



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 875**

51 Int. Cl.:

A61K 38/11 (2006.01)	A61K 38/21 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)	A61K 38/23 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)	A61K 38/28 (2006.01)
A61K 38/29 (2006.01)	A61K 31/575 (2006.01)
A61K 9/46 (2006.01)	A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)	A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08754187 .6**

96 Fecha de presentación : **01.05.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2155229**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.02.2010**

54

Título: **Composición para suministro transmucosal de polipéptidos.**

30

Prioridad: **01.05.2007 US 927006 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.05.2011

73

Titular/es: **CEPHALON, Inc.**
41 Moores Road P.O. Box 4011
Frazer, Pennsylvania 19355, US

72

Inventor/es: **Durfee, Steve, L. y**
Thurman, Gary, B.

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 359 875 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para suministro transmucosal de polipéptidos.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a los campos de la biotecnología y la química farmacéutica. En particular, la invención se refiere al suministro oral transmucosal de polipéptidos biológicamente activos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Es sabido que algunos polipéptidos farmacéuticamente activos son útiles en el campo médico en una diversidad de terapias. Los avances en la biotecnología han permitido la producción en gran escala de polipéptidos naturales y recombinantes para fabricación de productos en la industria farmacéutica. Se ha reconocido, sin embargo, que algunos polipéptidos son candidatos deficientes para la ruta de administración gastrointestinal oral debido a su tendencia a la descomposición en el tracto digestivo. De acuerdo con ello, la terapia con polipéptidos se ha realizado típicamente por la ruta parenteral, v.g. infusión o inyección.

Se ha desarrollado la administración transmucosal de fármacos, con inclusión de polipéptidos, utilizando formas de dosificación con composiciones que mejoran la absorción transmucosal. Por ejemplo, Igari *et al.*, Patentes U.S. Núms. 5.725.852 y 5.482.706 describen la administración mucosal de polipéptidos en asociación con citidina-colina-difosfato. Otro método para suministro transmucosal de polipéptidos, por ejemplo, se describe en Acharya *et al.*, Patente U.S. No. 6.210.699, utilizando polivinil-pirrolidona sin plastificar como mucoadhesivo. La absorción transvaginal de polipéptidos se describe en Fujii *et al.*, Patente U.S. No. 5.238.937, en donde el promotor de absorción incluye polioxietilenoalquilfenil-éter y ácido cólico.

Es bien sabido que la absorción oral transmucosal está asociada con ciertas ventajas, tales como posibilidad de auto-administración, comienzo más rápido de concentración en plasma y efecto terapéutico, y evitación del metabolismo de primer paso del ingrediente activo. Se han desarrollado diversas formas de dosificación para el suministro oral transmucosal de ciertos ingredientes activos a través de las mucosas, v.g., sublingual, bucal, gingival, palatal, y de los tejidos mucosales esofágicos. Dichas formas de dosificación han sido diseñadas para desintegración rápida y concentraciones elevadas del ingrediente activo a fin de efectuar la absorción en la cavidad oral.

Se ha explorado también la administración oral transmucosal de polipéptidos. Por ejemplo, la administración bucal de polipéptidos se describe en Heiber *et al.*, Patentes U.S. Núms. 5.863.555 y 5.766.620, en donde se administra por vía bucal un polipéptido insulino-trópico semejante a glucagón, en asociación con un mejorador de la permeación tal como sales biliares.

Una forma de dosificación oral formulada específicamente para absorción oral transmucosal de ciertos opiáceos tales como fentanilo, ha sido desarrollada bajo el nombre comercial FENTORA[®] utilizando la tecnología ORAVESCENT[®] (disponible de CIMA LABS., Inc., Eden Prairie, Minnesota). Esta tecnología ha sido descrita en las Patentes U.S. Núms. 6.200.604 y 6.974.590, por ejemplo, así como en las Solicitudes de Patente U.S. Publicadas Núms. 2005/0169989 (Núm. de Serie 1/026.132 presentada el 30 de diciembre de 2004); 2005/0142197 (Serial No. 1/026.327 presentada el 30 de diciembre de 2004); 2005/0142198 (Núm. de Serie 1/027.353 presentada el 30 de diciembre de 2004); y 2005/0163838 (Núm. de Serie 11/026.759 presentada el 30 de diciembre de 2004). Esta tecnología particular utiliza una formulación de excipientes que contiene una sustancia de ajuste del pH y un par efervescente para facilitar el transporte transmucosal del ingrediente activo citrato de fentanilo. No obstante, se encuentra en curso la identificación de otros compuestos farmacéuticamente activos que podrían beneficiarse de la administración de la forma de dosificación oral efervescente de ORAVESCENT[®].

Existe necesidad en el campo farmacéutico de formas de dosificación que alcancen éxito y mejoren el suministro de moléculas grandes, con inclusión de polipéptidos, a través del tejido mucosal oral. Existe necesidad adicional de formulaciones que consigan eficazmente el suministro transmucosal para estructuras moleculares mayores, con inclusión de polipéptidos.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona una composición que mejora la absorción transmucosal de polipéptidos a través del tejido mucosal oral y proporciona un comienzo terapéutico eficaz relativamente rápido de la misma. Se ha descubierto que puede prepararse una composición que mejora la absorción transmucosal de

polipéptidos proporcionando concentraciones terapéuticas en suero al receptor. Se ha descubierto también que la combinación de formas de dosificación transmucosal efervescentes con sales biliares tales como taurocolato (de sodio) puede mejorar significativamente la absorción de polipéptidos cuando se formulan de acuerdo con la invención. La combinación de composiciones efervescentes y sales biliares puede tener un efecto sinérgico sobre el transporte de polipéptidos a través de la mucosa oral, produciendo con ello resultados de biodisponibilidad que son mayores que la suma de sus efectos individuales de mejora de la absorción.

La invención proporciona una composición para absorción oral transmucosal que comprende un polipéptido biológicamente activo; una sal biliar; y un componente excipiente efervescente que comprende un par efervescente. La composición puede comprender opcionalmente además una sustancia de ajuste del pH, v.g., como parte del componente excipiente efervescente o como parte de la composición oral transmucosal. En algunas realizaciones, la composición comprende una forma de dosificación oral sólida, v.g., una tableta.

La invención proporciona adicionalmente una composición que comprende: un polipéptido biológicamente activo; una sal biliar; y un componente excipiente efervescente que comprende un par efervescente para uso en un método de mejora de la absorción transmucosal de un polipéptido biológicamente activo; la composición puede comprender además opcionalmente una sustancia de ajuste del pH.

La invención proporciona una composición oral transmucosal que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina, un componente excipiente efervescente; y una sal biliar, para uso en métodos de tratamiento de la diabetes en un receptor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención se ilustra adicionalmente por las figuras siguientes - ninguna de las cuales debe interpretarse como necesariamente limitante de la invención.

Las Figuras 1 a 15 son gráficos de barras que muestran la permeabilidad comparativa de diversos polipéptidos en combinación con diferentes composiciones excipientes utilizando tejido de cultivo de células epiteliales *in vitro*.

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de amilina por sí sola, en combinación con una sal biliar, en combinación con una composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. La amilina marcada por fluorescencia se mide por detección de fluorescencia.

La Figura 2 es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de la calcitonina de salmón por sí sola, en combinación con una sal biliar, en combinación con composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. La calcitonina marcada por fluorescencia se mide por detección de fluorescencia.

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de GLP-1 por sí solo, en combinación con una sal biliar, en combinación con composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. El GLP-1 marcado por fluorescencia se mide por detección de fluorescencia.

La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de insulina por sí sola, en combinación con una sal biliar, en combinación con composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. La insulina marcada por fluorescencia se mide por detección de fluorescencia.

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de glucagón en sí mismo, en combinación con una sal biliar, en combinación con composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. El glucagón marcado por fluorescencia se mide por detección de fluorescencia.

La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de PTH por sí sola, en combinación con una sal biliar, en combinación con composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. La PTH marcada por fluorescencia se mide por detección de fluorescencia.

La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de oxitocina por sí sola, en comparación con una sal biliar, en combinación con composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. La oxitocina marcada por fluorescencia se mide por detección de fluorescencia.

5 **La Figura 8** es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de Arg-vasopresina (desmopresina) por sí solo, en combinación con una sal biliar, en combinación con composición efervescente, y en combinación a la vez con la sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. La desmopresina marcada por fluorescencia se mide por detección de fluorescencia.

10 **La Figura 9** es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de PYY por sí solo, en combinación con una sal biliar, en combinación con composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. La PYY marcada por fluorescencia se mide por detección de fluorescencia.

15 **La Figura 10** es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de calcitonina de salmón por sí solo, en combinación con una sal biliar, en combinación con composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. La calcitonina de salmón se mide por kit y técnica ELISA.

20 **La Figura 11** es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de desmopresina (Arg-vasopresina) por sí solo, en combinación con una sal biliar, en combinación con una composición efervescente, y en combinación a la vez con una sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. La desmopresina se mide por LC/MS/MS.

La Figura 12 es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de interferón-alfa-2b en sí mismo, en combinación con una sal biliar, en combinación con composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. El interferón alfa-2b se mide por kit y técnica ELISA.

25 **La Figura 13** es un gráfico de barras que muestra la relación de intensificación (ER) *in vitro* de insulina (In-FITC) en diferentes condiciones a la permeabilidad de la misma concentración de insulina administrada sola. Las condiciones se expresan en combinación con sal biliar, en combinación con composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar y composición efervescente de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. Diversas sales biliares testadas incluyen taurocolato (TC), glicolato (GC) (sic), glicodesoxicolato (GDC), taurodesoxicolato (TDC), colato (C), tauroquenodesoxicolato (TCDC), y tauroursodesoxicolato (TUDC) de sodio. La In-FITC se mide por detección de fluorescencia.

30 **La Figura 14** es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de IGF-1 por sí solo, en combinación con una sal biliar, en combinación con una composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar (a diversas concentraciones) y composición efervescente. IGF-1 se mide por kit y técnica ELISA.

35 **La Figura 15** es un gráfico de barras que muestra la permeabilidad *in vitro* de HRPO-b en sí mismo, en combinación con una sal biliar, en combinación con composición efervescente, y en combinación a la vez con sal biliar y composición efervescente. HRPO-b se mide por el aumento de densidad óptica debido a la conversión de un sustrato específico por HRPO-b.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que la expresión "oral transmucosal", en el contexto del suministro y la absorción de fármacos, hace referencia a la fase pre-peristáltica de la absorción del fármaco por uno o más de los tipos de tejido mucosal asociados con la cavidad oral, *v.g.*, las regiones sublingual, bucal, gingival, palatal, y esofágica de tejido oromucosal. De modo más específico, lo que debe entenderse por la expresión es que la ruta de suministro primario del ingrediente activo tiene lugar a través del tejido mucosal de la cavidad oral. Debe entenderse que el término más amplio "transmucosal" hace referencia al suministro y la absorción tal como tiene lugar a través del tejido mucosal, abarcando el tejido mucosal de la boca, el recto o la vagina.

50 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "aproximadamente" hace referencia a un intervalo de valores de $\pm 10\%$ de un valor especificado, y equivalentes funcionales del mismo a no ser que se excluya

específicamente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "aproximadamente 50 mg" incluye $\pm 10\%$ de 50, o sea desde 45 mg a 55 mg.

5 Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que la expresión "polipéptido biológicamente activo" hace referencia a polipéptidos, péptidos y proteínas, y se refiere a una forma polímera de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden incluir aminoácidos codificados y no codificados, modificados química o bioquímicamente o aminoácidos derivatizados, y polipéptidos que tienen cadenas principales de péptidos modificados. El término incluye proteínas de fusión, con inclusión, pero sin carácter limitante, de proteínas de fusión como una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias conductoras heterólogas y homólogas, con o sin residuos metionina N-terminales; proteínas marcadas inmunológicamente; y análogos. Los polipéptidos biológicamente activos útiles en la presente invención incluyen, sin limitación, citoquinas, factores de crecimiento, factores hematopoyéticos, hormonas, enzimas, anticuerpos, antígenos, alérgenos y análogos. Los polipéptidos biológicamente activos comparten la actividad fisiológica asociada con el polipéptido base. Los polipéptidos biológicamente activos pueden tener cualquier longitud, v.g., desde aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos; desde aproximadamente 10 a aproximadamente 15 60 aminoácidos; desde aproximadamente 25 a aproximadamente 75 aminoácidos; desde aproximadamente 50 a aproximadamente 150 aminoácidos; desde aproximadamente 75 a aproximadamente 250 aminoácidos; desde aproximadamente 100 a aproximadamente 400 aminoácidos; desde aproximadamente 200 a aproximadamente 600 aminoácidos, y mayores.

20 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" debe entenderse que hace referencia a la cantidad determinada que se requiere para producir el efecto fisiológico propuesto y asociada con el ingrediente activo dado, tal como se mide de acuerdo con métodos y técnicas farmacocinéticos establecidos, para la ruta de administración dada.

25 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "forma de dosificación oral", cuando se utiliza en el sentido general, incluye tabletas, cápsulas, caplets, geles, cremas, películas, sprays, y análogas, susceptibles de desintegración/disolución por vía oral. Debe entenderse que la forma de dosificación oral de la invención incluye la composición farmacéutica de la invención como una forma de dosificación oral sólida que comprende un polipéptido biológicamente activo, acompañado por una formulación de excipientes que facilita y mejora la absorción oral transmucosal del ingrediente activo.

30 Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término "sustancialmente", a no ser que se defina de otro modo, hace referencia a una propiedad específica, característica o variable que cumple los criterios establecidos de tal modo que un experto en la técnica entendería que se consigue el beneficio a alcanzar, o la condición o propiedad deseada.

35 En general, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende una composición efervescente en combinación con una sal biliar, e incluye un polipéptido biológicamente activo como el ingrediente activo. La composición de la invención puede comprender adicionalmente una sustancia de ajuste del pH. En algunas realizaciones, la combinación de ingredientes, es decir, el ingrediente activo y los excipientes utilizados en la forma de dosificación, funcionan colectivamente para mejorar la absorción transmucosal del ingrediente activo, v.g. la relación de C_{max} a dosis, y/o reducción de la dosis realizada, de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, el uso de una composición efervescente y una sustancia de ajuste del pH, como parte de un componente excipiente efervescente, en asociación con una sal biliar tal como taurocolato de sodio, proporciona ventajas significativas para el suministro y/o la absorción de polipéptidos. En algunas realizaciones, se utilizan juntas una composición efervescente y sustancias de ajuste del pH para aumentar el suministro y/o la absorción de polipéptidos.

45 La composición de la invención puede prepararse y/o administrarse en forma de polvo o como una forma de dosificación oral, v.g. una tableta. Es también posible suministrar la composición de la invención en forma líquida. Con indiferencia de su forma, la composición se puede administrar y/o suministrar a un sitio específico de la cavidad oral en el que la composición se disuelve en el sitio de la mucosa oral a medida que entra en contacto con la saliva. En algunas realizaciones, la composición se disuelve dentro de un periodo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos. El ingrediente activo se transporta a través de o atraviesa la mucosa oral al menos en el área en la que se administró la composición. En algunas realizaciones, la composición comprende una formulación de excipiente efervescente, una sal biliar, y un polipéptido farmacéuticamente activo, y puede administrarse y/o suministrarse a los sitios sublingual, bucal, gingival, palatal, y/o esofágico del tejido oromucosal.

En algunas realizaciones, los polipéptidos biológicamente activos son transportados a través del tejido mucosal y absorbidos para efectuar su efecto biológico.

5 Una gran diversidad de actividades biológicas directas e indirectas asociadas con diversos polipéptidos pueden utilizarse para una extensa gama de tratamientos o terapias diversos; dichas terapias incluyen, pero sin carácter limitante, terapia con antibióticos, terapias hematopoyéticas, terapias antialérgicas, terapias hormonales, terapias de suplemento de polipéptidos, ensayos diagnósticos, terapias antidepresivas y psicotrópicas, terapias antitumorales, terapias antiarrítmicas, terapias con vasodilatadores, terapias con vasoconstrictores, terapias antihipertensivas, prevención y control de la diabetes, terapias anti-coagulantes, actividades supresoras del apetito, control de glucosa en sangre, control de glucemia, saciedad, terapias anti-infectivas, terapias osteoporóticas, vacunas, y análogas. Estos tratamientos o terapias podrían realizarse después del transporte con éxito del polipéptido apropiado a través de la mucosa y al torrente sanguíneo del receptor.

