

Anexo I

Resumen y conclusiones

Los datos experimentales de este Anexo I indican que la formulación reivindicada, con una capsula blanda, da lugar a una emulsión meta-estable cuando se expone a medio ácido (pH 1,2 y pH 4,5). Los dos valores de pH de medio ácido corresponden con los valores encontrados por las capsulas cuando en tránsito gastrointestinal, es decir, corresponden a condiciones gástricas simuladas. Los resultados demuestran que la sustitución de una capsula blanda por una capsula dura ya no permite obtener los mismos resultados porque no se observa la formación de una emulsión.

Objetivo

Con el fin de demostrar los efectos técnicos sorprendentes de la sustitución de una cápsula dura (descrita en la publicación internacional nº WO 2008/134512, en lo sucesivo **D1**) con una cápsula blanda en una formulación tal como la reivindicada, el comportamiento de disolución de diferentes composiciones fue probado y los resultados analizados por microscopía. Las imágenes fueron tratadas y se realizaron pruebas estadísticas.

Materiales y métodos

Las siguientes muestras fueron testadas.

Tabla 1. Composición de las muestras testadas.

Muestra	Capsula	Composición farmacéutica			
1 (reivindicada)	Blanda	Calcifediol	Mygliol	EtOH	---
2 (D1)	Dura	Calcifediol (0,12%)	Mygliol (97,54%)	EtOH (2,32%)	BHT (0,02%)
3 (variante de D1)	Dura	Calcifediol (0,12%)	Mygliol (97,54%)	EtOH (2,32%)	---

El medio gástrico fue simulado empleando los siguientes materiales:

Ácido clorhídrico al 37% (vwr prolabo), dihidrogenofosfato de potasio (vwr prolabo), hidrogenofosfato disódico (Merck), hidróxido sódico (Scharlau), NaCl (Labkem), dihidrógenofosfato sódico dihidrato (vwr prolabo), ácido acético glacial, *biorelevant powders* FaSSiF, FeSSiF, FaSSGF (Biorelevant).

Los medios ácidos fueron preparados como se indica a continuación.

HCl 0,1 N

Se añadieron 16,58 mL de ácido clorhídrico (37%) a un matraz de 2 L, se ajustó el volumen con agua y el pH a un valor de $1,2 \pm 0,05$.

Tampón fosfato 0,05M pH 4,5

Se disolvieron 13,6 g de dihidrogenofosfato de potasio en 2 L de agua y el valor de pH fue ajustado a $4,5 \pm 0,05$.

Tampón fosfato pH 6,8

Se añadieron 960,78 mL de una disolución de hidrogenofosfato disódico (71,6 g/L) a 1L de una disolución de dihidrogenofosfato de potasio (27 g/L). El valor de pH fue ajustado a $6,8 \pm 0,05$ y la disolución resultante guardada a una temperatura de 2-8 °C.

Dispersión de muestras probadas en medios gástricos simulados

Las muestras con capsula dura se rellenaron con 500 µL de la formulación correspondiente y se cerraron manualmente. Para simular el comportamiento de las muestras analizadas en condiciones gastrointestinales, se usó un agitador orbital Heidolph Unimax. El agitador se mantuvo a una temperatura constante de 37 °C. Cada muestra se dispersó en matraces de 150 mL que contenían 100 mL del medio ácido correspondiente. Las muestras se añadieron a cada matraz correspondiente, se agitaron a 200 rpm durante el tiempo necesario hasta que la cápsula se abrió, se desintegró o perdió todo su contenido. Las muestras se dejaron estabilizar durante 1 minuto y se tomaron alícuotas para observaciones microscópicas.

Cada muestra se caracterizó con 5 imágenes de microscopio y cada imagen se analizó con el software ImagePro Plus 6.0 para la medición del diámetro de los glóbulos.

Para proporcionar evidencia adicional de que solo la formulación como la reivindicada produce una emulsión de calcifediol, se realizó un análisis estadístico de la formación de glóbulos (mediante imágenes microscópicas).

