement sont les plus utilisées dans le but d'améliorer la qualité de vie des personnes ayant un problème d'insuffisance pancréatique exocrine (IPE) relié aux maladies comme la pancréatite, la fibrose kystique et la stéatorrhée. Les enzymes pancréatiques de remplacement ont différentes origines et les plus utilisées proviennent du pancréas d'origine porcine (EPP), étudiées dans le présent travail.

Dans le commerce on peut trouver des comprimés d'enzymes avec enrobages entériques. En effet, il y a plusieurs formes commerciales d'enzymes pancréatiques disponibles sur le marché et telles compositions peuvent être résistantes au milieu gastrique, mais le profil de libération n'est pas toujours satisfaisant. Comme un exemple, chez les patients atteints d'IPE la région supérieure du petit intestin est généralement acide ce qui a comme résultat que les préparations entériques normalement soient dissoutes trop tard dans l'intestin ce qui rendre indisponibles les enzymes dans le site approprié.

Suite à la découverte de la capacité des comprimés faits d'enzymes pancréatiques de former une couche externe en milieu acide (FGS), l'objectif du présent travail a été d'élaborer des comprimés d'enzymes sans excipients additionnés et sans enrobage, capables de se protéger dans un milieu gastrique et de libérer son contenu dans l'intestin.

Il semble que les enzymes ont une plus grande force de cohésion inter particulaire après leur compression et peuvent aussi être auto-assemblés en comprimés monolithiques. L'auto-assemblage est le résultat de plusieurs sortes d'interactions entre les chaînes de protéines, comme les associations d'hydrogène (ex: entre lysine, histidine, tyrosine et sérine) et les interactions ioniques (ex: entre les -COO^- et NH_3^+ impliquant glutamate-lysine et aspartate-lysine). Dans les comprimés obtenus, les protéines peuvent agir comme des tampons et de cette manière augmentent la stabilité gastrique. Dans le milieu intestinal, les groupes carboxyliques sont déprotonés et ionisés provoquant aussi l'hydratation, l'érosion et la désintégration des comprimés et la libération des enzymes thérapeutiques.

Des études de stabilisation et de dissolution des comprimés d'EPP (lipase, amylase et protéase) ont été faites dans des milieux FGS et FIS.

Suite aux résultats prometteurs du brevet «Compositions pharmaceutiques gastro-résistantes à base d'enzymes», le travail est approfondi sur des aspects structuraux en utilisant une préparation commerciale d'alpha-amylase.

Les profils FTIR et SDS/PAGE ont été utilisés pour étudier les interactions protéine - protéine dans des comprimés d'alpha-amylase et l'effet de la pression et du milieu gastrique sur la structure de cette enzyme.

La nouveauté du concept est que les enzymes pancréatiques en plus d'être les principes actifs, agissent comme liants et comme agents chargés de générer et stabiliser une couche externe sensible au pH.

Mots clés: enzyme, gastro-résistance, comprimés, pancréas, FTIR, alpha-amylase, lipase, protéase.

PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION

CHAPITRE 1

LES ENZYMES PANCRÉATIQUES ET L'INSUFFISANCE PANCRÉATIQUE EXOCRINE

Les enzymes - aspects généraux

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui accroissent la vitesse des réactions par des facteurs compris entre 10^6 et 10^{12} par rapport aux réactions correspondantes sans catalyseurs (Voet et Voet, 2005). Ils n'altèrent pas la position d'équilibre des réactions qu'ils catalysent et ne subissent pas eux-mêmes de changements permanents (Price et Stevens, 1984).

Les enzymes diffèrent des catalyseurs chimiques classiques par quatre propriétés fondamentales: i) vitesses de réaction catalysées plus grandes, ii) spécificité de substrat et de réaction plus grandes, iii) possibilité de régulation et iv) conditions de réaction plus douces (Voet et Voet, 2005). Il existe un grand nombre d'enzymes qui sont hautement spécifiques et chaque enzyme catalyse habituellement, mais pas exclusivement, un seul type de réaction (spécificité d'action).

Une enzyme forme un complexe réactif avec un ou plusieurs de ses substrats et diminue l'énergie d'activation par rapport à la réaction non catalysée. Les structures tertiaires et quaternaires des enzymes sont essentielles pour permettre leurs activités. Ces protéines catalytiques sont généralement reconnues pour être spécifiques envers leurs substrats et les réactions qu'elles catalysent. Cette spécificité de l'enzyme pour le substrat est engendrée par une complémentarité structurale, une compatibilité de charge ainsi que par des propriétés hydrophobes/hydrophiles (Voet et Voet, 2005). La réaction a lieu dans une région spécifique de ces protéines. Certains agents chimiques tels que les bases fortes, les acides forts, les températures extrêmes ou les concentrations élevées en sels, causent des changements au niveau de la structure tertiaire et dénaturent, habituellement de façon irréversible, l'enzyme et son pouvoir catalytique (Price et Stevens, 1984).

D'ici l'intérêt de réaliser pour des enzymes thérapeutiques des formes pharmaceutiques permettant une certaine stabilité dans les milieux gastrique et intestinal.

1.1 Les enzymes pancréatiques

Sécrétés par le pancréas exocrine, les enzymes pancréatiques constituent un groupe essentiel de protéines. Les principales sont: i) l'amylase pancréatique qui contribue à la digestion des polysaccharides (hydrolyse de glucides), ii) la lipase pancréatique, essentielle pour la digestion des lipides (hydrolyse des triglycérides) et iii) les protéases (hydrolyse des protéines). Leur rôle principal est de favoriser l'absorption des nutriments en améliorant la digestion des polysaccharides, les lipides et protéines (Vander *et al.*, 1995 (b)), voir tableau 1.1. Ces enzymes sont importantes car elles sont capables de digérer en bonne partie les aliments. Les enzymes de remplacement sont nécessaires pour le cas de déficit de certaines enzymes digestives (Sherwood, 2006).

Les enzymes pancréatiques s'écoulent dans le canal pancréatique qui rejoint le canal cholédoque en provenance du foie pour ensuite se déverser dans le duodénum au niveau de l'ampoule de Vater. Une partie des enzymes pancréatiques sont sécrétées sous forme inactive (ex: protéases), pour empêcher la digestion des cellules du tissu pancréatique (Vander *et al.*, 1995(b)).

Le blocage du canal pancréatique par un calcul et l'accumulation subséquente des enzymes digestives dans les canaux du pancréas peuvent activer des enzymes pancréatique comme la trypsine, et produire la destruction rapide des cellules fonctionnelles du pancréas (Vander *et al.*, 1995(b)).

La suppression de la production des enzymes pancréatiques a montré des désordres de la digestion et de l'absorption intestinale, fonctions qui sont sérieusement affectées et plus prononcées pour la digestion des gras et des protéines (Best et Taylor, 1961).

Les lipides jouent des rôles indispensables dans la structure et le métabolisme de la cellule. Les triglycérides représentent environ un 90% des lipides alimentaires et sont la principale réserve d'énergie métabolique chez les êtres humains (Voet et Voet, 2005).

Tableau 1.1: Action de certaines enzymes sécrétées par le système digestif des mammifères
(d'après Eckert *et al.*, 1999)

Enzyme et origine	Lien d'action	Substrat	Produit obtenu
Glandes salivaires			
Alpha-amylase salivaire	Cavité orale	Amidon	Quelques disaccharides, dextrines
Estomac			
Pepsinogène -pepsine	Estomac	Protéines	Long peptides
Lipase gastrique	Estomac	Triglycérides	Monoglycérides, Acides gras, glycérol
Pancréas			
Alpha-amylase pancréatique	Intestin grêle	Amidon, dextrines	Disaccharides
Trypsinogène-trypsine	Intestin grêle	Protéines	Longs peptides
Chymotrypsine	Intestin grêle	Protéines	Longs peptides
Élastase	Intestin grêle	Élastine	Longs peptides
Carboxypeptidases	Intestin grêle	Longs peptides	Oligopeptides, acides aminés
Aminopeptidases	Intestin grêle	Longs peptides	Oligopeptides, acides aminés
Lipase	Intestin grêle	Triglycérides	Monoglycérides, acides gras, glycérol
Nucléases	Intestin grêle	Acides nucléiques	Nucléotides
Intestin grêle			
Entérokinase	Intestin grêle	Trypsinogène	Trypsine
Disaccharidase	Intestin grêle*	Disaccharides	Monosaccharides
Peptidases	Intestin grêle*	Oligopeptides	Acides aminés
Nucléotidases	Intestin grêle*	Nucléotides	Nucléosides, acide Phosphorique
Nucléosidases	Intestin grêle*	Nucléosides	Sucres, purines, pyrimidines

*Intracellulaire

1.1.1 L'amylase pancréatique

L'activité amylolytique du fluide pancréatique est générée par l'amylase pancréatique. Cette enzyme (EC 3.2.1.1) est sécrétée par le pancréas sous forme d'isoenzymes: variété d'enzymes structurellement semblables mais avec différentes séquences d'acides aminés; elles ont en commun la capacité à catalyser la même réaction chimique (Price et Stevens, 1984).

Le point isoélectrique est de 7.0 pour l'amylase pancréatique (Takeuchi, Matsushima et Sugimura, 1975). Le pH optimal pour l'amylase pancréatique varie selon les auteurs, mais une majorité convient qu'il se situe autour de 6,9 avec une variation pouvant s'échelonner de 6,5 et 7,2 en fonction de la quantité d'ions présente dans la solution saline neutre (Ishikawa *et al.*, 1993). Cette enzyme digère l'amidon ainsi que le glycogène et dans les conditions favorables, le produit de digestion formé étant le maltose.

L'alpha-amylase est une métalloenzyme calcium dépendante inactivée par l'absence de calcium. Cet ion divalent va se lier à son site et ainsi stabiliser sa structure, mais il contribue également à son activité catalytique (Hsiu, Fischer et Stein, 1964). De plus, la présence de l'ion chlorure ou d'autres anions contribue également à activer cette enzyme, mais l'ion chlorure le fait d'une manière plus importante (Buisson *et al.*, 1987).

1.1.2 La lipase pancréatique

La lipase pancréatique (ou triacylglycerol lipase) catalyse l'hydrolyse des triglycérides aux positions 1 et 3 pour donner successivement des 1,2-diacylglycérols et des 2-acylglycérols (Voet et Voet, 2005). Chez de nombreux êtres vivants, cette réaction est capitale de par son rôle physiologique majeur dans le métabolisme des graisses et des lipides (Fickers, Destain et Thonart, 2008).

La lipase pancréatique (EC 3.1.1.3) est la principale enzyme responsable de la digestion des lipides dans le système digestif. L'hydrolyse des triglycérides est essentielle pour l'absorption de lipides par les entérocytes.

Les acides gras libres peuvent facilement traverser la paroi de la membrane épithéliale du tractus gastro-intestinal tandis que, le diacylglycérol ne peut pas être transporté à travers, ce qu'explique l'importance de la lipase pancréatique. Elle agit principalement sur les diglycérides libérés par la lipase gastrique.

La lipase pancréatique humaine est produite par les cellules acineuses pancréatiques. Purifiée à partir du suc pancréatique, la protéine a une masse moléculaire de 48 kDa (De Caro & *et al.*, 1977) et a été caractérisée comme une glycoprotéine composée de 449 acides aminés (Lowe *et al.*, 1989). Elle est sécrétée dans le duodénum et fonctionne à des pH légèrement alcalins (Fickers, Destain et Thonart, 2008).

L'activité de la lipase pancréatique peut s'exercer en présence ou en absence des sels biliaires. En leur absence, la lipase s'adsorbe d'abord à l'Interface lipide / eau avant d'hydrolyser les esters carboxyliques. Par contre, en présence de ces sels biliaires, la lipase pancréatique est inactive, mais son activité est restaurée par un cofacteur protéique appelé colipase (Fickers, Destain et Thonart, 2008).

La concentration de lipase dans le suc pancréatique est très élevée. Pour être active, cette enzyme a besoin de la présence i) d'ions Ca^{2+} (les ions Sr^{2+} et Mg^{2+} sont aussi des activateurs mais moins efficaces) et ii) la présence de sels biliaires ou d'autres substances comme des détergents. L'activité enzymatique de la lipase pancréatique augmente fortement lorsqu'elle est complexée à la colipase pancréatique, une protéine qui forme un complexe 1:1 avec la lipase en présence d'un mélange de micelles de phosphatidylcholine et de sels biliaires. Ce complexe favorise l'adsorption de l'enzyme sur les gouttelettes d'huile émulsifiée et stabilise l'enzyme sous sa conformation active (Voet et Voet, 2005).

La lipase pancréatique porcine se présente sous deux formes: A et B. La lipase A est active en milieu plus acide que la lipase B, mais à part cette différence, les deux enzymes sont pratiquement identiques (Verger *et al.*, 1969). Leurs masses moléculaires se situent entre 45 et 50 kilodaltons (kDa) et leurs points isoélectriques sont de 4,9 pour la lipase A et 5,0 pour la lipase B (Brokerhoff et Jensen, 1974).

Le pH auquel la lipase montre son activité optimale (6,5 et 9,0) varie dépendamment du substrat utilisé mais demeure dans le domaine légèrement alcalin (Best et Taylor, 1961).

1.1.3 Les protéases pancréatiques

Il y a plusieurs protéases impliquées dans le processus de digestion des protéines. Les deux principales protéases pancréatiques sont: i) la trypsine (EC 3.4.21.4) et ii) la chymotrypsine (EC 3.4.21.1). Synthétisées par le pancréas et sécrétées dans la lumière intestinale, les protéases pancréatiques catalysent l'hydrolyse des protéines d'une manière non sélective. Elles pourraient donc dégrader les membranes cellulaires ou les tissus environnants endogènes (auto-digestion). Cette capacité catalytique non sélective explique les raisons pour lesquelles les protéases ont besoin d'être synthétisées sous une forme inactive (zymogène inactif). La sécrétion sous forme de proenzyme est donc un mécanisme de régulation qui consiste en un blocage de l'accès du substrat au site de liaison par une partie de la chaîne peptidique du proenzyme. Ce n'est qu'après le clivage de cette région que, par un changement de conformation, la cavité du site actif se retrouve libre (Whitcomb et Lowe, 2007) et l'enzyme fonctionnelle.

Parmi les protéases, on peut citer deux groupes : i) les endopeptidases (trypsine, chymotrypsine, élastase) qui attaquent les liaisons peptidiques à l'intérieur des protéines et ii) les exopeptidases (carboxypeptidases A et B) qui attaquent les liaisons peptidiques à l'extrémité (-COOH terminale).

La trypsine est, comme la plupart des protéases pancréatiques, sécrétée par le pancréas sous forme de précurseur protéique (zymogène inactif), le trypsinogène. Ceci est un mécanisme important pour contrôler l'action des protéases une fois activées (Whitcomb et Lowe, 2007). Cette enzyme protéolytique peut activer les autres zymogènes pancréatiques (Vander *et al.*, 1995(b)).

La trypsine possède quatre ponts disulfures et une masse moléculaire de 23,8 kDa. Elle est constituée par 221 acides aminés (Cunningham, 1954). Le pH optimal pour cette enzyme se situe autour de 7,8 (Beek, 1973). Elle est inactivée réversiblement par la chaleur lorsqu'elle est dans un milieu acide, mais se décompose lentement dans un milieu alcalin (Best, Taylor et Brobeck, 1979). Plusieurs formes de la trypsine sont formées à la suite de différentes autolyses et coexistent chez l'humain (Rinderknecht, Renner et Carmack, 1979). La trypsine est responsable de l'hydrolyse des liens peptidiques du côté du groupement acyle au niveau des acides aminés possédant une charge positive dans leur chaîne latérale. Elle peut également briser les liens esters et amides de ces mêmes deux acides aminés.

1.2 L'insuffisance pancréatique exocrine (IPE)

L'IPE est causée par des conditions pathologiques comme: i) l'incapacité du pancréas exocrine de produire un niveau normal de ces enzymes (divers stades pathologiques du pancréas: pancréatites, pancréatectomie, fibrose kystique), ii) l'obstruction du canal pancréatique principal (tumeurs du pancréas, tumeurs ampullaires), iii) une diminution de la stimulation du pancréas (maladie cœliaque) ou iv) l'inactivation acide des enzymes pancréatiques (syndrome de Zollinger-Ellison). L'insuffisance pancréatique chez les adultes est produite principalement par la pancréatite chronique lorsque le pancréas est endommagé pour des raisons diverses, dont la consommation d'alcool étant la plus fréquente; chez les enfants, l'insuffisance pancréatique est associée à la fibrose kystique, une maladie génétique des glandes sécrétoires, qui comprennent les glandes qui font le mucus et la sueur. (Fieker, Philpott et Armand, 2011). La pancréatite chronique se caractérise par un processus primaire d'inflammation chronique et irréversible qui conduit à une fibrose avec calcification. Par contre, le patient atteint de pancréatite aiguë présente de la douleur abdominale sévère et aiguë, des nausées et des vomissements; en plus, le pancréas est enflammé de façon aiguë et les niveaux sériques des enzymes pancréatiques (amylase et lipase) sont élevés. Le rétablissement complet est observé dans la plupart des patients atteints de pancréatite aiguë. Les crampes abdominales, la stéatorrhée et la malnutrition sont entre autres les manifestations cliniques de l'IPE (Fieker, Philpott et Armand, 2011).

Pour avoir une absorption adéquate des nutriments il faut une production adéquate des enzymes pancréatiques par le pancréas et une activité enzymatique suffisante dans la lumière du duodénum. La diminution de la production d'enzymes pancréatiques entraîne une malabsorption des aliments.

L'IPE peut conduire à une condition qui produit une perturbation des processus digestifs ce qui entraîne à l'absorption inadéquate de nutriments et à la malabsorption (Krishnamurty *et al.*, 2009).

L'expression clinique de l'IPE va apparaître en fin d'évolution de la pancréatite chronique, lorsqu'une grande majorité des capacités sécrétoires du pancréas a disparu (sécrétion d'enzymes pancréatiques est inférieure à 10% de la valeur normale et destruction de 85 à 90 % du tissu glandulaire) ce qui va occasionner des troubles de la digestion surtout au niveau des graisses (faible hydrolyse des lipides dans la lumière de l'intestin grêle).

La présence accrue de lipides et d'autres nutriments dans l'intestin grêle distal entraîne des modifications significatives de la motilité intestinale menant à la vidange gastrique accélérée et au transit intestinal accru. Il en résulte une forte diminution du temps disponible pour la digestion et l'absorption des nutriments, qui également contribue à la malabsorption (Lager *et al.*, 1997).

Tandis que les protéines et la digestion de l'amidon sont généralement maintenues à un niveau physiologique normal même dans les cas graves d'IPE, plus de 80% de hydrates de carbone peuvent être digérés et absorbés en l'absence d'activité de l'amylase pancréatique et la flore colonique peut encore métaboliser les glucides non absorbés (Lager *et al.*, 1986).

Cependant, la lipase gastrique, ne compense pas efficacement la carence de la lipase pancréatique et une malabsorption des lipides devient le problème majeur et provoque de nombreux symptômes cliniques et les carences nutritionnelles. En contraste avec les autres enzymes pancréatiques la synthèse et la sécrétion de lipase pancréatique (enzyme cruciale de la digestion de lipides) sont affectées plus rapidement. Le déficit en lipase conduira à une malabsorption des triglycérides avec apparition secondaire d'une stéatorrhée.

1.2.1 Les enzymes de remplacement: Formes commerciales

L'administration des enzymes pancréatiques par voie orale, à une dose appropriée, est le traitement disponible pour l'IPE et a comme objectif l'amélioration de la digestion et de l'état nutritionnel du patient. L'administration des enzymes de remplacement réduit les symptômes liés à l'IPE atténuant l'ampleur de la stéatorrhée, et de la douleur chez les patients souffrants de pancréatite (Czako *et al.*, 2003).

En particulier, le plus grand bénéfice est vu dans les patients qui subissent une perte de poids et excrètent plus de 15 g de graisse dans les selles par jour (Krishnamurty *et al.*, 2009).

Les enzymes de remplacement viennent de différentes sources, dont les plus utilisées proviennent du pancréas porcin. D'autres sources importantes d'enzymes pancréatiques sont les préparations d'origine bovine (ils contiennent environ 75% moins de activité de lipase par rapport aux préparations humaine et porcine) et les préparations microbiennes (Krishnamurty *et al.*, 2009).

Les types et les posologies prescrites doivent être adaptés au patient et lui fournir un apport supplémentaire en enzymes pancréatiques pour assurer ainsi une absorption suffisante des nutriments et vitamines. La posologie finale dépend non seulement du degré de l'insuffisance pancréatique, mais également de la quantité d'aliments (teneur en lipides et protéines) pris par le patient. Pour que les suppléments d'enzymes pancréatiques soient efficaces, il est essentiel que le plus grand nombre d'enzymes pancréatiques atteignent l'intestin grêle proximal, en même temps que le chyme qui doit être digéré.

Les premières formulations d'enzymes pancréatiques étaient de la poudre encapsulée et des comprimés non-enrobés avec le limitant qu'elles étaient sensibles à l'inactivation acide dans l'estomac (seulement 8% de la lipase et 22% de la protéase atteint le duodénum). Il était donc nécessaire d'administrer jusqu'à 5 à 10 fois plus la quantité de lipase nécessaire pour la digestion intraluminale. Il y a présentement plusieurs formes commerciales d'enzymes pancréatiques disponibles sur le marché (tableau 1.2), mais leur profil de libération n'est pas toujours satisfaisant; parmi ces formes commerciales, les plus fréquentes sont: i) Microsphères gastro-protégées où la dissolution est tardive dans l'intestin grêle, ii) Les comprimés avec enrobage entérique qui sont souvent incapables de livrer les enzymes dans l'intestin et iii) Enzymes réticulées qui ont une préparation difficile (ce processus de modification des enzymes peut nuire à l'activité enzymatique).

Les enzymes pancréatiques d'origine porcine sont sensibles à pH acides, ce qui explique l'importance de la forme pharmaceutique qui doit assurer la protection des enzymes pancréatiques (particulièrement la lipase) contre l'acidité gastrique. La plus grande partie des préparations d'enzymes pancréatiques d'origine porcine actuellement disponibles consiste en comprimés, granulés ou microsphères recouvertes d'un revêtement résistant à l'acide gastrique conçus pour rester intactes à $\text{pH} < 4$ et à se dissoudre à valeurs de pH plus élevé (les revêtements les plus utilisés par les fabricants se dissolvent à pH entre 5,0 et 5,5).

Le pH auquel les enzymes sont livrées ne doit pas être si bas parce qu'elles se dégradent et pas si haut parce qu'elles ne seront pas livrées au duodénum. Une fois ce pH est atteint, la libération des enzymes pancréatiques doit être aussi rapide que possible de préférence dans 30-60 min pour assurer une digestion optimale des aliments (Kuhn *et al.*, 2007); la livraison dans ce temps assure la digestion enzymatique des aliments et permet que les nutriments soient absorbés dans le petit intestin; ce délai doit être respecté car les nutriments ne peuvent pas être absorbés complètement si les enzymes sont relâchés trop loin dans l'intestin (Kuhn *et al.*, 2007; Krishnamurty *et al.*, 2009).

Tableau 1.2: Formulations d'enzymes pancréatiques disponibles sur le marché
(d'après Krishnamurty *et al.*, 2009)

Formulation	Manufacturier		
Formulations à libération immédiate			
En comprimés	Pancrelipase	Différents manufacturiers	
	Panokase	Différents manufacturiers	
	Plaretase 8000	Ethex, St. Louis, MO	
	Viokase 8	Paddock Labs, Minneapolis, MN	
	Viokase 16	Axcan Scandipharm, Birmingham, AL	
En poudre	Viokase	Axcan Scandipharm	
Mini microsphères à enrobage entérique			
En capsule	Creon 5 SR	Solvay Pharmaceuticals, Marietta, GA	
	Creon 10 SR	Solvay Pharmaceuticals	
	Creon 20 SR	Solvay Pharmaceuticals	
Microsphères à enrobage entérique			
En capsule	Lipram 4500 DR	Global Pharmaceuticals, Philadelphia, PA	
	Pancrelipase	Différents manufacturiers	
	Pangestyme EC	Ethex	
	Ultrase	Axcan Scandipharm	
	Ku-Zyme HP	Schwarz Pharma, Milwaukee, WI	
	Lipram-PN10 DR	Global Pharmaceuticals	
	Lipram-CR10 DR	Global Pharmaceuticals	
	Palcaps 10 DR	Carlsbad Technology, Carlsbad, CA	
	Pangestyme CN-10 DR	Ethex	
	Lipram-UL12 DR	Global Pharmaceuticals	
	Pangestyme UL12 DR	Ethex	
	Pancrelipase	Différents manufacturiers	
	Pangestyme MT16 DR	Ethex	
	Panocaps MT 16 DR	Carlsbad Technology	
	Lipram-PN16 DR	Global Pharmaceuticals	
	Lipram-UL18 DR	Global Pharmaceuticals	
	Pangestyme UL18 DR	Ethex	
	Lipram-PN20 DR	Global Pharmaceuticals	
	Panocaps MT 20 DR	Carlsbad Technology	
	Lipram-UL20 DR	Global Pharmaceuticals	
	Pangestyme UL20 DR	Ethex	
	Lipram-CR20 DR	Global Pharmaceuticals	
	Palcaps 20 DR	Carlsbad Technology	
	Pangestyme CN-20 DR	Ethex	
	Microsphères à enrobage entérique avec un tampon bicarbonate		
	En capsule	Pancrecarb MS-4 DR	Digestive Care, Bethlehem, PA
		Pancrecarb MS-8 DR	Digestive Care
Pancrecarb MS-16 DR		Digestive Care	
Micro-comprimés à enrobage entérique			
En capsule	Pancrease MT4	McNeil, Raritan, NJ	
	Pancrease MT10	McNeil	
	Ultrase MT12	Axcan Scandipharm	
Formulations - comprimés			
	Enzar forte	Elder Pharmaceutique	
	Enzox plus	Tidal	
	Magizyme plus	Beijing Wisapple Biotech Co., Ltd	
	Magizyme D	Beijing Wisapple Biotech Co., Ltd	
	Panstal-N	Cipla	
	Amlipase Pancreatin	Archicare	
	B-Zyme	Brawn	
	Dispeptal	Sanofi Aventis	

Chez les patients souffrant de pancréatite chronique, le pH intra-duodéal est acide en raison de: i) l'augmentation de la production d'acide gastrique, ii) l'inhibition défectueuse de la sécrétion d'acide gastrique, et iii) la production affaiblie du bicarbonate dans le duodénum (Krishnamurty *et al.*, 2009). Tels facteurs résultent en un pH intra-duodéal acide qui peut nuire aux enzymes pancréatiques formulées sans enrobage ou retarder la dissolution de l'enrobage entérique et la livraison des enzymes jusqu'à ce que le contenu intestinal atteigne un segment plus distal de l'intestin avec un pH plus élevé. Cela peut réduire le temps pendant lequel la digestion enzymatique se produit avant que le repas atteigne le côlon (Fieker, Philpott et Armand, 2011).