15 Polipéptidos biológicamente activos adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, anilina, calcitonina derivada del salmón (s-CT), péptido 1 afín a glucagón (GLP-1), glucagón, hormona paratiroidea (PTH1), oxitocina, desmopresina (8D-Arg-vasopresina), insulina, proteína YY (PYY), citoquinas y linfoquinas tales como IFN α , IFN β , IFN γ , y análogas. Un listado de diversos polipéptidos pueden encontrarse en Igari *et al.*, Patente U.S. No. 5.725.852.

20 Polipéptidos biológicamente activos que pueden utilizarse con la invención incluyen aquéllos que pueden transportarse a través o permear el tejido de la mucosa oral y entrar en el torrente sanguíneo para producir sus efectos asociados. En algunas realizaciones, los polipéptidos tienen un peso molecular comprendido entre aproximadamente 500 Daltons y aproximadamente 200.000 Daltons (200 kDa), o mayor. En algunas realizaciones, los polipéptidos tienen un peso molecular comprendido entre aproximadamente 1000 Daltons y aproximadamente 20.000 Daltons. En algunas realizaciones, los polipéptidos tienen un peso molecular comprendido entre aproximadamente 3000 Daltons y aproximadamente 30.000 Daltons; en otras realizaciones, los polipéptidos tienen un peso molecular comprendido entre aproximadamente 5000 Daltons y 60.000 Daltons.

En algunas realizaciones, la presente solicitud proporciona adicionalmente métodos y composiciones para suministro transmucosal de grandes compuestos y moléculas de base no peptídica, así como conjugados polipéptido-fármaco.

30 Las composiciones de la invención incluyen al menos una sal biliar. A esta porción de la composición se hace referencia también en lo sucesivo como el "componente de sal biliar" de la composición. Las "sales biliares", como se utilizan en esta memoria, hacen referencia a la forma de sal catiónica de su ácido biliar correspondiente, *v.g.*, el ácido biliar taurocólico es taurocolato (de sodio) como sal biliar. Las sales biliares que pueden utilizarse con la invención incluyen, pero sin carácter limitante, sales biliares derivadas del grupo constituido por: taurocolato (TC) de sodio, glicocolato (GC) de sodio, glicodesoxicolato (GDC) de sodio, taurodesoxicolato (TDC) de sodio, colato (C) de sodio, tauroquenedesoxicolato (TCDC) de sodio, y tauroursodesoxicolato (TUDC) de sodio, y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, se utiliza la sal biliar sal de sodio de ácido taurocólico, es decir, taurocolato de sodio. Aunque para propósitos de ilustración de la invención el sodio es el catión citado, es posible utilizar otros cationes para formar sales biliares.

45 La cantidad de sal biliar que puede utilizarse variará de acuerdo con la sal biliar particular seleccionada. En algunas realizaciones, la cantidad de sal biliar será relativamente baja, y dentro de un intervalo que va desde una concentración mínima eficaz para conseguir los beneficios de la invención, y hasta una cantidad correspondiente a la toxicidad máxima aceptable. Los parámetros de cantidad mínima y máxima de sal biliar diferirán entre las diversas sales biliares. Para el taurocolato de sodio, la cantidad que puede utilizarse para la invención puede oscilar desde aproximadamente 0,05% en peso referido a volumen hasta aproximadamente 10% en peso referido a volumen, o entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 2,0% peso referido a volumen. En algunas realizaciones, se utiliza aproximadamente 1,0% peso referido a volumen de taurocolato de sodio.

50 Las composiciones farmacéuticas preparadas de acuerdo con la invención comprenden una composición efervescente como mejorador de la penetración. Esta porción de la composición de la invención puede designarse también en esta memoria como el "componente excipiente efervescente". En algunas realizaciones, el componente excipiente efervescente comprende un par efervescente. Un par efervescente puede ser un ácido y una base que son activados por el agua o la saliva; así, cuando se expone a agua o

5 saliva, v.g., después de disolución en la boca, la activación del par efervescente da como resultado la producción de dióxido de carbono. En algunas realizaciones, el componente excipiente efervescente incluye una sustancia de ajuste del pH además del par efervescente. Una diversidad de composiciones efervescentes o componentes excipientes efervescentes pueden utilizarse en la invención. Por ejemplo, pueden utilizarse las composiciones efervescentes y componentes excipientes efervescentes descritos en la Patente U.S. No. 5.178.878 y la Patente U.S. No. 5.503.846.

10 En algunas realizaciones, los componentes excipientes efervescentes incluyen pares efervescentes que son materiales activados por el agua o la saliva que se mantienen usualmente en estado anhidro con poca o ninguna humedad absorbida, o en una forma hidratada estable. En algunas realizaciones, los pares efervescentes comprenden al menos un ácido de grado alimentario y al menos una base reactiva de grado alimentario, que puede ser un carbonato o bicarbonato.

15 Ácidos adecuados para uso en la composición excipiente efervescente incluyen ácidos de grado alimentario, anhídridos de ácido y sales ácidas. Ácidos de grado alimentario incluyen, pero sin carácter limitante, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido fumárico, ácido adípico, ácido ascórbico y ácido succínico, y anhídridos de ácido o sales de los mismos. Las sales utilizadas pueden ser sales de sodio, potasio y calcio de grado alimentario, v.g. dihidrogenofosfato de sodio e hidrogenofosfato disódico, y sales de ácido cítrico así como sulfato ácido disódico.

20 Las bases que pueden utilizarse de acuerdo con la invención incluyen, pero sin carácter limitante, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, y análogas. Pueden utilizarse también carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de magnesio y análogos en la medida en que se utilizan como parte del par efervescente, pero pueden utilizarse también en la composición efervescente como sustancia de ajuste del pH.

25 En algunas realizaciones, la cantidad del componente excipiente efervescente es una cantidad eficaz y se determina basándose en propiedades distintas de aquéllas que podrían ser necesarias para conseguir la desintegración de una tableta en la boca. En algunas realizaciones, la efervescencia se utiliza como base para mejorar la transmisión del ingrediente activo a través de las membranas mucosales por administración bucal, sublingual o gingival en la cavidad oral. De acuerdo con ello, en algunas realizaciones, la cantidad del componente excipiente efervescente está comprendida entre aproximadamente 5 y aproximadamente 85%, entre aproximadamente 15 y 60%, entre aproximadamente 30 y 45%, y entre aproximadamente 35 y 40%, basada en el peso total de la formulación. En algunas realizaciones, la proporción relativa de ácido y base depende de los ingredientes específicos, v.g. si el ácido es mono-, di- o tribásico, los pesos moleculares relativos, etc.

35 En algunas realizaciones, la sustancia del ajuste del pH es un ingrediente adicional y distinto de cualquiera de los componentes del par efervescente. Un polipéptido que es susceptible de cambios de estado de ionización puede administrarse efectuando las condiciones apropiadas para su disolución y transmisión a través de los tejidos de la cavidad oral. En algunas realizaciones, si las condiciones ideales para un fármaco particular son básicas, la adición de un exceso suficiente de un ácido fuerte adecuado como parte del componente excipiente efervescente o de la sustancia del ajuste del pH puede no estar indicada. En algunas realizaciones, se selecciona una sustancia de ajuste del pH, por ejemplo carbonato de sodio anhidro, que actúa por separado y aparte del par efervescente.

40 Pueden utilizarse diversas sustancias de ajuste del pH para proporcionar una mejora adicional de la permeación del ingrediente activo. En ciertas realizaciones, la selección de la sustancia de ajuste del pH apropiada depende del fármaco a administrar y, en particular, del pH al cual el fármaco está ionizado o no ionizado, y de si la forma ionizada o la forma no ionizada facilita la transmisión a través de la mucosa.

45 En algunas realizaciones, la sustancia de ajuste del pH es cualquier sustancia que sea capaz de ajustar el pH localizado para promover el transporte a través de la mucosa en cantidades que den como resultado un pH comprendido generalmente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10, o entre aproximadamente 4 y aproximadamente 9. El pH es el "pH localizado" en el microentorno del área de contacto de la superficie de la mucosa oral y la forma de dosificación (o porciones de la misma cuando ésta se desintegra/disuelve) una vez puesta en la boca del receptor.

50 En algunas realizaciones, el pH localizado puede determinarse caracterizando inicialmente los cambios dinámicos de pH exhibidos por las tabletas utilizando medida de pH *in vitro*. El método consiste en la utilización de 0,5-10 ml de solución salina tamponada con fosfato en un tubo de ensayo de tamaño apropiado.

do u otro recipiente similar. Puede prepararse un volumen de 1 litro de solución salina tamponada con fosfato por disolución de 9,0 g de cloruro de sodio, 0,6 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 0,78 g de fosfato de sodio dibásico (anhidro) en aproximadamente 1000 ml de agua desionizada, y ajuste del pH a $7,0 \pm 0,05$ a la temperatura ambiente por adición de hidróxido de sodio 1N con agitación. El ajuste debería requerir aproximadamente 0,5 ml. La cantidad de medio utilizada depende del tamaño de la tableta y la dosificación. Por ejemplo, puede utilizarse un volumen de 1 ml para una tableta que pese 200 mg. Inmediatamente después del contacto con el medio, el perfil de pH de la solución se monitoriza en función del tiempo, utilizando un electrodo de microcombinación de pH.

En algunas realizaciones, los materiales que pueden utilizarse como sustancias de ajuste del pH de acuerdo con la presente invención incluyen carbonato, bicarbonato, fosfato, hidrogenofosfato y dihidrogenofosfato. Carbonatos adecuados incluyen, sin limitación, carbonato de sodio, carbonato de potasio o carbonato de calcio. Fosfatos adecuados incluyen, sin limitación, fosfato de calcio o fosfato de sodio. En algunas realizaciones, la sustancia de ajuste del pH es carbonato de sodio. En algunas realizaciones, las sustancias de ajuste del pH, cuando se suministran en cantidad adecuada, proporcionan un cambio en el pH localizado de al menos aproximadamente 0,5 unidades de pH, 1,0 unidades de pH, o aproximadamente 2,0 unidades de pH en comparación con una formulación idéntica por lo demás pero sin la sustancia de ajuste del pH.

En algunas realizaciones, la cantidad de sustancia de ajuste del pH varía con el tipo de sustancia de ajuste del pH utilizado, la cantidad de exceso de ácido o base del par efervescente, la naturaleza de cualesquiera ingredientes restantes, y el ingrediente activo. En algunas realizaciones, la cantidad de sustancia de ajuste del pH varía desde aproximadamente 0,5 a aproximadamente 25 por ciento, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 por ciento, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 por ciento, y entre aproximadamente 7 y aproximadamente 12 por ciento en peso del peso total de la formulación.

Cuando la composición se encuentra en la forma sólida de dosificación de una tableta, en algunas realizaciones la composición comprende adicionalmente uno o más de una carga, desintegrante, y lubricante. Puede utilizarse cualquier carga o cualquier cantidad de carga con tal que las formas de dosificación resultantes alcancen los resultados descritos en esta memoria. En algunas realizaciones, las cargas son azúcar y alcoholes-azúcar, y éstas pueden incluir cargas de compresión indirecta y de compresión directa. En algunas realizaciones, las cargas de compresión indirectas, una vez formuladas, tienen características de flujo y/o compresión que las hacen poco prácticas para uso en un proceso de fabricación de tabletas a alta velocidad sin aumento o ajuste. Por ejemplo, una formulación puede no fluir suficientemente bien y por consiguiente, puede ser necesario añadir un deslizante tal como dióxido de silicio.

En algunas realizaciones, las cargas de compresión directa no requieren prestaciones similares y generalmente tienen características de compresibilidad y fluidez que permiten que las mismas se utilicen directamente. En algunas realizaciones, las cargas de compresión indirecta pueden estar dotadas de las propiedades de las cargas de compresión directa. En algunas realizaciones, las cargas de compresión indirecta tienden a tener un tamaño de partícula relativamente más pequeño cuando se comparan con las cargas de compresión directa. En algunas realizaciones, cargas tales como manitol secado por pulverización tienen tamaños de partícula relativamente menores y son sin embargo a menudo directamente compresibles, dependiendo del modo en que se procesen ulteriormente las mismas. En algunas realizaciones, las cargas son cargas de compresión indirecta de tamaño de partícula grande.

Cargas adecuadas para uso con la invención incluyen, pero sin carácter limitante, manitol, lactosa, sorbitol, dextrosa, sacarosa, xilitol y glucosa. En algunas realizaciones, la carga es manitol secado por pulverización. La cantidad de carga utilizada puede variar desde aproximadamente 10 a aproximadamente 80 por ciento, desde aproximadamente 25 a aproximadamente 80 por ciento, o desde aproximadamente 35 a aproximadamente 60 por ciento en peso de la formulación.

Pueden utilizarse también desintegrantes en la composición. En algunas realizaciones, los desintegrantes pueden permitir la reducción de la dosificación y/o el aumento de la relación entre C_{max} y dosis. En algunas realizaciones, los desintegrantes incluyen aglomerantes que tienen también propiedades desintegrantes. Desintegrantes adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona reticulada (PVP-XL), almidón-glicolato de sodio, croscarmelosa sódica, hidroxipropil-celulosa reticulada, y análogas. En algunas realizaciones, la selección del desintegrante puede depender de si pueden obtenerse o no con su utilización los resultados descritos en un sistema dado.

En algunas realizaciones, el desintegrante es un glicolato de almidón. En algunas realizaciones, el desintegrante es almidón-glicolato de sodio. Un ejemplo de un almidón-glicolato de sodio es EXPLOTAB™ (grado estándar, disponible de Roquette, de Lestrem, Francia).

5 En algunas realizaciones, la cantidad de desintegrante varía de acuerdo con factores tales como tamaño de la forma de dosificación, naturaleza y cantidad de otros ingredientes, y análogos. En algunas realizaciones, la cantidad de desintegrante está comprendida entre aproximadamente 0,25 por ciento y aproximadamente 20 por ciento en peso de la formulación final, entre aproximadamente 0,5 por ciento y aproximadamente 15 por ciento p/p, entre aproximadamente 0,5 por ciento y aproximadamente 10 por ciento p/p, o entre aproximadamente 1 por ciento y aproximadamente 8 por ciento en peso, basada en el peso de la formulación acabada.

10 En algunas realizaciones, la invención comprende adicionalmente un lubricante de fabricación de tabletas o eyección. Lubricantes adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, estearato de magnesio, ácido esteárico, estearato de calcio, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el lubricante es estearato de magnesio. En algunas realizaciones, la cantidad de lubricante es menor que 1 por ciento de la formulación en peso. En algunas realizaciones, la cantidad de lubricante es menor que aproximadamente 0,5%. En algunas realizaciones, la cantidad de lubricante puede ser mayor que aproximadamente 1,0 por ciento, mayor que 1,5 por ciento y entre aproximadamente 1,5 por ciento y aproximadamente 3 por ciento. En algunas realizaciones, el lubricante es estearato de magnesio y se utiliza aproximadamente en un 2 por ciento en peso.

20 En algunas realizaciones, la composición de la invención incluye otros excipientes convencionales en cantidades generalmente conocidas, con tal que las mismas no desvirtúen significativamente los atributos ventajosos proporcionados por la invención. Tales excipientes adicionales pueden incluir, pero sin carácter limitante, aglomerantes, edulcorantes, agentes colorantes, agentes saborizantes, deslizantes, lubricantes, desintegrantes, conservantes, y análogos.

25 En algunas realizaciones, la composición de la invención puede prepararse como una forma de dosificación oral transmucosal sólida, v.g., una tableta. Las tabletas efervescentes preparadas de acuerdo con la invención pueden ser relativamente duras o blandas. Por ejemplo, pueden prepararse tabletas que contienen la composición de la invención de acuerdo con los métodos descritos en la Patente U.S. No. 5.178.878. Cuando se prepara de acuerdo con esta técnica, la forma de dosificación puede tener una dureza menor que aproximadamente 15 Newtons. El ingrediente activo puede estar recubierto con un material protector o puede carecer de recubrimiento. Cuando se fabrican tabletas friables, las mismas pueden envasarse en envases burbuja tales como los descritos en la Patente U.S. No. 6.155.423. En algunas realizaciones, pueden fabricarse formas de dosificación duras, con una dureza mayor que aproximadamente 15 Newtons de acuerdo con el proceso descrito en la Patente U.S. No. 6.024.981. Adicionalmente, el grado del estado de polvo, v.g. la reproducibilidad y/o consistencia del tamaño de partícula, puede afectar a los resultados.