Resultados

Muestra 1 (invención reivindicada)

En el medio ácido a pH 1,2, la capsula blanda de la invención requiere un tiempo promedio de 20-45 minutos hasta presentar señales de ruptura y perder su contenido. Esto se hace evidente ya que la solución inicialmente incolora se vuelve naranja con el tiempo. Cuando la capsula blanda de la invención se expone a un medio ácido de pH 4,5, el tiempo medio requerido para que la capsula pierda su contenido aumenta hasta 30-45 minutos.

Las observaciones de microscopio revelan pequeños glóbulos, confirmación de que las cápsulas de capsula blanda de la invención proporcionan la liberación de calcifediol como una emulsión. El análisis de las imágenes ópticas y la representación en histograma revelan que la capsula blanda de la invención libera glóbulos de tamaños comprendidos entre 1 μm y 6 μm para la muestra expuesta a un medio a pH 1,2 y glóbulos de tamaños comprendidos entre 1 μm y 20 μm para la muestra expuesta a un medio a pH 4,5.

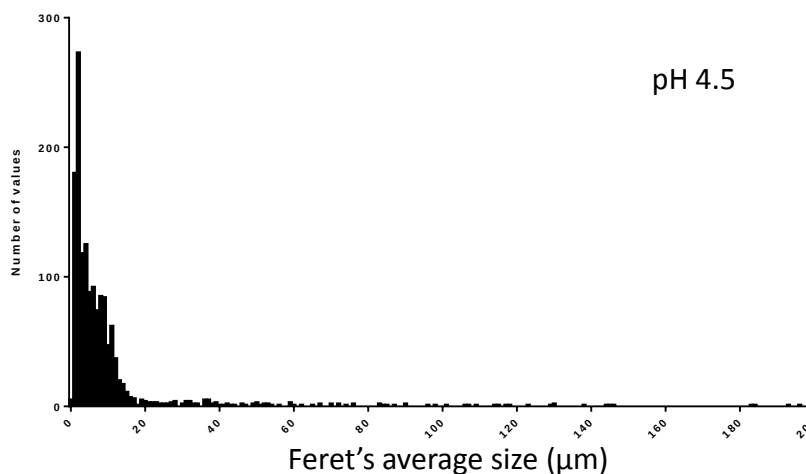
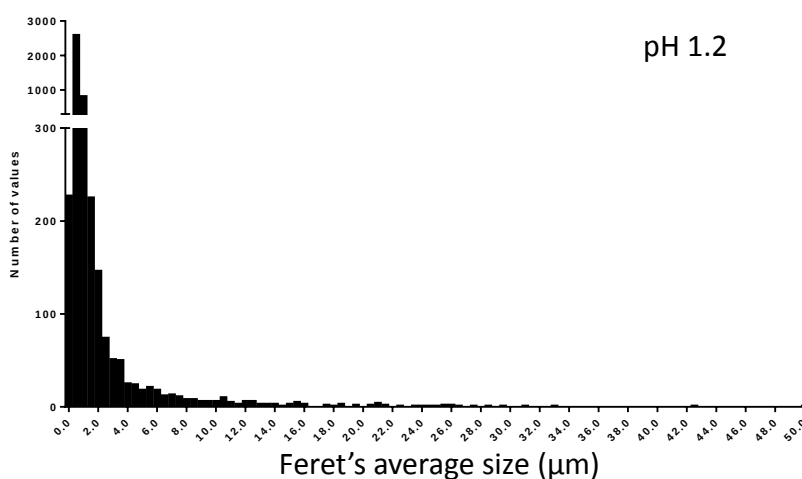


Figura 1. Distribución del tamaño de globulo (μm) de una muestra de la presente invención cuando expuesta a un medio ácido (pH 1,2 y 4,5).

