

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 487 493**

51 Int. Cl.:

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 9/28 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2007 E 07753175 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2001400**

54 Título: **Formulaciones orales de glicil-2-metilprolil-glutamato**

30 Prioridad:

14.03.2006 US 782148 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.08.2014

73 Titular/es:

**NEUREN PHARMACEUTICALS LIMITED (25.0%)
Level 1, 59 Wellington Street, Freemans Bay
Auckland 1011, NZ;
WEN, JINGYUAN (25.0%);
THOMAS, GREGORY BRIAN (25.0%) y
BICKERDIKE, MIKE JOHN (25.0%)**

72 Inventor/es:

**WEN, JINGYUAN;
THOMAS, GREGORY BRIAN y
BICKERDIKE, MIKE JOHN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 487 493 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

Formulaciones orales de glicil-2-metilprolil-glutamato

5 CAMPO DE LA INVENCION

10 **[0001]** La presente invención se refiere a formulaciones disponibles por vía oral de Glicil-2-Metilprolil-Glutamato (G-2MePE). En particular, la presente invención se refiere a microemulsiones, cristales líquidos y formulaciones encapsuladas del neuroprotector, G-2MePE, a procedimientos para fabricarlos, a composiciones farmacéuticas que los contienen, y a su uso en el tratamiento de trastornos neurológicos.

ANTECEDENTES

15 **[0002]** La patente de Estados Unidos No. 7.041.314, titulada "GPE Analogs and Peptidomimetics," presentada el 24 de mayo del 2002, reivindica la prioridad según 35 U.S.C. 119(e) de la solicitud provisional en Estados Unidos No. 60/293,853, presentada el 24 de mayo del 2001, describía la composición de materia de G-2MePE y otros análogos de GPE sintéticos y el uso de preparaciones acuosas para proteger neuronas in vitro del daño tóxico en los nervios.

20 **[0003]** La solicitud de patente de Estados Unidos No: 11/314.424, titulada "Effects of G-2MePE on neurodegeneration" presentada el 20 de diciembre de 2005 y la solicitud de patente de Estados Unidos No: 11/315,784, titulada "Cognitive Enhancement and Cognitive Therapy Using G-2MePE," presentada el 21 de diciembre del 2005, describían métodos de utilización de preparaciones acuosas de G-2MePE para proteger animales contra el daño neuronal inducido por apoplejía y lesión cerebral traumática.

25 **[0004]** La solicitud de patente de Estados Unidos No: 11/398.032, titulada "Treatment of Non-Convulsive Seizures in Brain Injury Using G-2-Methyl-Prolyl Glutamate," presentada el 4 de abril del 2006, describía métodos para utilizar en formulaciones acuosas de G-2MePE para tratar ataques no convulsivos en cerebros de animales sujetos a lesión cerebral balística penetrante.

30 **[0005]** El documento WO 2005/097161 describe suso de combinaciones de glicil-prolil-glutamato (GPE), glicil-2-metilprolil glutamato (G-2MePE), y dosis bajas de cafeína y alanol ("cafeinol") para tratar lesiones o enfermedades neurodegenerativas.

35 **[0006]** La patente de Estados Unidos No. 5.824.638 describe una preparación farmacológica para la administración oral de insulina que comprende una emulsión hidrofóbica estable que comprende (i) una fase continua de un material hidrofóbico seleccionado del grupo que consiste en un ácido carboxílico de cadena larga o éster o alcohol del mismo dispersado en una fase acuosa o (ii) que tiene una fase discontinua hidrofílica dispersada en una fase hidrofóbica de un ácido carboxílico de cadena larga o éster del mismo. La emulsión con insulina se incorpora en un portador farmacéutico adecuado para la administración oral.

40 **[0007]** Sin embargo, existe la necesidad en la técnica de proporcionar formulaciones mejoradas activas por vía oral que tengan una mejor biodisponibilidad y una mayor eficacia que las soluciones acuosas actuales del G-2MePE.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

45 **[0008]** En un aspecto, la presente invención proporciona métodos de preparación de formulaciones orales de G-2MePE como cápsulas, emulsiones y cristales líquidos que tienen una biodisponibilidad y eficacia oral mejoradas. Algunas formulaciones incluyen micropartículas, nanopartículas y/o potenciadores de la permeación. Otros aspectos de la presente invención proporcionan métodos de uso de formulaciones orales de G-2MePE para tratar afecciones neurodegenerativas. Las formulaciones en microemulsión y micropartículas de G-2MePE pueden proporcionar efectos neuroprotectores sustancialmente mejorados a los de las soluciones acuosas, y pueden conferir propiedades farmacocinéticas deseadas a las preparaciones de G-2MePE, mejorando así la eficacia terapéutica y la duración.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

55 **[0009]** La presente invención se describe con referencia a realizaciones específicas de la misma. A partir de las figuras se pueden apreciar otras características de las realizaciones de la invención, en las que:

60 La figura 1 representa un gráfico de la estabilidad de GPE y G-2MePE (G-2MePE) en presencia de una monocapa de células Caco-2.

La figura 2 representa un gráfico del efecto del pH sobre la estabilidad del G-2MePE en presencia de células Caco-2.

La figura 3 representa un gráfico del efecto de inhibidores de enzima en la degradación de GPE por células Caco-2.

65 La figura 4 representa un gráfico de los efectos de potenciadores de permeación sobre el transporte de fluoresceína sódica a través de cultivos de células Caco-2.