40 Las dimensiones y el tamaño de la forma de dosificación global, así como la cantidad de dosificación de ingrediente activo, pueden variar. La forma o configuración global de la forma de dosificación, tal como una tableta, puede variar. La configuración de la forma de dosificación puede ser diferente dependiendo del lugar destinado a su residencia durante la administración, v.g. bucal, gingival o sublingual. En algunas realizaciones, el tiempo de desintegración o disolución *in situ* (tiempo de residencia) alcanzado por la invención es un periodo suficiente para suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido farmacéuticamente activo a través de la mucosa. Este periodo puede ser menor que aproximadamente 30 minutos, o incluso menor que aproximadamente 20 minutos. En algunas realizaciones, el tiempo de residencia puede estar comprendido entre aproximadamente 5 minutos y 10 minutos, dependiendo de la respuesta del paciente y los ingredientes de la composición.

45 Las formas de dosificación de tabletas pueden prepararse utilizando equipos y métodos convencionales de fabricación de tabletas fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, las tabletas fabricadas de acuerdo con la invención se mezclan en seco y se comprimen directamente. En algunas realizaciones, las tabletas pueden prepararse por granulación. Pueden utilizarse técnicas de granulación en seco. Por ejemplo, puede utilizarse como carga manitol granulado. Como parte del proceso de preparación, en algunas realizaciones puede ser deseable granular o premezclar una porción de la composición antes de la mezclado y compresión final. Los materiales seleccionados se seleccionan para proporcionar la dosis y uniformidad de contenido deseadas. Así, en algunas realizaciones,

puede seleccionarse una cantidad apropiada de par efervescente, sustancia de ajuste del pH y desintegrante, y proporcionarse en cantidades predeterminadas y formularse en la forma de dosificación deseada. Cuando se utilizan lubricantes tales como estearato de magnesio, en algunas realizaciones, los mismos se añaden hacia el final del periodo de mezcladura, v.g., unos cuantos minutos antes de la cesación final de la mezcladura.

En algunos aspectos, la invención incluye también métodos de administración de un polipéptido biológicamente activo a un receptor, que comprende:

a) proporcionar una composición oral transmucosal de un polipéptido farmacéuticamente activo, composición efervescente y sal biliar;

b) situar la composición oral transmucosal en un sitio de tejido mucosal dentro de la cavidad oral del receptor; y

c) permitir que la composición se disuelva *in situ* durante un periodo suficiente para permitir la disolución de la forma de dosificación y suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido a través de la mucosa.

Debe entenderse que el término "proporcionar" incluye la retirada de la composición o su forma de dosificación del paquete o envase, y/o cualquier otro modo de dispensación que dispense la forma de dosificación. Como se ha expuesto anteriormente, las formas de dosificación preparadas de acuerdo con la invención pueden presentarse al receptor en envases burbuja. Como se utiliza en esta memoria, el término "receptor" debe entenderse que incluye mamíferos, con inclusión de humanos. El receptor, u otro individuo, puede colocar la composición entre la mejilla y la encía superior o inferior, o sublingualmente. En algunas realizaciones, la composición se proporciona con instrucciones de que la composición no debe ser chupada, masticada o tragada.

Usos terapéuticos

Pueden emplearse cierto número de usos terapéuticos con las composiciones transmucosales orales de la presente descripción, con inclusión de usos terapéuticos para control de la diabetes.

La invención proporciona una composición oral transmucosal que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina, un componente excipiente efervescente; y una sal biliar, para uso en métodos de tratamiento de la diabetes en un receptor.

La invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos que siguen, ninguno de los cuales debe interpretarse como necesariamente limitante de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Ensayo de Permeabilidad *In Vitro*

Se realizó un test de permeabilidad *in vitro* como sigue. Partiendo de inserciones acrílicas que tenían un extremo sellado con inserciones cuadradas de 0,6 cm de membranas acrílicas y de policarbonato sin células, se cultivaron células de carcinoma bucal humano (células SqCC/Y1) en la superficie de la membrana en medio de cultivo durante un periodo de 24 horas. El medio de cultivo se retiró de la parte superior de la inserción (proceso de "elevación con aire"), en el cual las células continuaron recibiendo nutrientes del medio de cultivo por debajo de las inserciones. En estas condiciones, se cultivaron las células durante un periodo de 7 a 10 días hasta que las células alcanzaron una confluencia multicapa sobre la membrana de policarbonato, aumentando con ello la densidad celular hasta una barrera multicapa, parecida a un tejido, que se asemejaba al del tejido mucosal bucal.

El ensayo se realizó lavando las inserciones con solución tampón Krebs-Ringer sin bicarbonato de sodio (KRB) e inspeccionando respecto a uniformidad por medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Cuando la resistencia eléctrica media necesaria era 350 ohms o mayor, se seleccionaron las inserciones para el test de permeabilidad, asegurando con ello el espesor de barrera de permeabilidad y la distribución coherentes.

Las inserciones se separaron en los grupos (v.g., n = 3) con valores TEER medios estrechamente similares (del grupo) a utilizar en formulaciones de test particulares de ingredientes farmacéuticos activos (es decir, polipéptidos). Para una sal biliar dada, por ejemplo, los grupos de muestra eran como sigue:

1) polipéptido solo;

5 2) polipéptido en combinación con sal biliar;

3) polipéptido en combinación con composición excipiente efervescente (Formulación de Excipiente 1) en polvo;

4) polipéptido en combinación con sal biliar (concentraciones variables y polvo de composición excipiente efervescente (Formulación de Excipiente 1)).

10 Se colocaron las inserciones en pocillos de cultivo de células con un volumen definido de KRB y se incubaron a 37°C sobre mesas de sacudidas ajustadas a 100 rpm. De este modo, las células se expusieron al ingrediente activo dado (polipéptido) sin y en combinación con las diversas formulaciones de excipiente descritas.

15 Las muestras se retiraron del fluido basolateral cada 10 minutos durante un periodo de 1 hora, y el fluido retirado se reemplazó con un volumen igual de KRB. Al final de la hora, se recuperó y se guardó el fluido residual en el interior de la inserción, se lavó la inserción con KRB, y se midió de nuevo el valor TEER. Se registraron las diferencias de TEER entre la TEER del paso inicial y la TEER del paso final.

20 Se evaluaron luego las inserciones en cuanto a citotoxicidad del tratamiento utilizando el ensayo de toxicidad MTS, y se realizaron también los efectos de los tratamientos en las muestras. El ensayo de toxicidad MTS mide la capacidad de las células vivas para convertir el compuesto de MTS tetrazolio en formazano, que absorbe la luz UV a 490 nm. La cantidad de absorbancia es directamente proporcional al número de células viables.

25 Las muestras de los pocillos basolaterales se analizaron respecto al ingrediente activo (polipéptido) utilizando diversas técnicas. La cantidad de ingrediente activo en el pocillo se calculó y se corrigió respecto a la pérdida por muestreo. A partir de este dato, se calculó la cantidad de ingrediente activo que atravesaba la barrera de células y se calculó el Coeficiente Aparente de Permeabilidad (Papp):

$$Papp = S/(A \cdot C)$$

en donde

S = pendiente de la curva de permeabilidad en la región lineal (mg/s);

30 A = área de la inserción cubierta con células (cm²);

C = concentración de ingrediente farmacéutico activo donante (mg/ml).

La Relación de Mejora (ER) es igual a la relación del Papp con el intensificador de absorción dividido por el Papp sin mejorador de absorción. Así pues, se utilizó esta técnica para cada una de las composiciones de mejora de la permeabilidad propuestas más adelante.

35 **Ejemplo 1A Preparación de las Formulaciones de Excipiente**

Formulación de Excipiente 1 (EF1)

El primer componente excipiente comprende preparar la composición efervescente en forma de polvo seco. En algunas realizaciones, la composición efervescente que se utiliza es el polvo de formulación excipiente indicado en la tabla siguiente:

Tabla 1 Componente Excipiente Efervescente Tableta de Placebo de 200 mg

Ingrediente:	Cantidad (mg)	Cantidad % peso
Manitol EZ	98	49%
Bicarbonato de sodio	42	21%
Ácido cítrico	30	15%
Carbonato de sodio	20	10%
Almidón-glicolato de sodio	6	3%
Estearato de magnesio	4	2%
Total:	200 mg	100%

Formulación de Excipiente 2 (EF2)

Se preparó una composición efervescente alternativa basada en la Formulación de Excipiente 1, excepto que se utilizó solamente el par efervescente y una sustancia de ajuste del pH. Esta formulación se preparó para la misma capacidad que los 200 mg de la Formulación de Excipiente 1:

Tabla 2 Componente Excipiente Efervescente, 92 mg de Polvo de Placebo

Ingrediente:	Cantidad (mg)	Cantidad (% peso)
Bicarbonato de sodio	42	45,7%
Ácido cítrico	30	32,6%
Carbonato de sodio	20	21,7%
Total:	92 mg	100%

Ejemplo 1B Ingrediente Activo y Componente de Sal Biliar

El segundo componente activo comprende la sal biliar taurocolato de sodio en combinación con el polipéptido biológicamente activo como se prepara en forma de solución. Por ejemplo, el ingrediente taurocolato de sodio y el polipéptido en forma seca puede reconstituirse en una solución salina tamponada. Una solución salina tamponada puede estar compuesta, por ejemplo, por Tampón Krebs-Ringer (D-glucosa) 1,8 g/l, cloruro de magnesio (anhidro) 0,0468 g/l, cloruro de potasio 0,34 g/l, cloruro de sodio 7,0 g/l, fosfato sódico dibásico (anhidro) 0,1 g/l, fosfato de sodio monobásico (anhidro) 0,18 g/l; pH ajustado a 7,4; sin utilización alguna de bicarbonato de sodio.

Así, en algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden la combinación de los componentes anteriores - componente excipiente efervescente en forma de polvo, y componente activo que contiene la sal biliar y el polipéptido biológicamente activo en solución - depositados en secuencia. La composición de dos partes componentes puede depositarse en secuencia, la composición de polvo seguida por la composición líquida, sobre el tejido mucosal.

Ejemplo 1C Preparación de la Forma de Dosificación Transmucosal Oral Sólida que Contiene Polipéptidos

Alternativamente a la composición descrita en el Ejemplo 1A y 1B, en algunas realizaciones pueden prepararse las composiciones de la invención como una forma de dosificación oral transmucosal sólida, v.g., tableta comprimida. La forma de dosificación de la tableta puede prepararse por mezcladura de la composi-

5 ción efervescente o composición excipiente efervescente, sal biliar, y polipéptido biológicamente activo en forma de polvo, seguido por compresión de la mezcla de polvos en una prensa de tabletas para formar la tableta sólida resultante. En algunas realizaciones, pueden prepararse formas de dosificación sólidas en la forma de una tableta utilizando métodos convencionales y equipo fácilmente disponible para los expertos en la técnica.

Test *in Vitro* de Utilización de Polipéptidos Marcados por Fluorescencia

10 Cuando se utiliza el ensayo de permeabilidad *in vitro*, los polipéptidos utilizados están a menudo conjugados con un resto fluorescente. En particular, el resto fluorescente utilizado se seleccionó de FAM (5(6)-carboxifluoresceína) y FITC (isotiocianato de fluoresceína). Los péptidos conjugados por fluorescencia permiten el uso de una técnica de ensayo sencilla y sensible para cualquier polipéptido dado que incluye el mismo resto, con indiferencia del peso molecular del polipéptido. Esto, a su vez, permite la evaluación de una gran diversidad y gama de polipéptidos utilizando un ensayo simple sin necesidad de desarrollar ensayos específicos para cada polipéptido particular.

15 La permeabilidad del polipéptido marcado por fluorescencia con y sin mejora se midió por el ensayo de permeabilidad *in vitro*. La cantidad de polipéptido que permeaba a través de las células/tejido al fluido basolateral se midió y se calculó el coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) para cada muestra de polipéptido. El Papp de la combinación de sal biliar (taurocolato) y el polvo efervescente se comparó con los valores Papp obtenidos con el polipéptido sólo, el polipéptido en combinación con composición efervescente sin sal biliar, y el polipéptido con sal biliar (taurocolato de sodio) sin la composición efervescente para determinar si existía sinergia entre los dos componentes mejoradores cuando se combinaban. Cuando se utilizó el taurocolato solo en el test, el polvo de taurocolato no se depositaba directamente sobre la superficie de las células para proteger contra el efecto tóxico en las células.

Ejemplo 2 Permeabilidad Comparativa *In Vitro* de la Amilina

25 Se evaluó la permeabilidad *in vitro* para el polipéptido amilina. La amilina está asociada con el control de la glucemia y el tratamiento de la diabetes. La amilina marcada con FAM es un péptido de 37 aminoácidos que tiene un PM de 4259,86 Daltons. Utilizando el modelo de cultivo de células arriba descrito, se testó la permeabilidad de amilina-FAM para las formulaciones siguientes:

Tabla 3 Formulaciones Comparativas Amilina-FAM

Ingredientes in KRB:	Cantidad	Am + EF1	Am + TC	Am + EF1 + TC
Amilina-FAM	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml
EF1	-	40 mg/ml	-	40 mg/ml
Na Taurocolato	-	-	10 mg/ml	10 mg/ml

30 Am = amilina; EF1 = Formulación de Excipiente 1; TC = taurocolato de sodio; KRB = solución tampón Krebs-Ringer.

35 Los resultados se muestran en la Figura 1. Como puede verse por los datos de la gráfica, la amilina como polipéptido activo junto con la sal biliar sola a la concentración dada no aumenta apreciablemente la absorción del polipéptido a través de tejido mucosal en el modelo *in vitro*. Análogamente, el componente excipiente efervescente (Formulación de Excipiente 1 arriba descrita en el Ejemplo 1A) solo con el polipéptido amilina-FAM tampoco mejora apreciablemente la absorción a través de la membrana del tejido mucosal.

40 La combinación de efervescencia con el 1% de sal biliar, sin embargo, mejora el transporte/permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal. Cuando se utilizan juntos, la combinación de taurocolato y componente excipiente efervescente con el polipéptido produjo un resultado de permeación mayor que la suma de los efectos de permeación individuales de la sal biliar y el componente efervescente por sí solos.

Ejemplo 3 Permeabilidad Comparativa *in Vitro* de s-CT

Se evaluó la permeabilidad *in vitro* para el polipéptido calcitonina derivado de salmón (s-CT) asociado con el metabolismo del calcio y el tratamiento de la osteoporosis. Se ha consignado también que IT es

una hormona de saciedad. s-CT marcada con FAM es un fragmento peptídico de 25 aminoácidos (8-32) que tiene un peso molecular de 3441.1 Daltons. Utilizando el modelo de cultivo de células arriba descrito, se testó la permeabilidad de s-CT-FAM para las formulaciones siguientes:

Tabla 4 Formulaciones Comparativas de s-CT-FAM

Ingredientes (en KRB):	s-CT sólo	s-CT + EF1	s-CT + TC	s-CT + EF1 + TC
s-CT-FAM	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml
EF1	-	40 mg/ml	-	40 mg/ml
Na Taurocolato	-	-	10 mg/ml	10 mg/ml

s-CT = calcitonina derivada de salmón; EF1 = Formulación de Excipiente 1; TC = taurocolato de sodio.

KRB = Solución tampón Krebs-Ringer.

Los resultados se muestran en la Figura 2. Como puede verse por los datos de la gráfica, s-CT-FAM como el polipéptido activo junto con la sal biliar sola a la concentración dada no aumenta apreciablemente la permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*. Asimismo, el componente excipiente efervescente formulación excipiente 1 arriba descrito en el Ejemplo 1A) solo con el polipéptido s-CT-FAM tampoco mejora apreciablemente la absorción a través del tejido mucosal.

En cambio, la combinación de efervescencia con el 1% de sal biliar, mejora el transporte/permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal. Cuando se utilizan juntos, la combinación de taurocolato y componente excipiente efervescente con el polipéptido parece producir un resultado de permeación mayor que la suma de los efectos de permeación individuales de la sal biliar y el componente efervescente por sí solos.

Ejemplo 4 Permeabilidad Comparativa *In Vitro* de GLP-1-FAM

Se evaluó la permeabilidad *in vitro* para el péptido 1 semejante a glucagón, conocido también como GLP-1. GLP-1 está asociado con el tratamiento de la diabetes tipo 2, así como con el control de la saciedad y la pérdida de peso. GLP-1-FAM es un péptido de 30 aminoácidos que tiene un peso molecular de 4071,71. Utilizando el modelo de cultivo de células arriba descrito, se testó la permeabilidad de GLP-1-FAM para las formulaciones siguientes:

Tabla 5 Formulaciones Comparativas de GLP-1-FAM

Ingredientes (in KRB):	GLP1 sólo	GLP1 + EF1	GLP1 + TC	GLP1 + EF1 + TC
GLP-1-FAM	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml
EF1	-	40 mg/ml	-	40 mg/ml
Na Taurocolato	-	-	10 mg/ml	10 mg/ml

GLP1 = GLP-1; EF1 = Formulación de Excipiente 1; TC = Taurocolato de sodio. KRB = solución tampón Krebs-Ringer.