Muestra 2 (según D1)

En medio ácido a pH 1,2, la formulación de capsula dura se disgrega en menos de 10 minutos, y la solución resultante es totalmente transparente, en contraste con la emulsión turbia que se observa para el caso de las cápsulas blandas de la invención. Las imágenes de microscopio revelan la ausencia de glóbulos, confirmación de que la formulación de capsula dura en D1 no produce una emulsión. Se obtienen resultados similares cuando la capsula dura se somete a un medio ácido a pH 4,5. En este caso, la capsula dura también se desagrega en menos de 10 minutos. Los tamaños promedio de partículas medidos a partir del análisis de imágenes microscópicas se representan en la Figura 2.

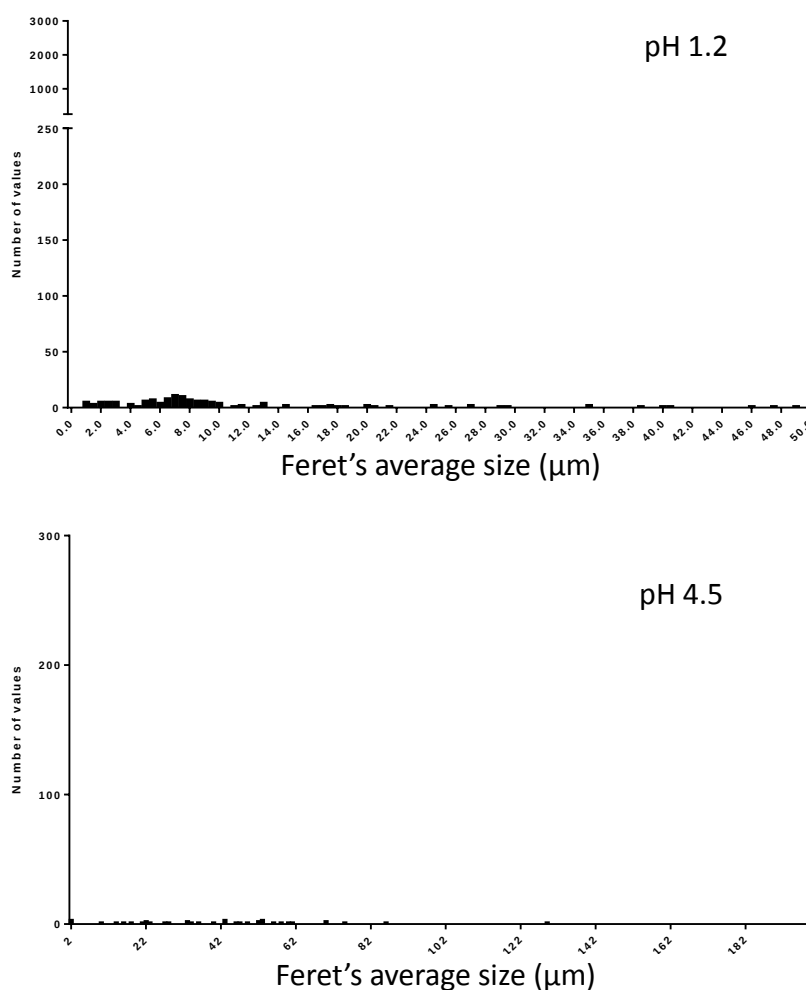
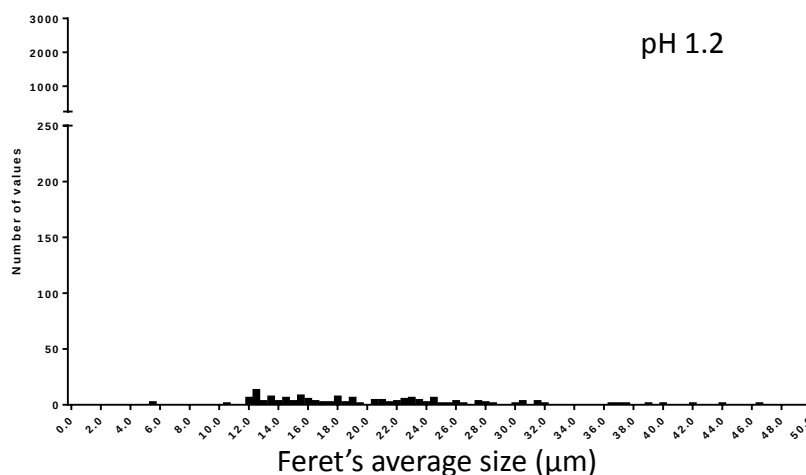