La figura 5 representa un gráfico de los efectos de potenciadores de permeación sobre la resistencia eléctrica

transepitelial (TEER) de cultivos de células Caco-2.

La figura 6 representa un gráfico de la captación de G-2MePE por células Caco-2.

La figura 7 muestra un gráfico de los efectos de potenciadores de permeación sobre el transporte de G-2MePE a través de cultivos de células Caco-2.

5 La figura 8 representa un gráfico de la unión a proteína de GPE in vitro por la albúmina.

La figura 9 representa un gráfico de la unión a proteína de G-2MePE in vitro por la albúmina.

La figura 10A representa un gráfico de la liberación de fluoresceína sódica de micropartículas en el medio a pH 1.

La figura 10B representa un gráfico de la liberación de fluoresceína sódica de micropartículas en el medio a pH 7.

La figura 11 representa un gráfico de un diagrama pseudo-terciario de microemulsiones que contienen G-2MePE.

10 La figura 12A representa una fotomicrografía de una micrografía electrónica de transmisión de fractura por congelación de nanocápsulas de la presente invención.

La figura 12B representa un diagrama esquemático que muestra fármaco atrapado en una nanocápsula.

La figura 13 representa un gráfico de perfiles de fármaco liberado de diferentes formulaciones de G-2MePE.

15 La figura 14 representa un gráfico de la farmacocinética después del tratamiento oral en plasma de rata de varias formulaciones que contienen G-2MePE.

La figura 15A representa un gráfico de los efectos de una microemulsión que contiene G-2MePE sobre el tamaño del infarto cuando se administra por vía oral a las 2 y 4 horas después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en ratas. La dosis total de G-2MePE fue de 80 mg/kg. Vehículo (n = 12); G-2MePE (n = 11). La diferencia entre los animales tratados con vehículo y tratados con G-2MePE fue estadísticamente significativa, evaluada mediante la prueba t de Student no apareada, $p < 0,0001$.

20 La figura 15B representa un gráfico de los efectos de una microemulsión que contiene G-2MePE sobre el cambio de peso corporal después de la oclusión de la arteria cerebral media. El G-2MePE se administró por vía oral 2 y 4 horas después de la MCAO. La dosis total fue de 80 mg/kg. Vehículo (n = 12); G-2MePE (n = 11). Los animales tratados con G-2MePE perdieron menos peso que los animales de control tratados con vehículo. $P = 0,0035$ mediante la prueba t de Student no apareada.

25 La figura 16A representa un gráfico de los efectos de microemulsiones que contienen diferentes dosis de G-2MePE sobre el tamaño del infarto cuando se administra por vía oral 3 horas después de la MCAO. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía con la prueba post-hoc de Dunnett. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. Vehículo (n = 9), 15 mg/kg (n = 8), 30 mg/kg (n = 8), 60 mg/kg (n = 7). *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

30 La figura 16B representa un gráfico de los efectos de microemulsiones que contienen diferentes dosis de G-2MePE sobre el cambio de peso corporal cuando se administra por vía oral 3 horas después de la MCAO. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía con la prueba post-hoc de Dunnett. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. Vehículo (n = 8), 15 mg/kg (n = 7), 30 mg/kg (n = 7), 60 mg/kg (n = 7).*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,41$; ***, $p \leq 0,001$.

35 La figura 17A representa un gráfico de los efectos de la administración oral de soluciones acuosas de G-2MePE o el tratamiento con vehículo en el área de infarto (en mm^2) después de la inyección de endotelina-1 (ET-1) para producir la MCAO. Tres horas después de la inyección de Et-1, se administraron G-2MePE (60 mg/kg) (n = 11) o vehículo (agua milliQ) (n = 13) por vía oral a ratas. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM y la significación se estableció a $p < 0,05$.

40 La figura 17B representa un gráfico de los efectos de la administración oral de soluciones acuosas de G-2MePE o el tratamiento con vehículo sobre el cambio en el peso después de la MCAO inducida por Et-1 en ratas.

La figura 18 representa un gráfico de los efectos de soluciones acuosas administradas por vía intravenosa de G-2MePE sobre MCAO inducida por endotelina-1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

50 **[0010]** El término "aproximadamente" con referencia a una dosificación o el tiempo se refiere a una variable particular y un intervalo alrededor de esa variable que está dentro del error de medición normal o está dentro de aproximadamente 20% del valor de la variable.

[0011] El término "animal" incluye a los humanos y los animales no humanos, tales como los animales domésticos (gatos, perros, y similares) y animales de granja (vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos, y similares).

55 **[0012]** El término "enfermedad" incluye cualquier afección no saludable de un animal, incluyendo particularmente la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, diabetes, trastornos motores, ataques, y disfunciones cognitivas debidas al envejecimiento.

60 **[0013]** El término "lesión" incluye cualquier daño agudo de un animal, incluyendo apoplejía no hemorrágica, lesión cerebral traumática, asfixia perinatal asociada con sufrimiento fetal, tal como después del desprendimiento, oclusión del cordón o asociado con el retraso del crecimiento intrauterino, asfixia perinatal asociada con la insuficiencia de una adecuada reanimación y respiración, lesiones graves del SNC asociadas con un percance próximo al ahogamiento, percance próximo a la muerte súbita, inhalación de monóxido de carbono, intoxicación por amoníaco u otros gases, paro cardíaco, coma, meningitis, hipoglucemia y estado epiléptico, episodios de asfixia cerebral asociados con la cirugía de bypass coronario, episodios de hipotensión y crisis hipertensivas, trauma cerebral y lesión tóxica.