Los resultados se muestran en la Figura 3. Como puede verse por los datos contenidos en el gráfico, el GLP-1-FAM como el polipéptido activo junto con la sal biliar sola a la concentración dada no aumenta apreciablemente la permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*. Análogamente, el componente excipiente efervescente (Formulación de Excipiente 1 arriba descrito en el Ejemplo 1A) solo con el polipéptido GLP-1-FAM no mejora tampoco apreciablemente la absorción a través del tejido mucosal.

En cambio, la combinación de efervescencia con el 1% de sal biliar sí mejora el transporte/permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal. Cuando se utilizan juntos, la combinación de taurocolato y componente excipiente efervescente con el polipéptido producen un resultado de permeación mayor que la suma de los efectos de permeación individuales de la sal biliar y el componente efervescente por sí solos.

Ejemplo 5 Permeabilidad Comparativa *in vitro* de Insulina-FITC

Se evaluó la permeabilidad *in vitro* para insulina. La insulina es un polipéptido de 51 aminoácidos que tiene un peso molecular de 5808 Daltons y está asociado con el tratamiento de la diabetes. La insulina utilizada para el test se conjugó con el resto fluorescente FITC (isotiocianato de fluoresceína). Utilizando el modelo de cultivo de células arriba descrito, se testó la permeabilidad de insulina-FITC para las formulaciones siguientes:

Tabla 6 Formulaciones Comparativas Insulina-FITC

Ingredientes (in KRB):	In sólo	In + EF1	In + TC	In + EF1 + TC
In-FITC	50 pM/ml	50 pM/ml	50 pM/ml	50 pM/ml
EF1	-	40 mg/ml	-	40 mg/ml
Na Taurocolato	-	-	10 mg/ml	10 mg/ml

In = insulina; EF1 = Formulación de Excipiente 1; TC = Taurocolato de sodio. KRB = solución tampón Krebs-Ringer.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Como puede verse por los datos del gráfico, insulina-FITC como el polipéptido activo junto con la sal biliar sola a la concentración dada no aumenta apreciablemente la permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*. Análogamente, el componente excipiente efervescente (Excipiente de Fórmula 1 arriba descrito en el Ejemplo 1A) solo con el polipéptido insulina no mejora tampoco la absorción a través del tejido mucosal.

En cambio, la combinación de efervescencia con el 1% de sal biliar, aumenta el transporte/permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal. Cuando se utilizan juntos, la combinación de taurocolato y componente excipiente efervescente con el polipéptido parece producir un resultado de permeación mayor que la suma de los efectos de permeación individuales de la sal biliar y el componente efervescente por sí solos.

Ejemplo 6 Permeabilidad Comparativa *in vitro* de Glucagón-FAM

Se evaluó la permeabilidad *in vitro* para glucagón, que está asociado con el tratamiento de la hipoglucemia aguda. Glucagón-FAM es un péptido de 11 aminoácidos que tiene un peso molecular de 1709,63 Daltons. Utilizando el modelo de cultivo de células arriba descrito, se testó la permeabilidad para las formulaciones siguientes:

Tabla 7 Formulaciones Comparativas Glucagón-FAM

Ingredientes (in KRB):	Gluc sólo	Gluc + EF1	Gluc + TC	Gluc + EF1 + TC
Gluc-FAM	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml
EF1	-	40 mg/ml	-	40 mg/ml
Na Taurocolato	-	-	10 mg/ml	10 mg/ml

Gluc = glucagón; EF1 = Formulación de Excipiente 1; TC = Taurocolato de sodio. KRB = solución tampón Krebs-Ringer.

Los resultados se muestran en la Figura 5. Como puede verse por los datos del gráfico, glucagón-FAM como polipéptido activo junto con la sal biliar sola a la concentración dada no aumenta apreciablemente la permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*. Análogamente, el componente excipiente efervescente (Excipiente de Fórmula 1 arriba descrito en el Ejemplo 1A) solo con el polipéptido glucagón-FAM no aumenta tampoco apreciablemente la absorción a través del tejido mucosal.

En cambio, la combinación de efervescencia con el 1% de sal biliar, mejora el transporte/permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal. Cuando se utilizaron juntos, la combinación de taurocolato y componente excipiente efervescente con el polipéptido produjeron un resultado de permeación mayor que la suma de los efectos de permeación individuales de la sal biliar y el componente efervescente por sí solos.

Ejemplo 7 Permeabilidad Comparativa *in vitro* de PTH

Se evaluó la permeabilidad *in vitro* para la hormona paratiroidea (PTH). PTH es un péptido de 38 aminoácidos asociado con el tratamiento de la osteoporosis. PTH-FAM tiene un peso molecular de 5174,2 Daltons. Utilizando el modelo de cultivo de células arriba descrito, se testó la permeabilidad de PTH-FAM para las formulaciones siguientes:

Tabla 8 Formulaciones Comparativas PTH-FAM

Ingredientes (in KRB):	PTH sólo	PTH + EF1	PTH + TC	PTH + EF1 + TC
PTH-FAM	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml
EF1	-	40 mg/ml	-	40 mg/ml
Na Taurocolato	-	-	10 mg/ml	10 mg/ml

PTH = hormona paratiroidea; EF1 = Formulación de Excipiente 1; TC = Taurocolato de sodio. KRB = solución tampón Krebs-Ringer.

Los resultados se muestran en la Figura 6. Como puede verse por los datos del gráfico, PTH-FAM como el polipéptido activo junto con la sal biliar sola a la concentración dada no aumenta apreciablemente la permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*. Análogamente, el componente excipiente efervescente (formulación excipiente 1 arriba descrita en el Ejemplo 1A) solo con el polipéptido PTH-FAM no aumenta tampoco apreciablemente la absorción a través del tejido mucosal.

En cambio, la combinación de efervescencia con el 1% de sal biliar mejora el transporte/permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal. Cuando se utilizaron juntos, la combinación de taurocolato y componente excipiente efervescente con el polipéptido producía un resultado de permeación mayor que la suma de los efectos de permeación individuales de la sal biliar y el componente efervescente por sí solos.

Ejemplo 8 Permeabilidad Comparativa *in vitro* de oxitocina-FAM

Se evaluó la permeabilidad *in vitro* para oxitocina, una hormona asociada con las contracciones del útero. Oxitocina-FAM es un péptido que tiene 9 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 1365,18 Daltons. Utilizando el modelo de cultivo de células arriba descrito, se testó la permeabilidad de oxitocina-FAM para las formulaciones siguientes.

Tabla 9 Formulaciones Comparativas oxitocina-FAM

Ingredientes (in KRB):	Oxy sólo	Oxy + EF1	Oxy + TC	Oxy + EF1 + TC
Oxy-FAM	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml
EF1	-	40 mg/ml	-	40 mg/ml
Na Taurocolato	-	-	10 mg/ml	10 mg/ml

Oxy = oxitocina; EF1 = Formulación de Excipiente 1; TC = Taurocolato de sodio. KRB = solución tampón Krebs-Ringer.

Los resultados se muestran en la Figura 7. Como puede verse por los datos del gráfico, oxitocina-FAM como el polipéptido activo junto con la sal biliar sola a la concentración dada no aumenta apreciablemente la permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*. Análogamente, el componente excipiente efervescente (Formulación Excipiente 1 arriba descrita en el Ejemplo 1A) solo con el polipéptido oxitocina-FAM no aumenta tampoco apreciablemente la absorción a través del tejido mucosal.

En cambio, la combinación de efervescencia con el 1% de sal biliar sí mejora el transporte/permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal. Cuando se utilizaron juntos, la combinación de taurocolato y componente excipiente efervescente con el polipéptido producía un resultado de permeación

mayor que la suma de los efectos de permeación individuales de la sal biliar y el componente efervescente por sí solos.

Ejemplo 9 Permeabilidad Comparativa *in vitro* de Desmopresina-FAM

Se evaluó la permeabilidad *in vitro* para 8 D-Arg vasopresina (AVP), conocida también como desmopresina. La desmopresina está asociada con la vasoconstricción y los tratamientos de terapia diurética. La desmopresina-FAM es un péptido de 9 aminoácidos que tiene un peso molecular de 1442,25 Daltons. Utilizando el modelo de cultivo de células arriba descrito, se testó la permeabilidad de desmopresina-FAM para las formulaciones siguientes:

Tabla 10 Formulaciones Comparativas AVP-FAM

Ingredientes (in KRB):	AVP sólo	AVP + EF1	AVP + TC	AVP + EF1 + TC
AVP-FAM	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml
EF1	-	40 mg/ml	-	40 mg/ml
Na Taurocolato	-	-	10 mg/ml	10 mg/ml

AVP = 8-Arg-vasopresina; EF1 = Formulación de Excipiente 1; TC = Taurocolato de sodio. KRB = solución tampón Krebs-Ringer.

Los resultados se muestran en la Figura 8. Como puede verse por los datos del gráfico, desmopresina-FAM como el polipéptido activo junto con la sal biliar sola a la concentración dada no aumenta apreciablemente la permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*. Análogamente, el componente excipiente efervescente (Formulación Excipiente 1 arriba descrita en el Ejemplo 1A) solo con el polipéptido desmopresina-FAM no aumenta tampoco apreciablemente la absorción a través del tejido mucosal.

En cambio, la combinación de efervescencia con el 1% de sal biliar sí mejora el transporte/permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal. Cuando se utilizaron juntos, la combinación de taurocolato y componente excipiente efervescente con el polipéptido producía un resultado de permeación mayor que la suma de los efectos de permeación individuales de la sal biliar y el componente efervescente por sí solos.

Ejemplo 10 Permeabilidad Comparativa *in vitro* de PYY-FAM

Se evaluó la permeabilidad *in vitro* para PYY, o proteína YY. PYY es un péptido de 34 aminoácidos asociado con el tratamiento de la obesidad. PYY-FAM tiene un peso molecular de 4407,71. Utilizando el modelo de cultivo de células arriba descrito, se testó la permeabilidad de PYY-FAM para las formulaciones siguientes.

Tabla 11 Formulaciones Comparativas PYY-FAM

Ingredientes (en KRB):	PYY sólo	PYY + EF1	PYY + TC	PYY + EF1 + TC
PYY-FAM	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml	100 pM/ml
EF1	-	40 mg/ml	-	40 mg/ml
Na Taurocolato	-	-	10 mg/ml	10 mg/ml

PYY = péptido YY; EF1 = Formulación de Excipiente 1; TC = Taurocolato de sodio. KRB = solución tampón Krebs-Ringer.

Los resultados se muestran en la Figura 9. Como puede verse por los datos del gráfico, PYY-FAM como el polipéptido activo junto con la sal biliar sola a la concentración dada no aumenta apreciablemente la absorción del polipéptido a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*. Análogamente, el componente excipiente efervescente (Formulación Excipiente 1 arriba descrita en el Ejemplo 1A) solo con el polipéptido PYY-FAM no aumenta tampoco apreciablemente la absorción a través del tejido mucosal.

En cambio, la combinación de efervescencia con el 1% de sal biliar sí mejora el transporte/permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal. Cuando se utilizaron juntos, la combinación de taurocolato y componente excipiente efervescente con el polipéptido producía un resultado de permeación mayor que la suma de los efectos de permeación individuales de la sal biliar y el componente efervescente por sí solos.

Se utilizaron también otros métodos que no empleaban polipéptidos marcados por fluorescencia para confirmar los efectos sinérgicos de mejora de la permeación de la invención.

Ejemplo 11 Análisis de s-CT por ELISA

Se midió calcitonina de salmón, o s-CT, por un kit ELISA ultrasensible DSL-10-3600 (adquirido de Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas). Utilizando esta técnica, la s-CT es capturada por un anticuerpo fijado a un plástico y se revela utilizando un anticuerpo específico unido a enzima que proporciona densidad óptica cuando se incuba con el sustrato específico de la enzima. De este modo, la cantidad de s-CT que pasaba a través de las células bucales cultivadas se midió a lo largo del tiempo y se utilizó para calcular los coeficientes de permeabilidad aparente (Papp).

Los resultados se representan en la Figura 10. Como puede verse por los datos de la figura, s-CT como el polipéptido activo combinado con la sal biliar (taurocolato de sodio) solo, o el polipéptido combinado con la composición efervescente (excipiente efervescente de fórmula 2 descrito en el Ejemplo 1A y designado como EF2) solo, no exhibe un aumento en la permeación del polipéptido s-CT a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*.

En cambio, la combinación del polipéptido s-CT, formulación efervescente y 1% o 2% de sal biliar, exhibe permeación/transporte apreciablemente mejorados del polipéptido a través del tejido mucosal. Cuando se utilizaron juntos, la combinación de taurocolato y la formulación excipiente efervescente con el polipéptido producía un resultado de permeación mayor que la suma de los efectos de permeación individuales del polipéptido con la misma sal biliar sola y la misma formulación efervescente sola.

Ejemplo 12 Análisis de Desmopresina por HPLC-MS-MS

Se desarrolló una técnica de cromatografía líquida (LC)-espectroscopia de masas (MS) para medir la cantidad de desmopresina que pasaba a través de las células bucales cultivadas a lo largo del tiempo. Se utilizaron luego estos datos para calcular el coeficiente de permeabilidad aparente (Papp). Utilizando la información recopilada de los tests comparativos, se construyó la Figura 11.

La desmopresina (8-Arg vasopresina, representada en la figura como DP) como el polipéptido activo en combinación con la sal biliar (taurocolato de sodio) a una concentración dada, o en combinación con la formulación efervescente sola (excipiente fórmula 2 arriba descrito en el Ejemplo 1A y designado también como EF2), no aumenta apreciablemente la permeación del polipéptido a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*. En cambio, la combinación del polipéptido (DP), formulación efervescente y 1% o 2% de sal biliar, exhibe una mejora apreciable del transporte/permeabilidad del polipéptido a través del tejido mucosal. Así pues, la técnica LC/MS/MS para cuantificación de péptidos respalda y corrobora generalmente los resultados observados utilizando las técnicas de polipéptidos marcados por fluorescencia descritas anteriormente en esta memoria.

Ejemplo 13 Análisis de IFN alfa-2b por ELISA

El interferón humano recombinante alfa-2b (IFN α) (peso molecular de 19.271 Daltons, que tiene 166 aminoácidos y una actividad específica de 260 millones de UI por mg de proteína (INTRON™ A, adquirido de Schering Corp., Kenilworth, New Jersey) se testó como el polipéptido biológicamente activo con la invención. IFN α es una citoquina implicada con la función inmune relacionada con infecciones virales. El polipéptido activo se midió utilizando la técnica ELISA (kit ELISA 41110-2 adquirido de PBL Interferon Source, Inc., Piscataway, New Jersey). En este ensayo, la cantidad de IFN α que pasaba a través de las células bucales cultivadas se midió a lo largo del tiempo y se utilizó para calcular el coeficiente de permeación aparente (Papp). Los datos se muestran en la Figura 11.

Como puede verse en la figura, IFN α como el polipéptido biológicamente activo en combinación con la sal biliar sola y la composición efervescente (Formulación de Excipiente 1 como se describe en el Ejemplo 1A y designado como PF1) solo no mejora apreciablemente la permeación de IFN α a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*. En cambio, la combinación de IFN α , 1% o 2% de sal biliar y composición efer-

vescente produce una mejora apreciable del polipéptido a través del tejido mucosal. La combinación de taurocolato y formulación efervescente junto con IFN α produce un resultado de permeación mayor que la suma de los efectos de permeación individuales de la sal biliar y la composición efervescente solos. Estos resultados de la técnica ELISA respaldan y corroboran generalmente los resultados observados por el ensayo de permeación de polipéptidos marcados por fluorescencia arriba descrito.

Test In Vivo de la Permeación Bucal Mejorada de Polipéptidos

Protocolo del Modelo del Perro Anestesiado

Se utilizaron modelos de perros anestesiados para evaluar la permeación transmucosal de composiciones de polipéptidos preparadas de acuerdo con la invención. Se seleccionaron perros cruzados de raza grande (15-35 kg) sexualmente maduros respecto a condiciones médicas para su cualificación. Para los tests, se anestesiaron los perros, se tumbaron sobre su costado derecho o izquierdo, y se canularon a través de la vena cefálica. Se fijó un anillo de teflón a la mucosa bucal en posición horizontal para formar un depósito. Los polipéptidos biológicamente activos a evaluar se depositaron, con o sin componentes intensificadores, sobre la mucosa bucal rodeada por el anillo. Dependiendo del experimento, los polipéptidos activos se depositaron en forma de solución, polvo seco o forma de dosificación sólida (tableta). Se tomaron muestras de sangre cada 10 minutos durante un periodo de 2 horas, tomándose muestras adicionales hasta las 4 horas dependiendo del protocolo. Las composiciones que contenían el agente activo se retiraron del depósito a los 60 minutos y el depósito se lavó dos veces.