Figura 2. Distribución del tamaño de globulo (μm) de una muestra de capsula dura de D1 cuando expuesta a un medio ácido (pH 1,2 y 4,5).

Muestra 3 (variante de la divulgación en D1)

Con el fin de demostrar que el efecto técnico sorprendente de la presente invención surge de la sustitución no arbitraria de una capsula dura por una capsula blanda, la formulación de capsula dura descrita en D1 se adaptó para acercarse aún más a la formulación actualmente reivindicada mediante la eliminación del antioxidante BHT.

Los resultados son similares a los obtenidos para la muestra 2 (formulación divulgada en D1). Por lo tanto, en medio ácido a pH 1,2, la formulación de capsula dura se disgrega en menos de 10 minutos, y la solución resultante es totalmente transparente, en contraste con la emulsión turbia que se observa para el caso de las cápsulas blandas de la invención. Las imágenes de microscopio revelan la ausencia de glóbulos, confirmación de que la formulación de capsula dura no produce una emulsión. Se obtienen resultados similares cuando la capsula dura se somete a un medio ácido a pH 4,5. Los tamaños promedio de partículas se muestran en la Figura 3.



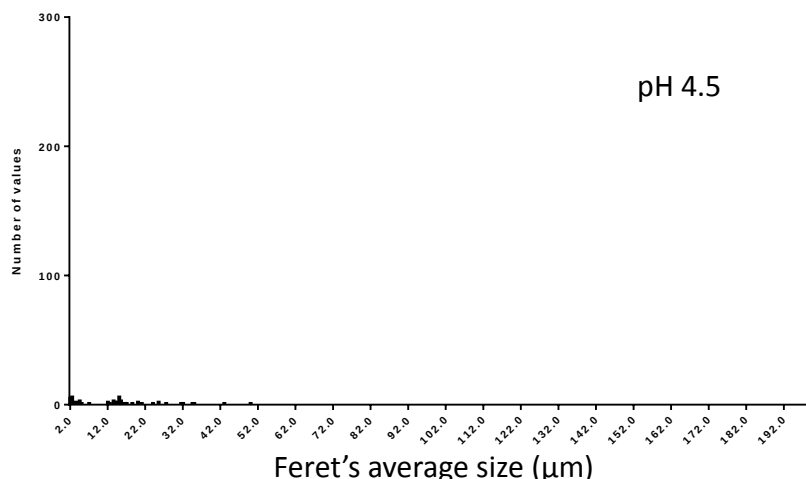


Figura 3. Distribución de tamaño de globulo (μm) para una muestra correspondiente a las formulaciones de capsula dura de D1 pero sin el antioxidante BHT, expuestas a medio acido (pH 1,2 y 4,5).

Análisis estadístico de los resultados

Al disponer del número de distribución de partículas en función de los tamaños promedio (ver las figuras anteriores), se realizó un análisis estadístico para garantizar que los resultados fuesen estadísticamente significativos. Los resultados que se muestran a continuación revelan que la cápsula blanda (muestra 1, tal como reivindicada) proporciona una diferencia estadísticamente significativa en el número de glóbulos de tamaño medio $<10 \mu\text{m}$ en comparación con glóbulos de tamaño medio $>10 \mu\text{m}$. Esta diferencia no se observó para las muestras comparativas 2 y 3.

Los resultados obtenidos cuando las muestras fueron sometidas al medio gástrico simulado a pH 1,2 están resumidos en la tabla 2 y representados en la Figura 4.