[0014] "Trastornos de la memoria" o "trastornos cognitivos" son trastornos que se caracterizan por el deterioro o pérdida de la capacidad de aprender, memorizar o recordar información, permanente o temporal. El trastorno de la memoria puede ser el resultado del envejecimiento normal, lesión en el cerebro, los tumores, las enfermedades neurodegenerativas, trastornos vasculares, trastornos genéticos (enfermedad de Huntington), hidrocefalia, otras enfermedades (enfermedad de Pick, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, SIDA, meningitis), sustancias tóxicas, deficiencia nutricional, trastornos bioquímicos, disfunciones psicológicas o psiquiátricas. La presencia de trastorno de la memoria en un ser humano se puede establecer a través de un examen del historia del paciente, un examen físico, pruebas de laboratorio, pruebas de imagen y pruebas neuropsicológicas. Las pruebas neuropsicológicas estándar incluyen, pero sin limitación, Brief Visual Memory Test-Revised (BVMT-R), Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB), Children's Memory Scale (CMS), Contextual Memory Test, Continuous Recognition Memory Test (CMRT), Controlled Oral Word Association Test and Memory Functioning Questionnaire, Denman Neuropsychology Memory Scale, Digit Span and Letter Number Sequence sub-test of the Wechsler Adult Intelligence Scale-III, Fuld Object Memory Evaluation (FOME), Graham-Kendall Memory for Designs Test, Guild Memory Test, Hopkins Verbal Learning Test, Learning and Memory Battery (LAMB), Memory Assessment Clinic Self-Rating Scale (MAC-S), Memory Assessment Scales (MAS), Randt Memory Test, Recognition memory Test (RMT), Rey Auditory and Verbal Learning Test (RAVLT), Rivermead Behavioural Memory Test, Russell's Version of the Wechsler Memory Scale (RWMS), Spatial Working Memory, Test of Memory and Learning (TOMAL), Vermont Memory Scale (VMS), Wechsler Memory Scale, Wide Range Assessment of Memory and Learning (WRAML).

[0015] El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica, y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario, así como para uso farmacéutico humano. Dichos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos, o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

[0016] El término "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y tiene las propiedades farmacológicas deseadas. Dichas sales incluyen sales que pueden formarse cuando protones ácidos presentes en los compuestos reaccionan con bases inorgánicas u orgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen las formadas con los metales alcalinos, por ejemplo sodio y potasio, magnesio, calcio, y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen las formadas con bases orgánicas, tales como aminas, por ejemplo etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, y similares. Las sales también incluyen sales de adición de ácido formadas por la reacción de un grupo amina o grupos presentes en el compuesto con un ácido. Los ácidos adecuados incluyen ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (por ejemplo ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, y ácidos alcanosulfónico y arenosulfónico, tales como ácido metanosulfónico y ácido benenosulfónico). Cuando hay dos grupos ácidos presentes en un compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable puede ser una monosal monoácido o una disal; y del mismo modo, cuando hay más de dos grupos ácidos presentes, todos o algunos de estos grupos se pueden sialificar. El mismo razonamiento se puede aplicar cuando dos o más grupos amina están presentes en un compuesto.

[0017] El término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un agente que, cuando se administra a un animal para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar el tratamiento para esa enfermedad medida utilizando un sistema de ensayo reconocido en la técnica.

[0018] El término "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad puede incluir la prevención de la aparición de la enfermedad en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no la experimenta ni muestra síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), la inhibición de la enfermedad (ralentizar o detener su desarrollo), el alivio de los síntomas o los efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo el tratamiento paliativo), y el alivio de la enfermedad (que causa la regresión de la enfermedad).

[0019] El término "déficit funcional" significa un déficit de comportamiento asociado con daño neurológico. Dichos déficits incluyen déficits en el andar, tal como se observa en pacientes con enfermedad de Parkinson, alteraciones motoras, tal como se observa en pacientes con la enfermedad de Huntington. El déficit funcional también incluye la colocación anormal del pie y trastornos de memoria que se describen en este documento.

[0020] El término "G-2MePE" o "NNZ-2566" significa el análogo tripéptido glutamato de glicil-2-metilprolilo.

[0021] El término "ataques" significa un patrón anormal de la actividad neuronal en el cerebro que da lugar a un déficit motor o la falta de control motor que da lugar a un movimiento anormal, incluyendo un movimiento espasmódico. "Ataques" incluye anomalías electroencefalográficas, acompañadas o no por una actividad motora anormal.

Tratamiento de los Trastornos Neurológicos

[0022] Los trastornos neurológicos que implican la degeneración o muerte de las neuronas han sido considerados como muy difíciles de tratar. Hasta hace poco, no se disponía de métodos para revertir la degeneración de las células nerviosas o de tratar con éxito la neurodegeneración. Dichas afecciones incluyen enfermedades crónicas,

tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y otras enfermedades crónicas bien conocidas. Además, las afecciones agudas que implican la neurodegeneración incluyen lesión cerebral traumática o "TBI" (incluyendo lesión cerebral balística penetrante o "PBB", y traumatismos con objetos romos), apoplejía, infarto de miocardio (MI), cirugía de injerto de bypass arterial cardíaco (CABG), hipoxia/isquemia (HI) y otras afecciones bien conocidas.