CHAPITRE II

FORMULATION DES AGENTS BIOACTIFS À ADMINISTRATION ORALE

Les polypeptides et les protéines ont un important potentiel thérapeutique car ces molécules jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie métabolique, l'entretien et fonctionnement des organes.

L'usage des médicaments à base de protéines est limité à cause de la complexité de leur formulation et des coûts d'élaboration au niveau industrielle. La complexité est due en grande partie aux propriétés chimiques et physiques des molécules telles que leur poids moléculaire, leur hydrophilie, leur hydrophobicité, leur constante d'ionisation et leur stabilité face au pH. De telles caractéristiques ajoutées au fait qu'il faut assurer l'activité biologique (stabilité), le transport et la livraison adéquate à leur site d'action ont un effet direct sur la formulation et cela se transforme en un défi technologique pour les industries pharmaceutiques.

Les approches initiales pour résoudre les problèmes associés à la formulation des peptides et protéines ont inclus: i) des modifications chimiques de la protéine ii) et/ou l'ajout des excipients ayant des propriétés de stabilisation (Almeida et Souto, 2007).

- La stabilité des peptides et des protéines pharmaceutiques

Les peptides et les protéines sont souvent formulés à l'état solide pour assurer la stabilité au cours du stockage (Lai et Topp, 1999). Bien que ces formulations à l'état sec sont généralement plus stables que sa solution aqueuse correspondante, une décomposition des protéines à l'état solide peut se produire à travers de différentes voies de dégradation (instabilités physique et/ou chimique) (Hageman, 1992; Lai et Topp, 1999).

L'instabilité physique fait référence à des changements au niveau de l'intégrité de la conformation tridimensionnelle de la protéine et n'implique pas nécessairement une modification

covalente. Ces processus physiques comprennent la dénaturation, l'agrégation, les précipitations et l'adsorption chimique aux surfaces (Lai et Topp, 1999).

Bien que le mécanisme de dégradation chimique puisse être difficile à déterminer, l'instabilité chimique implique la modification covalente d'une protéine ou d'un résidu d'acide aminé pour produire une nouvelle molécule. Les principaux types de réactions chimiques qui contribuent à l'instabilité des protéines et des peptides à l'état solide sont: le clivage de la liaison peptidique, l'oxydation, la réaction de Maillard, la déamination, la bêta-élimination, la dimérisation covalente et l'agrégation (Lai et Topp, 1999).

Les principaux facteurs qui affectent la stabilité chimique des médicaments solides faites à base de peptides et de protéines sont : la température, l'humidité, les excipients, l'activité d'ions hydrogène et l'état cristallin ou amorphe de la matière solide (Lai et Topp, 1999).

Il est connu que pour assurer des facteurs comme la stabilité et la livraison de substances actives dans une formulation pharmaceutique, l'industrie fait appel aux excipients qui vont aussi avoir une influence positive ou négative sur la conservation de l'activité enzymatique (Sakarkar *et al.*, 2009; Kuny, 2004).

Bien que des composants non-peptidiques/protéiques sont utilisés comme stabilisants des formulations et pour protéger le principe actif de son environnement, ils peuvent avoir des effets multiples comme par exemple: i) garder une humidité résiduelle qui peut être liée directement ou indirectement à des réactions de dégradation, ii) influencer le « pH » ou d'autres propriétés du milieu réactionnel. C'est à cause de ce type d'influence qu'il est important de les identifier et de les prévenir pour avoir une formulation de peptides ou de protéines la plus stable possible (Lai et Topp E, 1999).

- Le transport et la livraison adéquate de l'agent actif à son site d'action.

L'administration par voie orale d'un peptide ou protéine et sa livraison au long du tractus gastro-intestinal a un défi car il faut s'assurer que ces substances réussissent à surmonter des obstacles comme : i) la dégradation qui peut subir la protéine à cause du pH gastrique ou à cause des enzymes présentes dans le tractus gastro-intestinal, ii) la faible perméabilité des membranes iii) la

grande taille des molécules des peptides ou des protéines (Shaji et Patole, 2008), iv) la nécessité de livrer les peptides ou les protéines à des sites spécifiques (duodénum, plaques de Peyer, colon) pour exercer leurs fonctions thérapeutiques ou préventives.

En plus de la protéolyse dans l'estomac, i) l'acidité élevée du milieu peut provoquer la destruction des peptides et des protéines avant qu'elles atteignent l'intestin, et ii) des fragments de protéines et de polypeptides sont produits par l'action des enzymes gastriques, pancréatiques et intestinales. Les polypeptides qui n'ont pas été endommagés peuvent alors assujettis à une dégradation par les peptidases de la bordure de l'intestin; finalement les peptides survivants seront affrontés à une barrière qui empêche leur passage vers les cellules.

La faible biodisponibilité orale des macromolécules est principalement due à leur poids moléculaire élevé et à leur solubilité variable. La biodisponibilité des macromolécules est essentiellement indépendante de leur masse moléculaire quand leur taille est inférieure à 700 daltons (Da), et présente une diminution considérable avec une augmentation de la masse au-delà de ce seuil.

La biodisponibilité est aussi dépendante de l'hydrophobicité, car il est nécessaire d'avoir un minimum pour que les macromolécules puissent traverser l'épithélium et qu'elles soient en mesure d'être absorbées via diffusion passive par les cellules (Singh *et al.*, 2008).

Le développement des médicaments à base de peptides et de protéines est fortement limité par leur faible stabilité métabolique et une faible biodisponibilité, ce qui est dû en partie à leur incapacité à traverser facilement les barrières membranaires telles que l'intestin et la barrière hémato-encéphalique (Singh *et al.*, 2008). Le principal défi est d'améliorer la biodisponibilité orale des ces médicaments de moins de 1% à 30-50% au minimum; dans le but de relever ce défi, diverses stratégies sont actuellement examinées (Shaji et Patole, 2008), comme par exemple:

La modification chimique des peptides et des protéines de manière à améliorer leur stabilité enzymatique et d'augmenter leur capacité de pénétration des membranes.

- L'utilisation des promoteurs de l'absorption qui ont la fonction de faciliter le transport des macromolécules à travers les barrières lipidiques par le biais d'une rupture temporaire des

membranes, d'une augmentation de la perméabilité des membranes et ou par l'augmentation ou diminution de la solubilité des principes actifs.

- La formulation et usage des inhibiteurs spécifiques du type de la protéase visée.
- L'élaboration de matrices résistantes aux milieux de pH variable pour donner aux macromolécules une protection contre l'environnement qui les entoure pendant leur passage au long du tractus gastro-intestinal.
- La formulation des macromolécules avec des polymères muco-adhésifs qui augmentent le temps de contact entre le système de livraison des macromolécules et la muqueuse intestinale, en augmentant de cette manière le temps disponible pour l'absorption du principe actif.

Dans le contexte d'un intérêt croissant pour des formes pharmaceutiques à base de protéines, l'exemple de l'insuline est édificateur, avec plus de 5 millions articles abordant l'administration orale de cette protéine thérapeutique à basse masse moléculaire (6000 Da), pour laquelle, malgré des progrès importants, il n'y a pas encore un grand essor industriel, même si le besoin est majeur pour la thérapie quotidienne du diabète. Encore, la limitation des formes orales réside dans les difficultés d'assurer la biodisponibilité désirée, notamment l'adsorption intestinale.

Différemment, notre projet touche des conditions pathologiques (l'insuffisance pancréatique), qui nécessitent des formes pharmaceutiques des enzymes à action dans le lumen intestinal, dont la seule difficulté majeure est liée à la gastro-protection et non à la biodisponibilité.

CHAPITRE III

LA STRUCTURE DE PROTÉINES ET L'IMPACT DE LA COMPRESSION SUR LEURS PROPRIÉTÉS

3.1 Compression de poudres - aspects généraux

Les principales étapes du procédé pour la fabrication des comprimés impliquent: le remplissage des moules, la compression, la décharge, l'éjection et la relaxation, voir Fig. 3.1

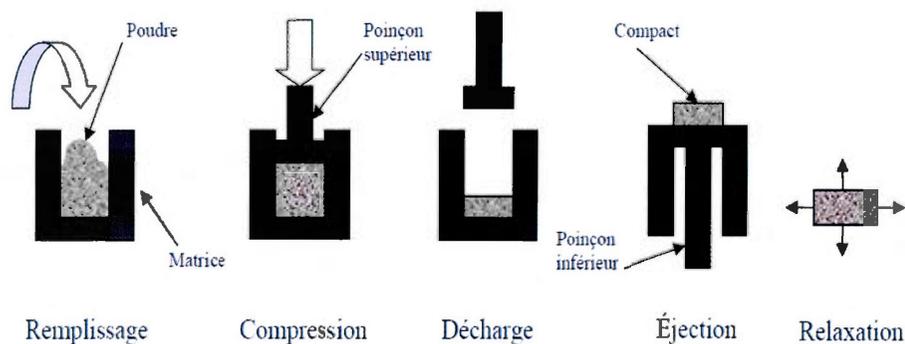


Figure 3.1: Représentation schématique des principales étapes dans le processus d'obtention des comprimés (Tirée de Kadiri, 2004).

L'étape de compression représente la concentration de particules solides libres (poudre ou granulés) qui sous pression sont transformés en un corps solide plus au moins poreux appelé comprimé. En effet les particules des poudres qui vont former un comprimé doivent être capables de s'agglutiner et rester liées les unes aux autres.

Le comprimé est obtenu lorsqu'une pression est exercée sur la poudre grâce à un poinçon, ce que entraîne tout d'abord une diminution du volume occupée par la poudre permettant que les surfaces des particules se rapprochent l'une de l'autre, en résultant une augmentation des forces d'attraction et des liaisons inter-particules. Pendant cette variation de pression, plusieurs phénomènes peuvent avoir lieu comme par exemple la déformation (plastique ou élastique) du matériel ou la destruction de sa structure (Kuny, 2004).

D'une façon générale, les phénomènes qui peuvent avoir lieu pendant l'application de cette pression, peuvent être résumés en quatre étapes: i) Une diminution du volume occupé par la poudre résultant du glissement inter-particulaire, ii) suite à l'immobilité des particules résulte la formation temporaire des colonnes et des petits espaces vides inter-particulaires, iii) une plus grande pression produit une destruction des colonnes formées dans l'étape précédente, avec augmentation du nombre de contacts entre particules et une déformation du matériel qui contribuent au renforcement de l'adhérence à l'intérieur du comprimé iv) continuation de la déformation et la relaxation du matériel (Kuny, 2004).

La(es) poudre(s) utilisée(e) durant le processus de compression peuvent suivre une déformation. Le type de déformation (figure 3.2) suivi dépend: du type de matériel (comportement sur pression) et de la pression (force) appliquée.

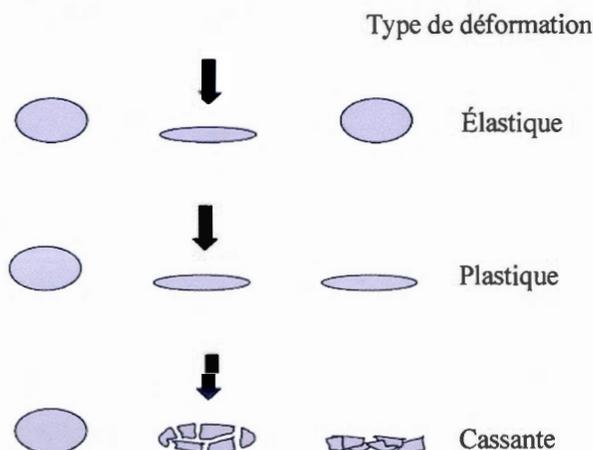


Figure 3.2: Schéma de la déformation typique avant, pendant et après l'application d'une force de compression (d'après Kuny, 2004).

La transition entre poudre et comprimé se déroule pendant la troisième étape des quatre qui comprend la compression. Ces quatre étapes ne se produisent pas de façon homogène et au même temps dans les différentes régions du cœur du comprimé; la distribution non homogène de la pression et les différentes caractéristiques des composants des mélanges utilisés pour produire un comprimé ont comme résultat que différentes régions peuvent être en différente étape au même temps (Kuny, 2004).

3.2 Les effets de la compression sur la structure et les propriétés des protéines

La pression peut induire des modifications de la structure des protéines. Cependant, l'effet de la pression est fortement influencé par les caractéristiques intrinsèques de la protéine concernée.

Les effets de la pression sur la structure et sur la fonction des protéines dépendent de facteurs comme: i) l'ampleur de la pression, ii) le mécanisme de réaction (dans le cas d'enzymes), et iii) l'équilibre global des forces responsables de la structure de la protéine (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2002).

L'ampleur de la pression exercée sur les protéines peut avoir comme effet une augmentation, une diminution ou une inactivation réversible ou irréversible de l'activité enzymatique. Des nombreuses études des effets de la pression sur les protéines et sur l'inactivation des enzymes ont été faites (Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera, 2009). Une augmentation modérée de la pression sous certaines conditions peut même conduire à une augmentation de l'activité enzymatique (Morild, 1981; Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera, 2009). Ces études ont été confinées à étudier l'effet de la pression hydrostatique sur les enzymes.

Une importance particulière a été donnée aux faibles interactions intra et inter- moléculaires des protéines qui sont fortement impliquées dans leur structure et fonction. Ces interactions sont affectées par la pression et constituent l'une des clés pour comprendre les effets de pression sur les biomatériaux (Balny, 2004). La stabilité de la structure native d'une protéine, sa conformation et ses activités biologiques sont le résultat d'un équilibre subtil des interactions (faibles et fortes) dans les chaînes polypeptidiques de la protéine et entre la protéine et son environnement telles que la présence d'autres protéines, des lipides, des solutés (Balny, 2004).

Les principaux types d'interactions faibles sont impliqués soit au niveau intramoléculaire, soit au niveau intermoléculaire.

Les principales interactions intramoléculaires trouvées dans les protéines sont de type ionique, hydrophobe, des interactions hydrogène, et des interactions d'hydratation (d'abord, liaisons H avec les molécules d'eau de la couche d'hydratation et avec de l'eau piégée dans les cavités des protéines), forces de Van der Waals et liaisons covalentes. Les interactions intermoléculaires sont celles qui régissent les interactions protéine-protéine, enzyme-substrat et protéine-non-protéine. Selon leur nature, ces interactions peuvent être affectées positivement ou négativement par la pression (Boonyaratanakornkit, *et al.*, 2002).

Les structures secondaires, tertiaires et quaternaires sont plus facilement affectées par la pression, car des interactions faibles sont impliquées. Par contre, la structure primaire qui est maintenue par des interactions covalentes n'est pas affectée, de façon courante par la pression (Boonyaratanakornkit, *et al.*, 2002).

La pression peut agir sur la stabilité des protéines, et elle est maintenant considérée comme une importante variable pour étudier la structure et la relation structure-fonction. Malgré plusieurs études faites, certains aspects de la façon comme les protéines réagissent à la pression restent inconnues.

Bien que de nombreuses études ont été faites sur l'effet de la pression hydrostatique sur les protéines, l'effet de la pression à l'état solide reste un sujet peu étudié (Picker, 2002; Sakarkar *et al.*, 2009; Zarrintan *et al.*, 1990; Kuny, 2004; Teng et Groves, 1988).

Le processus rapide du développement biotechnologique a permis d'inclure d'une façon croissante de nouveaux médicaments dans la liste de substances biologiquement actives (peptides, protéines, etc.). Ces nouvelles substances sont extrêmement sensibles à leur environnement et dans la plupart de cas elles dépendent essentiellement de leur structure pour exercer leur activité pharmacologique. Pour cette raison, l'obtention des formes pharmaceutiques permettant la protection adéquate de ces substances biologiquement actives représente un défi technologique majeur pour l'industrie du médicament.

Les comprimés sont les formes pharmaceutiques de choix pour la formulation des enzymes administrables par voie orale, car dans la plupart des cas, dans une formulation pharmaceutique des enzymes en forme liquide une décomposition peut avoir lieu (Picker, 2002). Cependant, un facteur important dans le processus de compression sont les dommages partiels survenant à cause de la pression des matériaux qui peuvent générer pour des protéines actives, telles que des enzymes, une perte de leur activité (Picker, 2002).

Des études qui ont utilisé différentes enzymes ont montré qu'après une certaine force du compactage, il existe une significative perte d'activité enzymatique. Ainsi la lipase et l'urease ont montré des pertes significatives d'activité de 30% et 50% respectivement en utilisant des pressions au-delà de 400 MégaPascals (MPa) (Wurster et Ternik, 1995; Zarrintan *et al*, 1990). Bien que le mécanisme qui produit la perte de l'activité enzymatique n'est pas claire, une corrélation entre l'augmentation de la force de compression et la diminution de l'activité enzymatique a lieu (Wurster et Ternik, 1995; Zarrintan *et al*, 1990).

Ainsi, la perte d'activité peut être expliquée comme :

- Une conséquence des dommages mécaniques survenus suite à la force de compression. La réduction de volume due à la compression peut produire une déformation de la macromolécule et ces changements structurels peuvent provoquer une dénaturation de la protéine (Kuny, 2004). Cette dénaturation à l'état sec est irréversible. L'inactivation irréversible peut entraîner i) la formation de conformations incorrectes d'enzymes pendant leurs associations ou ii) la perte de la capacité des sous-unités des enzymes de s'associer en raison des changements structurels, probablement due à une distribution de pression hétérogène lors de la compression à l'état solide (Wurster et Ternik, 1994).
- La création de nouvelles liaisons au sein de la molécule de l'enzyme lors de la compression (Schulz *et al.*, 1997).
- La production de chaleur lors de la compression est une autre possible explication, mais plusieurs auteurs ont mentionné qu'il n'existe aucune preuve à l'appui (Kuny, 2004).

Il existe une corrélation entre la diminution de l'activité induite par l'application de la pression et la ductilité du matériel (Nürnberg et Scheler, 2000). Le type de comportement (plastique,

élastique ou cassant) des enzymes en poudre durant la compression est un facteur qui peut avoir une influence significative. L'origine et la méthode d'obtention de ces poudres à une influence importante sur son comportement durant la compression. Les poudres d'enzymes utilisées pour la compression solide sont rarement pures; la plupart du temps elles sont produites par lyophilisation, ce qui nécessite une addition d'agents de lyophilisation (Kuny, 2004). Des études ont montré l'influence de la force de compression sur l'activité enzymatique de trois différents types d'alpha-amylase qui ont une origine différente (Picker, 2002). Ces études ont suggéré qu'il n'y a pas de prédiction générale possible sur le comportement sous compression d'une enzyme en poudre.

CHAPITRE IV

PRÉSENTATION DU PROJET

4.1 Le Concept

Des propriétés associatives des protéines peuvent conduire à des formes pharmaceutiques des enzymes thérapeutiques sans excipients. Ces associations sont dues uniquement aux propriétés chimiques, électriques et structurales (configuration) des molécules protéiques.

Types d'interactions intra-ou inter-chaînes:

ioniques (ex. $\text{-COO}^- \dots \text{NH}_3^+$: glutamate-lysine et d'aspartate-lysine)

Associations d'hydrogène, liaisons peptidiques (lysine, tyrosine, sérine)

Autres liaisons associatives (ex. π - π phénylalanine-tyrosine)

Stabilisation Van der Waals (ex. alanine-leucine).

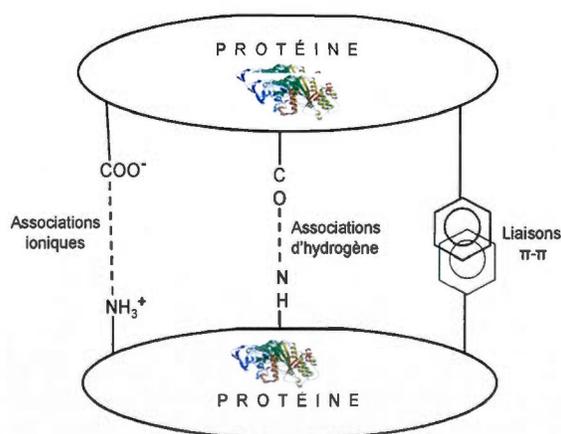


Figure 4.1: Schéma des types d'interactions intra-ou inter-chaînes entre protéines

Notre approche vient d'apporter une solution innovatrice pour obtenir des formes pharmaceutiques d'enzymes pancréatiques, tout en assurant une stabilité gastrique supérieure aux plusieurs produits commerciaux. De plus, il n'a pas besoin de excipients, ce qui permet d'éliminer une possible influence sur l'activité enzymatique (Sakarkar *et al.*, 2009; Kuny, 2004).

Ce nouveau concept a été développé en collaboration avec Axcan Pharma et protégé par une demande de brevet déjà publiée, décrite dans le chapitre IV et présentée en extenso dans l'annexe I.

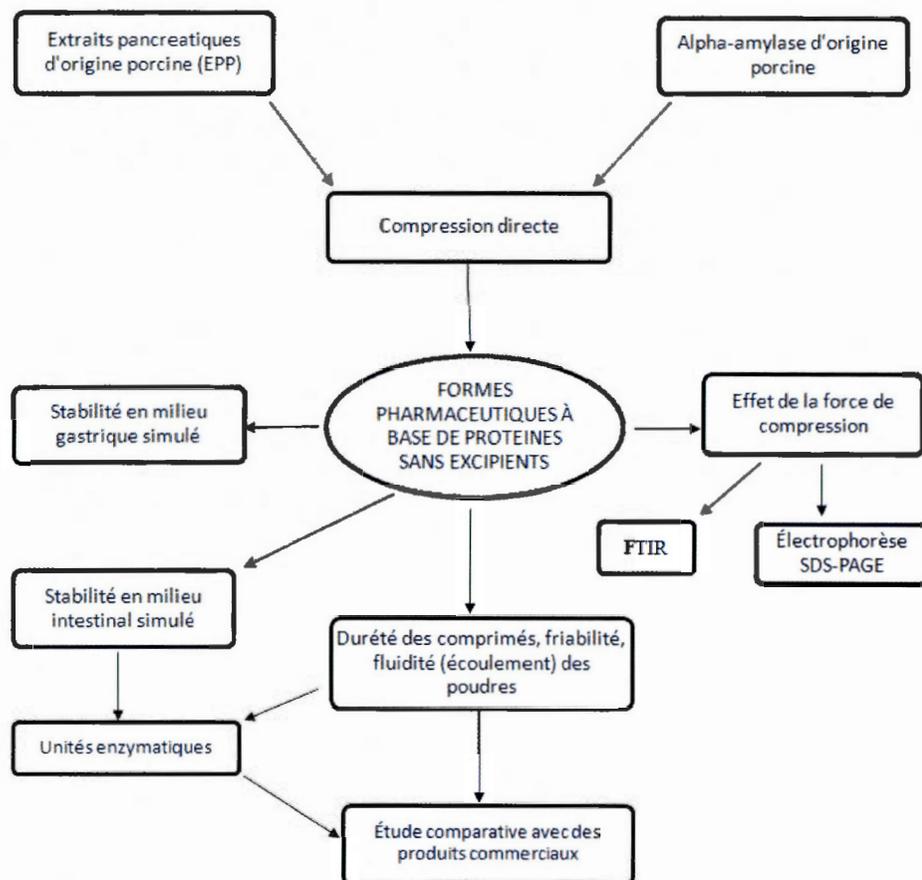


Figure 4.2: Présentation schématique des différentes étapes du projet.