Al cabo de 2 horas, se recupera el perro de la anestesia y se retira el anillo de su mucosa bucal. Después de la recuperación de la anestesia, se toman muestras subsiguientes de sangre de los perros despiertos. Se deja que las muestras de sangre se coagulen, se separa el suero por centrifugación, y se congela el suero a -20° o -80°C, dependiendo del protocolo hasta que se analiza respecto al contenido de polipéptido activo.

Ejemplo 14

A. Permeación Transmucosal Oral de Desmopresina

Se testó desmopresina (desamino-Cys1-D-Arg vasopresina, o D-Arg vasopresina) respecto a permeación bucal en el torrente sanguíneo por diversas formas de administración: solución, polvo, y tableta comprimida. Se testó la desmopresina con la composición efervescente EF1 (Ejemplo 1A) sola, con sal biliar (taurocolato de sodio), y con la combinación de sal biliar y composición efervescente. La desmopresina se testó adicionalmente con los ingredientes efervescentes excipientes EF1 y Ejemplo 1A), así como con la formulación efervescente básica EF2 (Ejemplo 1A).

Preparación de Tabletas de Desmopresina

Se prepararon tabletas que contenían desmopresina para el experimento por combinación de 200 mg de la formulación efervescente descrita en el Ejemplo 1A (EF1) con 20 mg de taurocolato de sodio. Esta mezcla se añadió directamente a un vial de desmopresina liofilizada. Los viales con los polvos se mezclaron durante 30 minutos y se comprimieron luego en tabletas utilizando una prensa de tabletas Piccola de 8 estaciones con diámetro circular de 5/16" (7,94 mm), herramienta con borde biselado de calibre D. Los polvos de los viales individuales se depositaron en cada matriz y se comprimieron a mano con una fuerza de compresión aproximada de 3 kN. Se habían preparado varias tabletas de test que contenían composición efervescente y sal biliar únicamente para averiguar las condiciones óptimas de prensado antes de preparar las tabletas que contenían el polipéptido activo. Las tabletas acabadas se guardaron desecadas a -20°C antes de utilizarlas en el estudio.

Las tabletas preparadas de acuerdo con lo anterior se testaron en perros por el protocolo arriba descrito. Cuando se utilizaron tabletas en el estudio, la tableta se puso directamente sobre la mucosa bucal canina y se hidrató durante 1 minuto con agua. Se tomaron muestras de sangre sucesivas y se extrajo el suero. La desmopresina se midió utilizando análisis LC/MS/MS de las muestras de suero.

La Tabla 7 contiene la información evaluada de las formulaciones y los resultados de biodisponibilidad del estudio *in vivo*.

Tabla 12a Formulaciones Comparativas *In Vivo* y Resultados

Formulación	DP sólo (solución)	DP+EF1 (solución)	DP+TC (so- lución)	DP+EF2 + TC	DP+EF1 +TC (polvo)	DP+EF1 +TC (tableta)
Desmopresina	830 µg - 415 µg/ml en 2 ml	830 µg - 415 µg/ml en 2 ml	830 µg - 415 µg/ml en 2 ml	830 µg - 415 µg/ml en 2 ml	830 µg	830 µg
EF1	-	200 mg (polvo)	-	-	200 mg (pol- vo)	200 mg
EF 2	-	-	-	93 mg (polvo)	-	-
TC	-	-	20 mg (pol- vo)	-	20 mg (polvo)	20 mg
Sol. salina añadida	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Resultados (Valores medios)						
Primera detección	No se de- tectó	No se detectó	No se de- tectó	17,5±5,0 min	10 min	10 min
Cmax	No se de- tectó	No se detectó	No se de- tectó	9,3±1,6 ng/ml	16,0±1,0 ng/ml	9,5±3,1 ng/ml
Tmax	No se de- tectó	No se detectó	No se detectó	103±15 min	75,0±7,1 min	90,0±14,1 min

DP = desmopresina; TC = taurocolato de sodio; EF1 = Formulación de Excipiente 1; EF2 = Formulación de Excipiente 2.

5 Como puede verse por los datos anteriores, la desmopresina como el polipéptido biológicamente activo en combinación con la sal biliar a la concentración dada, o con las formulaciones efervescentes, no aumenta apreciablemente la permeación del polipéptido a través del tejido mucosal en el modelo *in vivo*. En cambio, la combinación de sal biliar con la formulación efervescente, aumenta apreciablemente el transporte/permeación del polipéptido a través del tejido mucosal. La combinación de taurocolato y composición efervescente con el polipéptido produce un resultado de permeación, en tanto que no se observó resultado alguno cuando la sal biliar individual o las composiciones efervescentes se utilizaron por sí solos con desmopresina.

15 Además, aunque no se pretende quedar ligados por la teoría, parece posible que la formulación efervescente sea también eficaz para mejorar la permeación de la desmopresina cuando se utiliza en combinación con ácido taurocólico y por consiguiente puede indicar que la porción de formulación efervescente del núcleo (excipiente de fórmula 2) o la composición efervescente más general (efervescente de fórmula 1), descritas ambas en el Ejemplo 1A, pueda ser una porción eficaz para sinergia cuando se aparea con taurocolato.

B. Permeación Transmucosal Oral de la Calcitonina de Salmón

20 Se testó calcitonina de salmón (s-Ct) respecto a permeación bucal en el torrente sanguíneo de perros anestesiados con tabletas efervescentes comprimidas que contenían s-Ct y la sal biliar (taurocolato de sodio) para 0%, 2,5%, 5,0% y 10% de sal biliar. Las tabletas se prepararon utilizando técnicas y equipo similares a los arriba descritos para desmopresina. La tabla siguiente contiene la información de formulación de las tabletas evaluadas.

Tabla 12b

Formulación	No	2,5%	5%	10%
	NaTC	NaTC	NaTC	NaTC
Calcitonina de salmón	1,00	1,00	1,00	1,00
Taurocolato de sodio	0,00	5,00	10,00	20,00
Cloruro de sodio	2,17	1,63	1,09	0,00
Manitol 60	80,83	76,37	71,91	63,00
Bicarbonato de sodio	42,00	42,00	42,00	42,00
Ácido cítrico	30,00	30,00	30,00	30,00
Carbonato de sodio	20,00	20,00	20,00	20,00
Crospovidona	20,00	20,00	20,00	20,00
Estearato de Mg	4,00	4,00	4,00	4,00
TOTAL	200,00	200,00	200,00	200,00

5

Se testaron las tabletas en perros anestesiados utilizando el procedimiento descrito para desmopresina en perros. Como demuestra la tabla siguiente, existe una mejora en la permeabilidad transmucosal de s-Ct en los perros anestesiados cuando se añade NaTC a una formulación efervescente como se evidencia por un gran aumento en AUC (estimado utilizando el método de la regla del trapecio). Aunque existen diferencias de absorción entre los perros, los datos son coherentes para cada perro individual. Se produce una gran mejora en la permeabilidad por adición de 2,5% de NaTC o más a la formulación efervescente.

Tabla 12C. Efecto sobre AUC (pg min/ml) de cantidades variables de NaTC sobre la permeabilidad de sCt en tabletas efervescentes *in vivo* (todas las tabletas incluyen sCt y EF1)

Perro	Sin NaTC	2,5% NaTC	5% NaTC	10% NaTC	10% NaTC repetición
90	21.000		100.000	190.000	
95	11.000		130.000	255.000	
101		80.000	200.000	300.000	320.000
103		95.000	230.000	300.000	380.000

Ejemplo 15

A. Estudio de Permeación Comparativa de Insulina (solución) *in vivo*

5 Se testó insulina humana recombinante respecto a permeación bucal en el torrente sanguíneo en
 1.0 diversas composiciones en solución aplicadas a la mucosa bucal canina. Se testó la insulina por sí sola con
 la formulación efervescente EF1 (Ejemplo 1A), en combinación con sal biliar y con sal biliar y las formulacio-
 nes efervescentes EF1 y EF2. El procedimiento utilizado para este estudio implicaba un protocolo de tipo
 "Pinza de Glucosa", en el cual se infunde dextrosa al 5% a lo largo del tiempo en la cantidad necesaria para
 mantener niveles de glucosa en sangre relativamente constantes. La cantidad total de dextrosa se registra
 como la medida indirecta de la cantidad de insulina funcional, biológicamente activa, absorbida. Adicional-
 mente, se midió directamente la insulina absorbida, con las muestras de suero testadas para el nivel de
 insulina utilizando un kit ELISA (KAQ1251, obtenido de Biosource, Camarillo, California). La cantidad de
 insulina que pasaba a través del tejido bucal se midió a lo largo del tiempo. La insulina se testó con el exci-
 piente de fórmula 1 (EF1) así como la formulación excipiente efervescente de formula 2 (EF2). Las formula-
 ciones testadas y los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 13 Formulaciones Comparativas de Insulina *in vivo*, y Resultados

Formulación	In sola (solución)	In+EF1 (solución)	In+EF2 (solución)	In+TC (solución)	In+EF1 +TC (solución)	IN+EF2 +TC (solución)
Insulina	1 IU/kg/ml	1 IU/kg/ml	1 IU/kg/ml	1 IU/kg/ml	1 IU/kg/ml	1 IU/kg/ml
EF1	-	200 mg (polvo)	-	-	200 mg (polvo)	-
EF2	-	-	93 mg (polvo)	-	-	93 mg (polvo)
TC	-	-	-	20 mg (polvo)	20 mg (polvo)	20 mg (polvo)
Sol. salina	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Resultados (Vals. medios)						
In detectada por primera vez	60 min.	20±14 min.	15±10 min	No se detectó	13±5 min.	10 min.
Cmax	549±776 ng/ml	524±252 ng/ml	582±347 ng/ml	No se detectó	1814±638 ng/ml	1754±773 ng/ml
Tmax	80 min	75±21 min	70±12 min	No se detectó	58±5 min	60 min
Dextrosa utilizada	1164±1435 mg	235±469 mg	292±584 mg	167±18 mg	7273±4959 mg	9406±9429 mg

15

In = insulina; EF1 = Formulación de Excipiente 1; EF2 = Formulación de Excipiente de la composición efer-
 vescente 2; TC = taurocolato de sodio

B. Estudio de Permeación Comparativo de Insulina (Tableta) *in vivo*

La insulina en forma de polvo se formuló en tabletas de acuerdo con las formulaciones siguientes:

Tabla 14 Formulaciones Comparativas de Tabletas de Insulina (200 mg)

Ingrediente:	In sola (tableta)	In+EF1 (tableta)	In+TC (tableta)	In+EF1+TC (tableta)
Insulina (In)	2,86 mg	2,86 mg	2,86 mg	2,86 mg
Taurocolato de sodio (TC)	-	-	20 mg	20 mg
Manitol	173,14 mg	81,14 mg	153,14 mg	61,14 mg
Bicarbonato de sodio	-	42 mg	-	42 mg
Ácido cítrico	-	30 mg	-	30 mg
Carbonato de sodio	-	20 mg	-	20 mg
Crospovidona	20 mg	20 mg	20 mg	20 mg
Estearato de magnesio	4 mg	4 mg	4 mg	4 mg
Total:	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg

In = insulina; EF1 = Formulación de Excipiente 1; TC = taurocolato de sodio.

5 Las tabletas se prepararon utilizando una técnica y equipo similares a los arriba descritos para desmopresina, y se testaron las tabletas en perros utilizando el protocolo del modelo de perro anestesiado arriba descrito. Para el estudio canino *in vivo*, se pusieron las tabletas directamente sobre la mucosa bucal y se hidrataron durante un periodo de 1 minuto con agua. Se recogieron muestras de suero y se analizaron utilizando un kit ELISA, se analizaron los datos y se obtuvieron resultados medios. Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

10 Tabla 15 Datos de Permeabilidad in vivo para Tabletas de Insulina (200 mg)

Formulación	In sólo (tableta)	In+EF1 (tableta)	In+TC (tableta)	In+EF1+TC (tableta)
In detectada por primera vez	35±21 min	10 min	15±7 min	10 min
Cmax	428±18 pg/ml	1260±53 pg/ml	439±204 pg/ml	3503±1505 pg/ml
Tmax	90±42 min	65±7 min	55±7 min	67±12 min
Dextrosa utilizada	0	0	0	20639±7607 mg

In = insulina; EF1 = Formulación de Excipiente 1; TC = taurocolato de sodio.

Ejemplo 16 Datos Comparativos de Sales Biliares

15 Se realizó un experimento con objeto de determinar las sales biliares más eficaces que podrían funcionar con la invención. Las sales biliares candidato se seleccionaron inicialmente respecto a niveles de toxicidad en tests de cultivo de células (*in vitro*). Se preparó y se testó una solución de las sales biliares disueltas en solución tampón Krebs-Ringer y diluciones sucesivas al doble. Se realizó sobre las muestras el ensayo MTS para toxicidad (fácilmente asequible para los expertos en la técnica). Utilizando el valor Tox 50, se determinó la capacidad de mejora de las sales biliares en combinación con una cantidad definida de polvo Formulación de Excipiente 1. Se prepararon muestras en cantidades de 2X, 1X, 1/2X y 1/4X de Tox 50 y se evaluaron respecto a su capacidad de mejora de la permeabilidad solas y en combinación con aproximadamente 5 a 6 µg de la formulación excipiente efervescente (Formulación de Excipiente 1) arriba descrita. Así, se comparó la capacidad de mejora y las capacidades sinérgicas con el excipiente efervescente.

25 Se seleccionaron una extensa colección de sales biliares respecto a propiedades prospectivas de mejora cuando se combinan con las formulaciones de excipiente efervescente dentro del contexto de la

invención. De acuerdo con ello, se seleccionaron las sales biliares siguientes basándose en la evaluación prospectiva: taurocolato (TC) de sodio , glicocolato (GC) de sodio , glicodesoxicolato (GDC) de sodio , taurodesoxicolato (TDC) de sodio , colato (C) de sodio , tauroquenodesoxicolato (TCDC) de sodio, y taurodesoxicolato de sodio (TUDC), y combinaciones de las mismas.

5 La relación de mejora (ER) es la relación del coeficiente de permeabilidad aparente con el tratamiento mejorador dividido por el coeficiente de permeabilidad aparente con el ingrediente activo solo. Se realizaron esta técnica y cálculo para cada una de las sales biliares testadas.

10 Los resultados se muestran en la Figura 13. Como puede verse por los datos de la figura, para cada una de las 7 sales biliares testadas, la combinación del polipéptido activo (insulina) en combinación con la sal biliar y el componente excipiente efervescente de acuerdo con la composición de la invención, produce efectos de permeabilidad sustancialmente mayores como se indican por la ER en comparación con el agente de mejora de la permeación utilizado individualmente (es decir, la sal biliar sola o el excipiente efervescente solo).

15 Como puede verse por la Figura 13, ni la formulación que utilizaba el polipéptido en combinación con la sal biliar sola, ni el polipéptido con el componente excipiente efervescente solo, alcanza niveles de permeabilidad en la proporción de la combinación final del polipéptido (insulina) junto con sal biliar y componente excipiente efervescente a la vez. Este resultado se alcanzaba coherentemente, con indiferencia de la sal biliar que se utilizara en las formulaciones.

Ejemplo 17 Análisis de IGF-1 por ELISA

20 Se evaluó la permeabilidad *in vitro* para el Factor de Crecimiento Semejante a la Insulina-1 (IGF-1). IGF-1 se compone de 70 aminoácidos con 3 enlaces disulfuro internos. La misma tiene un peso molecular de aproximadamente 7600 Daltons. IGF-1 es un factor de crecimiento complejo con funciones múltiples. Utilizando el modelo de cultivo de células arriba descrito, se testó la permeabilidad de IGF-1. Se midió IGF-1 por un kit ELISA (DG-100, R&D Systems, Minneapolis MN). Utilizando esta técnica, IGF-1 es capturado por un anticuerpo fijado a un plástico y se revela utilizando un anticuerpo específico unido a enzima que proporciona densidad óptica cuando se incuba con el sustrato específico de la enzima. Así, la cantidad de IGF-1 que pasaba a través de las células bucales cultivadas se midió a lo largo del tiempo y se utilizó para calcular los coeficientes de permeabilidad aparente (Papp).

30 Los resultados se representan en la Figura 14. Como puede verse por los datos de la figura, IGF-1 como el polipéptido activo solo combinado con la sal biliar (taurocolato de sodio), o el polipéptido combinado con la composición efervescente (Formulación de Excipiente efervescente 2 descrita en el Ejemplo 1A y a la que se hace referencia como EF2) sola, no exhibe un aumento en la permeación del polipéptido IGF-1 a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*.