[0023] Recientemente, han aparecido varias estrategias nuevas para el tratamiento de la neurodegeneración. Éstas incluyen el uso de factor de crecimiento 1 de tipo insulina (IGF-1), el tripéptido N-terminal de IGF-1, a saber, glicil-prolil-glutamato (GPE), análogos de GPE, y análogos sintéticos de GPE. Uno de ellos, a saber, glutamato de glicil-2-metilprolilo (G-2MePE) ha sido descrito en la patente de EE.UU. N°: 7.041.314, titulada "Análogos de GPE y peptidomiméticos", publicada el 9 de mayo de 2006 y describe la síntesis y el uso de análogos sintéticos de GPE.

[0024] Además, la solicitud de patente de EE.UU. N°: 11/315,784; la publicación N°: US 2007/0004641 titulada "Mejora Cognitiva y Terapia Cognitiva Usando Glicil-L-2-metilprolilo-L-glutamato", presentada el 21 de diciembre de 2005, describe los efectos de G-2MePE para mejorar la cognición en ratas in vivo.

[0025] La solicitud de EE.UU. N°: 11/314,424 titulada "Efectos de glutamato de glicil-2-metilprolilo en la Neurodegeneración", describe los efectos de G-2MePE sobre la lesión cerebral traumática, un modelo de apoplejía en ratas inducido por la endotelina-1, la neuroprotección in vitro causada por toxinas, lesión isquémica hipóxica in vivo, en el modelo in vivo de la esclerosis múltiple, encefalopatía autoinmune experimental (EAE).

[0026] La solicitud de patente de EE.UU. N°: 11/398,032 presentada el 4 de abril de 2006, titulada "El tratamiento de la ataques no convulsivos en Lesiones Cerebrales Usando glutamato de G-2-metilprolilo ", describe el uso de G-2MePE para tratar ataques que son "silenciosos", es decir, no tienen un componente motor manifiesto. Dichos ataques no convulsivos pueden asociarse con una lesión traumática cerebral, apoplejía, hipoxia/isquemia y lesión tóxica.

[0027] Aunque las solicitudes de patentes anteriores demuestran la fabricación y la utilidad de G-2MePE, es deseable producir formulaciones que han mejorado las propiedades farmacocinéticas (PK) o farmacodinámica (PD). Las formulaciones de la presente invención satisfacen esas necesidades.

[0028] Además de G-2MePE tal como se describe en el presente documento, una composición puede contener opcionalmente, además de un compuesto de la presente invención, al menos un agente neuroprotector adicional seleccionado entre, por ejemplo, factores de crecimiento y derivados asociados (factor I de crecimiento de tipo insulina (IGF-I), factor II de crecimiento de tipo insulina (IGF-II), factor de crecimiento transformante $\beta 1$, activina, hormona del crecimiento, factor de crecimiento nervioso, proteína de unión a hormona de crecimiento, proteínas de unión a IGF (especialmente IGFBP-3), factor básico de crecimiento de fibroblastos, factor ácido de crecimiento de fibroblastos, el producto génico hst/Kfkg, FGF-3, FGF-4, FGF-6, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento inducido por andrógenos. Los miembros adicionales de la familia de FGF incluyen, por ejemplo, int-2, factor 1 homólogo del factor de crecimiento de fibroblastos (FHF-1), FHF-2, FHF-3 y FHF-4, factor 2 de crecimiento de queratinocitos, factor de activación glial, FGF-10 y FGF-16, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado del cerebro, neurotrofina 3, neurotrofina 4, proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), factor neurotrófico derivado de línea de células gliales, factor neurotrófico dependiente de la actividad, factor inhibidor de la leucemia de citoquinas, oncostatina M, interleuquina), α -interferón, β -interferón, γ -interferón, o interferón de consenso, y TNF- α . Otras formas de agentes terapéuticos neuroprotectores incluyen, por ejemplo, clometiazol; ácido quinurénico, Semax, tacrolimus, L-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol, análogo de andrenocorticotropina-(4-9) [ORG 2766] y dizolcipina (MK-801), selegilina; antagonistas de glutamato, tales como, NPS1506, GV1505260, MK-801, GV150526; antagonistas de AMPA, tales como 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)quinoxalina (NBQX), LY303070 y LY300164; agentes anti-inflamatorios dirigidos contra la adhesina MAdCAM-1 y/o sus receptores de integrina $\alpha 4$ ($\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$), tales como anti-MAdCAM-1MAB MECA-367 (ATCC acceso no. HB-9478). La mayoría de estos agentes, especialmente los péptidos, tales como los factores de crecimiento, y similares, no son activos por vía oral, y pueden beneficiarse de la administración por inyección, infusión o incorporación en una formulación que actúa por vía oral de la presente invención.

Administración

[0029] Las formulaciones de la presente invención se pueden administrar después o antes de la aparición de una afección que es probable que dé lugar a la neurodegeneración o un síntoma de la misma. Por ejemplo, se sabe que puede aparecer hipoxia/isquemia durante la cirugía de inserción de bypass en una arteria coronaria (CABG). De este modo, un paciente puede ser tratado previamente con un compuesto de la presente invención antes de colocarse en un sistema de oxigenación extracorpórea. En algunas realizaciones, puede ser deseable administrar un compuesto de la presente invención aproximadamente 4 horas antes de la cirugía o antes de un evento que probablemente conduzca a una lesión traumática o neurológica. En algunas realizaciones, las formulaciones de la presente invención pueden administrarse de forma subaguda a pacientes que se recuperan de una apoplejía, TBI, CABG, o cualquier otra lesión neurológica que da lugar a la neurodegeneración o un síntoma de la misma. En otras realizaciones, dichas formulaciones se pueden administrar a pacientes que sufren de trastornos cognitivos. En aún

otras realizaciones, dichas formulaciones se pueden administrar a pacientes que sufren de déficit funcionales asociados con daño neurológico.