DEUXIÈME PARTIE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE V

MATÉRIEL ET MÉTHODES

5.1 Matériel

5.1.1 Extrait d'enzymes pancréatiques d'origine porcine (EPP)

Extrait d'EPP fourni par Axcan Pharma contenant de la lipase, des protéases et de l'amylase ainsi que d'autres enzymes pancréatiques.

5.1.2 Comprimés de référence

Comprimés sans enrobage gastro-résistant qui contient EPP et excipients.

5.1.3 Standards

USP pancreatin lipase, lot I1E327 activité de lipase 21,2 Unités USP (USP U) /mg, USP pancreatin lipase, lot J0G363 activité de lipase 93,3 USP U/mg, USP pancreatin amylase and protease, lot I1E218; activité d'amylase 174 USP U/mg; activité de protéase 124 USP U/mg.

5.1.4 Réactifs

Analyse de lipase:

Acacia (51201), huile d'olive (75343) et sels biliaires (48305) de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (TRIS) de Bioshop (Burlington, ON, Canada), acide chlorhydrique, chlorure de sodium et hydroxide de sodium de EMD (Gibbstown, NJ, USA),

Analyse de protéase:

Caséine du lait de bovine (C5890) de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); acide trichloroacétique (TCA) (93610-340) d'Anachemia (Montréal, QC, Canada); hydroxide de sodium de EMD (Gibbstown, NJ, USA); phosphate de potassium monobasique de Anachemia (Montréal, QC, Canada).

Analyse d'amylase:

Amidon soluble très pur (33615) et 0.1 N Iodine (35090) de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); thiosulfate de sodium (74888-380), phosphate de potassium monobasique et phosphate de sodium dibasique anhydre de Anachemia (Montréal, QC, Canada); acide chlorhydrique, chlorure de sodium et hydroxyde de sodium de EMD (Gibbstown, NJ, USA); acide sulfurique de Fisher Scientific (Montréal, QC, Canada).

5.1.5 Alpha-amylase d'origine porcine (extraite du pancréas de porc)

Type VI-B, ≥ 10 units/mg solide (A3176-5MU), lot 68F00791, obtenu auprès de Sigma-Chemical co. (USA) et utilisé sans purification supplémentaire.

5.2 Méthodes

5.2.1 Préparation des comprimés d'EPP sans excipients

Des comprimés monolithiques à base de poudre d'EPP ont été obtenus par compression directe (Carver hydraulic press—Wabash IN USA) en utilisant des poinçons à face plate de diamètre: 9,7 mm, 6 mm, 4 mm et 2 mm (Sami Précision, Montréal).

Comprimés de 500, 142, 64 et 15 mg respectivement ont été obtenus à des forces de compression dans la gamme:

Exemple A: 1,0 à 2,5 T

Exemple B: 2,5 à 5,0 T

Tableau 5.1: Activités de lipase, amylase et protéase dans les comprimés de 500 mg (9,7 mm de diamètre)

Composants du comprimé	Activité enzymatique
Lipase	25000 unités USP
Amylase	94000 unités USP
Protéase	94000 unités USP

5.2.2 Détermination de l'activité enzymatique

Les monographies sur la pancréatine (USP29-NF24) et sur la pancrélipase (USP29-NF24) décrivent en détail les méthodes recommandées pour évaluer la composition des produits contenant lipase, amylase et lipase. La méthode USP de référence pour le dosage de lipase est une méthode titrimétrique qui a besoin de plusieurs équipements. Le dosage USP d'amylase a été effectué par une réaction iode-amidon, selon la méthode Willstatter Schubel. Pour doser les protéases, l'USP recommande une méthode spectrophotométrique utilisant un substrat de caséine suivie par une précipitation avec acide trichloracétique.

L'activité de l'amylase a été dosée par la méthode USP (USP29-NF24) – titrage – iodométrique: lors d'une digestion enzymatique d'amidon par l'alpha-amylase, la quantité d'amidon non hydrolysé réagisse avec l'iode ajouté. L'excès d'iode n'ayant pas réagi a été déterminé par thiosulfate de sodium. La détection de la neutralisation se fait par titrage colorimétrique. En effet, la coloration bleu foncé disparaît à mesure de la neutralisation de l'iode par le thiosulfate et la disparition complète de coloration correspond au point de virage. L'activité enzymatique de l'amylase peut donc être déduite selon la quantité de titrant utilisée après l'hydrolyse et selon la quantité de substrat initiale (Ehrhardt, Grasshoff et Kremling, 1998).

Le dosage de l'amylase est un titrage par retour du complexe formé par l'iode et l'amylose. L'enzyme a été dissoute en une concentration appropriée dans un tampon de phosphate de potassium (200 mM, pH 6,8) et ensuite ajouté à une solution qui contient 25 mL de substrat à base d'amidon de pomme de terre (0,01%), 1 mL de NaCl (11,7 en 1000), 10 mL de tampon phosphate (55,5 mM, pH 6,8) et maintenu à $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ pendant 10 min. Après, la réaction a été arrêtée avec 2 ml HCl (1M), ensuite ajouté 10 mL d'iode (0,1 N) et 45 mL de NaOH (0,1 M) et placée dans

l'obscurité. Après 15 minutes, 45 mL d'acide sulfurique (2N) ont été additionnés à la solution de la réaction et ensuite titrée avec thiosulfate (0,1N). Une unité d'amylase USP contient la quantité d'enzyme qui décompose l'amidon à une vitesse de 0,16 meq de liens glycosidique par minute sous les conditions de l'analyse (Demers, 2010).

L'activité de la lipase a été dosée par la méthode USP (USP29-NF24) – titrage des acides gras provenant des triglycérides libérés par l'action de la lipase sur l'huile d'olive en utilisant une solution d'hydroxyde de sodium (pH-stat Method).

Le dosage USP de la lipase a été fait par titrimétrie. Le substrat a été préparé par homogénéisation d'huile d'olive avec une solution de gomme arabique (solution 10% dans l'eau) et de l'eau froide déionisée en une proportion 10:82,5:7,5 (v/v). Un volume de 10,0 mL de substrat a été dilué avec 8,0 mL d'un tampon (0,06% w/v Tris(hydroxyméthyl) aminométhane et 0,23% w/v NaCl), 2,0 mL d'un solution de sels biliaires (8,0 % w/v) et 9,0 mL d'eau, chauffé au $37 \pm 0,1$ °C et ajusté le pH à 9,2. Une solution aqueuse enzymatique en une concentration appropriée (entre 8 à 16 USP U/mL) a été additionnée à ce milieu d'analyse. La libération des acides gras a été continuellement suivie par titrage avec NaOH (0,1 M) pendant 5 min, en gardant un pH de 9,0. Une unité USP de lipase contient la quantité d'enzyme qui libère 1,0 meq d'acides gras par min à pH 9,0 et 37 °C sous les conditions de l'essai (Demers, 2010).

L'activité de la protéase a été dosée par la méthode USP (USP29-NF24) – méthode spectrophotométrique qui est une modification du protocole établi par Kunitz, 1947. Celui-ci comporte plusieurs étapes : une action protéolytique sur le substrat, une précipitation des protéines non clivées par l'acide trichloracétique (TCA) et une détection des acides aminés aromatiques des peptides clivés par une lecture en spectrophotomètre à 280 nm.

Le dosage de la protéase est basé sur le fait que l'acide amine tyrosine peut être détecté par spectrophotométrie. La préparation de protéase en concentration adéquate (2,5 USP U/mL), dissoute dans un tampon de phosphate de potassium (5 mM, pH 7,5) et équilibrée à 40 ± 1 °C a été ajoutée au substrat de caséine (1,25% dans l'eau) en proportion de 3:5 (v/v) et gardée à la même température pendant 1 heure. La réaction a été arrêtée avec 5,0 mL de TCA (5%), filtrée et lue à 280 nm. Une unité USP de protéase contient la quantité d'enzyme qui hydrolyse la caséine à une vitesse initiale pour libérer par minute une quantité de peptides non précipités par TCA qui donne

la même absorbance à 280 nm que 15 mmol de tyrosine dans les conditions de l'analyse (Demers, 2010).

5.2.3 Stabilité d'EPP dans l'Int des comprimés après incubation

En fluide gastrique simulé (FGS) sans pepsine :

Des comprimés d'EPP (500 mg) sans excipients et comprimés de référence ont été incubés individuellement à différents temps dans 50 mL FGS sans pepsine et sous agitation constante à 50 rpm. Après le temps d'incubation indiqué, les comprimés ont été prélevés et l'Int du comprimé a été utilisée pour y doser l'activité enzymatique de lipase, amylase et protéase. Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'activité enzymatique des comprimés sans être incubés (100%).

En FGS et ensuite dans le fluide intestinal simulé sans pancréatine (FIS) :

Des comprimés d'EPP (500 mg) sans excipients et des comprimés de référence ont été incubés individuellement à différents temps dans 50 mL FGS sans pepsine, sous agitation constante à 50 rpm puis transférés dans 50 mL de FIS, sous agitation constante à 50 rpm. Après le temps d'incubation indiqué, les comprimés ont été prélevés et l'Int du comprimé a été utilisée pour y doser l'activité enzymatique de la lipase, l'amylase et des protéases. Les valeurs ont été normalisées, par rapport à l'activité enzymatique des comprimés sans être incubés.

Directement dans FIS :

Comprimés d'EPP (500 mg) sans excipients et comprimés de référence ont été incubés individuellement à différents temps directement dans 50 mL FIS et sous agitation constante à 50 rpm. Après le temps d'incubation indiqué, les comprimés ont été prélevés et l'Int du comprimé a été utilisée pour y doser l'activité enzymatique de lipase, amylase et protéase. Les valeurs ont été normalisées, par rapport à l'activité enzymatique des comprimés sans être incubés.

5.2.4 Stabilité d'EPP mesuré dans le comprimé entier (Int + Ext)

Comprimés d'EPP sans excipients* et comprimés de référence ont été incubés (n=3) à différents temps dans un appareil de dissolution USP I (panier) (Distek dissolution system 2100A) dans 800

mL du FGS sans pepsine, 37°C et 100 rpm. Après le temps d'incubation indiqué, les comprimés ont été prélevés pour y doser l'activité enzymatique de la lipase. Les valeurs ont été normalisées, compte tenu de l'activité enzymatique des comprimés sans être incubés.

(*) Les comprimés de 9,7 mm de diamètre (500 mg) ont été incubés individuellement. Les petits comprimés ont été incubés en nombre équivalent à la quantité des unités enzymatiques des comprimés de 500 mg.

5.2.5 Livraison de lipase dans FIS en conditions que miment le passage par le tractus digestif

Les tests de dissolution ont été effectués dans un appareil USP I (Distek dissolution system 2100A). Comprimés d'EPP sans excipients ont été incubés * (n=3) dans FGS sans pepsine (60 min, 800 mL, 37°C, 100 rpm), puis transférés dans une solution tampon de pH 4,5 (60 min, 800 mL, 37 °C, 100 rpm), et finalement transférés dans l'appareil de désintégration (Electrolab ED-2L) dans FIS (30 min, 800 mL, 37 °C). Après, des échantillons (aliquotes de 5 mL de FIS) ont été prélevés à différents intervalles de temps pour y doser l'activité enzymatique de la lipase libérée dans FIS. Les valeurs ont été normalisées, par rapport à l'activité enzymatique des comprimés sans être incubés.

(*) Les comprimés de 9,7 mm de diamètre (500 mg) ont été incubés individuellement. Les petits comprimés ont été incubés en nombre équivalent à la quantité des unités enzymatiques des comprimés de 500 mg.

5.2.6 Dureté et friabilité des comprimés d'EPP

Tous les comprimés ont été préparés 24 heures avant de tester la dureté et la friabilité. La dureté (kp) des comprimés a été mesurée en utilisant un duromètre automatique (Vankel VK 200). Les résultats présentés correspondent à une moyenne de 5 mesures avec 10 comprimés par mesure.

La friabilité des comprimés a été déterminée en utilisant un friabilateur automatique (Vankel friabilator), selon la méthode USP <1216> (USP29-NF24). Le pourcentage de friabilité a été calculé à partir de la perte de poids des comprimés en raison des cycles de rotation. Les résultats présentés correspondent à une moyenne de 5 mesures.

5.2.7 Évaluation de l'écoulement des poudres

L'échelle de l'écoulement des poudres, y compris l'indice de compressibilité, le caractère d'écoulement, et le rapport Hausner des comprimés ont été déterminés selon les procédures décrites dans l'USP <1174> (USP29-NF24).

5.2.8 Préparation des comprimés d'alpha-amylase sans excipients

Les comprimés d'alpha-amylase de 9,7 mm de diamètre et 1,2 g (poids total) ont été obtenus par compression directe (presse hydraulique Carver) de la poudre d'alpha-amylase à des forces de compression de 1,0 T, 3,0 T, 6,0 T et 8,0 T.

Tableau 5.2: Équivalences des forces de compression utilisées pour l'élaboration des comprimés d'alpha-amylase

Tonnes (T) (presse hydraulique Carver)	Surface du comprimé (cm ²)	T/cm ²	kbar
1	0,739	1,35	1,32
3	0,739	4,06	3,98
6	0,739	8,12	7,96
8	0,739	10,82	10,62

5.2.9 Détermination de l'activité d'alpha-amylase

L'activité d'alpha-amylase a été déterminée par la méthode réductimétrique établie par Noelting et Bernfeld (1948) utilisant l'acide dinitrosalicylique (DNS) pour révéler (540 nm) les produits d'amylyse (maltose et dextrines). L'enzyme a été incubée pendant 3 min à température ambiante avec de l'amidon soluble à 1% comme substrat et arrêtée avec le réactif de DNS.

L'activité d'alpha-amylase a été déterminée en deux parties des comprimés: i) dans la surface des comprimés (l'Ext) où le comprimé est soupçonné d'avoir le plus de pression et ii) dans l'intérieur du comprimé (l'Int) où la poudre a supporté moins de pression.

5.2.10 La stabilité des comprimés d'alpha-amylase dans FGS

La poudre d'alpha-amylase et des comprimés d'alpha-amylase faits à différentes forces de compression ont été incubés individuellement pendant 120 min dans l'appareil USP type 1 (paniers) (modèle DISTEK) dans 900 mL de FGS sans pepsine pH 1,2 ou FGS pH 1,2 (contenant 800 – 2500 unités / mL de pepsine) (USP29-NF24) à 37 °C et 100 rpm, simulant le passage gastrique. À la fin de l'incubation, les comprimés ont été transférés individuellement dans 900 mL d'eau pendant 2 min à 37 °C et 200 rpm. Les comprimés ont été prélevés et l'Ext et l'Int des comprimés ont été utilisés pour évaluer la structure primaire (par électrophorèse SDS-PAGE) et secondaire (par FTIR) d'alpha-amylase après incubation dans FGS.

5.2.11 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide-sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE)

La poudre d'alpha-amylase (100 mg), l'Ext (100 mg) et l'Int (100 mg) des comprimés d'alpha-amylase et faites avec différentes pressions, après 120 minutes d'incubation dans FGS avec ou sans pepsine, 100 rpm et 37 °C (la poudre d'alpha-amylase sans incubation, utilisée comme un témoin positif) et séchés à température ambiante ont été individuellement dissous dans 15 mL de H₂O (pH 11.0); ensuite, les volumes de 200 µL de chaque solution enzymatique ont été mélangés avec 200 µL de tampon de chargement électrophorèse contenant (0,12 M Tris-HCl pH 6,8 contenant 4% SDS, 20% de glycérol, 10% β-mercaptoéthanol et 0,004% bleu de bromophénol) et bouillis pendant 5 min. Un volume de 30 µL d'échantillon enzymatique traité a été mis sur un gel de polyacrylamide 12% obtenu selon la méthode de Laemmli (1970) et fait migrer à température ambiante pendant 1 h (120 V) en utilisant un tampon d'électrophorèse (0,025 M tris-Base pH 8,3 contenant 0,19 M glycine et 0,1% SDS). Marqueurs de différent poids moléculaires de protéines (large gamme, Bio-Rad Laboratoires), contenant bleu de bromophénol, ont été mis sur chaque gel d'électrophorèse. Les protéines ont été colorées avec R-250 de bleu brillant de Coomassie.

5.2.12 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

L'analyse spectroscopique FTIR a été réalisée en utilisant le spectrophotomètre Nicolet FTIR 6700 / NXR 967 FT Raman. L'analyse FTIR a été faite sur i) comprimés d'alpha amylase

(différentes forces de compression) et ii) comprimés d'alpha-amylase (incubés individuellement dans 900 mL de FGS avec ou sans pepsine pendant 120 minutes, 100 rpm et 37 °C). Spectres de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} étaient enregistrés à une résolution de 2 cm^{-1} avec un total de 128 scans pour chaque échantillon.

CHAPITRE VI

RÉSULTATS

6.1 Stabilité des comprimés d'EPP

Pendant l'incubation des comprimés d'EPP sans excipients dans FGS un gonflement de la couche externe des comprimés a été observée (Fig. 6.1). L'incubation dans SIF accélère nettement le phénomène d'érosion.

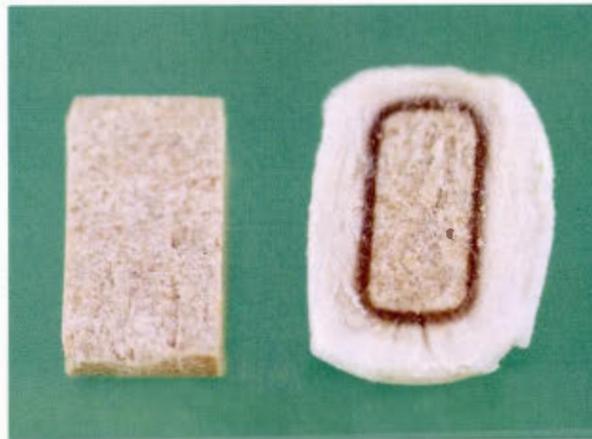


Figure 6.1: Coupe transversale des comprimés d'EPP sans excipients avant et après 60 min d'incubation dans FGS sans pepsine

Les résultats sur l'épaisseur de la couche hydratée des comprimés incubés pendant différents temps dans FGS sans pepsine sont présentés dans le tableau 6.1 et à la Fig. 6.2.

Tableau 6.1: Cinétique d'hydratation de comprimés d'EPP sans excipients dans FGS sans pepsine.

Temps d'incubation dans FGS (min)	Épaisseur de la couche hydratée (mm)			
	Comprimés 9,7 mm diamètre		Comprimés 2,0 mm diamètre	
	Pression 2,0 T	Pression 0,25 T	Pression 2,0 T	Pression 0,25 T
2	0,45	0,45	0,50	0,55
5	0,79	0,75	0,75	0,75
10	1,20	1,25	1,03	1,27
15	1,45	1,44	1,24	1,42
20	1,50	1,68	--	--
30	1,79	1,94	--	--
60	2,37	3,10	--	--

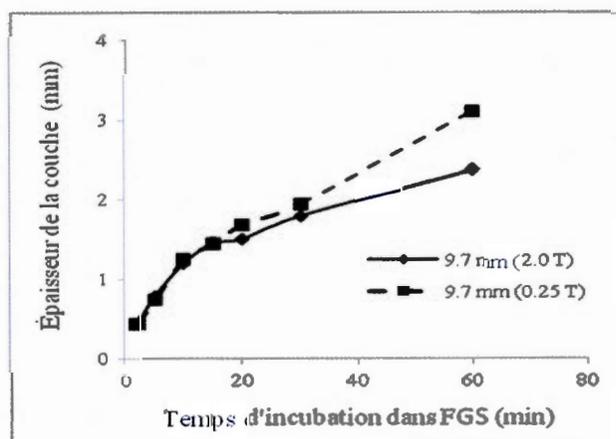


Figure 6.2: Cinétique d'hydratation du comprimé de 9,7 mm dans FGS en fonction de la force de compression.

6.1.1 Stabilité d'EPP dans l'Int des comprimés après incubation

Les résultats sur l'activité enzymatique dans l'Int des comprimés d'EPP sans excipients après incubation pendant différents temps dans FGS et ou FIS sont présentés dans les tableaux 6.2, 6.3 et 6.4.

Tableau 6.2: Évaluation comparative de l'activité de lipase dans l'Int des comprimés d'EPP sans excipients versus comprimés de référence.

Conditions de dissolution	Activité*(%)	
	Comprimés d'EPP sans excipients (Exemple 1)	Comprimé de référence
Activité initiale	100	100
Activité après 60 min FGS sans pepsine	87,1	0
Activité après 120 min FGS sans pepsine	92,5	0
Activité après 60 min FGS sans pepsine et 30 min FIS	94,4	0

*activité relative par rapport à l'activité initiale

Tableau 6.3: Évaluation comparative de l'activité de protéase dans l'Int des comprimés d'EPP sans excipients versus comprimés de référence.

Conditions de dissolution	Activité* (%)	
	Comprimés d'EPP sans excipients (Exemple 1)	Comprimé de référence
Activité initiale	100	100
Activité après 30 min FGS sans pepsine	84,1	15,0
Activité après 60 min FGS sans pepsine	75,2	7,1
Activité après 60 min FGS sans pepsine et 30min FIS	79,2	7,7

*activité relative par rapport à l'activité initiale

Tableau 6.4: Évaluation comparative de l'activité d'amylase dans l'Int des comprimés d'EPP sans excipients versus comprimés de référence.

Conditions de dissolution	Activité* (%)	
	Comprimés d'EPP sans excipients (Exemple 1)	Comprimé de référence
Activité initiale	100	100
Activité après 60 min FGS sans pepsine	70,8	11,4
Activité après 60 min FGS sans pepsine et 30min FIS	80,3	13,8

*activité relative par rapport à l'activité initiale

6.1.2 Stabilité d'EPP mesuré dans le comprimé entier (Int + Ext)

Les résultats de la stabilité d'EPP dans le comprimé entier (Int et Ext) par rapport au comprimé de référence sont présentés dans le tableau 6.5.

Tableau 6.5: Activité de lipase dans les comprimés d'EPP après incubation dans FGS sans pepsine.

Forme de dosage	Activité de lipase (%) (USP II, 100 rpm, 37°C)		
	30 min	60 min	120 min
Comprimés d'EPP sans excipients (500mg)	64,4 ± 4,2	44,2 ± 2,7	22,9 ± 3,9
Comprimés de référence	Non détectable	Non détectable	Non détectable

6.1.3 Stabilité des comprimés d'EPP faits avec différentes forces de compression

Les résultats de la stabilité d'EPP dans des comprimés entiers (Int et Ext) faits avec différentes forces de compression sont présentés dans le tableau 6.6.

Tableau 6.6: Évaluation comparative de l'activité de lipase dans les comprimés d'EPP sans excipients et comprimés de référence.

Formulation	Activité de lipase (%) (USP I, 100 rpm, 37°C)	
	60 min	120 min
Comprimé 500 mg (Compression exemple A)	50,9 ± 3,7	29,4 ± 3,2
Comprimé 500 mg (Compression exemple B)	55,5 ± 4,1	38,9 ± 3,4
Comprimé de référence	Non détecté	Non détecté

6.2 Évaluation d'écoulement des poudres

Les capacités d'écoulement du poudre PEC et poudre PEC + acide stéarique a été évaluées en utilisant l'indice de compressibilité et le rapport Hausner comme décrits dans le chapitre <1174> de l'USP29-NF24, et les résultats sont présentés dans le tableau 6.7.

Tableau 6.7 : L'écoulement de poudre d'EPP avec et sans acide stérique

Formulation	Indice de compressibilité	Rapport Hausner	Caractéristique d'écoulement*
Poudre PEC	25	1,33	Passable
Poudre PEC + acide stérique	24	1,31	Passable

*Selon les critères USP29

6.3 Évaluation de la friabilité et de la dureté des comprimés d'EPP

La friabilité et la dureté des comprimés d'EPP et comprimés de référence ont été réunies dans le tableau 6.8

Tableau 6.8 : Évaluation de la friabilité et la dureté des comprimés d'EPP.

Force de compression (T)	Friabilité (%)	Dureté Moyenne (kp)
1,0	8,33	5,3
1,5	0,35	7,0
2,0	0,30	8,4
2,5	0,20	8,3
3,0	0,20	10,1
Comprimé de référence	0,11	11,7

6.4 Effet du temps d'incubation et de la taille du comprimé sur la stabilité gastrique

Comprimés d'EPP sans excipients de différentes tailles : 2, 4, 6 et 9,7 mm de diamètre et de poids moyens de 15, 64, 142 et 500 mg respectivement ont été incubés dans FGS sans pepsine à différents temps d'incubation (30, 60 et 120 min). L'effet du temps d'incubation et de la taille du comprimé sur la stabilité gastrique a été évalué (tableau 6.9 et Fig. 6.3).

Tableau 6.9: Caractéristiques des comprimés d'EPP sans excipient de diverses tailles et leur activité de lipase (%) incubés dans FGS sans pepsine pendant différents temps.