Tabla 2. Número de glóbulos separados por tamaño ($10 \mu\text{m}$) para las muestras 1, 2 y 3 sometidas a un medio ácido a pH 1,2.

Muestra	Número de globulos	
	$< 10 \mu\text{m}$	$> 10 \mu\text{m}$
1	4342	84
2	101	35
3	2	143

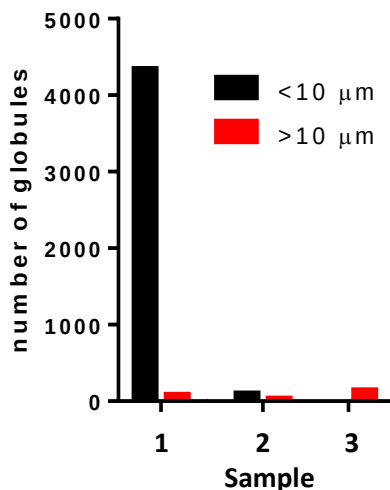


Figura 4. Número de globulos de tamaño inferior (negro) y superior (rojo) a 10 μm para las muestras 1, 2 y 3 en medio ácido a pH 1,2.

De forma similar a la anterior, los resultados obtenidos cuando las muestras se enviaron al medio gástrico simulado a pH 4,5 se resumen en la tabla 3 y se representan en la Figura 5.

Tabla 3. Número de glóbulos separados por tamaño (10 μm) para las muestras 1, 2 y 3 sometidas a un medio ácido a pH 4,5.

Muestra	Número de globulos	
	< 10 μm	> 10 μm
1	1171	287
2	4	34
3	20	36

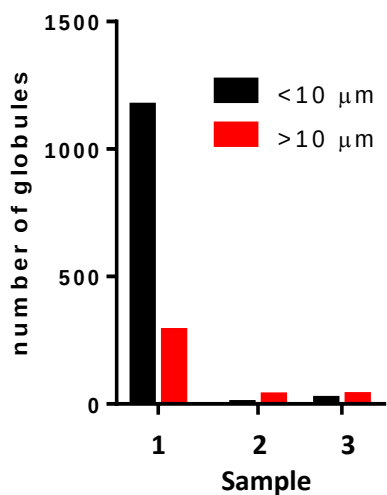


Figura 5. Número de globulos de tamaño inferior (negro) y superior (rojo) a 10 μm para las muestras 1, 2 y 3 en medio ácido a pH 4,5.

De la misma manera que la anterior, se realizaron análisis estadísticos adicionales comparando el número de glóbulos de tamaño medio $<5 \mu\text{m}$ con glóbulos de tamaño medio $>5 \mu\text{m}$. Los resultados obtenidos cuando las muestras se sometieron a medio gástrico simulado a pH 1,2 se resumen en la tabla 4 y se representan en la Figura 6.

Tabla 4. Número de glóbulos separados por tamaño (5 μm) para las muestras 1, 2 y 3 sometidas a un medio ácido a pH 1,2.

Muestra	Número de glóbulos	
	$< 5 \mu\text{m}$	$> 5 \mu\text{m}$
1	4233	172
2	33	39
3	0	96

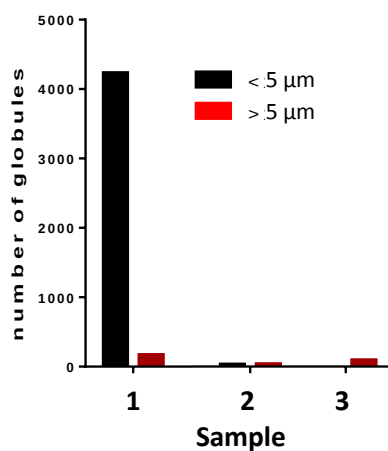


Figura 6. Número de globulos de tamaño inferior (negro) y superior (rojo) a 5 μm para las muestras 1, 2 y 3 en medio ácido a pH 1,2.