Administración oral de G-2MePE

[0030] La administración oral se encuentra entre los métodos más seguros, convenientes y económicos de la administración de fármacos. La ventaja terapéutica de los productos administrados actualmente por vía oral se centra en la mayor predicción y control de la administración de los principios activos, lo que conduce a una mejor eficacia terapéutica y efectos secundarios reducidos. Esto, combinado con una disminución de la frecuencia de la administración, mejora la complacencia del paciente y, por lo tanto, los resultados del tratamiento. La administración oral de fármacos también se asocia típicamente con un bajo riesgo de infección, ya que los mecanismos de defensa naturales del cuerpo no se atraviesan durante la administración.

[0031] Con el fin de obtener los efectos terapéuticos deseados, se administran preferiblemente agentes neuroprotectores, especialmente péptidos o análogos de péptidos, usando formulaciones y sistemas de administración que mantienen la estabilidad del fármaco y permiten la administración al tejido diana óptimo. A menos que se utilicen estrategias de formulación adecuadas, la biodisponibilidad de los péptidos administrados por vía oral puede ser baja debido a las barreras bioquímicas y físicas que limitan la absorción. Además, la barrera hematoencefálica (BBB) también puede presentar un obstáculo formidable en el suministro de fármacos al cerebro después de la administración periférica. La BBB está compuesta de una red especializada de células endoteliales microvasculares y es responsable del transporte selectivo de moléculas desde el compartimento sistémico en el sistema nervioso central (SNC).

[0032] Existen muchos factores de carácter bioquímico, fisiológico y físicoquímico, así como formas de dosificación de la formulación, que determinan el grado de absorción de un fármaco, la biodistribución y los efectos farmacológicos tras la administración oral. Para los péptidos en particular, estos factores incluyen: la permeabilidad intestinal, la estabilidad enzimática, tipo de sistema de administración y el tiempo de tránsito de la formulación. Entre estos factores, las barreras bioquímicas y las barreras físicas pueden ser importantes para influir en la eficacia de los péptidos administrados por vía oral. Estas dos barreras deben superarse mediante sistemas de administración racional antes de dirigir los péptidos a través de la BBB. El diseño racional de formulaciones de péptidos activos por vía oral debe basarse en una o más de las siguientes estrategias: (a) inhibir o modular la actividad proteolítica que degrada el péptido, (b) mejorar el transporte paracelular o transcelular del péptido, (c) mejorar la penetración del péptido a través de la barrera mucosa, (d) aumentar la vida media del péptido en circulación para los péptidos que requieren una presencia sostenida para la eficacia terapéutica, (e) desarrollar análogos de péptidos resistentes a la proteasa que retienen la actividad biológica, y/o (f) estabilizar el péptido mediante conjugación a moléculas portadoras o mediante encapsulación.

[0033] Teniendo esto en cuenta, se han diseñado estrategias de formulación adecuadas para G-2MePE con el fin de maximizar su estabilidad durante el almacenamiento, proteger G-2MePE de las enzimas proteolíticas del tracto intestinal y liberar los sitios de péptidos en el tracto gastrointestinal favorables a la absorción, y mejorar la absorción del fármaco a través del epitelio intestinal.

[0034] Se ha encontrado inesperadamente que las formulaciones de G-2MePE en microemulsiones, emulsiones gruesas ("coarse"), cristales líquidos, y encapsulación pueden proporcionar propiedades deseables, haciendo que estas formulaciones sean útiles en el tratamiento de afecciones caracterizadas por la degeneración neuronal o la muerte.

[0035] En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden una emulsión de agua en aceite.

Emulsiones que contienen G-2MePE

[0036] En algunas realizaciones la emulsión de agua en aceite contiene una fase oleosa, compuesta de ácidos carboxílicos de cadena larga o ésteres o alcoholes de los mismos, un tensoactivo o un agente activo de superficie, y una fase acuosa que contiene principalmente agua y G-2MePE.

Lípidos y Alcoholes

[0037] Los ácidos carboxílicos de cadena larga son aquellos que varían de C₁₆ a C₂₂ con hasta tres enlaces insaturados (también con ramificación). Los ejemplos de ácidos saturados de cadena lineal son el ácido n-dodecanoico, ácido n-tetradecanoico, ácido n-hexadecanoico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, montánico y ácido melísico. También son útiles los ácidos monocarboxílicos de cadena lineal monoolefinicos insaturados. Ejemplos de éstos son el ácido oleico, ácido gadoleico y ácido erúcido. También son útiles ácidos monocarboxílicos de cadena lineal insaturados (poliolefinicos). Ejemplos de éstos son ácido linoleico, ácido ricinoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico y ácido behenólico. Los ácidos ramificados útiles incluyen, por ejemplo, ácido diacetil tartárico.