Diamètre du comprimé (mm)	Poids moyenne (mg)	Dureté Moyenne (kp)	Temps (min)	Activité lipase (%)	Observations
2,0	15	2,3	30	Non détectable	Une couche externe mince est formée et la partie interne du comprimé (noyau) est mouillée
			60		
			120		
4,0	64	2,5	30	37,1 ± 2,5	Une couche externe mince est formée et la partie interne du comprimé (noyau) reste sèche
			60	16,6 ± 2,8	
			120	Non détectable	
6,0	142	3,7	30	46,6 ± 2,3	Une couche externe mince est formée et la partie interne du comprimé (noyau) reste sèche
			60	31,4 ± 3,4	
			120	13,0 ± 2,7	
9,7	500	9,3	30	67,8 ± 1,9	Une couche externe mince est formée et la partie interne du comprimé (noyau) reste sèche
			60	52,4 ± 1,7	
			120	36,8 ± 2,9	

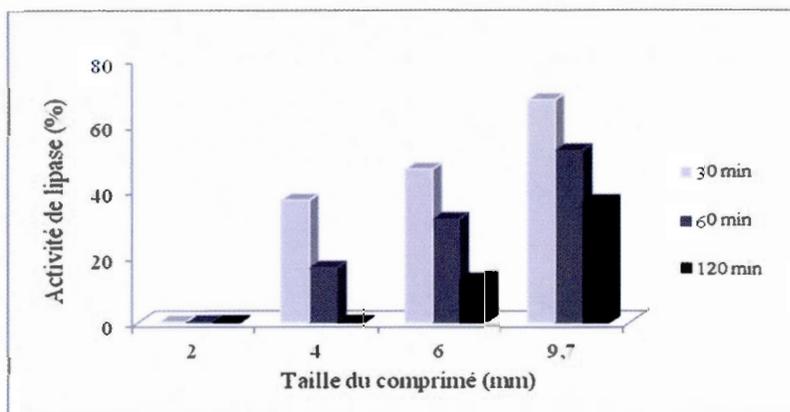


Figure 6.3: Effet du temps d'incubation et de la taille du comprimé sur l'activité enzymatique résiduelle après 30 min, 60 min et 120 min d'incubation dans FGS par rapport à l'activité initiale du comprimé avant incubation (100%).

6.5 Livraison de lipase dans FIS en conditions que miment le passage gastro-intestinal

L'activité de lipase libérée dans FIS par des comprimés d'EPP sans excipients après l'exposition au FGS sans pepsine (pH 1,2) pendant 60 min, suivie par l'exposition au tampon acétate pH 4,5 pendant 60 min, et l'exposition subséquente au FIS pendant 15 et 30 min sont présentées dans le tableau 6.10 et la Fig. 6.4.

Tableau 6.10 : Activité de lipase libérée dans FIS par des comprimés d'EPP sans excipients de diverses tailles.

Diamètre du comprimé (mm)	Poids moyenne (mg)	Activité de lipase libérée (%) dans FIS	
		15 min	30 min
2,0	15	Non détectable	Non détectable
4,0	64	13,3 ± 2,4	14,0 ± 2,7
6,0	142	21,2 ± 3,1	28,4 ± 2,9
9,7	500	42,4 ± 2,7	44,5 ± 1,9

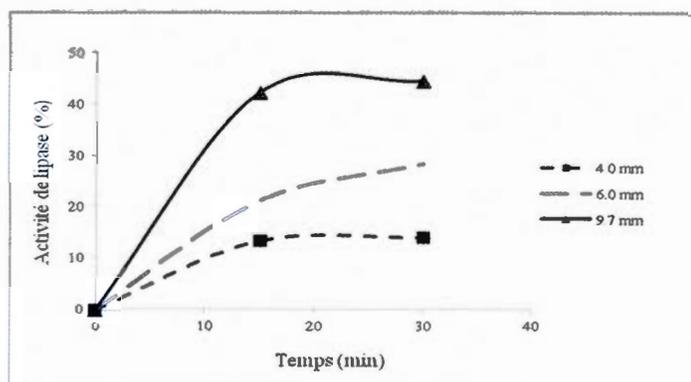


Figure 6.4 : Profil de dissolution des comprimés d'EPP de diverses tailles.

La Fig. 6.5 montre une comparaison entre l'activité de lipase résiduelle dans le comprimé d'EPP sans excipients après incubation de 60 min dans FGS par rapport à l'activité de lipase libérée après 15 min dans FIS.

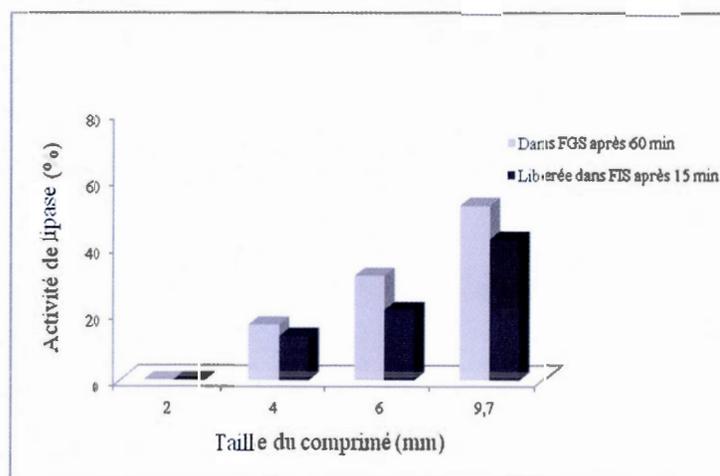


Figure 6.5: Comparaison de l'activité de lipase qui reste dans les comprimés d'EPP après incubation de 60 min dans FGS et l'activité libérée dans FIS pendant 15 min.

6.6 L'effet de la force de compression sur la structure d'alpha-amylase

Les résultats de l'effet de la pression sur les structures d'alpha-amylase sont présentés en deux parties i) résultats de la spectrométrie FTIR (§6.6.1) et ii) résultats sur l'activité enzymatique (§6.6.2).

6.6.1 Étude de la structure secondaire d'alpha-amylase par analyse FTIR

Le spectre d'absorbance FTIR de la poudre d'alpha-amylase (Fig.6.6) et l'attribution de la bande d'amide I se trouvent dans le tableau 6.11

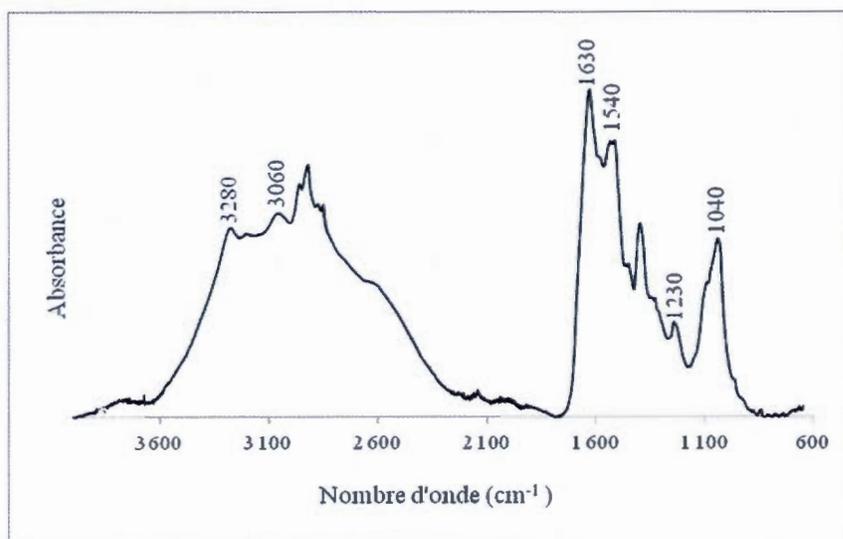


Figure 6.6 : Spectre FTIR de la poudre d'alpha-amylase.

Tableau 6.11 : Nombres d'onde de la bande amide I pour la poudre et pour des comprimés d'alpha-amylase.

Forme	Pression (kbar)	Nombre d'onde Amide I (cm⁻¹)
Poudre	0	1633
Comprimé	1	1634
Comprimé	4	1633
Comprimé	8	1633
Comprimé	11	1634

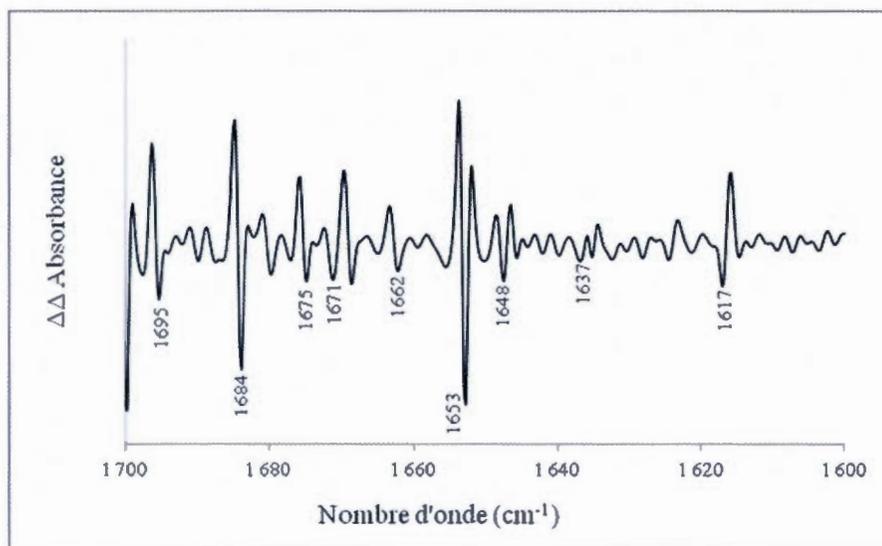


Figure 6.7: Le profil de la dérivée seconde ($\Delta\Delta$) de la bande d'amide I de la poudre d' α -amylase.

Tableau 6.12: Composition de la structure secondaire d' α -amylase en poudre et en comprimés.

Forme/Pression (kbar)	Pression (kbar)	Coude-beta (%)	Feuillet-beta (%)	Hélice-alpha (%)	Non-ordonnée (%)
Poudre	0	48	16	27	9
Comprimé	1	51	19	22	8
Comprimé	4	52	22	17	8
Comprimé	8	51	23	17	9
Comprimé	11	53	25	14	8

Tableau 6.13: Composition relative de la structure secondaire d' α -amylase en poudre et en comprimés.

Pression (kbar)	Coude-beta (%)	Feuillet-beta (%)	Hélice-alpha (%)	Non-ordonnée (%)
0	100	100	100	100
1	106	119	83	85
4	108	136	66	94
8	105	140	65	105
11	110	151	54	90

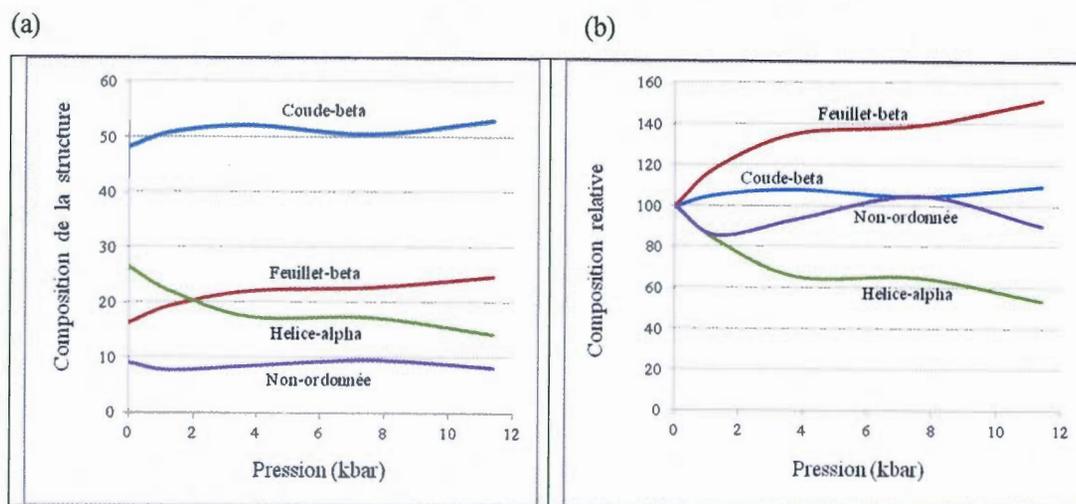


Figure 6.8: Composition de la structure secondaire (a), et compositions relatives de la structure secondaire (b) de la poudre et des comprimés d'alpha-amylase.

6.6.2 L'effet de la force de compression sur l'activité enzymatique

La Fig. 6.9 représente l'effet des pressions de compactage de 1, 4, 8 et 11 kbar sur l'activité enzymatique de l'alpha-amylase calculé dans l'Ext du comprimé (Fig. 6.9a) et dans le reste du comprimé (Fig. 6.9b).

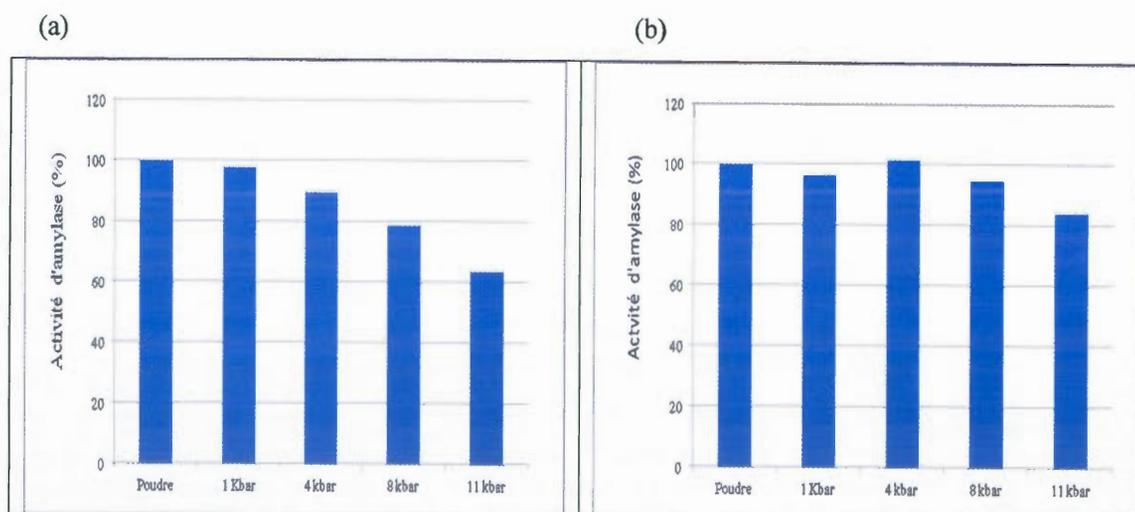


Figure 6.9: L'effet de la pression de compactation sur l'activité enzymatique de l'alpha-amylase à la surface du comprimé (a) et dans le reste du comprimé (b).

6.7 L'effet de l'acide et de la pepsine sur la structure d'alpha-amylase

Pendant l'incubation des comprimés d'alpha-amylase sans excipients dans FGS, la couche externe des comprimés commence à se mouiller (Fig. 6.10).

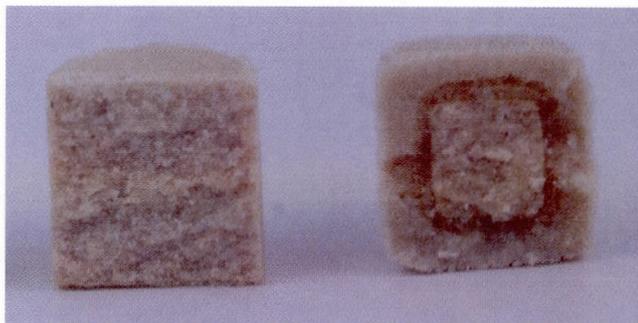


Figure 6.10: Coupe transversale des comprimés d'alpha-amylase sans excipients avant incubation (gauche) et après 120 min d'incubation dans FGS (droite)

6.7.1 Étude structurale par la méthode SDS/PAGE

La Fig. 6.11 représente les images des gels: (a) la poudre d'alpha-amylase et l'Int des comprimés incubés pendant 120 min dans SGF sans pepsine (900 mL, 37°C et 100 rpm), (b) la poudre d'alpha-amylase et l'Ext des comprimés incubés pendant 120 min dans SGF sans pepsine (900 mL, 37°C et 100 rpm) (c) la poudre d'alpha-amylase et l'Int des comprimés incubés pendant 120 min dans SGF avec pepsine (900 mL, 37°C et 100 rpm), (d) la poudre d'alpha-amylase et l'Ext des comprimés incubés pendant 120 min dans SGF avec pepsine (900 mL, 37°C et 100 rpm). La poudre d'alpha-amylase sans être incubée dans FGS avec et sans pepsine a été utilisée comme témoin.

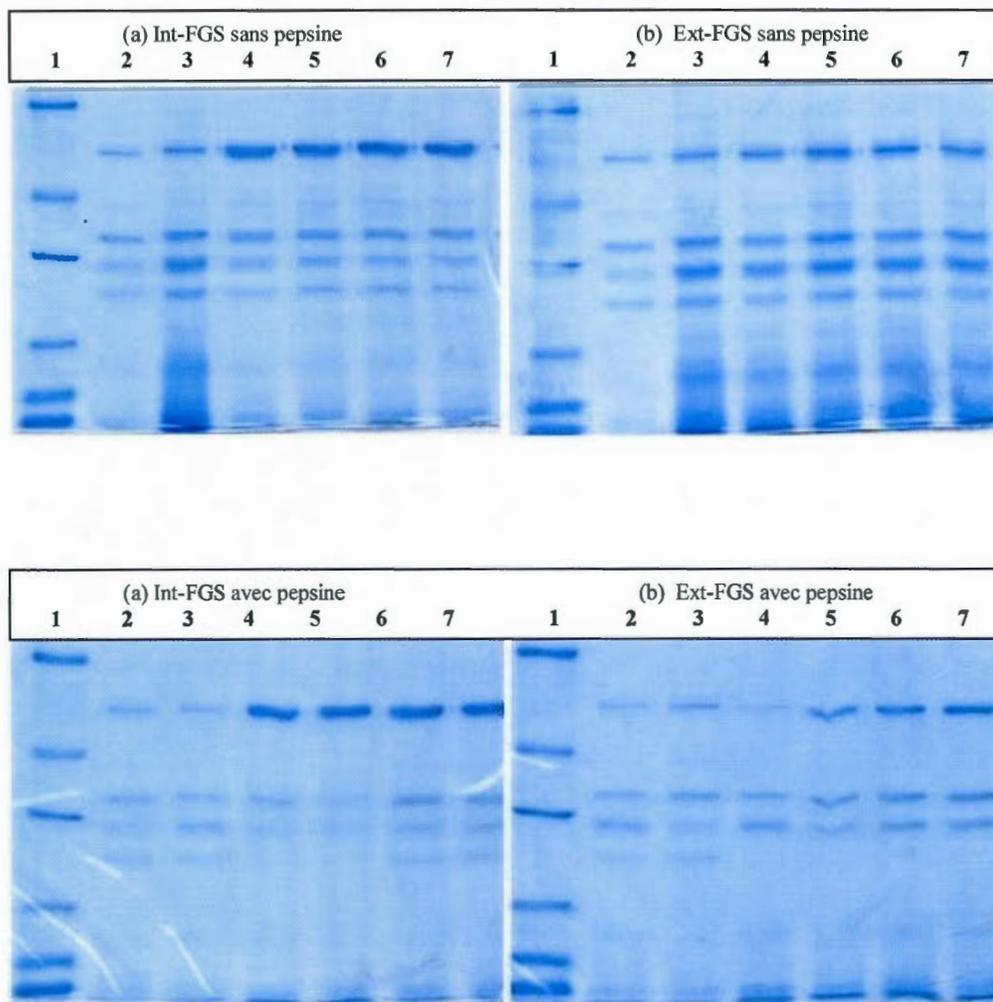


Figure 6.11: SDS-PAGE de la poudre et de l'Int et de l'Ext des comprimés d'alpha-amylase après incubation pendant 120 min dans FGS avec et sans pepsine à 37 °C et 100 rpm. Standard (différentes masses moléculaires) (1), témoin (poudre d'alpha-amylase) (2), poudre incubée(3) et comprimés d'alpha-amylase obtenus: 1 kbar(4), 4 kbar(5), 8 kbar(6), 11 kbar(7).

La Fig. 6.12 représente les intensités de bandes du standard (2) et de la poudre de l'alpha-amylase (b).

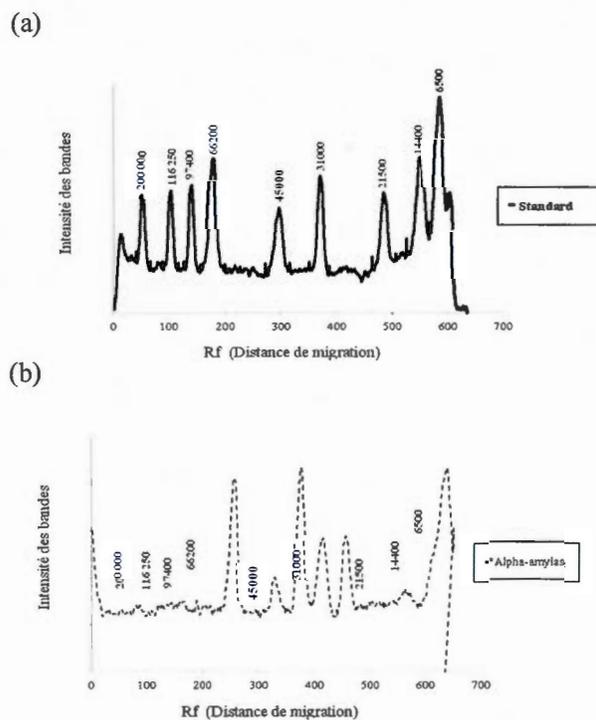


Figure 6.12: Intensité des bandes en SDS/PAGE du (a) standard et (b) de la poudre d'alpha-amylase.

La Fig. 6.13 et le tableau 6.13 présentent les variations de la stabilité structurale relative des échantillons d'alpha-amylase en fonction de la pression. Le 100% c'est l'intensité de la bande de l'alpha-amylase en poudre sans incubation (témoin).

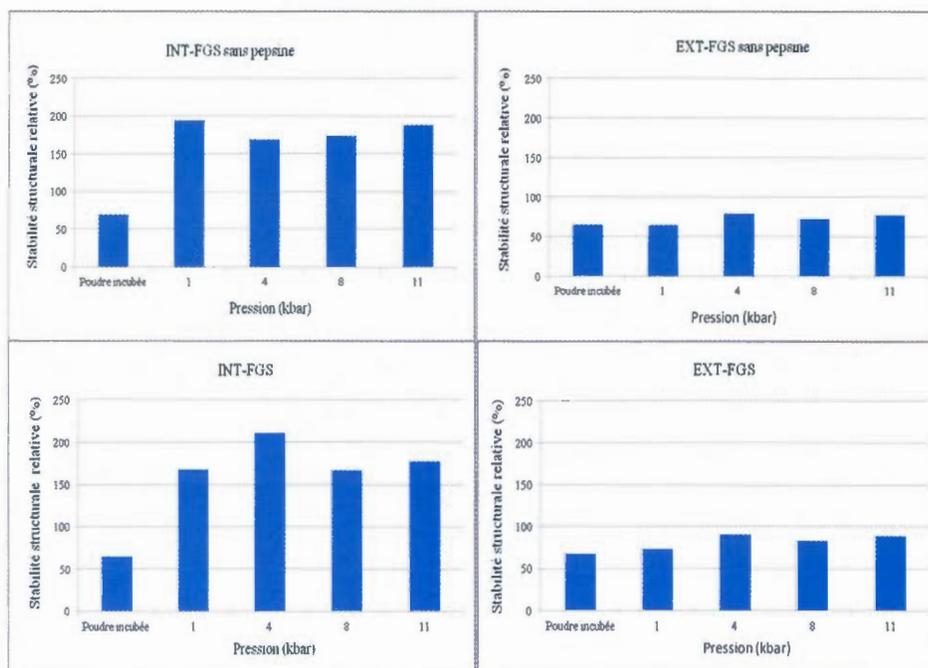


Figure 6.13: Stabilité relative de la structure primaire de la poudre, de l'Int et de l'Ext des comprimés d'alpha-amylase après incubation pendant 120 min dans FGS avec et sans pepsine à 37 °C et 100 rpm

La Fig. 6.13 et le tableau 6.13 présentent les variations de la stabilité structurale relative des échantillons d'alpha-amylase en fonction de la pression. Le 100% c'est l'intensité de la bande de l'alpha-amylase en poudre sans incubation (témoin).

Tableau 6.14: Effet du FGS avec et sans pepsine sur la stabilité relative de la structure primaire des échantillons d'alpha-amylase en fonction de la pression.

Pression (kbar)	INT-FGS sans pepsine (%)	EXT-FGS sans pepsine (%)	INT-FGS (%)	EXT-FGS (%)
Témoin	100	100	100	100
Poudre incubée	69	65	64	68
Comprimé 1 kbar	194	64	168	73
Comprimé 4 kbar	169	79	211	91
Comprimé 8 kbar	174	73	167	83
Comprimé 11 kbar	188	78	177	89

6.7.2 Étude de la structure secondaire d'alpha-amylase par analyse FTIR

Des changements survenues suite à la compression ont été observés au niveau de la bande à 1617 cm^{-1} du spectre de dérivée seconde de la bande d'amide I de l'Ext des comprimés (Fig. 6.14) après incubation dans SGF avec ou sans pepsine.