35 En cambio, la combinación del polipéptido IGF-1, EF2 y 1% de sal biliar exhibe permeación/transporte mejorados del polipéptido a través del tejido mucosal. Cuando se utilizan juntos, la combinación de taurocolato y la formulación excipiente efervescente con el polipéptido produce un resultado de permeación mayor que la suma de los efectos de permeación individuales del polipéptido con la misma sal biliar sola y la misma formulación efervescente sola. Estos resultados, utilizando un ELISA, respaldan y corroboran en general los resultados obtenidos utilizando la técnica de ensayo de permeación marcada por fluorescencia arriba descrito.

Ejemplo 18 Análisis de la Peroxidasa de Rábano Picante por Actividad Enzimática

45 Se obtuvo peroxidasa de rábano picante (HRPO-b) marcada con biotina (Sigma Chemical, St. Louis, MO). HRPO-b tiene aproximadamente 308 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 34.000 Daltons. Es una enzima común utilizada en bioensayos tales como ELISA. Se purificó de otros componentes de las muestras utilizando perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. La actividad enzimática de HRPO-b en las perlas magnéticas lavadas se midió por análisis de la conversión del sustrato peroxidasa (R&D Systems, Minneapolis, MN) a una D.O. de 450 nM. De este modo se midió la cantidad de HRPO-b que pasaba a través de las células bucales cultivadas a lo largo del tiempo y se utilizó para calcular los coeficientes de permeabilidad aparentes (Papp).

50 Los resultados se representan en la Figura 15. Como puede verse por los datos de la figura, HRPO-b como el polipéptido activo por sí solo, combinada con la sal biliar (taurocolato de sodio) sola, o el polipép-

tido combinado con la composición efervescente (excipiente efervescente de fórmula 2 descrito en el Ejemplo 1A y designado como EF2) sola, no exhibe un aumento en la permeación del polipéptido HRPO-b a través del tejido mucosal en el modelo *in vitro*.

5 En cambio, la combinación del polipéptido HRPO-b, EF2 y 1% de sal biliar exhibe permeación/transporte mejorados del polipéptido a través del tejido mucosal. Cuando se utilizan juntos, la combinación de taurocolato y la formulación de excipiente efervescente con el polipéptido producen un resultado de permeación mayor que la suma de los efectos de permeación individuales del polipéptido con la misma sal biliar sola y la misma formulación efervescente sola. Estos resultados, utilizando actividad enzimática intacta, respaldan y corroboran generalmente los resultados obtenidos utilizando la técnica del ensayo de permeación marcada por fluorescencia arriba descrito.

10 Los datos experimentales descritos anteriormente en esta memoria respaldan una interacción sinérgica entre los ingredientes del componente efervescente, la sal biliar, y los ingredientes de polipéptido biológicamente activo de las composiciones de la invención. Aunque no se desea quedar ligados con la teoría, se cree que la formulación de excipiente efervescente interacciona con el ingrediente de la sal biliar de una manera que facilita el transporte de los polipéptidos a través de la mucosa como ruta de suministro del fármaco. Otra posible explicación puede ser que la combinación de los efectos individuales del componente efervescente y la sal biliar sobre el tejido mucosal creen una permeabilidad celular total neta mayor.

Aplicabilidad Industrial

20 La invención es útil en el suministro de diversos polipéptidos por la ruta de suministro oral transmucosal a los receptores. Adicionalmente, la invención puede utilizarse en los campos médico, farmacéutico o nutricional.

25 La invención se ha descrito anteriormente en esta memoria con referencia a realizaciones y técnicas diversas y específicas. Sin embargo, una persona experta en la técnica comprenderá que pueden hacerse variaciones y modificaciones razonables de dichas realizaciones y técnicas sin desviarse significativamente del alcance de la invención tal como se define por las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición transmucosal que comprende:
 - a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido biológicamente activo;
 - b) un componente excipiente efervescente; y
 - c) una sal biliar.
- 5 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual el polipéptido tiene un peso molecular comprendido entre aproximadamente 500 Daltons y aproximadamente 200 kiloDaltons.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la cual el polipéptido tiene un peso molecular comprendido entre aproximadamente 1000 Daltons y aproximadamente 20.000 Daltons.
- 10 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual dicho componente excipiente efervescente comprende un ácido y una base.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la cual dicho componente excipiente efervescente comprende ácido cítrico y bicarbonato de sodio.
- 15 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual dicha sal biliar se selecciona del grupo constituido por taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, glicodesoxicolato de sodio, taurodesoxicolato de sodio, colato de sodio, tauroquenodesoxicolato de sodio, y tauroursodesoxicolato de sodio, y combinaciones de los mismos.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la cual dicha sal biliar es taurocolato de sodio.
- 20 8. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual dicho componente excipiente efervescente comprende adicionalmente una sustancia de ajuste del pH.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la cual la sustancia de ajuste del pH es un carbonato.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en la cual la sustancia de ajuste del pH es carbonato de sodio.
- 25 11. La composición transmucosal de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente un desintegrante.
12. La composición de acuerdo con la reivindicación 11, en la cual dicho desintegrante es un glicolato de almidón.
- 30 13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la cual dicho glicolato de almidón es almidón-glicolato de sodio.
14. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 11, en la cual dicho polipéptido biológicamente activo se selecciona del grupo constituido por amilina, calcitonina derivada de salmón rosa (s-CT), péptido 1 semejante a glucagón (GLP-1), glucagón, hormona paratiroidea (PTH), oxitocina, y desmopresina (D-Arg vasopresina).
- 35 15. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 11, en la cual dicho polipéptido biológicamente activo se selecciona del grupo constituido por insulina, proteína YY (PYY), IFN- α , IFN- β , e IFN- γ .
16. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para uso en un método de mejora de la absorción transmucosal del polipéptido biológicamente activo.
- 40 17. Una forma de dosificación oral sólida que comprende una composición oral transmucosal de acuerdo con la reivindicación 1.
18. La forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 17, en la cual dicho componente excipiente efervescente comprende adicionalmente una sustancia de ajuste del pH.

19. La forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 17, en la cual dicho polipéptido es insulina.

20. Una composición oral transmucosal que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina, un componente excipiente efervescente, y una sal biliar para uso en un método de tratamiento de la diabetes en un receptor que se encuentra en necesidad de ello.

5

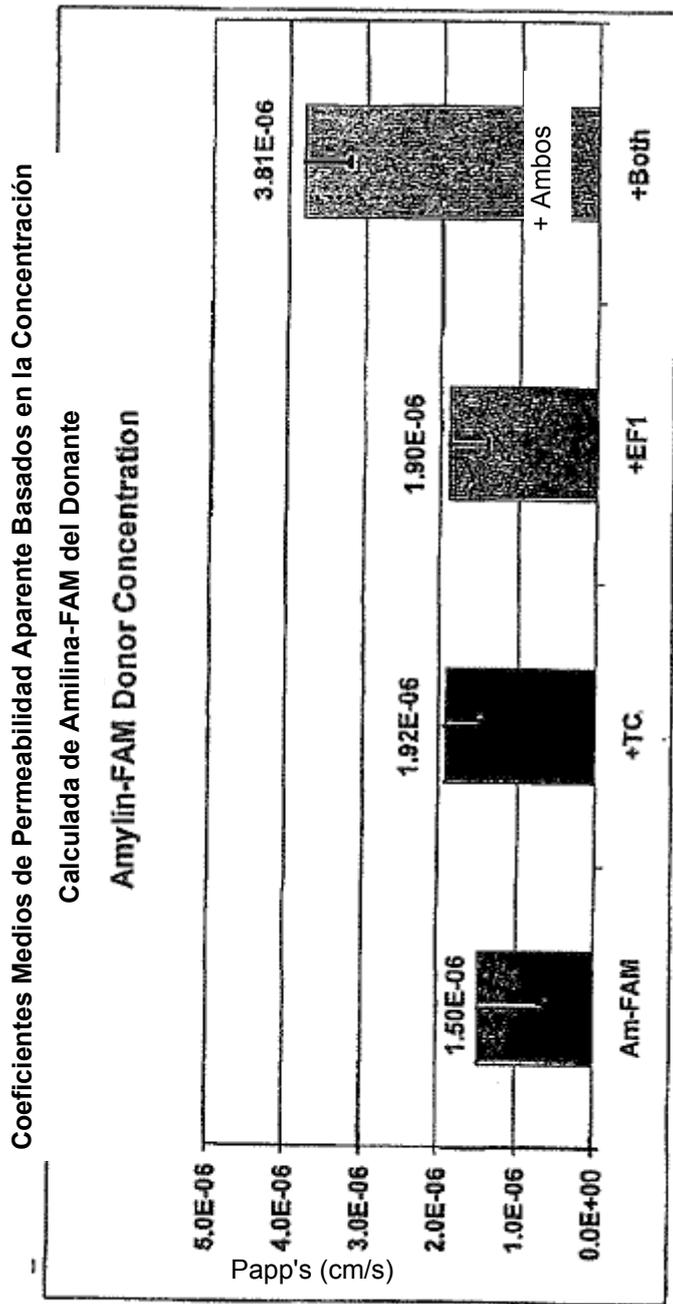


FIG. 1

Coefficientes Medios de Permeabilidad Aparente Basados en la Concentración Calculada s-Calcitonina-FAM del Donante y Datos de Fluorescencia

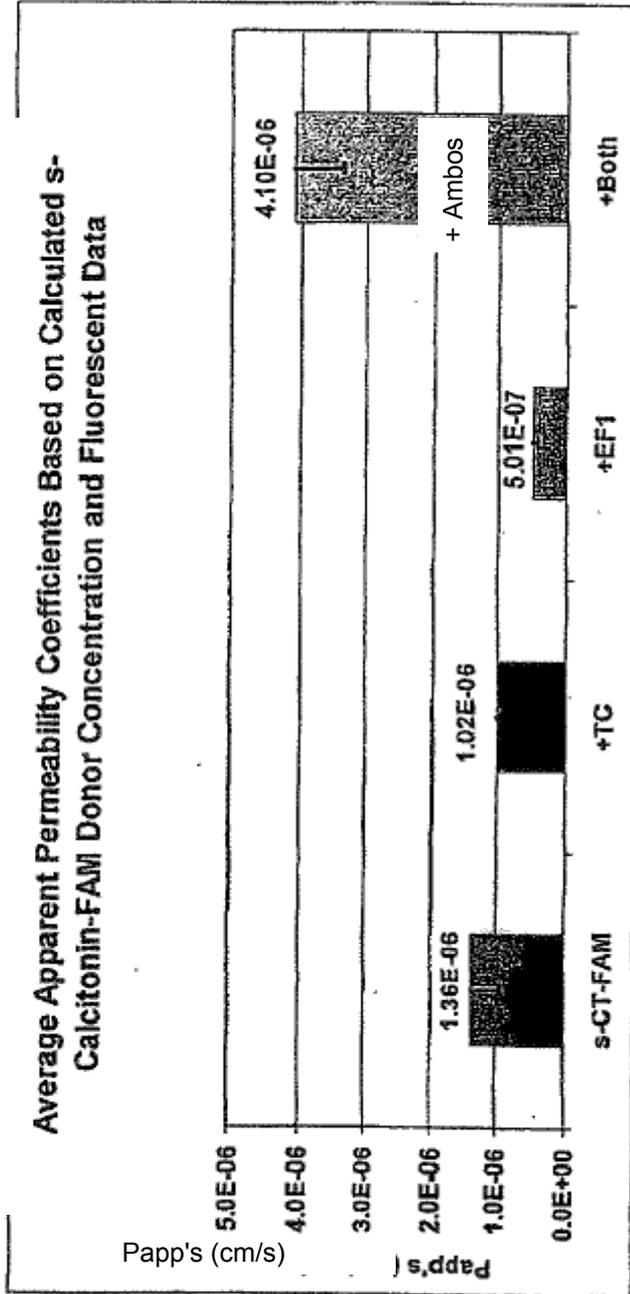


FIG. 2

Coeficientes Medios de Permeabilidad Aparente Basados en la Concentración Calculada de GLP-1-FAM del Donante

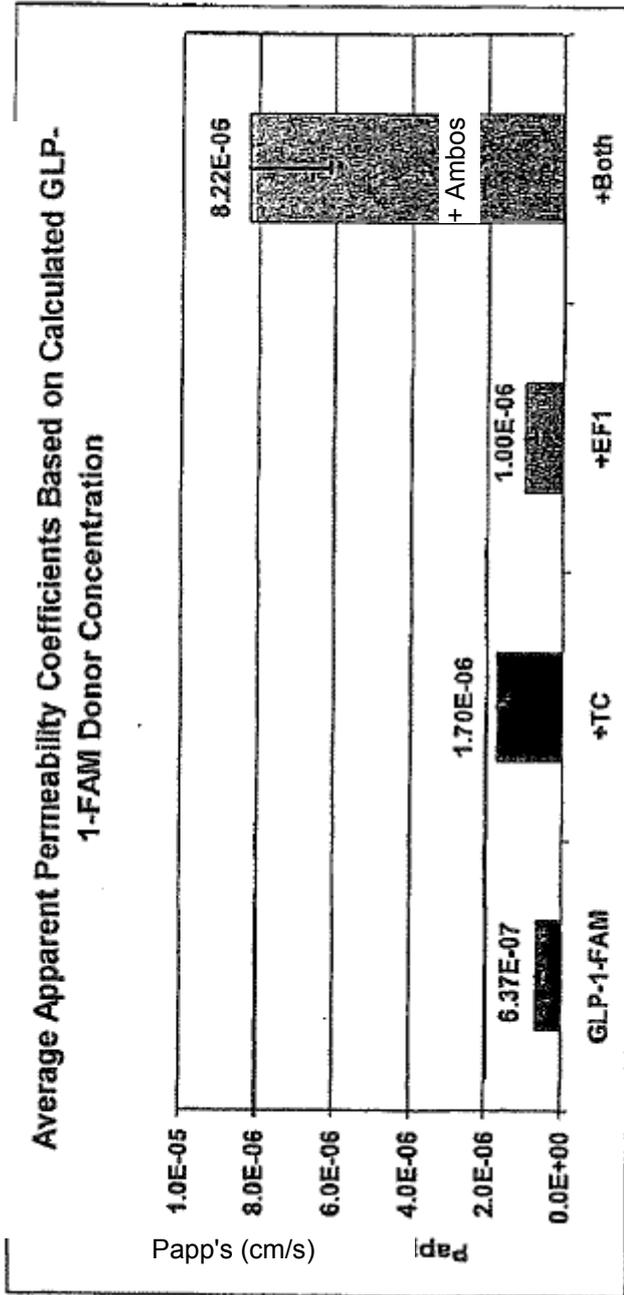


FIG. 3

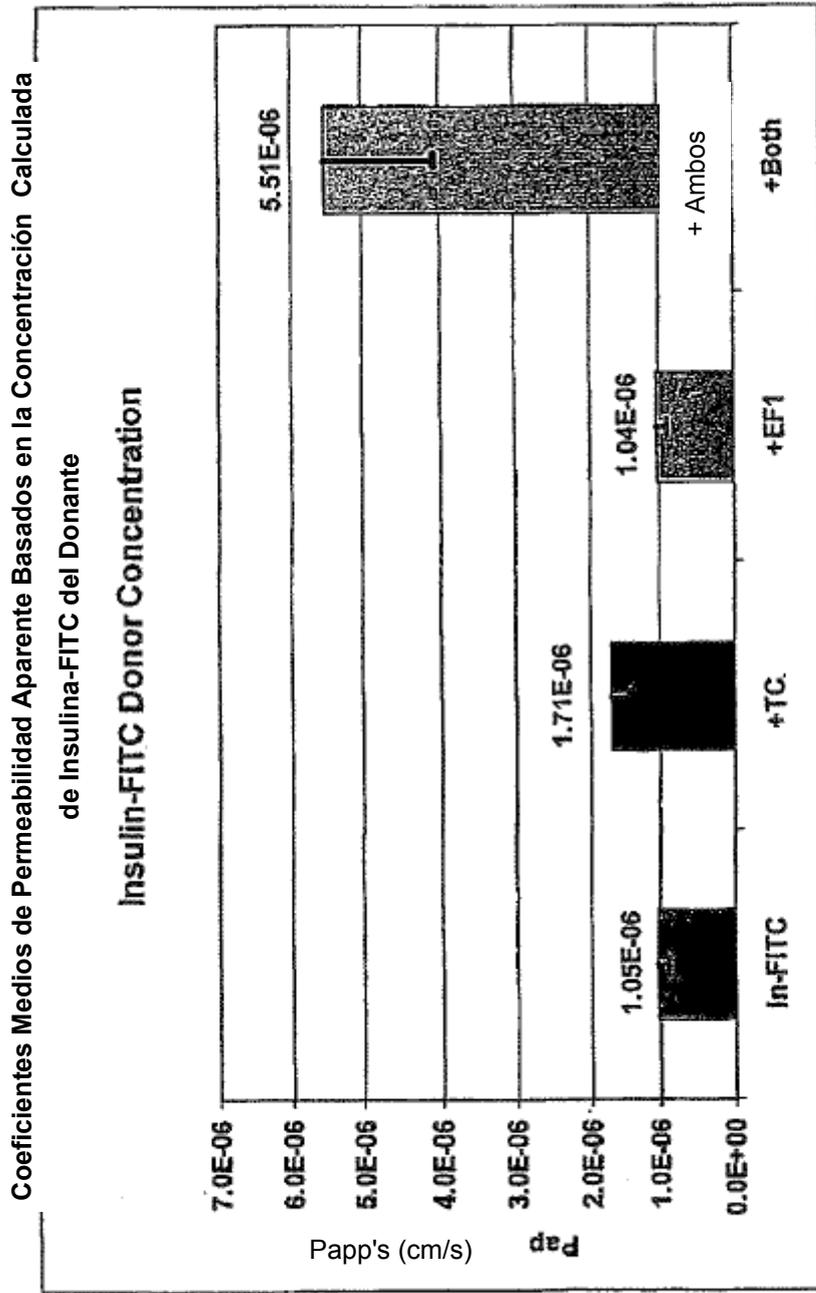


FIG. 4

Coefficientes Medios de Permeabilidad Aparente Basados en la Concentración

Calculada de Glucagón-FAM del Donante

Average Apparent Permeability Coefficients Based on Calculated
Glucagon-FAM Donor Concentration