[0038] Ejemplos de ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga incluyen, pero sin limitación, aquellos del grupo de: monoestearatos de glicerilo; monopalmitatos de glicerilo; mezclas de monoestearato de glicerilo y monopalmitato de glicerilo; monolinoleato de glicerilo; monooleato de glicerilo; mezclas de monopalmitato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, monooleato de glicerilo y monolinoleato de glicerilo; monolinolenato de glicerilo; monogadoleato de glicerilo; mezclas de monopalmitato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monolinoleato de glicerilo, monolinolenato de glicerilo y monogadoleato de glicerilo; glicéridos acetilados, tales como monoglicéridos acetilados destilados; mezclas de monoésteres de propilenglicol, monoglicéridos destilados, esteroil lactilato de sodio y dióxido de silicio; d-alfa tocoferol polietilenglicol 1000 succinato; mezclas de ésteres de monoglicéridos y diglicéridos, tales como Atmul; esteroil lactilato de calcio; monoglicéridos y diglicéridos etoxilados; monoglicéridos y diglicéridos lactatados; éster de ácido carboxílico lactilato de glicerol y propilenglicol; ésteres lactílicos de ácidos carboxílicos de cadena larga; ésteres de poliglicerol de ácidos carboxílicos de cadena larga, monoésteres y diésteres de propilenglicol de ácidos carboxílicos de cadena larga; esteroil lactilato de sodio; monoestearato de sorbitán; monooleato de sorbitán; otros ésteres de sorbitán de ácidos carboxílicos de cadena larga; monoglicéridos succinilados; estearil monogliceril citrato; heptanoato de estearilo; ésteres de cetilo de ceras; octanoato de estearilo; Ésteres C₁₀-C₃₀ de colesterol/lavosterol; y ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga de sacarosa.

[0039] Ejemplos de los ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga autoemulsionantes incluyen los de los grupos de estearatos, palmitatos, ricinoleatos, oleatos, behenatos, ricinolenatos, miristatos, lauratos, caprilatos, y caproatos.

[0040] Los alcoholes útiles en la invención se ejemplifican por las formas hidroxilo de los ácidos carboxílicos ejemplificados más arriba y también alcohol de estearilo.

[0041] En algunas realizaciones, la fase oleosa puede comprender una combinación de 2 o más de los ácidos carboxílicos de cadena larga o ésteres o alcoholes de los mismos.

[0042] En algunas realizaciones, la fase oleosa puede comprender una mezcla de triglicérido caprílico/cáprico y monoglicéridos/diglicéridos C8/C10 de ácido caprílico.

Agentes activos de superficie

[0043] Los agentes activos de superficie o tensoactivos son moléculas de cadena larga que se pueden acumular en de interfases hidrófilas/hidrófobas (agua/aceite) y disminuir la tensión superficial en la interfase. Como resultado pueden estabilizar una emulsión. En algunas realizaciones de la presente invención, el tensoactivo puede comprender: la familia de tensoactivos Tween^(R) (sorbato de polioxietileno), la familia de tensoactivos Span^(R) (ésteres de ácido carboxílico de cadena larga de sorbitán), la familia de tensoactivos Pluronic^(R) (copolímeros de bloque de óxido de etileno o propileno), familia de tensoactivos Labrasol^(R), Labrafil^(R) y Labrafac^(R) (cada uno glicéridos poliglicolizados), ésteres de sorbitán de oleato, estearato, laurato u otros ácidos carboxílicos de cadena larga, poloxámeros (copolímeros de bloque de polietilenglicol-polipropilenglicol o Pluronic^(R)), otros ésteres de ácido carboxílico de cadena larga de sorbitán o sacarosa, mono y diglicéridos, derivados de PEG de triglicéridos caprílico/cáprico y mezclas de los mismos o mezcla de dos o más de los anteriores.

[0044] En algunas realizaciones, la fase del tensoactivo puede comprender una mezcla de monooleato de Polioxietileno (20) sorbitán (Tween 80^(R)) y monooleato de sorbitán (Span 80^(R)).

[0045] La fase acuosa puede comprender G-2MePE suspendido en agua y un tampón. En algunas realizaciones G-2MePE estará presente en la fase acuosa a la concentración de 1 mg a 300 mg/ml.

[0046] En algunas realizaciones, dichas emulsiones son emulsiones gruesas, microemulsiones y emulsiones de cristal líquido. En otras realizaciones dicha emulsión puede comprender opcionalmente un potenciador de la permeación. Para los agentes acuosos, tales como G-2MePE, puede ser especialmente deseable incorporar el fármaco en la fase acuosa de una emulsión. Dichas formulaciones de "agua en aceite" proporcionan un entorno biofísico adecuado para el fármaco y pueden proporcionar una interfase aceite-agua que puede proteger el fármaco de efectos adversos de pH o de enzimas que pueden degradar el fármaco. Además, dichas formulaciones de agua en aceite pueden proporcionar una capa lipídica, que puede interaccionar favorablemente con los lípidos en las células del cuerpo, y pueden aumentar la partición de la formulación sobre las membranas de las células. Dicha partición puede aumentar la absorción de fármacos en dichas formulaciones en la circulación y por lo tanto puede aumentar la biodisponibilidad del fármaco.

[0047] En otras realizaciones, se pueden usar ventajosamente micropartículas o nanopartículas que contienen una microemulsión encapsulada, una emulsión gruesa o cristal líquido. En todavía otras realizaciones, pueden utilizarse ventajosamente comprimidos que contienen G-2MePE y aglutinantes, excipientes y opcionalmente con un recubrimiento entérico. Estas formulaciones pueden proteger el G-2MePE de la degradación en el estómago y pueden ayudar en el transporte del fármaco a los sitios en el tracto gastrointestinal donde se puede realizar la absorción.