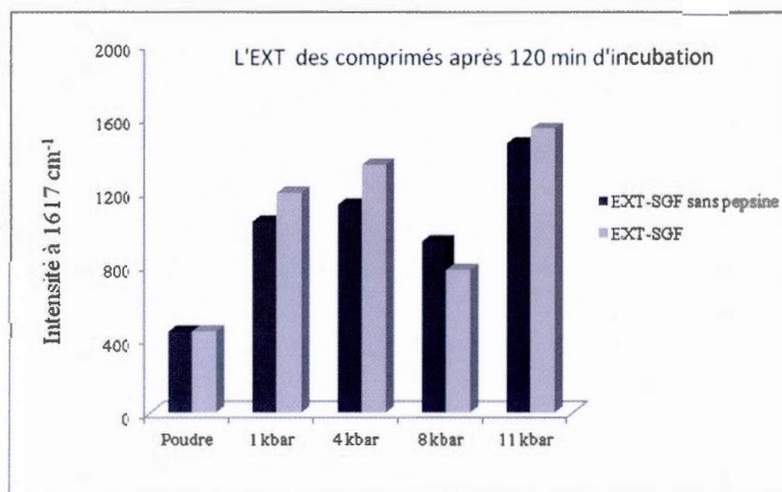


Figure 6.14: Intensité de la bande à 1617 cm^{-1} du spectre de dérivée seconde de la bande amide I de la poudre (témoin) et de l'Ext des comprimés incubés pendant 120 min dans FGS.

CHAPITRE VII

DISCUSSION

7.1 Stabilité des comprimés d'EPP

Les comprimés d'EPP sans excipients incubés dans FGS sans pepsine semblaient former une couche externe (dans la surface) *in situ*, au cours de la dissolution. Il a été observé qu'après 60 min d'incubation, l'Int du comprimé reste sèche tandis qu'à l'Ext du comprimé, une couche est formée (Fig. 6.1). L'incubation dans FIS nettement accélère le phénomène d'érosion ce qui est utile pour la livraison intestinale.

7.1.1 Stabilité d'EPP dans l'Int des comprimés après incubation

Dans l'Int (noyau), les comprimés d'EPP sans excipient (Fig. 6.1) ont maintenu les activités enzymatiques de lipase, d'amylase et de protéase suite à leur incubation dans FGS sans pepsine et ensuite dans FIS.

Plus précisément, 87,1% de l'activité de lipase, 75,2 % de la activité de protéase et 70,8% de l'activité d'amylase ont été maintenus dans la partie intérieure des comprimés d'EPP sans excipients incubés dans FGS sans pepsine pendant 60 min (tableaux 6.2, 6.3 et 6.4).

Le 94,4% de l'activité de lipase, 79,2% de l'activité de la protéase et 80,3% de l'activité d'amylase ont été trouvés dans la partie intérieure des comprimés d'EPP sans excipient incubés pendant 60 min dans FGS sans pepsine suivie de 30 min en FIS (tableaux 6.2, 6.3 et 6.4).

Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues avec les comprimés de référence qui ont généré des faibles niveaux d'activités enzymatiques retrouvées suite à l'incubation et ont présenté des

pertes d'activité supérieure de 75% (tableaux 6.2, 6.3 et 6.4) pour chacune des enzymes (lipases, protéases et amylases).

L'enzyme choisie pour continuer l'étude a été la lipase considérant son importance pour le traitement de l'insuffisance pancréatique (Krishnamurty *et al.*, 2009), et en plus, elle est la plus instable des trois enzymes, au cours du passage le long du tractus gastro-intestinal en raison qu'elle est très sensible aux pH acides et à la protéolyse (Kuhn *et al.*, 2007). Donc, cette sensibilité a été considérée comme un agent "indicateur" sur la viabilité de notre concept de formulation "sans excipient". Les résultats suivants ont été obtenus sur la totalité du comprimé (Int et Ext), ce qui permet de connaître le pourcentage d'activité enzymatique qui reste dans le comprimé après leur exposition dans FGS sans pepsine ou qui est libérée dans FIS.

7.1.2 Stabilité d'EPP mesurée dans le comprimé entier (Int + Ext)

L'essai a été fait dans le comprimé entier (Int et Ext). En effet, la lipase présente dans les comprimés de référence a été inactivée (Non détectable) pendant les premières 30 min d'incubation dans FGS sans pepsine, mais les comprimés d'EPP sans excipients ont gardé 64,4% après 30 min. Il y a la tendance que plus le temps d'incubation augmente plus l'activité de lipase qui reste dans le comprimé diminue (voir tableau 6.5), mais le fait de garder plus de 20% est important considérant que dans les mêmes conditions la perte observée dans les produits de référence est totale.

7.1.3 Stabilité des comprimés d'EPP faits à différentes forces de compression

L'évaluation de la stabilité gastrique a été faite dans le comprimé entier (Int + Ext). Les comprimés d'EPP dans FGS sans pepsine pendant 60 et 120 minutes ont retenu une activité marquée de la lipase. Les résultats montrent que la force de compression a une influence sur l'activité de la lipase comme indiqué dans le tableau 6.6, où l'augmentation de la force de compression permet de garder plus d'activité de lipase. Encore des valeurs de 29% et 38% sont encourageantes considérant la perte totale observée avec les comprimés de référence.

7.2 Évaluation des propriétés d'écoulement des poudres

La poudre d'EPP présente un écoulement approprié, comme indiqué par leur indice de compressibilité et par les données de rapport Hausner (tableau 6.7). Dans une expérience supplémentaire, un excipient pharmaceutique, l'acide stéarique (employé couramment comme lubrifiant) a été incorporé dans la poudre d'EPP utilisée dans l'exemple 1, et l'indice de compressibilité, rapport Hausner, et le caractère d'écoulement ont été évalués. Il peut être conclu que, au niveau de 2% en lubrifiant, les caractéristiques de fluidité et la compressibilité des poudres n'ont pas été modifiées de façon majeure (tableau 6.7).

Les résultats sont présentés dans le tableau 6.7 qu'en comparaison avec les valeurs théoriques trouvées dans l'échelle de fluidité (tableau 7.1), donnent un caractère d'écoulement passable.

Tableau 7.1: Échelle de l'écoulement-valeurs théoriques USP<1174> (d'après USP29-NF24)

Indice de compressibilité (%)	Caractère de l'écoulement	Rapport de Hausner
≤10	excellent	1,00-1,11
11-15	bon	1,12-1,18
16-20	moyenne	1,19-1,25
21-25	passable	1,26-1,34
26-31	bas	1,35-1,45
32-37	très bas	1,46-1,59
≥38	très, très bas	>1,60

7.3 Évaluation de la friabilité et de la dureté des comprimés d'EPP

La friabilité des comprimés d'EPP sans excipients a montré une diminution avec l'augmentation de la force de compression utilisée pour préparer les comprimés. La dureté des comprimés augmente avec la force de compression du comprimé (voir tableau 6.8).

La friabilité et la dureté adéquates sont trouvées réunies dans les comprimés préparés en utilisant une force de compression entre 2,0 T – 3,0 T.

7.4 Effet du temps d'incubation et de la taille du comprimé sur la stabilité gastrique

Des comprimés de différente taille et différent poids ont été incubés dans FGS sans pepsine a différents temps d'incubation (tableau 6.9).

La gastro-résistance des compositions pancréatiques formulées est dépendante de la masse et du temps d'exposition du comprimé dans FGS.

La masse des comprimés est importante en gastro-protection. Une augmentation de la masse du comprimé permet d'avoir une meilleure résistance gastrique.

Une taille minimale du comprimé est nécessaire pour la formation d'une couche protectrice. Si le diamètre du comprimé est trop petit (ex: comprimés de 2 mm), les fronts d'hydratation vont se fusionner et la couche de protection ne peut pas être efficace (tableau 6.9). Dans ce cas, aucune activité enzymatique n'a pas été détectée dans les comprimés. La taille des comprimés joue un rôle important dans la gastro-protection; les comprimés plus grands transportent plus d'enzymes et offrent une meilleure gastro-résistance en raison de leur possibilité de maintenir une partie sèche à l'intérieur du comprimé après avoir formé une couche protectrice. Cette partie sèche garde une activité suffisante pour assurer sa libération en milieu intestinal.

Le temps d'incubation des comprimés dans FGS sans pepsine est un autre paramètre mesuré et il est apparu que l'activité enzymatique diminue avec le temps d'incubation du comprimé. La taille des comprimés est encore importante, les plus grands étant ceux qui ont gardé le plus d'activité à la fin de l'incubation.

7.5 Livraison de la lipase dans FIS en conditions que miment le passage gastro-intestinal

L'activité de la lipase qui reste dans les comprimés de 4,0 mm de diamètre après 60 min dans FGS sans pepsine est de 16,6% (tableau 6.10) et après les premières 15 min dans FIS une libération de 13,3% a été observée (tableau 6.10). De façon générale, la quantité de lipase qui reste dans les comprimés de différentes tailles après l'incubation de 60 min dans FGS (tableau 6.10) est libérée en FIS après les premières 15 min (tableau 6.10, Fig. 6.4). La vitesse de libération des enzymes

pancréatiques doit être aussi rapide que possible (30-60 min) pour assurer la digestion enzymatique des aliments (Fieker A., Philpott J. et Armand M, 2011; Krishnamurty *et al.*, 2009). La libération presque totale après les premières 15 min (Fig. 6.5) est une caractéristique importante, montrant l'utilité de nos formes pharmaceutiques d'EPP, soupçonnées de libérer les enzymes au niveau du duodénum.

Toute cette partie a été effectuée avec un extrait pharmaceutique d'origine porcine (EPP), produit commercialement. Comme il est un produit enrichi mais pas purifié, il est inadéquat pour des études plus poussées pour élucider et comprendre le rôle de la compression sur les propriétés associatives des protéines.

Ainsi, la partie subséquente du projet de maîtrise a été réalisée avec une enzyme purifiée: l'alpha-amylase pancréatique d'origine porcine (Sigma-Aldrich).

7.6 L'effet de la force de compression sur la structure d'alpha-amylase

7.6.1 Étude de la structure secondaire d'alpha amylase par analyse FTIR

Les attributions des bandes d'absorption présentées dans le tableau 7.2 (Byler et Susi, 1986) sont utilisées pour identifier les bandes caractéristiques du FTIR d'alpha amylase (Fig. 6.6).

Tableau 7.2: Attribution des bandes caractéristiques du FTIR de l'alpha-amylase.
(Tirée de Byler et Susi, 1986)

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution	Mode de vibration
3280	Amide A	Résonance de Fermi γ (N-H) avec amide II
3060	Amide B	Résonance de Fermi γ (N-H) avec amide II
1630	Amide I	γ (C=O) couplé avec γ (C-N) et δ (N-H)
1540	Amide II	δ (N-H) couplé avec γ (C-N)
1410	Amide III	δ (N-H) et γ (C-N)
1230		Inconnue
1040		γ (N-C) du squelette

γ : élongation, δ : déformation

La bande d'amide I a été utilisée largement pour étudier la structure secondaire des protéines (Van de Weert, Hering et Haris, 2005; Byler et Susi, 1986; Fitter et Heberle, 2000). L'absorption de la bande d'amide I est due majoritairement (environ 80%) à l'élongation de C=O de groupe amide. Cette bande dépend de la nature de la liaison d'hydrogène formée entre les groupes C=O et N-H qui détermine la structure secondaire des protéines. Les études de FTIR avec la pression en présence de D₂O ont montré que le nombre d'onde de l'amide I diminue avec la pression; il pourrait être environ 10 cm⁻¹ pour une pression de 7 kbar (Heremans et Smeller, 1998). Les nombres d'onde qui correspondent à la bande d'amide I de la poudre et des comprimés obtenus avec de forces de compression entre 1 et 11 kbar ont été trouvés entre 1633 et 1634 cm⁻¹ (tableau 6.11) suggérant que la structure secondaire des comprimés de l'alpha-amylose n'est pas changée par la pression.

Malgré la constance de nombres d'onde d'amide I de la poudre et des comprimés (tableau 6.11) une étude qualitative a été effectuée afin de détecter des changements, s'ils existent, dans la structure secondaire au niveau plus détaillé. Il a été montré que la bande originale d'amide I peut correspondre à un mélange de différentes conformations comme la conformation de feuillet-bêta, de coude-bêta, d'hélice-alpha et de non-ordonnée (Byler et Susi, 1986; Van de Weert, Hering et Haris, 2005). Chaque conformation a un ou plusieurs nombres d'onde spécifiques.

L'évaluation de chaque conformation de structure secondaire a été réalisée selon la méthode de référence (Meal, 2006). Dans cette référence, la composition de polystyrène (PS) et poly (4-méthylstyrène) (P4MS) du copolymère PS-P4MS a été déterminée par le rapport des pics caractéristiques du spectre de la dérivée seconde d'UV (ultra-violet) de chaque constituant (269 nm pour PS et 275 nm pour P4MS).

La Fig. 6.7 présente la dérivée seconde du spectre de la poudre entre 1700 et 1600 cm⁻¹. Les nombres d'onde et les conformations des pics de structure secondaire sont présentés dans le tableau 7.3 (Byler et Susi, 1986). La présence d'un pic à 1700 cm⁻¹ a été ignorée et pas utilisée dans les analyses des résultats du FTIR car la conformation associée à ce pic n'a pas été répertoriée dans la littérature.

Tableau 7.3: Nombres d'onde et conformations des pics de la bande d'amide I à partir de la dérivée seconde du spectre FTIR d'alpha-amylose (d'après Byler et Susi, 1986)

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attributions
1700	Inconnue, ignoré
1695, 1684, 1671 1668, 1662	Coude-bêta
1675, 1637, 1633 1624, 1617	Feuillet-bêta
1653	Alpha-hélice
1645	Non-ordonnée

Afin d'avoir une comparaison entre les spectres, la ligne de base de chaque spectre est corrigée et les spectres originaux ont été normalisés avec la bande à 2960 cm⁻¹ attribuée aux vibrations de méthyle et méthylène de chaînes latérales de protéines. Chaque conformation de structure secondaire de l'alpha-amylose est le rapport de la somme des intensités de ses bandes caractéristiques divisée par l'intensité totale de toutes les conformations confondues (Fig. 6.8a, tableau 6.12).

L'effet de la pression sur la structure secondaire c'est montré plus évident par la composition relative. Ce paramètre est le rapport de composition de différentes conformations de l'alpha-amylose des comprimés sur celle de la poudre qui est considérée comme le 100%. La Fig. 6.8b et le tableau 6.14 présentent les compositions relatives de la poudre et des comprimés pressés à 1, 4, 8 et 11 kbar.

Les analyses obtenues ont indiqué une tendance des effets de la pression sur la structure de l'alpha-amylose selon les informations données par l'étude de FTIR:

- La poudre de l'alpha-amylose contient environ 50% de conformation coude-bêta, 15% de feuillet-bêta, 25% d'hélice-alpha et 10% de non-ordonnée.
- Il a une augmentation de conformation feuillet-bêta et une diminution de celle d'hélice-alpha avec l'augmentation de la pression. Le changement de conformation commence à 1 kbar et devient stable à partir de 2 kbar jusqu'à environ 6 kbar. Après 6 kbar, il y a une augmentation de 50% (Fig. 6.8b) des conformations feuillet-bêta et une diminution de 50% de la conformation hélice-alpha par rapport aux données par la poudre sans compression (0 kbar)

(Fig. 6.8b), tandis que la conformation coude-bêta présente une augmentation limitée de 10% (Fig. 6.8b, tableau 6.13) et la conformation non-ordonnée a une variation autour de 15%.

Les conformations alpha et beta sont les caractéristiques les plus importantes des protéines (Peiqiang, 2005). L'altération du pourcentage de ces deux conformations dans la structure secondaire de la protéine par rapport aux conditions originales peut être générée par la pression (Panick *et al.*, 1998) et/ou par une variation des conditions de son entourage comme la température ou l'acidité. Dans notre cas, la pression a généré une augmentation des pourcentages des structures feuillet-bêta et une diminution des structures hélice-alpha de façon similaire aux résultats obtenues par Peiqiang (2005) avec des variations de température. L'augmentation des structures feuillet-bêta est compensée par une diminution de proportion similaire des structures hélice-alpha (Fig. 6.8).

7.6.2 L'effet de la force de compression sur l'activité enzymatique

Les résultats montrent que les forces de compression peuvent provoquer une diminution (inactivation partielle) de l'activité enzymatique au cours de la compression de la poudre d'alpha-amylase. L'effet de la pression a montré une plus haute influence dans la surface du comprimé (Fig. 6.9a) plutôt que dans le reste du comprimé (Fig. 6.9b).

Nos résultats Fig. 6.9 (a), montrent qu'il n'y a pas d'inactivation notable à des pressions allant jusqu'à 4 kbar, mais qui au-delà de cette pression environ 20% (8 kbar) à 40% (11 kbar) de l'activité est perdue. Cette perte d'activité est presque linéaire avec l'augmentation des pressions et peut être expliquée par le mouvement des particules et réarrangement structuraux. Un comportement similaire de l'effet de la pression du compactage sur l'activité enzymatique a été observé par Zarrintan, Teng et Groves, 1990 ("Wheat germ lipase"), Teng et Groves, 1988 ("Urease") et Picker, 2002 ("Alpha-amylase").

Les changements structurels de l'enzyme induits par la pression ont donc entraîné une perte de son activité. Cette corrélation peut être expliquée par la réduction de l'espace inter particulaire durant l'étape de réarrangement et du mouvement des particules et surtout au stade de déformation de ces particules et peut finir par la destruction de l'état natif de l'enzyme sous compression (Kuny, 2004).

Selon Teng et Groves, (1988), les éléments de structure tertiaire et quaternaire des enzymes sont suffisamment déformés pour exposer la surface hydrophobique rendant partiellement dénaturée la protéine. Quelques uns des groupes mercapto sont très réactifs et peuvent être impliqués dans les réactions d'inter-échange avec les groupes disulfure produisant la polymérisation. La protéine dénaturée est un matériel différent de son état initial et peut avoir une plus grande résistance au cisaillement; il pourrait donc agir comme une barrière de cisaillement pour la protéine à l'intérieur du comprimé (Teng et Groves, 1988), n'étant pas exclue une certaine stabilisation.

Bien qu'une plus grande résistance aux forces de cisaillement de protéines dénaturées par rapport aux protéines natives n'est pas prouvée (Teng et Groves, 1988), celle-ci peut être une explication au comportement trouvé, qui montre une plus rapide diminution de l'activité dans la surface du comprimé (Fig. 6.9a) que dans le reste du comprimé (Fig. 6.9b).

7.7 L'effet de l'acidité et de la pepsine sur la structure d'alpha-amylase

Les comprimés ont été incubés pendant 120 min dans 900 mL de FGS avec ou sans pepsine à 37°C et 100 rpm (USP, type I) pour mimer les conditions gastriques et pouvoir mesurer l'effet, s'il existe, de la pression plus l'influence de l'acide et de la pepsine sur la structure de la poudre et des comprimés d'alpha-amylase. Les comprimés mis dans FGS semblaient former une couche de gel de surface (Fig. 6.10). Après 2 heures d'incubation, l'Int du comprimé reste sèche, comme dans le cas des comprimés de EPP (Fig. 6.1).

7.7.1 Étude structurale par la méthode SDS/PAGE

La protection obtenue par compression de la poudre d'alpha-amylase a été évaluée par SDS-PAGE (Fig. 6.11). La poudre d'alpha-amylase et l'Ext des comprimés obtenus à différentes pressions et incubés dans FGS sans pepsine (Fig. 6.11 b, pistes 3, 4, 5, 6, et 7) montrent des bandes de bas poids moléculaire caractéristiques d'une dénaturation irréversible; par contre, l'alpha-amylase non incubée en FGS sans pepsine (piste 2) et l'Int des comprimés incubés dans FGS sans pepsine (Fig. 6.11 a pistes 4, 5, 6, et 7) ne présentent pas ce type de bandes (Fig. 6.11b), pistes 3, 4, 5, 6, et 7). Ces résultats montrent que la compression donne une certaine protection à l'alpha-

amylase de l'Int des comprimés, donc elle offre une protection partielle aux comprimés faites avec cette enzyme face à son incubation dans FGS sans pepsine.

La poudre d'alpha-amylase et l'Ext des comprimés incubés en FGS avec pepsine montrent une dénaturation irréversible (Fig. 6.11d, pistes 3, 4, 5, 6, et 7) tandis que l'Int des comprimés incubés en FGS montrent des bandes d'alpha-amylase plus intenses que dans le cas de l'Ext des comprimés incubés dans FGS. Il est probable que la pepsine coupe les protéines en petits morceaux de bas poids moléculaire que probablement n'étaient pas visibles ou pas retenus par le gel.

Les profils SDS-PAGE (Fig. 6.11 piste 3) montrent une dénaturation irréversible de la poudre de l'alpha-amylase incubée dans le milieu FGS avec ou sans pepsine; il est possible d'y voir différentes bandes des composants de basses masses moléculaires en comparaison avec le témoin (poudre de l'alpha-amylase piste 2) qui n'était pas exposés à ces milieux (piste 2) et qui ne présente pas ces bandes.

La Fig. 6.12, la courbe (*en ligne discontinue*) montre que l'échantillon de l'alpha-amylase (Sigma Aldrich) contient 5 fractions avec les poids moléculaires de 54, 45, 31, 30 et 25 kDa respectivement. La première bande de 54 kDa correspond à l'amylase et elle sera utilisée pour étudier sa structure.

La stabilité structurale relative, qui est le rapport du pourcentage de la surface de la bande d'amylase de l'échantillon sur celui de la poudre d'alpha-amylase a été utilisée pour mesurer les effets de l'acide et de la pepsine sur la structure d'alpha-amylase de tous les comprimés analysés. Le pourcentage de surface de la bande d'amylase sur la surface totale de toutes les bandes a été calculé pour tous les échantillons i.e. l'Int et l'Ext des comprimés incubés dans FGS avec et sans pepsine.

L'alpha-amylase en poudre est instable quand elle est exposée pendant 120 min au milieu FGS avec et sans pepsine à 37°C et 100 rpm, et par contre, quand elle est comprimée aux différentes forces entre 1 et 11 kbar (Fig. 6.11 et 6.13 et tableau 6.14), elle montre une augmentation de sa stabilité face aux deux milieux FGS; ainsi, la stabilité structurale relative de l'Int du comprimé incubée dans FGS se trouve entre 169% - 194% et l'Int du comprimé incubée dans FGS sans pepsine entre 167% - 211% (tableau 6.14), tandis que, la stabilité structurale relative de l'Ext des comprimés incubés dans FGS est de 73% - 91% et l'Ext du comprimé incubé dans FGS sans

pepsine de 64% - 79%. En comparaison, la stabilité de l'alpha-amylase en poudre incubée dans ces milieux est de 64% - 69%.

Nous ne pouvons pas expliquer des résultats de stabilité supérieurs à 100%; il n'est pas exclu un réarrangement suite à la compression qui protège durant la manipulation de l'enzyme pour le SDS-PAGE. Donc, nous proposons de nommer cette stabilité accrue comme « stabilité relative apparente ». Néanmoins, indépendamment de la terminologie, il est clair que l'Int des comprimés est protégé et plus stable par rapport à l'alpha-amylase en poudre incubée dans SGF et par rapport à la couche extérieure des comprimés. Cet aspect de protection est important, assurant une bonne disponibilité thérapeutique.

Ces résultats nous amènent à conclure que la compression d'alpha-amylase permet d'offrir une protection à l'Int des comprimés faits avec cette enzyme selon notre approche quand ils sont mis dans les milieux FGS avec et sans pepsine.

Il n'y a pas une grosse différence entre la stabilité relative de l'alpha-amylase de l'Int des comprimés faits avec une force de compression entre 1 kbar - 11 kbar et mis dans FGS par rapport à celle de l'Int des comprimés faits avec les mêmes forces de compression quand ils sont mis dans le milieu FGS sans pepsine Fig. 6.13; similairement, la stabilité relative de l'alpha amylase de l'Ext des comprimés a un comportement semblable dans les milieux FGS avec et sans pepsine. Les résultats sont satisfaisants en tenant compte que les comprimés sont faits sans excipients de protection gastrique.

La stabilité relative de l'alpha amylase de l'Ext des comprimés (64% - 78%) dans le milieu FGS sans pepsine et de l'Ext des comprimés (68% - 89%) dans le milieu FGS est toujours inférieure à la stabilité relative de l'alpha amylase sans avoir été incubée (le témoin, 100%).

Les analyses des résultats de SDS/PAGE suggèrent que:

- La structure primaire de l'Ext de l'alpha-amylase est dénaturée environ 30% par le milieu acide.
- Il ne semble pas avoir une différence significative entre les résultats obtenus pour la stabilité relative de l'alpha-amylase en poudre incubée et celle de l'Ext des comprimés incubés dans FGS avec ou sans pepsine (Fig. 6.13), tandis que l'Int des comprimés semble protégé.