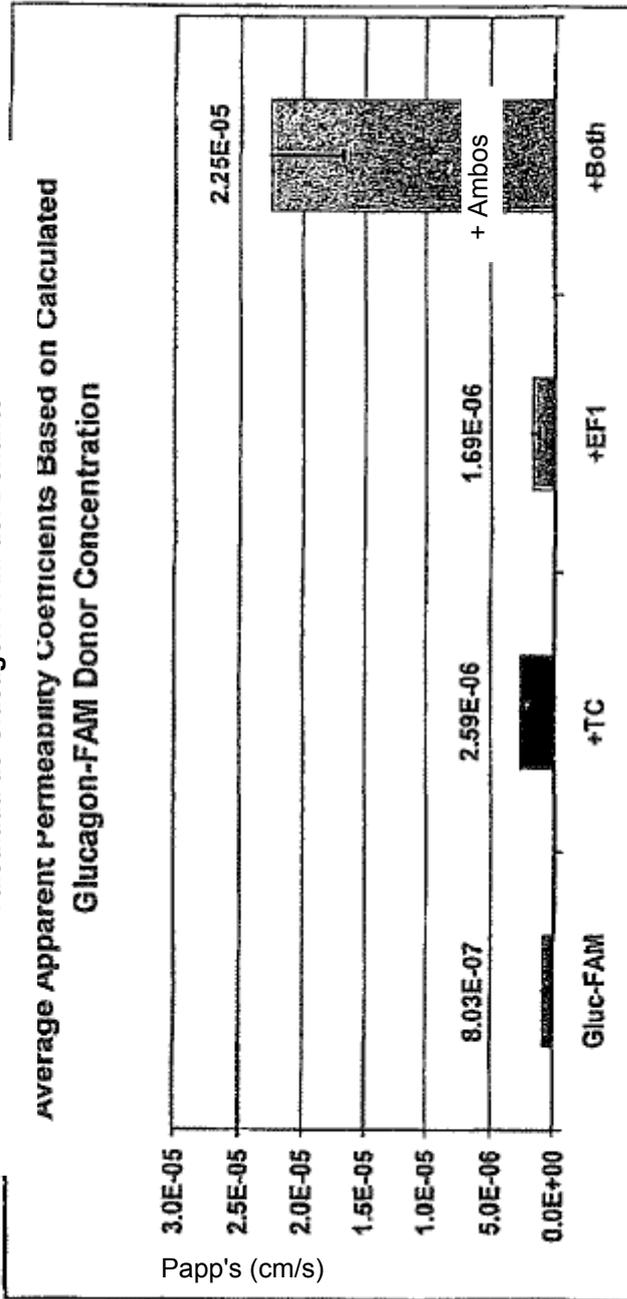


FIG. 5

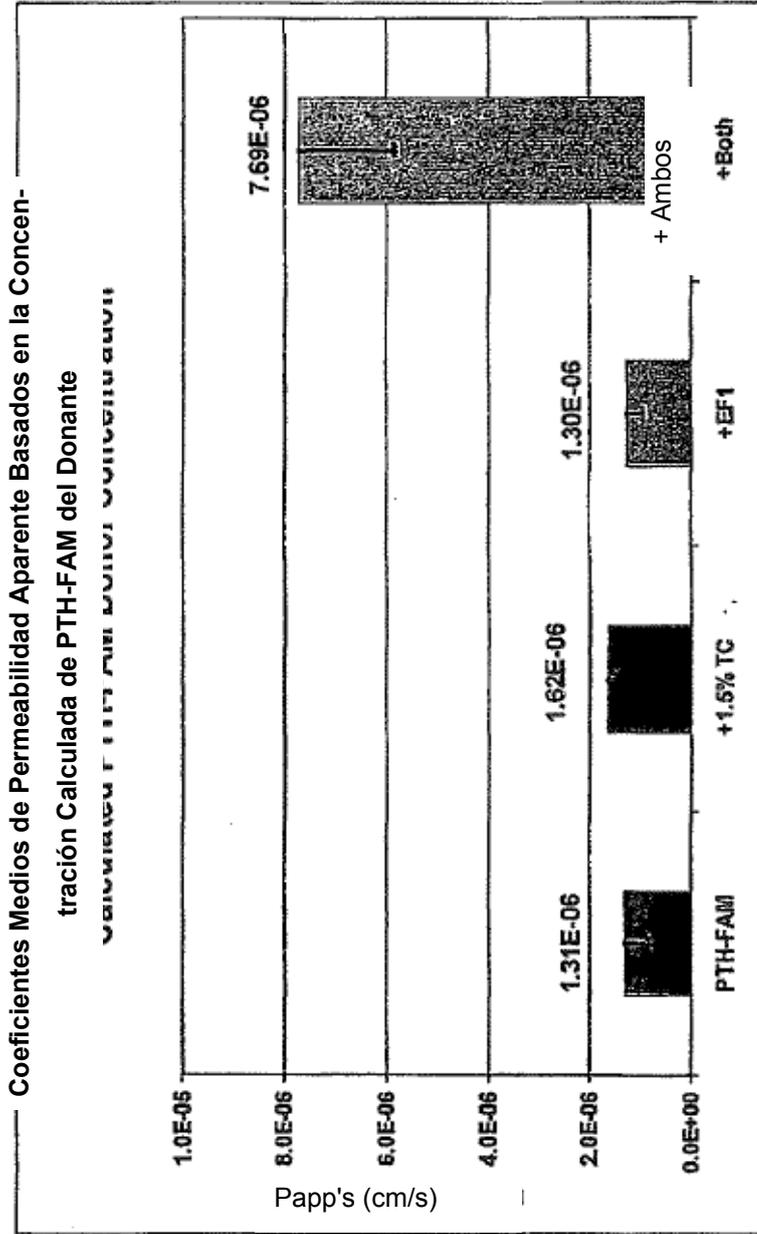


FIG. 6.

Coeficientes Medios de Permeabilidad Aparente Basados en la Concentración
 Calculada de Oxitocina-FAM del Donante

Average Apparent Permeability Coefficients Based on Calculated
 Oxytocin-FAM Donor Concentration

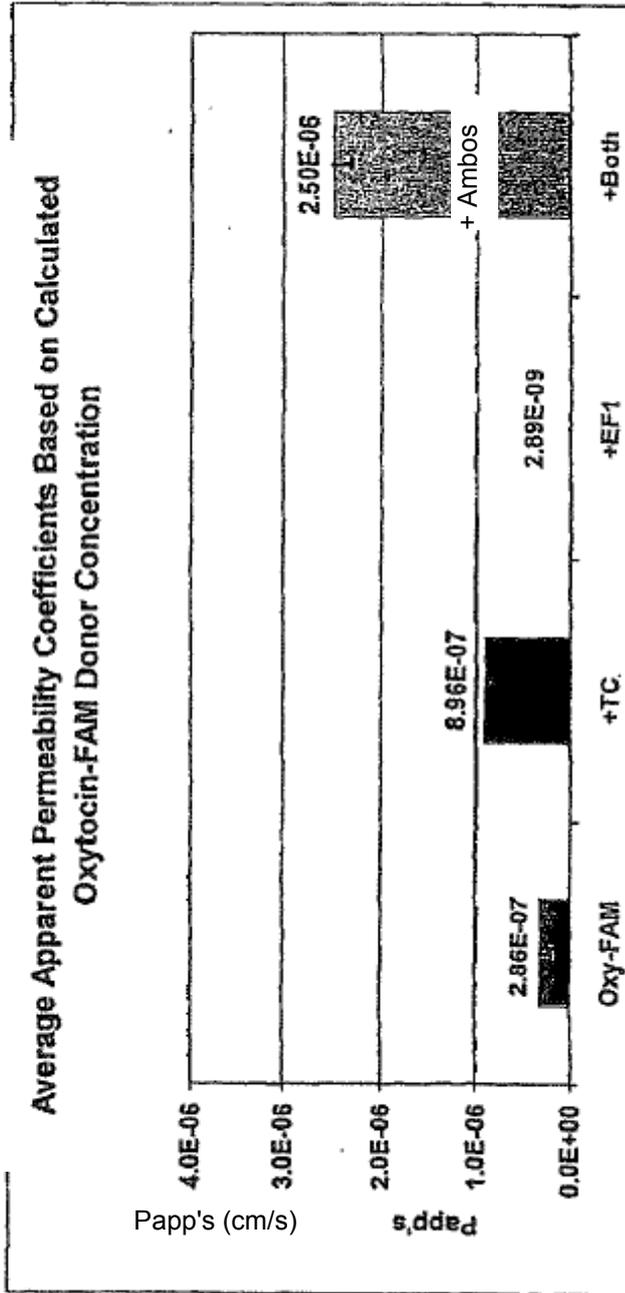


FIG. J

Coefficientes Medios de Permeabilidad Aparente Basados en la Concentración Calculada de AVP-FAM del Donante

Calculated AVP-FAM Donor Concentration

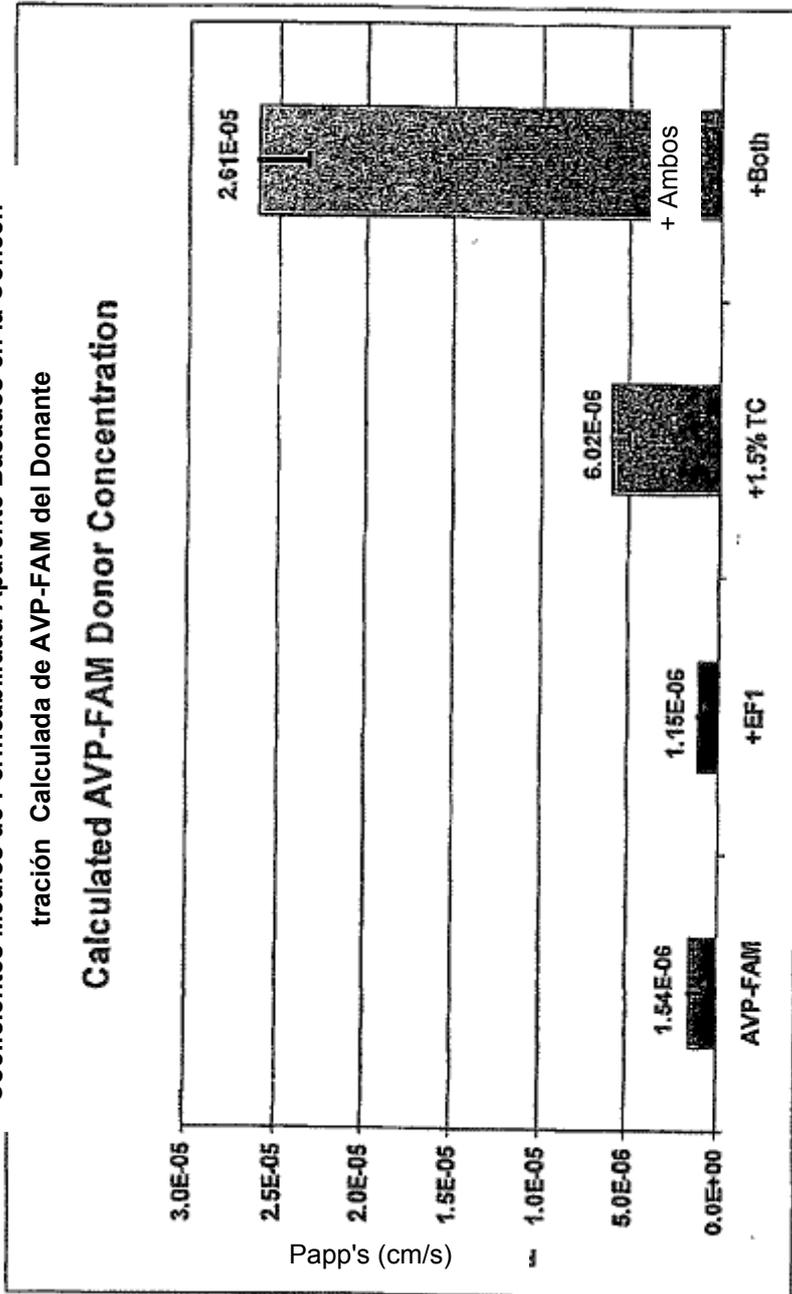


FIG. 8.

Coefficientes Medios de Permeabilidad Aparente Basados en la Concentración Calculada de Péptido YY-FAM del Donante

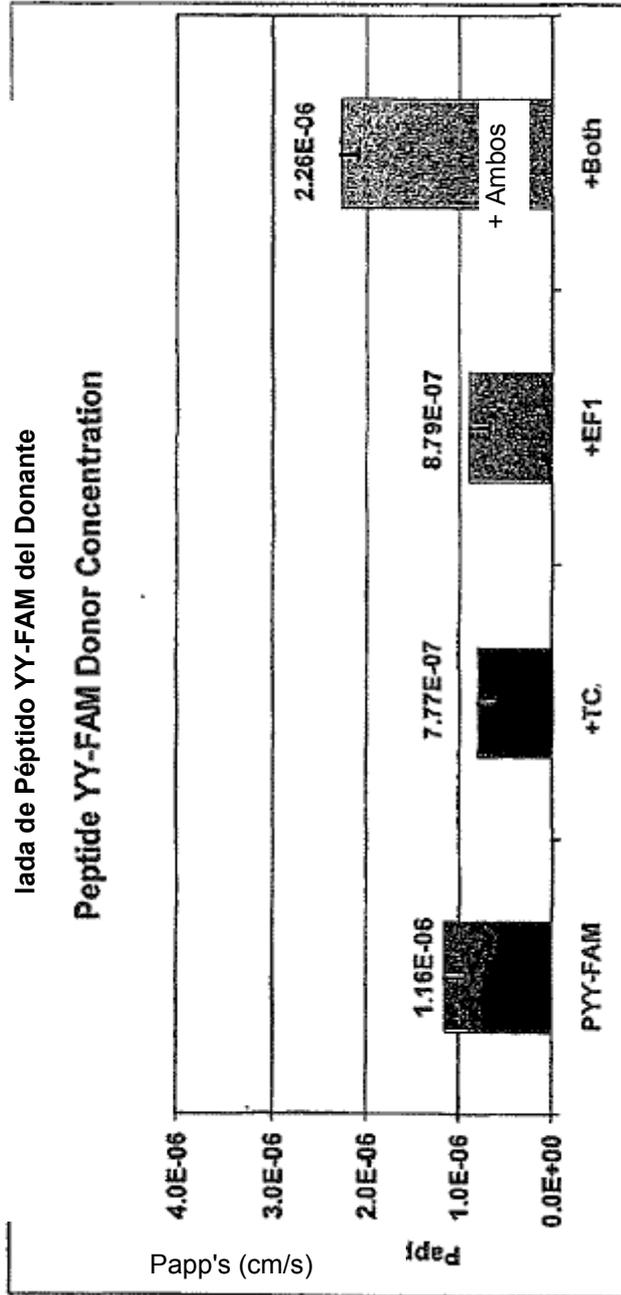


FIG. 9

Coefficientes Medios de Permeabilidad Apparente Basados en la Concentración Calculada de s-Calcitonina del Donante