[0048] Se ha encontrado sorprendentemente que ciertas formulaciones de G-2MePE tienen propiedades inesperadas en comparación con otros agentes neuroprotectores más conocidos. Además, se ha encontrado de forma inesperada que el G-2MePE se comporta de manera diferente a los solutos acuosos típicos, incluyendo soluciones acuosas de G-2MePE.

EJEMPLOS

[0049] Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar el alcance a estos ejemplos específicos. Las personas expertas en la técnica pueden apreciar fácilmente que las enseñanzas y descripciones de la presente solicitud proporcionan una guía para el desarrollo de otras variaciones obvias. Todas esas variaciones se consideran parte de la presente invención.

Ejemplo 1: Línea celular Caco-2 de carcinoma de colon humano

[0050] Se estableció un modelo in vitro para cribar compuestos para determinar su idoneidad para la administración oral. El objetivo inicial era superar las barreras enzimáticas y físicas para mejorar la absorción de péptidos neuroprotectores a través del tracto gastrointestinal.

[0051] La línea celular Caco-2 ha sido ampliamente utilizada para imitar el comportamiento del intestino (véase la patente de EE.UU. n.º: 5.824.638). La línea Caco-2 se estableció con éxito y se mantuvo de forma rutinaria en el laboratorio de cultivo de tejidos. Durante las dos últimas décadas, el sistema de cultivo de células Caco-2 ha sido aceptado como un modelo in vitro adecuado para el cribado rápido de la absorción intestinal del fármaco. Las células Caco-2, originalmente aisladas a partir de un adenocarcinoma de colon humano, se cultivaban de manera rutinaria como células confluentes en una placa de cultivo celular Transwell. Después de la diferenciación en cultivo, exhiben una morfología correcta y exhiben muchas de las enzimas hidrolasas en el borde en cepillo, propiedades de transporte de iones y sistemas portadores típicos del epitelio intestinal humano. Además, los cultivos de células Caco-2 intactas maduras exhiben una resistencia eléctrica transepitelial (TEER) característica, lo que refleja la presencia de complejos de unión estrecha entre las células vecinas y funciones de transporte de iones inherentes de las células intestinales. De forma similar a la mucosa intestinal humana normal, las células Caco-2 tienen cantidades notables de enzimas que metabolizan fármacos de la Fase I (es decir, el citocromo P450 1A1 y 1A2) y Fase II (es decir UDG-glucuronosiltransferasas), así como transportadores de fármacos, tales como P-proteína, y similares. Por lo tanto, el sistema de cultivo de células Caco-2 se ha utilizado ampliamente para estudiar el transporte de fármacos de pequeño peso molecular (hidrófilos y lipófilos) y péptidos terapéuticos, y los mecanismos implicados. Por lo tanto, los resultados obtenidos utilizando cultivos de células Caco-2 son predictivos de la absorción de fármacos por los intestinos de los seres humanos.

Ejemplo 2: Estabilidad de GPE y G-2MePE en presencia de células Caco-2

Objetivo

[0052] El objetivo de este estudio fue investigar la estabilidad enzimática de GPE y G-2MePE en presencia de las peptidasas presentes en cultivos de células Caco-2.

Métodos

[0053] Se obtuvieron células Caco-2 de carcinoma de colon de la American Type Culture Collection (ATCC) y se mantuvieron en un cultivo en DMEM con glucosa elevada con suero de ternera fetal al 10%, más penicilina/estreptomicina (Pen/Strep) a 37°C, en 5% de CO₂. Las células se subcultivaron durante aproximadamente 5-7 días. Se incubaron 50-100 µg/ml de GPE y 50-100 µg/ml de G-2MePE respectivamente con monocapa de Caco-2 en tampón de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (pH 7,4) en un matraz T75 a 37°C y se expusieron a 5% de CO₂ en aire. Se recogieron muestras a 0, 15, 30, 45, 60, 120, 150, 180, 210, 240, 360 y 1440 minutos.

[0054] Las muestras recogidas se extrajeron mediante la adición de 400 µl de ácido sulfúrico 0,04 M en tubos de ensayo, cada uno de los cuales contenía 50 µl de una muestra. Los tubos de ensayo se dejaron en hielo durante 5 min y se agitaron. Se añadieron los 50 µl de tungstato de sodio al 10% a cada tubo y los tubos se agitaron inmediatamente y se dejaron en hielo durante 10 min, se agitaron de nuevo y se dejaron en hielo durante otros 10 min. Las células se centrifugaron a 20.000 g a 4°C durante 20 min. Se recogió el sobrenadante para la prueba.

[0055] El GPE y G-2MePE intactos y sus metabolitos se analizaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en una columna Aqua 5µ, 250x4,6 mm, C18 (Phenomenex, Auckland, Nueva Zelanda) conectada a un modelo de separación Waters Alliance 2695 y un detector PDA Waters 2996 a una absorbancia fijada en 200 nm. El contenido de proteína de las muestras se midió mediante el ensayo de Lowry.

Resultados

[0056] Se identificaron cuatro metabolitos de la degradación del GPE en presencia de células Caco-2. El G-2MePE era más resistente a la degradación enzimática por las enzimas de células Caco-2 que el GPE (figura 1). No se encontraron metabolitos para el análogo de G-2MePE, lo que confirma su estabilidad en presencia de células Caco-2.