- Les résultats montrent aussi que la pression diminue la dénaturation de la structure primaire de l'alpha-amylase de l'Ext des comprimés incubés dans FGS avec et sans pepsine par rapport à l'alpha amylase en poudre incubé dans FGS avec et sans pepsine (Fig. 6.13).

Les résultats obtenus laissent conclure que l'élaboration de comprimés d'alpha-amylase sans excipients autres que les agents qui accompagnent l'amylase comme matière première (stabilisants, sels, si échéant) est une alternative pour obtenir un produit pharmaceutique stable pour administration par la voie orale.

7.7.2 Étude de la structure secondaire d'alpha-amylase par analyse FTIR

Les analyses FTIR utilisés pour comparer l'effet de FGS avec et sans pepsine sur la structure d'alpha-amylase des comprimés faits avec 1, 4, 8 et 11 kbar de pression, ont montré que les comprimés incubés dans FGS semblent former une couche externe *in situ* (Fig. 6.10), comme dans les comprimés d'EPP sans excipients (Fig. 6.1). Les profils de la dérivée seconde FTIR de l'Int et de l'Ext des comprimés ont été étudiés.

Le profil FTIR (dérivée seconde) de la bande d'amide I d'alpha-amylase de l'Ext du comprimé incubé dans FGS présente une augmentation de la bande à 1617 cm^{-1} par rapport à la poudre qui a deux bandes principales au 1653 cm^{-1} et 1684 cm^{-1} . La bande à 1617 cm^{-1} augmente en détriment de la bande à 1653 cm^{-1} qui diminue, et la bande à 1684 cm^{-1} ne change pas.

L'augmentation de l'Intensité de la bande au 1617 cm^{-1} est une caractéristique de la formation d'un gel ou d'un agrégat suite à la formation de réseaux feuillet-bêta intermoléculaires (Clark, Saunderson et Suggett, 1981) où les ponts d'hydrogène jouent un rôle très important (Allain, Paquin et Subirade, 1999) comme déjà observé pour les autres protéines (Clark, Saunderson et Suggett, 1981 ; Nagano, Mori et Nishinari, 1994). Il semble que le comportement entérique des comprimés d'alpha-amylase est dû principalement à leur habilité de créer *in situ* de fortes structures feuillet-bêta, de façon similaire aux résultats obtenus par Caillard et Subirade, 2012. La présence de la bande à 1684 cm^{-1} suggère une structure coude-bêta (Byler et Susi, 1986).

En dépit de la force de compression (1, 4, 8, ou 11 kbar) en présence ou l'absence de pepsine, dans l'Ext des comprimés des réarrangements moléculaires ont eu lieu, ce qui est révélé par l'augmentation de l'Intensité de la bande à 1617 cm^{-1} (Fig. 6.14).

Le profil FTIR (déconvolution) de la bande d'amide I d'alpha-amylase de l'Ext du comprimé incubé dans FGS présente des changements importants par rapport à celui de la poudre, indiquant des modifications structurelles de la protéine, tandis que le spectre de l'Int du comprimé incubé dans FGS présente une allure très similaire à celle de la poudre (témoin) sans incubation.

CHAPITRE VIII

CONCLUSION

Suite à la découverte de la capacité des comprimés d'EPP de former une couche externe en milieu FGS (demande de brevet «Compositions pharmaceutiques gastro-résistantes à base d'enzymes» Annexe I), l'objectif du présent travail a été d'élaborer des comprimés d'enzymes sans excipients additionnés et sans enrobage, capables de se « auto-protéger » dans un milieu gastrique et de libérer le contenu enzymatique avant 30 min dans l'intestin (milieu FIS).

Effectivement, il a été noté que les comprimés d'enzymes pancréatiques ont une partie sèche à l'intérieur et forment *in situ* une couche d'aspect gélatineux sur la surface des comprimés quand ils sont mis dans un milieu gastrique (FGS). En plus, après que les comprimés sont sorties du milieu FGS et mis dans un milieu FIS, ils sont dissous, ce qui est utile pour la livraison intestinale.

En tenant compte de l'habilité des comprimés d'enzymes de former une couche externe et de laisser une partie interne sèche quand ils sont mis dans FGS, la première partie du travail a été dirigée vers l'étude de l'effet de la pression de compression, de la taille des comprimés d'EPP et du temps d'incubation sur l'activité enzymatique résiduelle.

Dans leur partie Int (noyau), les comprimés d'EPP sans excipient (voir figure 5.1) ont maintenu en bonne partie leurs activités enzymatiques de lipase, d'amylase et de protéase suite à l'incubation dans FGS sans pepsine. Incubés dans les mêmes conditions, les comprimés de référence ont présenté des pertes d'activité supérieure de 75% pour chacune des enzymes (lipases, protéases et amylases).

Les résultats ont montré que la lipase présente dans les comprimés de référence a été inactivée pendant les premières 30 min d'incubation dans FGS sans pepsine (0%), mais les nouveaux

comprimés d'EPP sans excipients ont gardé 64,4% après 30 min avec une tendance de diminution avec le temps.

L'épaisseur de la couche hydratée diminue avec l'augmentation de la force de compression. Pendant l'incubation dans FGS sans pepsine, le gonflement des comprimés et l'érosion de la couche externe ont été observés. L'incubation dans FIS nettement accélère le phénomène d'érosion ce qui est utile pour la livraison intestinale.

La gastro-résistance des compositions pancréatiques d'EPP sans excipients est dépendante de la masse et du temps d'exposition du comprimé dans FGS. La masse des comprimés est importante en gastro-protection. Une augmentation de la masse du comprimé permet d'avoir une meilleure résistance gastrique.

Une taille minimale du comprimé est nécessaire pour la formation d'une couche protectrice. Si le diamètre du comprimé est trop petit, les fronts d'hydratation se fusionnent et la couche de protection ne peut pas être efficace.

Les comprimés plus grands transportent plus d'enzyme, et en plus ils offrent une meilleure gastro-résistance que les plus petits.

Pour assurer l'activité de la lipase, il est important que la possibilité de laisser une partie sèche à l'intérieur du comprimé après avoir formé une couche protectrice externe.

En conclusion et de façon générale

- i) La taille des comprimés joue un rôle important dans la gastro-protection étant donné que les comprimés de grandes tailles transportent plus d'enzyme et offrent une meilleure gastro-résistance.
- ii) L'activité enzymatique diminue avec le temps d'incubation des comprimés dans FGS.
- iii) L'activité enzymatique dépend fortement du pH du milieu d'incubation : au pH acide les comprimés restent entiers, mais au pH > 5.0 les comprimés se désagrègent et se dissolvent en libérant les enzymes dans le fluide intestinal.

Les résultats montrent aussi que les forces de compression peuvent provoquer une diminution de l'activité enzymatique au cours de la compression de la poudre d'alpha-amylase.

La pression a exercé une plus haute influence sur la surface plutôt que dans le reste du comprimé.

Les changements structuraux de l'enzyme, induits par la pression ont entraîné une perte partielle de son activité. Cette corrélation peut être expliquée par la réduction de l'espace inter-particulaire à l'étape du réarrangement et du mouvement des particules affectant l'état natif de l'enzyme sous compression (Kuny, 2004).

La protéine dénaturée est un matériel différent face à son état initial et peut avoir une plus grande résistance au cisaillement ; il pourrait donc agir comme une barrière de cisaillement pour la protéine à l'intérieur du comprimé (Teng et Groves, 1988) ceci pouvant être une explication au comportement observé qui montre une plus rapide diminution de l'activité à la surface du comprimé que dans le reste du comprimé.

Les résultats obtenus avec l'électrophorèse SDS-PAGE laissent voir une dénaturation irréversible d'alpha-amylase en poudre et dans la partie extérieure des comprimés incubés dans le milieu FGS ou FGS sans pepsine. SDS-PAGE montre que la structure d'alpha-amylase native est instable quand elle est exposée aux deux milieux, mais quand elle est comprimée aux différentes forces entre 1 et 11 kbar, elle montre une augmentation de sa stabilité, et l'intérieur du comprimé n'est pas dénaturé. La partie externe du comprimé forme une couche protectrice empêchant la dénaturation de la partie interne des comprimés par l'acide.

En FTIR la bande d'amide I d'alpha-amylase de l'Ext du comprimé incubé dans FGS présente une augmentation de la bande à 1617 cm^{-1} par rapport à la poudre. L'augmentation de l'intensité de la bande au 1617 cm^{-1} est compensée par une diminution d'une proportion similaire des structures alpha-hélice.

L'augmentation de l'intensité de la bande à 1617 cm^{-1} est caractéristique de la formation de gel et d'agrégats suite à la formation de réseaux feuillet-beta intermoléculaires (Clark, Saunderson et Suggett, 1981) où les ponts d'hydrogène jouent un rôle très important (Allain, Paquin et Subirade, 1999).

Les résultats indiquent que les enzymes thérapeutiques telles que l'alpha-amylase quand sont comprimées peuvent jouer plusieurs rôles: comme ingrédient actif, comme agent liant et comme agent formateur de gel sensible au pH.

Des propriétés associatives des protéines peuvent conduire à des formes pharmaceutiques des enzymes thérapeutiques sans excipients. Ces associations sont probablement dues aux propriétés associatives, chimiques, électriques et structurales (configuration) des molécules.

Perspectives

Au futur, des études de stabilité des comprimés d'enzymes seront nécessaires pour continuer de mettre en valeur le nouveau concept de compression directe des protéines sans utilisation d'excipients.

Il est possible d'améliorer encore le pourcentage d'activité enzymatique livré au niveau FIS après incubation des comprimés en milieu FGS; pour ce faire, différents changements comme par exemple des variations de pression et de variations de la forme et de la taille des comprimés peuvent conduire à des améliorations par rapport aux résultats obtenus.

Une étude plus approfondie serait nécessaire pour connaître les réarrangements qui peuvent survenir au niveau des structures secondaires des enzymes en milieu FIS après passage en milieu FGS.

Des études *in vivo* seront nécessaires pour confirmer les résultats obtenus *in vitro* étant donné que les formulations proposées présentent un intérêt pour l'industrie pharmaceutique dans le domaine des systèmes de protection et de livraison de principes actifs au niveau intestinal surtout comme remplacement des enzymes pancréatiques, un approche vitale dans des conditions de pathologies chroniques comme l'IPE.

ANNEXES

COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES GASTRO - RÉSISTANTES À BASE D'ENZYMES

COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES GASTRO - RÉSISTANTES À BASE D'ENZYMES

Pub. No.: WO/2011/114224 **International Application No.:** PCT/IB2011/000579
Publication Date: 22.09.2011 **International Filing Date:** 18.03.2011
IPC: A61K 9/20 (2006.01), A61J 3/00 (2006.01), A61K 38/46 (2006.01), A61K 9/16 (2006.01), A61K 9/24 (2006.01), A61K 9/48 (2006.01), A61P 1/14 (2006.01)
Applicants: APTALIS PHARMA CANADA, INC. [CA/CA]; 597 Laurier Boulevard Mont-Saint-Hilaire, Quebec J3H 6CH (CA) (For All Designated States Except US).
 MATEESCU, Mircea, Alexandru [CA/CA]; (CA) (For US Only).
 BUSTOS, Ingrid, Janet [CA/CA]; (CA) (For US Only).
 DUMOULIN, Yves [CA/CA]; (CA) (For US Only).
 SZABO, Pompilia, Ispas [CA/CA]; (CA) (For US Only)
Inventors: MATEESCU, Mircea, Alexandru; (CA).
 BUSTOS, Ingrid, Janet; (CA).
 DUMOULIN, Yves; (CA).
 SZABO, Pompilia, Ispas; (CA)

Priority Data: 61/315,814 19.03.2010 US

Title (EN) GASTRO-RESISTANT ENZYME PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS
 (FR) COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES GASTRO-RÉSISTANTES À BASE D'ENZYMES

Abstract: (EN) The present invention generally relates to compacted pharmaceutical compositions (such as tablets) comprising one or more enzymes, where the composition is monolithic or multiparticulates (such as mini-tablets, micro-tablets, or prills), or where the composition has multiple layers with the outermost layer containing one or more enzymes.
 (FR) La présente invention concerne des compositions pharmaceutiques compactées (telles que des comprimés) comprenant une ou plusieurs enzymes, la composition étant monolithique ou multiparticulaire (telle que des mini-comprimés, des micro-comprimés, ou des granules), ou la composition ayant de multiples couches, la couche extérieure contenant une ou plusieurs enzymes.



Fig. 1: Cross section of a compacted pharmaceutical composition (PCC) with the intention to control gastric flow.

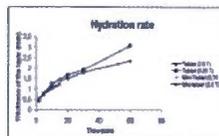


Fig. 2: Hydration kinetics of compacted pharmaceutical compositions obtained by direct compression of different tablet sizes and compositions from one and another Table 1-3.

Designated States: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 African Regional Intellectual Property Org. (ARIPO) (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW)
 Eurasian Patent Organization (EAPO) (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
 European Patent Office (EPO) (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR)
 African Intellectual Property Organization (OAPI) (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publication Language: English (EN)
Filing Language: English (EN)

GASTRO-RESISTANT ENZYME PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

[0001] This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 61/315,814, filed March 19, 2010, which is hereby incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention generally relates to pharmaceutical compositions (such as tablets) comprising one or more enzymes (for instance, pancreatic enzymes), where the composition is monolithic or a single layer of multiparticulates (such as mini-tablets, micro-tablets, or prills), or where the composition has multiple layers with the outermost layer containing one or more enzymes.

BACKGROUND

[0003] Various disease states of the pancreas produce a condition in which insufficient pancreatic enzymes are available for digestive processes. Enzyme deficiency associated with, for example, pancreatitis, pancreatectomy, steatorrhea, and cystic fibrosis, can disrupt the breakdown and absorption of nutrients resulting in malnutrition.

Exogenously administered pancreatic enzymes can be used to treat pancreatic insufficiency. Pancreatic enzymes exhibit optimal activity at near neutral pH conditions found in the small intestine. Under gastric conditions, these orally administered enzymes generally become irreversibly inactivated.

[0004] Several delayed release forms of orally administered pancreatic enzymes have been proposed. Pancreatic enzymes can be formulated as gastric resistant microspheres (See U.S. Patent Nos. 6,051,220; 5,405,621; 5,352,460; 5,324,514, and

5,260,074). Such compositions may be resistant to gastric fluids, but fail to exhibit satisfactory release profiles. For example, enteric coated preparations often dissolve too late in the upper intestine to make the enzymes unavailable at the desired location. Further, enteric-coated compositions are often unable to release active enzyme in patients with exocrine pancreas insufficiency because the upper regions of the small intestine in these patients is often acidic. See Barraclough M, Taylor CJ., Twenty-four hour ambulatory gastric and duodenal pH profiles in cystic fibrosis: effect of duodenal hyperacidity on pancreatic enzyme function and fat absorption, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996, 23: 45-50; Carriere F, Grandval P, Renou C, et al., Quantitative study of digestive enzyme secretion and gastrointestinal lipolysis in chronic pancreatitis, *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005, 3: 28-38; Youngberg CA, Berardi RR, Howatt WF et al., Comparison of gastrointestinal pH in cystic fibrosis and healthy subjects, *Dig Dis Sci* 1987, 32: 472-80; Zentler-Munro PL, Fitzpatrick WJ, Batten JC, Northfield TC, Effect of intrajejunal acidity on aqueous phase bile acid and lipid concentrations in pancreatic steatorrhea due to cystic fibrosis, *Gut* 1984, 25: 500-7.

[0005] Compositions comprising cross-linked enzyme preparations are known (See U.S. Patent Publication Nos. 2001/0046493 and 2003/0017144). Cross-linking has been shown to enhance resistance to acidic pH. However, the efficient preparation of cross-linked proteins is difficult, and the cross-linking process may adversely affect enzyme activity. Furthermore, crosslinking enzymes may result in difficulties in obtaining regulatory approval, and difficulties in the production of compliant proteins. Compositions comprising fungal and microbial enzyme mixtures as an alternative to animal enzymes for treating pancreatic insufficiency have also been disclosed (See U.S. Patent No. 6,051,220, and U.S. Patent Publication Nos. 2008/0279839 and 2004/0057944).

[0006] Currently, orally administrable pancrelipase dosage forms are prescribed for pancreatic insufficiency. Patients, however, must swallow several of these dosage forms each day. In many cases, patients may be required to swallow 8 or more dosage forms

daily. Patient compliance can be increased by reducing the high number of dosage forms which must be administered.

[0007] Accordingly, there remains a need for improved enzyme preparations for treating disorders related to pancreatic enzyme deficiency.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0008] The present inventors surprisingly discovered that compacted, uncoated tablets of enzymes (such as pancrelipase) retain significant enzymatic activity even after exposure to simulated gastric fluids. In the case of pancrelipase preparations, reduction or exclusion of typical excipients, such as enteric coatings, can result in approximately 20-40% reduction in size. Alternatively, the drug load of the preparations can be significantly increased without a similar increase in size, thus reducing the number of dosage forms a patient must swallow each day for the same dose of enzymes

[0009] In the compacted compositions of the present invention, the enzymes (such as pancreatic enzymes) act as active ingredients as well as a binder and a pH-sensitive gel-forming agent. One embodiment of the present invention is a compacted pharmaceutical composition comprising one or more enzymes (e.g., pancrelipase) self-assembled such that the enzymes have greater cohesive inter-particle strength after compaction than prior to compaction. The composition is typically orally administrable, and can be a tablet or multiparticulates (such as mini-tablets, micro-tablets, or prills), for which one or multiple units can be eventually incorporated into, for example, a capsule. The composition is typically gastroresistant. In one preferred embodiment, the tablet shape in simulated gastric fluid (SGF) is substantially maintained. Without being bound by any particular theory, the inventors believe that upon administration, an outer layer is formed (as shown for instance in Fig. 1) which contributes to gastro-resistance of the dosage form. The inventors have also found that the inner part of the tablet is substantially dry (Fig. 1). Preferably, the pharmaceutical compositions retain at least about 30, about 40, about 50, about 60, about 70, about 80, or about 90% of their activities in the inner dry core of the pharmaceutical composition after exposure to simulated gastric fluid for 1 or 2 hours. Because of the

enhanced gastro-resistance of the compositions of the present invention, the drug content of the composition can be about 80, about 90, about 95, or even about 99% or greater (based on the total weight of the composition).

[0010] The enzymes can be digestive hydrolases. In one embodiment, the enzymes are selected from amylases, lipases, proteases, and any combination of any of the foregoing. In one preferred* embodiment, the composition contains pancrelipase. The enzymes can be of porcine or non-porcine origin. For instance, the pancrelipase can be of porcine origin.

[0011] In a preferred embodiment, the pharmaceutical composition is un-coated. In another preferred embodiment, the pharmaceutical composition is monolithic. Yet, another preferred embodiment consists is an un-coated monolithic dosage form, such as an un-coated monolithic tablet. The pharmaceutical composition can be formed by compaction at a force of from about 0.25 to about 3.0 T.

[0012] Preferably, the composition is substantially free (e.g., contains less than about 5, about 4, about 3, about 2; about 1, about 0.5, or about 0.2% w/w) of binder and/or disintegrant, or completely free of binder and/or disintegrant. In one embodiment, the composition is substantially free of binder and substantially free of disintegrant. In another embodiment, the composition is substantially free of binder and free of disintegrant. In yet another embodiment, the composition is free of binder and substantially free of disintegrant.

[0013] Preferably, the composition is substantially free (e.g., contains less than about 5, about 4, about 3, about 2, about 1, about 0.5, or about 0.2% w/w) of excipients, or completely free of excipients.

[0014] According to one preferred embodiment, the composition (e.g., tablet) is not enterically coated.

[0015] Another embodiment is a monolithic, compacted, gastro-resistant pharmaceutical composition comprising one or more enzymes self-assembled so as to enhance cohesion within the composition. The composition is typically orally administrable, and can be a tablet, or a mini-tablet or multiparticulates such as prills which can be incorporated into, for example, a capsule. The enzymes can be any described in the present application, such as pancrelipase. Furthermore, the composition can have a drug content of at least about 65, about 80, about 90, about 95, or about 99% or greater, or can have a drug content of 100% by weight. In addition, other pharmaceutically active ingredients can be incorporated to obtain multipurpose pharmaceutical dosage forms. Preferably, the composition is substantially free of excipients, or completely free of excipients. According to one preferred embodiment, the composition is not enterically coated.

[0016] Another embodiment is a monolithic, compacted, gastro-resistant pharmaceutical composition comprising pancrelipase. The pancrelipase comprises a mixture of lipase, amylase, and proteases. The composition is typically orally administrable, and can be a tablet or multiparticulates (such as mini-tablets, micro-tablets, or prills), for which one or

multiple units can be eventually incorporated into, for example, a capsule. After administration, an outer coating is formed from the enzymes exposed on the surface of the composition. The lipases, amylases, and proteases in the inner core composition preferably retain at least about 30% of their activity, after the composition is exposed to simulated gastric fluid for 1 hour or 2 hours.

[0017] In the inner (dry) core of the compositions described above, the lipases and amylases preferably retain at least about 80% and about 30% of their activity, respectively, after exposure to simulated gastric fluid for 2 hours. The proteases in the composition preferably retain at least about 70% of its activity after exposure to simulated gastric fluid for 1 hour.

[0018] More preferably, the lipase retains at least about 40, about 50, about 60, about 70, about 80, or about 90% of its activity in the inner core of the composition, after exposure to simulated gastric fluid for 1 hour or 2 hours. The amylase more preferably

retains at least about 40, about 50, or about 60% of its activity, after exposure to simulated gastric fluid for 1 hour or 2 hours. The proteases more preferably retain at least about 40, about 50, about 60, about 70, or about 80% of its activity, after exposure to simulated gastric fluid for 1 hour. These data can be obtained by exposing the compositions (e.g., tablets) to a particular volume of SGF or SIF (see, for instance, the testing method below).

[0019] The composition can be directly compacted with a compression force of from about 0.25 to about 3.0 T.

[0020] The composition can have a drug load of about 80, about 90, about 95, or even about 99% by weight or greater.

[0021] Preferably, the composition is substantially free of excipients, or completely free of excipients.

[0022] According to one preferred embodiment, the composition is not enterically coated.

[0023] Yet another embodiment is a compacted pharmaceutical composition comprising one or more enzymes, where the composition has an enzyme drug load of at least about 80%. Preferably, the composition has a drug content of at least about 90, about 95, or about 99% or greater. The composition is typically orally administrable, and can be a tablet or multiparticulates (such as mini-tablets, micro-tablets, or prills), for which one or multiple units can be eventually incorporated into, for example, a capsule. The enzymes can be any described in the present application, such as pancrelipase. According to one preferred embodiment, the composition is not enterically coated.

[0024] Yet another embodiment is a monolithic, compacted, gastro-resistant pharmaceutical composition comprising one or more enzymes self-assembled so as to enhance cohesion within the composition. The composition is typically orally administrable, and can be a

tablet or multiparticulates (such as mini-tablets, micro-tablets, or prills), for which one or multiple units can be eventually incorporated into, for

example, a capsule. The enzymes can be any described in the present application, such as pancrelipase. Preferably, the composition has a drug content of at least about 80, about 90, about 95, or about 99% or greater. Preferably, the composition is substantially free of excipients, or completely free of excipients. According to one preferred embodiment, the composition is not enterically coated.

[0025] Yet another embodiment is a compacted pharmaceutical composition comprising one or more enzymes, wherein the composition is substantially free (or completely free) of excipients and is not enterically coated. The composition is typically orally administrable, and can be a tablet or multiparticulates (such as mini-tablets, micro-tablets, or prills), for which one or multiple units can be eventually incorporated into, for example, a capsule. The enzymes can be described in the present application, such as pancrelipase. Preferably, the composition has a drug content of at least about 80, about 90, about 95, or about 99% by weight or greater.

[0026] Yet another embodiment is a multi-layer, compacted pharmaceutical composition comprising one or more enzymes in the outermost layer of the composition. The composition is typically orally administrable, and can be a tablet or multiparticulates (such as mini-tablets, micro-tablets, or prills), for which one or multiple units can be eventually incorporated into, for example, a capsule. Preferably, the enzymes are self-assembled such that the enzymes have greater cohesive strength resulting from the compaction. The composition is preferably gastroresistant. In one embodiment, one or more of the enzymes retain -at least about 30, about 40, about 50, about 60, about 70, about 80, or about 90% of their activity in the inner tablet core after exposure to simulated gastric fluid for 1 hour.

[0027] Yet another embodiment is a pharmaceutical composition comprising a layer of one or more enzymes, wherein the layer is substantially free of binder and/or disintegrant.

[0028] Yet another embodiment is a pharmaceutical composition consisting of pancrelipase, wherein the lipase of the pancrelipase retains at least about 80% of its

activity after exposure to pH of 1.2 at 37° C for 2 hours. In a preferred embodiment, the lipase of the pancrelipase retains at least about 85 or about 90% of its activity (e.g., in the inner dry core of the pharmaceutical composition) after exposure to pH of 1.2 at 37° C for 2 hours. In one embodiment, the amylase and/or protease in the pharmaceutical composition retain at least about 30, about 40, about 50, about 60, about 70, about 80, or about 90% of their activities in the inner dry core of the pharmaceutical composition after exposure to pH of 1.2 at 37° C for 2 hours.