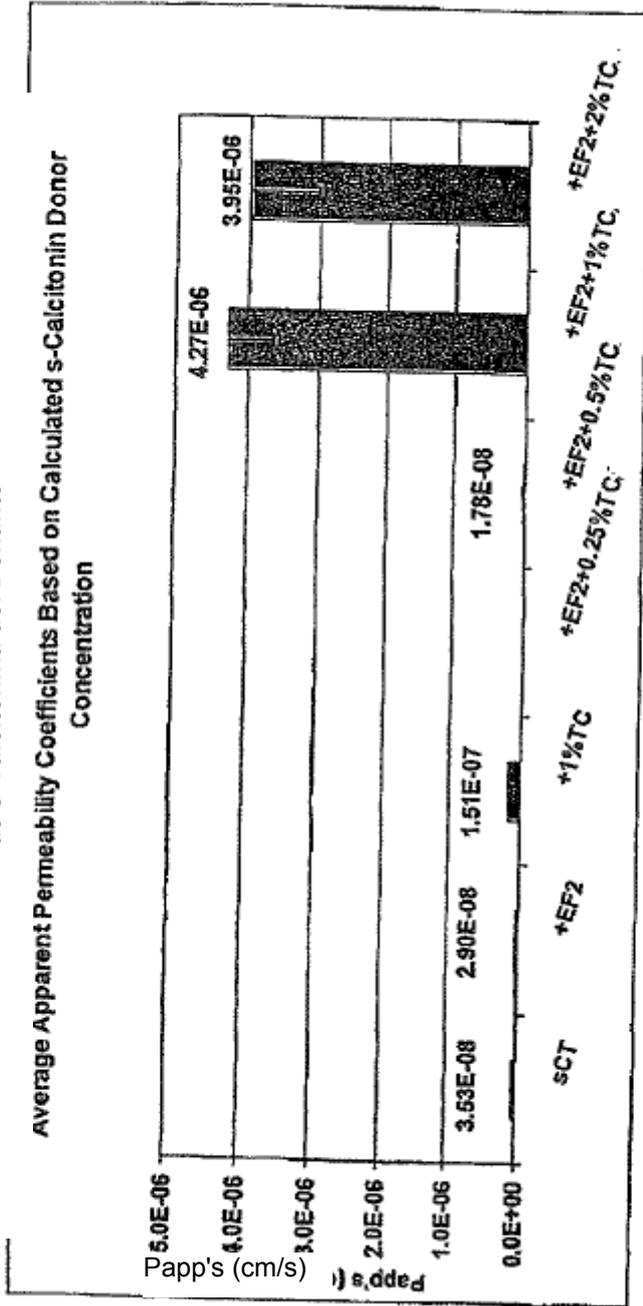


FIG. 10

Coefficientes Medios de Permeabilidad Aparente Basados en la Concentración Calculada de Desmopresina del Donante

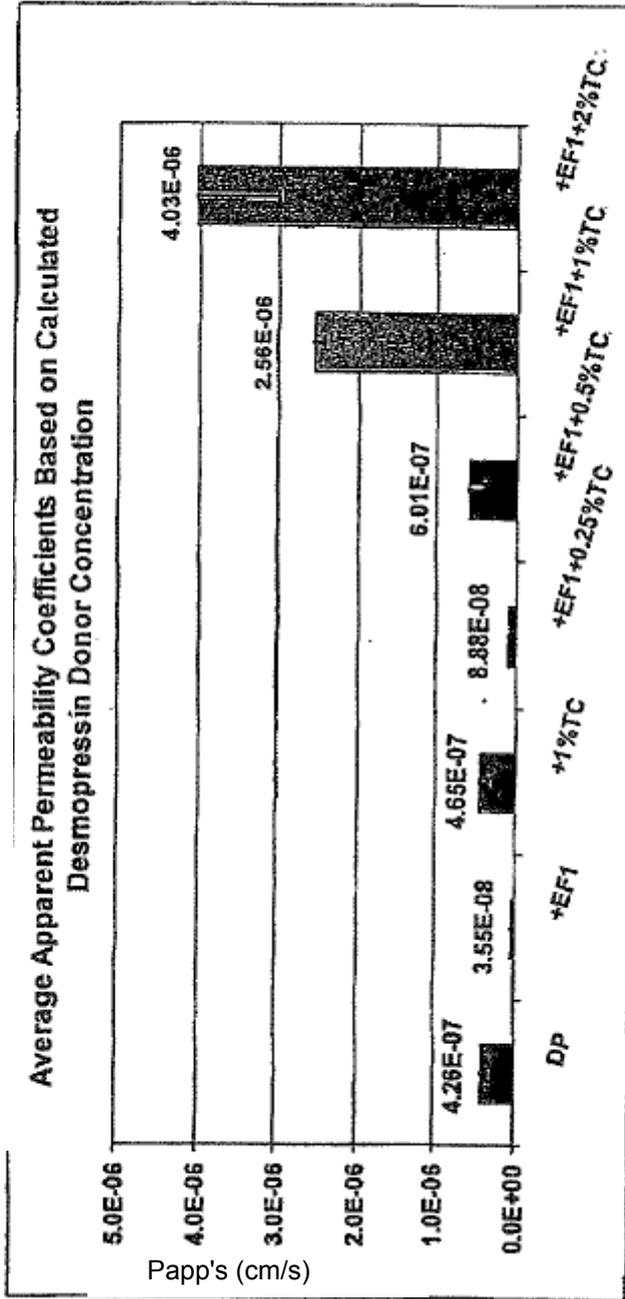


FIG. 11

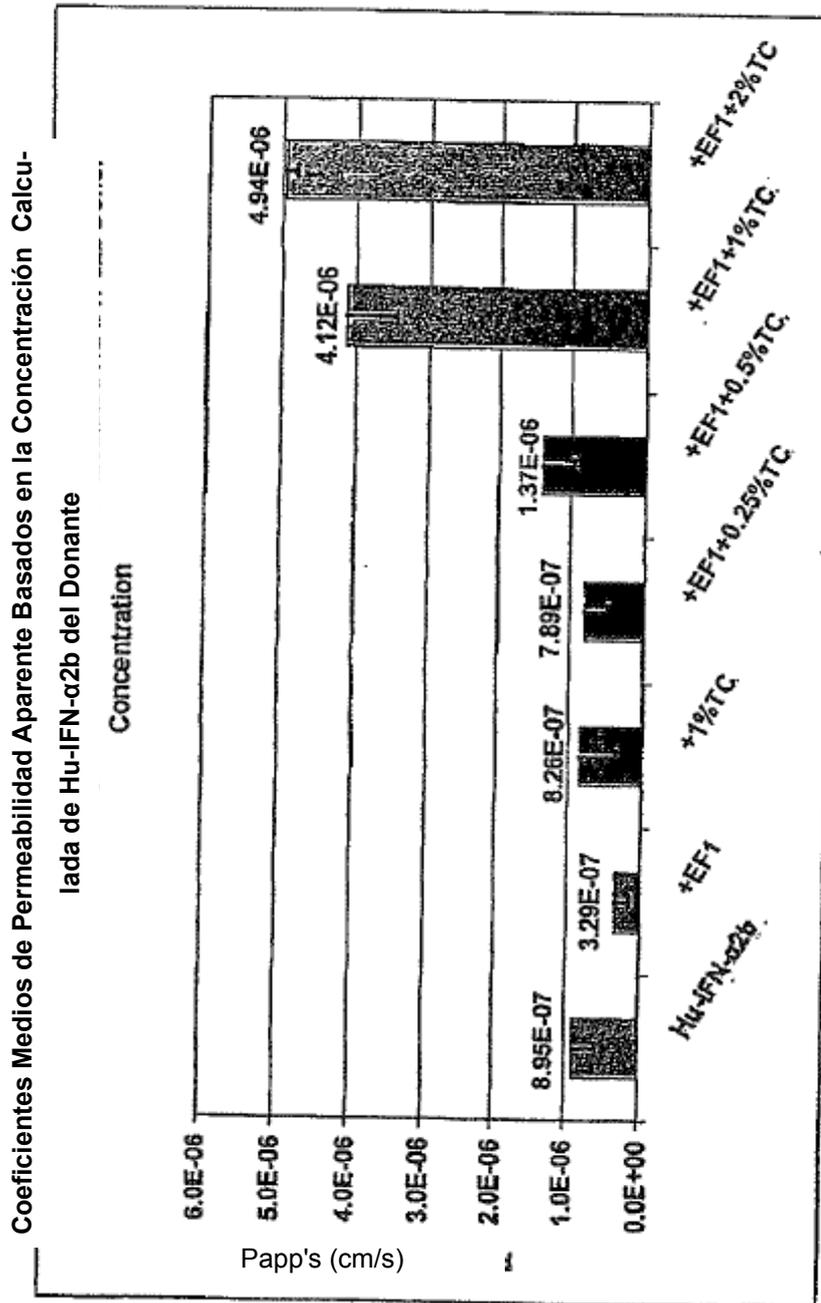


FIG.12

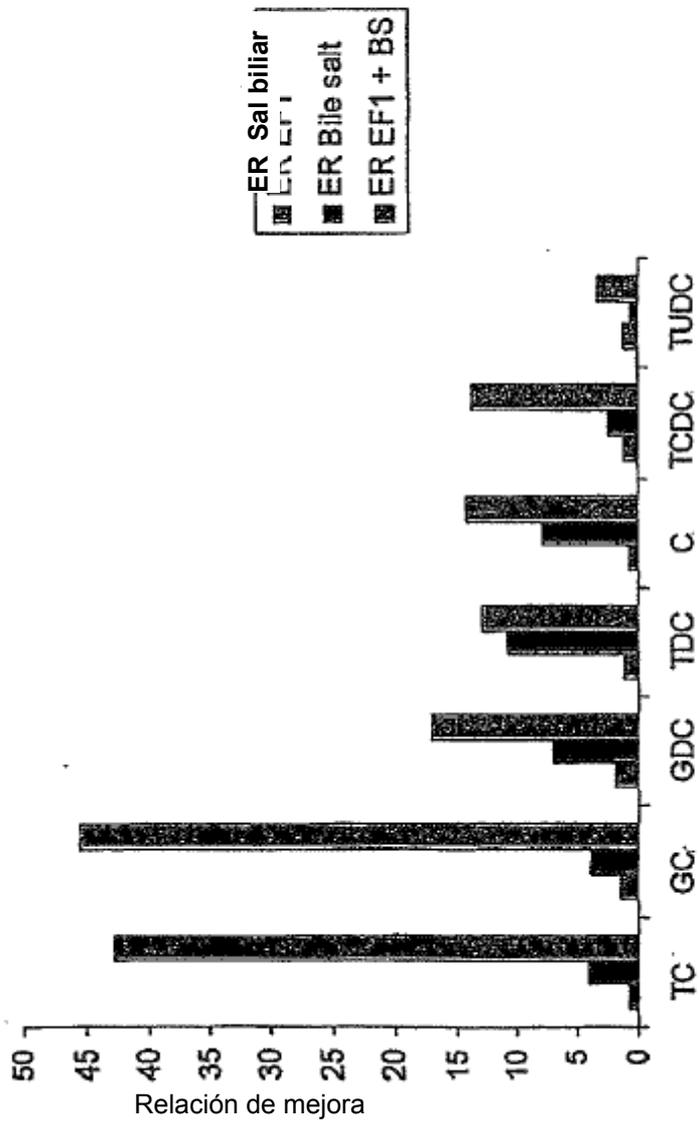


FIG. 13

Coefficientes Medios de Permeabilidad Aparente Basados en la Concentración
 Calculada de IGF-1 del Donante (Barras de SEM)

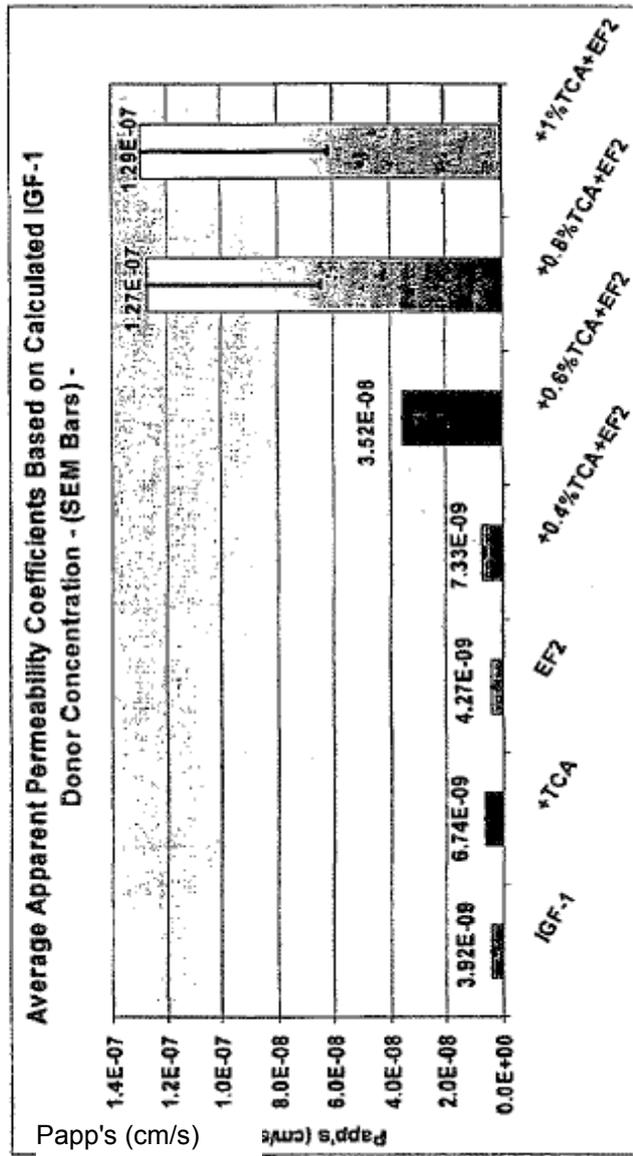


FIG. 14

Coeficientes Medios de Permeabilidad Aparente Basados en la Concentración Calculada de HRPO-b del Donante

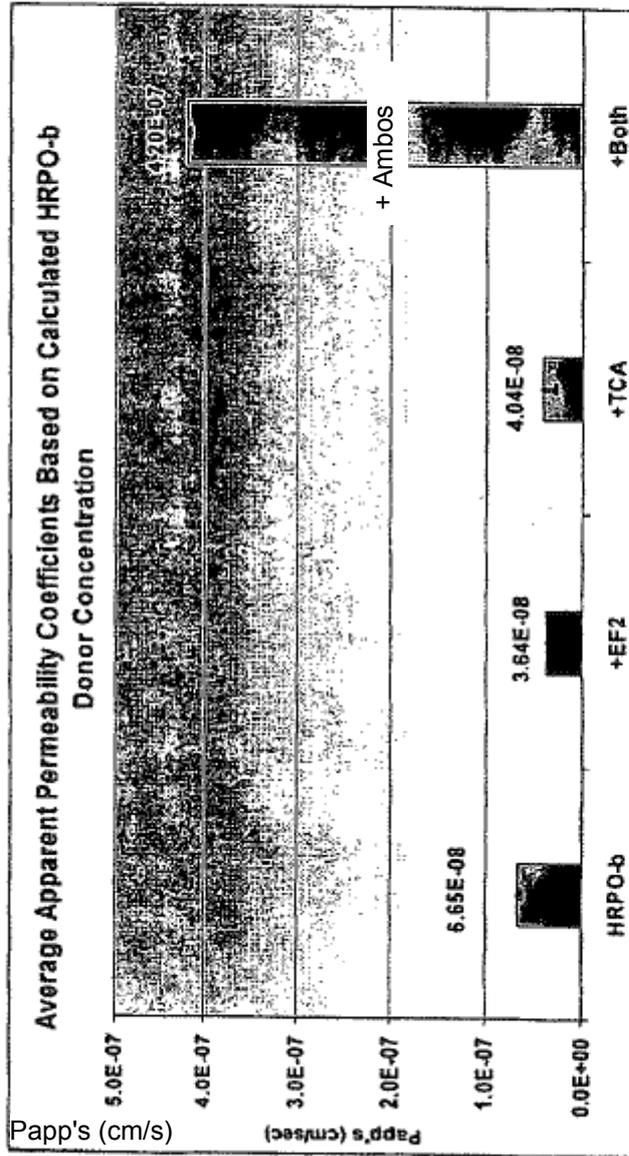


FIG. 15