[0029] Yet another embodiment is a pharmaceutical composition consisting of pancrelipase obtainable by compressing pancrelipase free of other excipients at a compression force of from about 0.25 to about 3.0 T (e.g., from about 1.0 to about 3.0 T or from about 1.25 to about 3.0 T).

[0030] In any of the aforementioned embodiments, the composition may comprise from about 1,000 to about 150,000 USP units of lipase, from about 3,000 to about 300,000 U proteases, and from about 3,000 to about 500,000 U amylases. In another embodiment, the composition comprises from about 2,000 to about 75,000 USP units of lipase, from about 8,000 to about 250,000 U proteases, and from about 8,000 to about 250,000 U amylases. In yet another embodiment, the composition comprises from about 2,000 to about 40,000 USP units of lipase, from about 8,000 to about 160,000 U proteases, and from about 8,000 to about 160,000 U amylases.

[0031] Yet another embodiment is a process for preparing a pharmaceutical composition comprising one or more enzymes. The method includes compacting an enzyme preparation free or substantially free of excipients. Preferably, the compaction is performed at a compression force of from about 0.25 to about 3.0 T. According to one preferred embodiment, the compacted pharmaceutical composition is a tablet. According to one particular embodiment, the pharmaceutical composition is not enterically coated.

[0032] Yet another embodiment is a method for treating a digestive disorder by administering a pharmaceutical composition of the present invention. Preferably, a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition is administered. Preferably, the composition is orally administered.

[0033] In one embodiment, the composition comprises pancrelipase. The patient may suffer from partial or complete exocrine pancreas insufficiency. The exocrine pancreas insufficiency may be concomitant with cystic fibrosis, chronic pancreatitis, post-pancreatectomy, post-gastrointestinal bypass surgery (e.g., Billroth II gastroenterostomy), ductal obstruction from neoplasm (e.g., of the pancreas or common bile duct), alcoholism, or pancreatic carcinomas.

[0034] Yet another embodiment is a method for controlling steatorrhea by administering to a patient in need thereof a pharmaceutical composition of the present invention, where composition comprises pancrelipase. Preferably, the composition is orally administered.

[0035] The inventors of the present invention have discovered that enzyme preparations become gastro-resistant upon compaction. Without being bound by any particular theory, the inventors describe in this and the next paragraph the theorized mechanism by which the present invention is believed to operate. The inventors believe that the enzymes undergo self-assembly during the compaction process. The self-assembly results from various types of interactions between protein chains, such as hydrogen associations (e.g., from histidine, lysine, tyrosine, and serine), other associative binding (e.g., π - π interactions involving aromatic rings of phenylalanine and tyrosine), and ionic interactions (e.g., $-\text{COO}^-$ with between glutamate-lysine and aspartate-lysine). These interactions also improve the stability of the shape of the pharmaceutical composition (e.g., tablet). Furthermore, the ionic stabilization results in the protein acting as a buffer and thus enhances gastric stability.

[0036] The associative and ionic interactions are pH sensitive. The pharmaceutical compositions exhibit strong cohesion in acidic pH (and thus afford gastric stability). In intestinal fluid, however, the carboxylic groups are deprotonated, which triggers hydration, erosion of the pharmaceutical composition, and disintegration with the release of the therapeutic enzymes. The enzymes thus act as a biologically active agent as well as a binder and pH sensitive swelling agent.

[0037] Because the compacted pancrelipase itself acts as a binder and is gastro-resistant, a tablet with a significantly higher drug content can be obtained. Thus, either a significantly larger amount of therapeutic enzyme can now be delivered in tablets of the same size as prior art tablets, or smaller tablets having the same amount of drug as prior art tablets can be used. Furthermore, in many embodiments, an enteric coating is not necessary to protect the enzyme from gastric acidity.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0038] Figure 1 is an image of the cross-section of a non-enterically coated pancreatic enzyme concentrate (PEC) tablet with a self-coating formed after exposure to simulated gastric fluid for 1 hour.

[0039] Figure 2 shows the thickness of the hydrated layer in tablets, prepared by the procedure described in Example 1 having the sizes indicated in Table XII, after exposure to SGF.

DETAILED DESCRIPTION

[0040] As used herein, the term "comprising" is open ended and, in connection with a composition, refers to the elements recited. The term "comprising" as used in connection with the compositions described herein can alternatively cover compositions "consisting essentially of" or "consisting of" the recited components (e.g., pancrelipase).

[0041] As used herein, the term "enzymes" refers to any polypeptide having catalytic activity. Generally, enzymes may be available in powder or crystalline form, typically as enzyme concentrates derived from animal sources. However, plant and

microbial derived systems can also be used. Non-limiting examples of enzymes include digestive enzymes.

[0042] Digestive enzymes include, for example, lipases, amylases and proteases. In one embodiment, the digestive enzyme is pancrelipase. Pancrelipase (or "pancreatin") typically includes amylase, lipase, and protease enzymes. Non-limiting examples of digestive enzymes also include lipase and co-lipase, trypsin, chymotrypsin, chymotrypsin B, pancreatopeptidase, carboxypeptidase A, carboxypeptidase B, glycerol ester hydrolase, phospholipase, sterol ester hydrolase, elastase, kininogenase, ribonuclease, deoxyribonuclease, α -amylase, papain, chymopapain, glutenase, bromelain, ficin, β -amylase, cellulase, β -galactosidase, lactase, sucrase, isomaltase, and any combination of

any of the foregoing. Other non-limiting examples of digestive enzymes include exogenous enzymes such as β -amylase, cellulase, and any combination of any of the foregoing.

[0043] In one embodiment, the digestive enzyme is a pancreatic enzyme. The term "pancreatic enzyme" refers to any one of the enzyme types present in the pancreatic secretion, such as amylase, lipase, protease, or mixtures thereof, or any extract of pancreatic origin having enzymatic activities, such as pancreatin. The pancreatic enzyme can be obtained through extraction from the pancreas (e.g., of porcine or non-porcine

origin), produced artificially, or obtained from sources other than the pancreas, such as from microbes, plants or other animal tissues.

[0044] In another embodiment, the digestive enzyme comprises a lipase. The term "lipase" refers to an enzyme that catalyzes the hydrolysis of lipids to glycerol and simple fatty acids. Examples of lipases include, but are not limited to, animal lipase (e.g., porcine lipase), bacterial lipase (e.g., *Pseudomonas* lipase and/or *Burkholderia* lipase), fungal lipase, plant lipase, recombinant lipase, chemically-modified lipase, or mixtures thereof.

[0045] In yet another embodiment of the present invention, the digestive enzyme comprises an amylase. The term "amylase" refers to glycoside hydrolase enzymes that

break down starch, for example α -amylases, β -amylases, γ -amylases, acid α -glucosidases, salivary amylases such as ptyalin. The amylases suitable for use in the compositions of the present invention include, but are not limited to, animal amylases, bacterial amylases, fungal amylases, plant amylases, recombinant amylases, and chemically modified amylases, or mixtures thereof.

[0046] In another embodiment, the digestive enzyme comprises proteases. The term "proteases" refers to enzymes that degrade peptide bonds. Proteases are generally identified by their catalytic type, e.g., aspartic acid peptidases, cysteine (thiol) peptidases, metallopeptidases, serine peptidases, threonine peptidases, alkaline or semi-alkaline proteases, neutral and peptidases of unknown catalytic mechanism. Non-limiting examples of proteases include serine proteases, threonine proteases, cysteine proteases, aspartic acid proteases (e.g., plasmepsin) metalloproteases, and glutamic acid proteases. Proteases suitable for use in the compositions of the present invention include, but are not limited to animal proteases, bacterial proteases, fungal proteases (e.g., an *Aspergillus melleus* protease), plant proteases, recombinant proteases, and chemically modified proteases, or mixtures thereof.

[0047] In one embodiment, the digestive enzyme is a porcine pancreatic extract comprising various lipases (e.g., lipase and phospholipase A2), proteases (e.g., trypsin, chymotrypsin, carboxypeptidase A and B, elastase, and kininogenase), amylases, and optionally nucleases (ribonuclease, deoxyribonuclease), cholesterol esterase, and cofactors such as colipase. In another embodiment, the digestive enzyme is substantially similar to human pancreatic fluid. In yet another embodiment, the digestive enzyme is non-porcine pancrelipase. In yet another embodiment, the digestive enzyme is pancrelipase of porcine origin. In another

embodiment, the digestive enzyme is pancrelipase USP. In still another embodiment, the digestive enzyme is pancrelipase having a lipase activity of from about 69 to about 120 U USP/mg, amylase activity of greater than or equal to about 216 U USP/mg, protease activity of greater than or equal to about 264 U USP/mg, and total protease activity of greater than or equal to about 264 U USP/mg.

[0048] In one embodiment, the compositions of the present invention can comprise one or more lipases (i.e., one lipase, or two or more lipases), one or more amylases (i.e., one amylase, or two or more amylases), one or more proteases (i.e., one protease, or two or more proteases), mixtures of one or more lipases and colipase with one or more amylases, mixtures of one or more lipases with one or more proteases, mixtures of one or more amylases with one or more proteases, or mixtures of one or more lipases with one or more amylases and one or more proteases.

[0049] Lipase activities in the compositions of the present invention can range from about 1,000 to about 150,000 International Units (U). Amylase activities in the compositions of the present invention can range from about 3,000 to about 500,000 U. Proteases activities in the compositions of the present invention can range from about 3,000 to about 500,000U. In another embodiment, the composition comprises from about 2,000 to about 75,000 USP units of lipase, from about 8,000 to about 250,000 U proteases, and from about 8,000 to about 250,000 U amylases. In yet another

embodiment, the composition comprises from about 2,000 to about 40,000 USP units of lipase, from about 8,000 to about 160,000 U proteases, and from about 8,000 to about 160,000 U amylases.

[0050] Lipase activities in the compositions can be from about 3000 to about 25,000 IU, from about 4500 to about 25,000 IU, for example from about 4500 to about 5500 IU, from about 9000 to about 11,000 IU, from about 13,500 to about 16,500 IU, and from about 18,000 to about 22,000 IU. Amylase activities in the compositions can be from about 8100 to about 180,000 IU, for example from about 8000 to about 45,000 IU, from about 17,000 to about 90,000 IU, from about 26,000 to about 135,000 IU, from about 35,000 to about 180,000 IU. Protease activities in the compositions can be from about 8000 to about 134,000 IU, for example from about 8000 to about 34,000 IU, from about 17,000 to about 67,000 IU, from about 26,000 to about 100,000 IU, from about 35,000 to about 134,000 IU. In one embodiment, the lipase activity ranges from about 4500 to about 5500 IU, the amylase activity ranges from about 8000 to about 45,000 IU, and the protease activity ranges from about 8000 to about 34,000 IU. In another embodiment, the lipase activity ranges from about 9000 to about 11,000 IU, the amylase activity ranges from about 17,000 to about 90,000 IU, and the protease activity ranges from about 17,000 to about 67,000 IU. In yet another embodiment, the lipase activity ranges from about 13,500 to about 16,500 IU, the amylase activity ranges from about 26,000 to about 135,000 IU, and the protease activity ranges from about 26,000 to about 100,000 IU. In still another embodiment, the lipase activity ranges from about 18,000 to about 22,000 IU, the amylase activity ranges from about 35,000 to about 180,000 IU, and the protease activity ranges from about 35,000

to about 134,000 IU. In still another embodiment, the lipase activity can be about 5,000 or about 30,000 lipase PhEur.

[0051] The ratio of amylase/lipase in the compositions can range from about 1.8 to about 8.2, for example from about 1.9 to about 8.2, and about 2.0 to about 8.2. The ratio of protease/lipase in the compositions or oral dosage forms of the present invention can range from about 1.8 to about 6.2, for example about 1.9 to about 6.1, and about 2.0 to about 6.1.

[0052] In one embodiment, the ratio of amylase : lipase in the PEP can be in the range of from about 1 to about 10, for example from about 2.38 to about 8.75 (enzymatic assay is performed according to USP). The ratios of protease : lipase in the PEP can be in the range of from about 1.00 to about 8.00, for example from about 1.86 to about 5.13 (enzymatic assay is performed according to USP).

[0053] In another embodiment, the activities of lipase, protease, and amylase those described in Tables A and B, below:

Table A

Activity (IU) Ratio

Formulation Amylase/ Protease/

Lipase Amylase Protease

Lipase Lipase

1 Min 4500 8100 8100 1.8 1.8

Max 5500 45000 34000 8.2 6.2

Activity (IU) Ratio

Formulation Amylase/ Protease/

Lipase Amylase Protease

Lipase Lipase

Min 9000 17100 17100 1.9 1.9

Max 11000 90000 67000 8.2 6.1

Min 13500 26100 26100 1.9 1.9

Max 16500 135000 100000 8.2 6.1

Min 18000 35100 35100 2.0 2.0

Max 22000 180000 134000 8.2 6.1

Min 3800 6800 6800 1.8 1.8

Max 4600 37700 28500 8.2 6.2

Min 9500 17100 17100 1.8 1.8

Max 11500 94300 71300 8.2 6.2

Min 15100 27200 27200 1.8 1.8

Max 18500 151700 114700 8.2 6.2

Min 18900 34000 34000 1.8 1.8

Max 23100 189400 143200 8.2 6.2

Min 5400 9700 9700 1.8 1.8

Max 6600 54100 40900 8.2 6.2 0 Min 10800 19400 19400 1.8 1.8

Max 13200 108200 81800 8.2 6.2 1 Min 21600 38900 38900 1.8 1.8

Max 26400 216500 163700 8.2 6.2

Table B

Activity (PhEur) Ratio

Formulation Amylase/ Protease/

Lipase Amylase Protease

Lipase Lipase 2 Min 9000 3900 1 10 0.43 0.012 Max 11000 21700 2150 1.98 0.196

13 Min 22500 9800 280 0.43 0.012

Max 27500 54300 5400 1.98 0.196

14 Min 36000 15600 450 0.43 0.012

Max 44000 86900 8600 1.98 0.196

[0054] The term "U" or "EU" refers to enzymatic units. One USP Unit of amylase activity is contained in the amount of pancrelipase that decomposes starch at an initial rate such that 0.16 μEg of glycosidic linkage is hydrolyzed per minute under the

conditions of the Assay for amylase activity from the Official Monograph for

Pancrelipase (The 2009 United States Pharmacopeia 32/National Formulary 27)

incorporated herein by reference. One USP Unit of lipase activity is contained in the amount of pancrelipase that liberates 1.0 μEg of acid per minute at pH 9.0 and 37°C under the conditions of the Assay for lipase activity from the Official Monograph for Pancrelipase (The 2009 United States Pharmacopeia 32/National Formulary 27)

incorporated herein by reference. One USP Unit of protease activity is contained in the amount of pancrelipase that under the conditions of the Assay for protease activity from the Official Monograph for Pancrelipase (The 2009 United States Pharmacopeia

32 National Formulary 27) incorporated herein by reference, hydrolyzes casein at an initial rate such that there is liberated per minute an amount of peptides not precipitated by trichloroacetic acid that gives the same absorbance at 280 nm as 15 nmol of tyrosine.

[0055] Below is a table for converting units of amylase, lipase, and protease.

Conversion values for units of enzyme activity

Amylase 1 PhEur unit equals 1 FIP unit equals 1 BP unit equals 4.15 USP units
Lipase 1 PhEur unit equals 1 FIP unit equals 1 BP unit equals 1 USP unit
Protease 1 PhEur unit equals 1 FIP unit equals 1 BP unit* equals 62.5 USP units
*Only free protease for pancreatin; total protease for pancreatic extract.

BP— British Pharmacopoeia; FIP— Federation Internationale Pharmaceutique; PhEur—

European Pharmacopoeia.

[0056] The total amount of digestive enzymes (by weight) in the compositions or oral dosage forms of the present invention can be from about 65 to about 100%, from about 80 to about 100%, from about 90 to about 100%, from about 95 to about 100 or about 85%, about 90%, about 95%, or about 100%, inclusive of all ranges and subranges therebetween. In one embodiment, the total amount of digestive enzymes is from about 80 to about 100%. In another embodiment, the total amount of digestive enzymes (e.g., pancrelipase) ranges from about 90 to about 99% (e.g., about 98%).

[0057] In one embodiment the dosage forms of the present invention comprise at least one digestive enzyme, have a moisture content of about 10% or less, about 5% or less, about 3% or less, about 2.5% or less, about 1.5% or less, or about 1% or less, inclusive of all ranges and subranges therebetween (e.g., any of about 2.5% to about 3%, about 2% to

about 3%, about 1.5% to about 3%, about 1% to about 3%, about 2% to about 2.5%, about 1.5% to about 2.5%, about 1% to about 2.5%, about 1.5% to about 2%, about 1% to about 2%, and about 1% to about 1.5%). Compositions maintained at low moisture content have been found to be substantially more stable compared to conventional compositions maintained at higher moisture contents, e.g. above about 3% or higher. Moisture content can be measured by loss on drying (LoD) USP method.

[0058] In yet another embodiment, the compositions exhibit a loss of enzyme activity measured in the inner core of the composition of no more than about 25%, no more than about 20%, no more than about 15%, no more than about 12%, no more than about 10%, no more than about 8%, or no more than about 5%, after being submerged in simulated acidic solution for 1 hour at room temperature.

[0059] The term "simulated gastric fluid" (or SGF) refers to a gastric fluid solution prepared as follows: Dissolve 2.0 g of sodium chloride in 7.0 mL of hydrochloric acid and sufficient water to make 1000 mL. This test solution has a pH of about 1.2. See U.S. Pharmacopeia 29th Ed., Test Solutions, Simulated Gastric Fluid.

[0060] The term "simulated intestinal fluid" (or SIF) refers to an intestinal fluid solution prepared as follows: Dissolve 6.8 g of monobasic potassium phosphate in 250 mL in water, mix, and add 77 mL of 0.2 N sodium hydroxide and 500 mL of water. Adjust the resulting solution with either 0.2 N sodium hydroxide or 0.2 N hydrochloric acid to a pH of 6.8 ± 0.1 . Dilute with water to 1000 mL. See U.S. Pharmacopeia 29th Ed., Test Solutions, Simulated Intestinal Fluid.

[0061] The compositions of the present invention can be prepared into or incorporated into any suitable oral dosage form. Non-limiting examples of suitable dosage forms include tablets or multiparticulates (such as mini-tablets, micro-tablets, and prills), for which one or multiple units can be eventually incorporated into, for example, a capsule. In a preferred embodiment, the pharmaceutical composition is in the form of tablets. In a more preferred embodiment, the tablet is free of or substantially free of excipients and is not enterically coated,

[0062] The composition (e.g., a mini-tablet or tablet) can have a diameter ranging from about 0.5 to about 15 mm, from about 2 to about 10 mm, or from about 4 to about 10 mm. For example, the diameter can be about 2, about 4, about 6, about 8, about 9.7, or about 10 mm. The tablet diameter can be measured, for example, with a caliper.

[0063] The term "excipient" refers to any inert substance added to a pharmaceutical composition. Non-limiting examples of excipients include those excipients described in the Handbook of Pharmaceutical Excipients. American Pharmaceutical Association, 6th Ed. (2009). Excipients can include, for example, fillers such as saccharides, for example, lactose or sucrose, mannitol or sorbitol, cellulose preparations and/or calcium phosphates, for example, tricalcium phosphate or calcium hydrogen phosphate, binders, such as, starch, using, for example, maize starch, wheat starch, rice starch, potato starch, gelatin, methyl cellulose, hydroxy-propylmethylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, and/or

polyvinyl pyrrolidone, and/or polyethylene glycol, auxiliaries such as flow-regulating agents, and lubricants, for example, silica, talc, and/or stearic acid or salts thereof, such as magnesium stearate or calcium stearate.

[0064] The term "coating", as used herein, refers to a material used to coat a formed composition (e.g., tablet), typically for the purpose of protecting the active ingredient or drug substance present in the composition against degradation, to provide a desired release pattern for the drug substance after administration, to mask the taste or odor of the drug substance, or for aesthetic purposes. The coating may consist of for example, sugar coating, film coating, or enteric coating. Sugar coating is water-based and results in a thickened covering around a formed tablet. A film coat is a thin cover around a formed tablet or bead. Unless it is an enteric coat, the film coat will dissolve in the stomach. An enteric-coated tablet or bead will pass through the stomach and break up in the intestines. Water-insoluble coatings comprising, for example, ethylcellulose, may be used to coat tablets and beads to slow the release of drug as the tablet passes through the gastrointestinal tract. Hydroxyethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropyl methylcellulose, methylcellulose and ethylcellulose are examples of film coatings. Enteric coatings may comprise, for example, cellulose acetate phthalate, shellac, methacrylate polymers, and alginate.

[0065] The term "treatment" or "treating" means any treatment of a disease or disorder in a mammal, including: preventing or protecting against the disease or disorder, that is, causing the clinical symptoms not to develop; inhibiting the disease or disorder, that is, arresting or suppressing the development of clinical symptoms; and/or relieving the disease or disorder, that is, causing the regression of clinical symptoms. The term "mammal" includes human subjects.

[0066] The following examples are given as specific illustrations of the invention. It should be understood, however, that the invention is not limited to the specific details set forth in the examples. All parts and percentages in the examples, as well as in the remainder of the specification are by weight unless otherwise specified.

[0067] Further, any range of numbers recited in the specification or paragraphs hereinafter describing or claiming various aspects of the invention, such as that representing a particular set of properties, units of measure, conditions, physical states, or percentages, is intended to literally incorporate expressly herein by reference or otherwise, any number falling within such range, including any subset of numbers or ranges subsumed within any range so recited.

EXAMPLES

EXAMPLE 1 : Excipient-Free Digestive Enzyme Tablet

TABLE I

Excipient-Free Tablet (500 mg tablet)

(Obtained by Direct Compaction at 2.5T)

Tablet Components	Amount
Lipase	25,000 USP Units
Amylase	94,000 USP Units
Protease	94,000 USP Units

[0068] Excipient-free tablets were prepared by direct compression of 500 mg of active substance (having the enzymatic activity for lipase, proteases and amylase as mentioned in Table 1) in a die with a diameter of 9.7 mm.

[0069] Smaller tablets as indicated below were also prepared. Each size of smaller tablets were prepared in sufficient number such that their total had an overall mass close to 500 mg. (equivalent to one 9.7 mm tablet).

Tablet 2.0 mm (34 mini-tablets)

Tablet 4.0 mm (8 tablets)

Tablet 6.0 mm (4 tablets)

Tablet 9.7mm (1 tablet)

EXAMPLE 2: Evaluation of Excipient-Free Pancreatic Enzyme Tablet and Reference Tablet containing 40% w/w excipients in Simulated Gastric Fluid and Simulated Intestinal Fluid

[0070] The enzyme activity of the excipient-free tablets of Example 1 and reference uncoated tablets containing excipients was evaluated in Simulated Gastric Fluid (SGF) and Simulated Intestinal Fluid (SIF) as described below. The reference tablets contained 8,000 USP units of lipase, 30,000 USP units of amylase, and 30,000 USP units of proteases and approximately 40% w/w of pharmaceutical excipients. The reference tablets were prepared by direct compression. The results are shown in Tables II - V.

Methods

[0071] Tablets were maintained in a solution of SGF (50 mL) at pH 1.2 or SIF (50 mL) at pH 6.8 at room temperature with constant rotatory stirring (50 rpm). Lipase, amylase, and

proteases activities of each sample were measured over time using the inner part of the tablets (i.e., a part of the tablet that was still dry and not hydrated by the dissolution media). Evaluation was done using the pancrelipase USP monographed methods for all three enzymes.

Results

[0072] The excipient-free tablets maintained significant lipase, amylase and protease activity following exposure to the simulated gastric and intestinal fluids. Specifically, 92.5% of lipase activity and 41.83% amylase activity was maintained in excipient-free tablets exposed to SGF for 2 hours. 79.16% protease activity was observed in the excipient-free tablets immersed in SGF for 1 hour followed by 0.5 hour in SIF.

[0073] Low levels of enzyme activity were retained in the reference tablets where the active principle was mixed with pharmaceutical acceptable excipients. In the presence of intestinal fluids, the reference tablets exhibited an activity loss exceeding 75% activity for each of lipase, proteases and amylase.

TABLE II

COMPARATIVE EVALUATION OF LIPASE ACTIVITY OF EXCIPIENT-FREE
TABLET AND REFERENCE TABLET

Dissolution conditions	Percent Activity (relative to initial activity)	
	Example 1	Reference tablet
Initial Activity	100	100
Activity After Exposure To SGF, for 1 Hr	87.1	0
Activity After Exposure To SGF for 2 Hrs	92.5	0
Activity After Exposure To SGF, for 1hrs and SIF, for 0.5 Hr	94.4	0

TABLE III

COMPARATIVE EVALUATION OF PROTEASES ACTIVITY OF EXCIPIENT- FREE
TABLET AND REFERENCE TABLET

Dissolution conditions	Percent Activity (relative to initial activity)	
	Example 1	Reference tablet
Initial Activity	100	100
Activity After Exposure To SGF, for 1 Hr	75.17	7.05
Activity After Exposure To SGF for 0.5 Hrs	84.1	15.03
Activity After Exposure To SGF, for 1hr and SIF, for 0.5 Hr	79.16	7.68

TABLE IV

COMPARATIVE EVALUATION OF AMYLASE ACTIVITY OF EXCIPIENT-FREE
TABLET AND REFERENCE TABLET

Percent Activity

Dissolution conditions (relative to initial activity)

Example 1 Reference tablet

Initial Activity 100 100

Activity after exposure to SGF, for

1 Hr 70.79 11.42

Activity after exposure to SGF for

2 Hrs 41.83 0

Activity after exposure to SGF, for

1 hr and SIF for 0.5 Hr 80.28 13.83

Activity After Exposure To SIF, for

0.5 Hr 86.25 34.20

EXAMPLE 3: Evaluation of lipase activity determined on the entire tablet after exposure to SGF at various time intervals.

[0074] Tablets prepared in Example 1 and Reference Tablets as described in Example 2 were exposed to SGF for 30, 60, and 120 minutes, and the lipase activity of the entire resulting tablets were evaluated. The results are shown in Table V below.

TABLE V

EXCIPIENT-FREE TABLET CONTAINING 500 mg TABLET OBTAINED BY
DIRECT COMPACTION AT 2.5T

Dosage form	Remaining lipase activity after exposure to SGF (% reported to the initial value)		
	30 min in SGF	60 min SGF	120 min SGF
Excipient-free tablet (example 1)	64.35 ± 4.17	44.24 ± 2.7	22.90 ± 3.9
Reference tablet (containing excipients)	0.0	0.0	0.0

EXAMPLE 4: Evaluation of Friability and Hardness of Excipient-Free Tablet

Digestive Enzyme Compositions

[0075] Excipient-free tablets were prepared as described in Example 1 and were compacted using compression forces of 1.0 - 3.0 T. The friability and hardness of each tablet were measured. The results are provided in Table VI.

Methods

[0076] All tablets were prepared 24 hours before testing hardness and friability.

[0077] Tablet hardness (kp) was measured using an automatic tablet hardness tester (model TBH 30, Erweka). The results reported represent an average of 5 measurements with 10 tablets each.

[0078] Tablet friability was determined using standard methods with an automatic friabilator. Percent friability of each tablet was calculated from the amount of tablet weight loss due to instrument rotation cycles as indicated in USP method no. I216. The reported results represent an average of 5 measurements.

Results

[0079] The friability of excipient-free tablets was shown to decrease with increasing compression force used to prepare the tablets. The hardness for the tablets increased with increasing tablet compression force. Suitable friability and hardness are met in tablets prepared using a compression force of 1.0-3.0 T.

TABLE VI

EVALUATION OF FRIABILITY AND HARDNESS OF EXCIPIENT -FREE TABLET

FORMULATION/ FRIABILITY HARDNESS COMPRESSION (%) (kp)

FORCE (T)

Example 1 (LO T) 8.33 Mean 5.3

Example 1 (1.5 T) 0.35 Mean 7.0

Example 1 (2.0 T) 0.30 Mean 8.4

Example 1 (2.5 T) 0.20 Mean 8.3

Example 1 (3.0T) 0.20 Mean 10.1

Reference tablets 0.11 Mean 11.7

[0080] EXAMPLE 5: Mechanical behavior of Excipient-free Tablets Exposed to SGF. The mechanical behaviour of the excipient-free tablets submerged in SGF is shown in Table VII.

Methods

[0081] The excipient-free tablets were prepared as described in Example 1 and were compressed using two compression force ranges (A: 1.0 - 2.5 T and B 2.5 - 5.0 T).

[0082] Tablets were suspended in a solution of SGF (50 mL) at pH 1.2 for 30, 60, and 120 minutes followed by exposure for 0, 30, 60, and 120 minutes in SIF (50 mL) at pH 6.8 at room temperature with constant stirring (50 rpm). Table VII shows treatment with SGF at different times followed by SIF.

Results

[0083] Complete disintegration of the excipient-free tablets occurred after subjecting tablets to SGF with subsequent exposure with SIF for 120 minutes. During dissolution, tablet

swelling and erosion of the external layer was observed. SIF clearly accelerated the erosion/dissolution which is useful for intestinal delivery.

TABLE VII

BEHAVIOUR OF EXCIPIENT-FREE TABLET COMPRESSED AT A: 1.0 - 2.5 T OR B: 2.5 - 5.0 T AND EXPOSED TO SIMULATED GASTRIC AND SIMULATED INTESTINAL FLUIDS FOR VARIOUS INTERVALS OF TIME

(tablet deformation and (tablet deformation and fragility observed) fragility observed)

120 min tablet is completely tablet is completely

disintegrated disintegrated

120 min 0 min 60% of initial tablet 70% of initial tablet

30 min 20% of initial tablet 25% of initial tablet

60 min 10% of initial tablet 10% of initial tablet

(tablet deformation and (tablet deformation and fragility observed) fragility observed)

120 min tablet is completely tablet is completely disintegrated disintegrated

EXAMPLE 6: Evaluation of Gastric Stability

[0084] Excipient-free tablets were prepared as described in Example 1 and were compressed using two compression force ranges (A: 1.0 - 2.5 T and B 2.5 - 5.0T).

Methods

[0085] Tablets were submerged in SGF (800 mL) at pH 1.2 at 37° C with constant stirring (100 rpm) using an USP apparatus 2. Lipase activity of the entire tablet was monitored over a 120 minute time interval. Reference tablets as described in Example 2 were also evaluated.

Results

[0086] Significant lipase activity was maintained in excipient-free tablets exposed to

SGF at 60 minute and 120 minute time intervals, as shown in Table VIII.

TABLE VIII

COMPARATIVE EVALUATION OF LIPASE ACTIVITY FROM EXCIPIENT-FREE
TABLET AND REFERENCE TABLET

Formulation/ Activity reported to Activity

Compression Force initial lipase activity reported to initial lipase

after 60 minutes of activity after 120 minutes

exposure to SGF (%) of exposure to SGF (%)

Example 1 50.88 29.37

Compression

range A

Example 1 55.50 38.94

Compression

range B

Reference tablet

0.0 0.0

EXAMPLE 7: Evaluation of Flow Properties of powders

[0087] Excipient-free tablets were prepared as described in Example 1. The flowability scale, including the compressibility index, flow character, and Hausner ratio, of the tablets was determined according to the procedures outlined in the U.S. Pharmacopeia (USP29<1174>) (www.pharmacopeia.cn/v29240/-usp29nf24s0_cl174.html). The results are shown in Table IX.

TABLE IX

SCALE OF FLOWABILITY (theoretical values as per USP 29)

COMPRESSIBILITY INDEX (%)	FLOW CHARACTER	HAUSNER RATIO
≤10	Excellent	1.00-1.11
11-15	Good	1.12-1.18
16-20	Fair	1.19-1.25
21-25	Passable	1.26-1.34
26-31	Poor	1.35-1.45
32-37	Very poor	1.46-1.59
≥38	Very, very poor	≥1.60

Results

[0088] When compared with theoretical values found in the flowability scale (Table IX), pancreatic enzyme concentrate (PEC) powders exhibited suitable flowability as indicated by their compressibility index and Hausner ratio data. In an additional experiment, a pharmaceutical excipient (i.e. stearic acid) was incorporated into the enzyme powder used in Example 1, and the compressibility index, Hausner ratio, and flow character were evaluated. It can be concluded that at a 2% level the lubricant did not significantly change the flowability and compressibility characteristics of proposed powders.

TABLE X

FLOWABILITY OF PEC POWDER WITH AND WITHOUT STERIC ACID

FORMULATION	COMPRESSIBILITY INDEX (%)	HAUSNER RATIO	FLOW CHARACTER
PEC powder	25	1.33	Passable
PEC prepared with 2% steric acid	24	1.31	Passable

EXAMPLE 8

[0089] Tablets were prepared by the procedure described in Example 1 having the weights indicated in Table XI. The hardness of the tablets prior SGF exposure and the lipase activity of the tablets after exposure SGF were measured. The results are shown in Table XI.

TABLE XI

CHARACTERISTICS OF EXCIPIENT-FREE TABLETS OF VARIOUS SIZE AND THEIR GASTRORESISTANCE AFFORDED WHEN EXPOSED FOR DIFFERENT INTERVALS IN SGF

Weight /unit (average)	Tablet Hardness (kp)	Lipase activity (%)* in the residual tablet after various exposure times		Observations
		0.5 h 1.0 h 2.0 h		
15 mg	Mean 2.3	0.5 h 1.0 h 2.0 h	Not detectable	External thin layer is formed the internal part of the tablet (core) becomes wet
64 mg	Mean 1.0	0.5h 1.0h 2.0 h	37.1% 16.6% 0 %	External thin layer is formed and the internal part of the tablet (core) remains dry
142 mg	Mean 1.0 -	0.5h 1.0h 2.0 h	46.6% 31.4% 13.0%	External thin layer is formed and the internal part of the tablet (core) remains dry
500 mg	Mean 9.3	0.5h 1.0h 2.0 h	67.8% 52.4% 36.8%	External thin layer is formed and the internal part of the tablet (core) remains dry

*Percentage in comparison with the initial value of lipase activity in PEC used for tablets. The USP apparatus 1 was used for dissolution.

All tablets were compressed at 2T

EXAMPLE 9: HYDRATION KINETICS OF EXCIPIENT-FREE TABLET IN SGF

[0090] Tablets were prepared by the procedure described in Example 1 having the sizes indicated in Table XII. The thickness of the hydrated layer after exposure to SGF was measured. The results are shown in Table XII and Fig. 2. An image of the hydrated layer formed in one tablet is shown in Fig. 1.

TABLE XII

Time In SGF (min)	Hydrated layer thickness (mm)			
	Excipient-free tablet Diameter 9.7mm Compaction 2T	Excipient-free tablet Diameter 9.7mm Compaction 0.25T	Excipient-free tablet Diameter 2.0mm Compaction 0.25T	Excipient-free tablet Diameter 2.0mm Compaction 2T
2	0.45	0.45	0.55	0.50
5	0.79	0.75	0.75	0.75
10	1.20	1.25	1.27	1.03
15	1.45	1.44	1.42	1.24
20	1.50	1.68	-	-
30	1.79	1.94	-	-
60	2.37	3.10	-	-

Example 10: LIPASE RECOVERY IN SIF FROM EXCIPIENT-FREE TABLETS AFTER EXPOSURE FOR 1 H IN SGF

[0091] Tablets were prepared by the procedure described in Example 1 having the weights indicated in Table XIII. All tablets were compressed at a compression force range A. The lipase activity in the tablet after exposure to SGF and subsequent exposure to SIF was evaluated in dissolution medium. The results are shown in Table XIII below.

Tablet mass	Lipase activity after 1h in SGF (App.I)	Lipase activity in pH 6 after 1 hour in SGF followed by the indicated minutes in SIF (App. II)
15 mg	Not detectable	NA
64 mg	16.6%*	after 10 min 330 IU (6%)* after 20 min 340 IU after 30 min 340 IU

142 mg 31.4 %* after 10 min 1024IU (8%)*

after 20 min 1040 IU

after 30 min 1057 IU

500 mg 52.4 %* after 15 min 5 625 IU (12.5%)*

after 30 min 7 155 IU (15.9%)*

after 60 min 9 405 IU (20.9%)*

* Percentage from the initial lipase activity in the PEC used for tablet preparation

EXAMPLE 11: LIPASE ACTIVITY OF EXCIPIENT-FREE TABLETS AFTER EXPOSURE MIMICKING THE IN VIVO CONDITIONS

[0092] Tablets were prepared by the procedure described in Example 1 having the weights indicated in Table XIV. All tablets were obtained by direct compression at a compression force ranging between 1- 2.5 T (range A) . The lipase activity in the tablet after exposure to SGF (pH = 1.2) for 1 hour, exposure to fluid at a pH of 4.5 for 1 hour, and subsequent exposure to SIF for 15 minutes was evaluated. The results are shown in Table XIV below.

TABLE XIV

Mass/dosage unit	Lipase activity (dosage in the residual tablet) after 1h in SGF	Lipase activity after 1 hour in SGF, 1h at pH 4.5 (App. I) and 15 min in SIF (disintegration)
15 mg	Not detectable	NA
64 mg	16.60%	13.3 ± 2.4
142 mg	31.40%	21.2 ± 3.1
500 mg	53.50%	42.4 ± 2.7

Percentage from the initial lipase activity in the PEC used for tablet preparation [0093] All patents and patent applications cited in this specification are incorporated herein by reference in their entirety and to the same extent as if each reference was individually incorporated by reference.

BIBLIOGRAPHIE

Allain A.F., P. Paquin, et M. Subirade. 1999. «Relationships between conformation of b-lactoglobulin in solution and gel states as revealed by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy». *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 26, p.337–344.

Almeida A.J et E. Souto. 2007. «Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins». *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 59, p.478–490.

Balny C. 2004. «Pressure effects on weak interactions in biological Systems». *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol.16, p.S1245-S1253.

Beek T., 1973. «The raie of pancreatic enzymes in digestion». *American Journal of Clinical Nutrition*, vol.26, p.311-325.

Best, C.H. et N.B. Taylor. 1961. «Pancreas, liver and biliary system». In *The physiological basis of medical practice* (Taylor N.B., Ed.), p. 629-661, Baltimore: The Williams & Wilkins company.

Best, C. H., N. B. Taylor et I. R. Brobeck. 1979. «Pancreatic secretion». In *Best & Taylor's Physiological basis of medical practice–10th edition* (Brobeck J.R., Ed.), p. 256-266, Baltimore: The Williams & Wilkins Company.

Boonyaratanakornkit, B., Park C., Clark D., 2002. «Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol.1595, p. 235-249.

Brokerhoff H. et R.G. Jensen. 1974. «Lipases». In *Lipolytic Enzymes* (Brokerhoff H., Jensen R., Eds.), p.25-34, New York: Academic Press.

Buisson, G., E. Duée, R. Haser et F. Payan. 1987. «Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity». *Journal of the European Molecular Biology Organization*, vol.6, p. 3909-3916.

Byler, D. et H. Susi. 1986. «Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra». *Biopolymers*, vol. 25, p. 469-487.

Caillard, R. et Subirade M. 2012. «Protein based tablets as reversible gelling systems for delayed release applications». *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 437, p. 130–136.

Clark A.H., D.H.P. Saunderson et A. Suggett. 1981. «Infrared and laser-Raman spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gels». *International Journal of Peptide and Protein Research*, vol. 17, p.353-364.

Cunningham L. W. Jr. 1954. «Molecular-kinetic properties of crystalline diisopropyl phosphoryl trypsin». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 211, p.13-19.

Czako L., T. Takacs, P. Hegyi, L. Pronai, Z. Tulassay, L. Lakner, Z. Döbrönte, K. Boda, et J. Lonovics. 2003. «Quality of life assessment after pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis». *Canadian Journal of Gastroenterology*, vol.17, p.597-603.

De Caro A., C. Figarella, J. Amic, R. Michel et O. Guy. 1977. «Human pancreatic lipase: A glycoprotein». *Biochimica and Biophysica Acta - Protein Structure*, Vol. 490, p. 411-419.

Demers, D. 2010. «Optimisation de méthodes chromogéniques pour l'évaluation d'enzymes pancréatique en milieu pharmaceutique». Mémoire de la maîtrise en chimie, Montréal, Université du Québec à Montréal, p. 66-67.

Eckert, R., D. Randall, W. Burggren, et K. French. 1999. «Acquisition de l'énergie: nutrition, digestion et métabolisme». In *Physiologie animale—Mécanismes et adaptations* (Eckert R., Randall D., Burggren W., Eds.), p. 627-664, Bruxelles: De Boeck Université.

Ehrhardt, M., K. Grasshoff et K. Kremling. 1998. *Methods of seawater analysis*. Weinheim: Wiley-VCH, 650 p.

Eisenmenger M.J., J. Reyes-De-Corcuera. 2009. «High pressure enhancement of enzymes: A review». *Enzyme and Microbial Technology*, vol.45, p. 331-347.

Fickers P., J. Destain et P. Thonart. 2008. «Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, vol.12, p.119-130

Fieker, A., J. Philpott et M. Armand. 2011. «Enzyme replacement therapy for pancreatic insufficiency: present and future». *Clinical and Experimental Gastroenterology*, vol. 4, p. 55-73.

Fitter J. et J. Heberle J. 2000. «Structural Equilibrium Fluctuations in Mesophilic and Thermophilic alpha-amylase». *Biophysical Journal*, Vol. 79, p. 1629-1636.

Grasshoff, K., K. Kremling, Ehrhardt, M. 1999. «Methods of seawater analysis» (Grasshoff K., Kremling K., Ehrhardt M. Eds.), p.650, Weinheim: Wiley-VCH.

Hageman M. J. 1992. «Water sorption and solid-state stability of proteins». In *Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation* (T. J. Ahern et M. C. Manning, Eds.), p. 273-309, New York : Plenum Press.

Heremans K. et L. Smeller. 1998. «Protein structure and dynamics at high pressure». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1386, p. 353-370.

Hsiu J., E. H. Fischer et E. A. Stein. 1964. «Alpha-Amylases as Calcium-Metalloenzymes. II. Calcium and the Catalytic Activity». *Biochemistry*, 3, p. 61-66.

Ishikawa, K., I. Matsui, S. Kobayashi, H. Nakatani et K. Honda. 1993. «Substrate recognition at the binding site in mammalian pancreatic alpha-amylases». *Biochemistry*, vol. 32, p. 6259-6265.

Kadiri M. S. 2004. «Compression de poudres pharmaceutiques et interaction avec l'outillage analyse expérimentale et modélisation numérique» Thèse de doctorat, Toulouse, Institut national polytechnique de Toulouse, 21-45 p.

Krishnamurty, D. M., Rabiee A., Jagannath S. B. et Andersen D.K. 2009 «Delayed release pancrelipase for treatment of pancreatic exocrine insufficiency associated with chronic pancreatitis». *Therapeutics and clinical risk management*, Vol. 5, p. 507-520.

Kuhn, R.J., S. Eytting, F. Henniges et A. Potthoff . 2007. «*In Vitro* Comparison of Physical Parameters, Enzyme Activity, Acid Resistance, and pH Dissolution Characteristics of Enteric-Coated Pancreatic Enzyme Preparations: Implications for Clinical Variability and Pharmacy Substitution». *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, vol. 12, p. 115-128.

Kuny, T. T. 2004. «Compression Behavior of the Enzyme β -Galactosidase». Thèse de doctorat, Basel, University of Basel, 7- 34 p.

Laemmli U.K., 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature*, vol. 227, p.680-685.

Lai, M. C. et E. M. Topp. 1999. «Solid-state chemical stability of proteins and peptides». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 88, p. 489-500.

Layer, P., V.L. Go. et E.P. DiMagno. 1986. «Fate of pancreatic enzymes during small intestinal aboral transit in humans». *American Journal of Physiology*, Vol. 251, p. 475- 480.

Layer, P., M.R. vonderOhe, J.J. Holst, J.B. Jansen, D. Grandt, J. Holtmann, et H. Goebell. 1997. «Altered postprandial motility in chronic pancreatitis: role of malabsorption». *Gastroenterology*, Vol. 112, p. 1624-1634.

Lowe, M.E, J.L. Roseblum et A.W. Strauss. 1989. «Cloning and characterization of human pancreatic lipase cDNA». *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 264, p. 20042-20048.

Meal, L. 2006. «Fourier transform infrared and second derivative ultraviolet spectrometry in determining polystyrene-poly(4-methylstyrene) blend composition». *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 102, p. 3400–3403.

Morild, E. 1981. «The theory of pressure effects on enzymes». *Advances in Protein Chemistry*, vol. 34, p. 93–166.

Nagano, T., H. Mori et K. Nishinari. 1994. «Rheological properties and conformation states of beta-conglucinin gels at acidic pH». *Biopolymers*, vol. 34, p. 293–298

Noelting, G. et P. Bernfeld. 1948. «Diastatic enzymes III. Alpha-amylase: determination of activity and control of absence of alpha-amylase». *Helvetica Chimica Acta*, vol. 31, p.286-290.

- Nürnberg, E. et S. Scheler. 2000. «Compression and disintegration properties of tablets containing digestive enzymes of microbial origin/1st communication: Physicochemical behaviour of microbial enzymes under compression». *Pharmazeutische Industrie*, vol. 62, p. 630-635.
- Panick, G., R. Malessa, R. Winter, G. Rapp, K.J. Frye et C.A. Royer. 1998. «Structural characterization of the Pressure-denatured state and unfolding/refolding kinetics of staphylococcal nuclease by synchrotron small-angle X-ray scattering and fourier-transform infrared spectroscopy». *Journal of Molecular Biology*, vol. 275, p. 389-402.
- Peiqiang Y. 2005. «Protein secondary structures (α -helix and β -sheet) at a cellular level and protein fractions in relation to rumen degradation behaviours of protein: a new approach». *British Journal of Nutrition*, vol. 94, p. 655-665.
- Picker, K. M. 2002. «Influence of tableting on the enzymatic activity of different alpha-amylases using various excipients». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 53, p.181-185.
- Price, N.C. et L. Stevens. 1984. «Introduction». In *fundamentals of enzymology* (N.C.Price et L. Stevens Eds.), p.1-14, New York: Oxford University Press.
- Rinderknecht, H., I. G. Renner et C. Carmack. 1979. «Trypsinogen variants in pancreatic juice of healthy volunteers, chronic alcoholics, and patients with pancreatitis and cancer of the pancreas». *Gut*, vol. 20, p. 886-891.
- Sakarkar, D.M., R.V. Kshirsagar, S.A. Tadavi et P.K. Pawde. 2009. «Tableting compression behaviour of enzyme trypsin-chymotrypsin». *International Journal of Applied Pharmaceutics*, vol. 1, p. 30-44.
- Schulz, B., Schmidt, P. C., Stoeva, S., Voelter, W., Göckeritz, D., 1997. Tablettierung und Aktivitätsverhalten von Enzymen. *Pharmazie* 52 (10), 785-790
- Shaji, J. et V. Patole. 2008. «Protein and peptide drug delivery: Oral approaches». *Indian journal of Pharmaceutical science*, Vol. 70, p. 269-277.

Sherwood, L. 2006. «Appareil digestif». In *Physiologie Humaine*, 2^e édition (A. Lockhart Trad.), p. 465-470, Bruxelles: Editions De Boeck.

Singh, R., S. Singh et W.J., Lillard. 2008. «Past, present, and future technologies for oral delivery of therapeutic proteins». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, p. 2497-2523.

Takeuchi, T, T Matsushima et T Sugimura. 1975. «Separation of human [alpha]-amyJase isozymes by electro-focusing and their immunological properties». *International journal of clinical chemistry*, vol. 60, p. 207-213.

Teng, C.D. et Groves M.J. 1988. «The effect of compactional pressure on urease activity». *Pharmaceutical Research*, vol. 5, p. 776-780.

The United States Pharmacopoeia 29 National Formulary 24. 2006. «Pancreatin» p. 1629

The United States Pharmacopoeia 29 National Formulary 24. 2006. «711» Dissolution, p. 2673.

The United States Pharmacopoeia 29 National Formulary 24. 2006. <1216> Tablet Friability, p. 3046.

The United States Pharmacopoeia 29 National Formulary 24. 2006. <1174> Powder flow p. 3017.

Tozaki, H., I. Komoike, C. Tada, T. Maruyama, A. Terabe, T. Suzuki, A. Yamamoto et S. Muranishi. 1997. «Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 86, p. 1016-1021.

Van de Weert, M., J. A. Hering et P. I. Haris. 2005. «Fourier transform infrared spectroscopy». *Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals* (W. Jiskoot et D. Crommelin Eds.), p.131-167, Arlington: American Association of Pharmaceutical Scientists.

Vander, A. J., J.H. Sherman, D.S. Luciano et R. Brière. 1995 (b). «La digestion et l'absorption des aliments». In *Physiologie Humaine – 3^e édition* (A.J. Vander, Sherman J.H., Luciano D.S. et Brière R. Ed.), p. 537-574, Montréal: Les Éditions de la Chenelière inc.

Verger, R., G.H. de Hass, L. Sarda et P. Desnuelle. 1969. «Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity». *Biochim Biophys Acta*, vol.188, p. 272-282.

Voet, D., et Voet J.G. 2005. «Les mécanismes de l'action enzymatique». *Biochimie* 2^e édition, (G. Rousseau et L. Domenjoud Trad.) p. 457-496, Bruxelles : De Boeck Université.

Whitcomb, D. C. et M. E. Lowe. 2007. «Human pancreatic digestive enzymes». *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 52, p. 1-17.

Wurster, D.E. et R.L. Ternik. 1995. «Pressure-Induced Activity Loss in Solid State Catalase». *Journal Pharmaceutical Sciences*, vol.84, p. 190-194.

Zarrintan, H.M., C.D. Teng et M.J. Groves. 1990. «The effect of compactional pressure on a wheat germ lipase preparation». *Pharmaceutical Research*, vol. 7, p. 247-250.