Conclusión

[0057] Se concluye que el G-2MePE es enzimáticamente estable en contacto con células epiteliales intestinales.

Ejemplo 3: Estabilidad enzimática del G-2MePE en la presencia de células Caco-2 a diferente pH

Objetivo

[0058] El objetivo de estos estudios fue determinar el efecto del pH sobre la degradación de G-2MePE por células Caco-2.

Métodos

[0059] Se añadieron 100 µg/ml de G-2MePE a la parte apical de los cultivos confluentes de células Caco-2 en condiciones de pH diferentes. Se tomaron muestras a 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 minutos más tarde. Las muestras se centrifugaron a 20.000 g durante 15 min y se inyectaron 50 µl de sobrenadante a la columna de HPLC. El G-2MePE y los metabolitos se analizaron en una columna Aqua 5u 250x4,6 mm C18 (Phenomenex, Auckland, Nueva Zelanda) conectada a un modelo de separación Waters 2695 Alliance y un detector PDA Waters 2996 a una absorbancia fijada en 210 nm. A continuación se determinaron la actividad peptidolítica y la vida media de G-2MePE en diferentes condiciones de pH.

Resultados

[0060] Se observó la actividad peptidolítica más elevada de G-2MePE a un pH de 6,5. La actividad peptidolítica más baja de G-2MePE se observó en condiciones ácidas con un pH de menos de 5,5 (figura 2). La degradación moderada de G-2MePE también se observó en condiciones básicas (pH 7-9,5).

Conclusión

[0061] El G-2MePE es estable a $\text{pH} \leq 5,5$. De este modo, el G-2MePE es probable que esté protegidos en el medio relativamente ácido del estómago (por ejemplo, $\text{pH} < 3,0$), pero es probable que esté menos protegido en el medio más neutro del duodeno, íleon o colon.

Ejemplo 4: Degradación enzimática de GPE en presencia de inhibidores

Objetivo

[0062] El objetivo de este estudio fue determinar si las peptidasas o proteasas de células Caco-2 células pueden degradar el GPE. El razonamiento era que si GPE puede ser enzimáticamente degradado por células Caco-2, entonces el G-2MePE también podría someterse a la degradación enzimática. La inhibición de dicha degradación puede mejorar la biodisponibilidad de G-2MePE.

Métodos

[0063] GPE se incubó con cultivos confluentes de células Caco-2 en ausencia o en presencia de los inhibidores de la enzima SDA (sal biliar) y EDTA durante 4 h. Se recogieron muestras a diferentes puntos de tiempo. GPE intacta se analizó por HPLC y el contenido de proteína de las muestras se estimó por el ensayo de Lowry. Se utilizó Porcentaje de inhibición para evaluar la eficacia de las sales biliares y de EDTA en la inhibición de la degradación de GPE.

Resultados

[0064] Los efectos de la sal de bilis (SDA) y EDTA sobre la peptidólisis de GPE en presencia de células cultivadas de Caco-2 se muestran en la figura. 3. La degradación de GPE se inhibió significativamente por SDA ($\geq 5 \text{ mM}$) y EDTA ($\geq 20 \text{ mM}$). El orden de clasificación de la eficacia para la prevención de la peptidólisis de GPE en presencia de células Caco-2 fue SDA (20 mM) > SDA (10 mM) > EDTA (20 mM) > SDA (5 mM) > SDA (2 mM). La inhibición de la peptidólisis de GPE fue proporcional a la dosis de SDA utilizada.

Conclusión

[0065] Este estudio in vitro demostró que las peptidasas, incluyendo aminopeptidasas y endopeptidasas, pueden estar implicadas en la degradación de GPE por células Caco-2. SDA (5-20 mM) y EDTA (20 mM) mostraron una inhibición significativa en la prevención de dicha degradación (figura 3). De este modo, la inclusión de inhibidores de peptidasas o proteasas puede mejorar la biodisponibilidad de G-2MePE.

Ejemplo 5: Citotoxicidad de GPE y G-2MePE

Objetivo

[0066] El objetivo de este estudio de crecimiento fue determinar si el GPE y/o el G-2MePE pueden inhibir el crecimiento de las células. El razonamiento es que si el G-2MePE inhibe el crecimiento de células intestinales, dicha inhibición del crecimiento podría limitar las dosis de G-2MePE que pueden ser toleradas. Se utilizó sulforrodamina B (SRB) y se determinó el 50% de concentración inhibidora del (IC_{50}) necesaria para inhibir el crecimiento de células Caco-2. Se deseó determinar la dosis segura para los estudios de transporte a través de las monocapas de células Caco-2.

Métodos

[0067] La sulforrodamina B (SRB) ha demostrado ser un marcador de proteína útil para su uso en la cuantificación de las proteínas celulares de células cultivadas. Se cree que el colorante se une a aminoácidos básicos de las proteínas celulares. De este modo, la medición colorimétrica del colorante unido puede proporcionar una estimación del número de células. El método de ensayo es simple y reproducible, y las mediciones de punto final no son críticas con el tiempo, una ventaja significativa sobre los ensayos que usan derivados de tetrazolio.

[0068] Las células Caco-2 se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) esterilizado, que contenía 10% de suero de ternera fetal, 1% de penicilina-estreptomicina-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales, y tripsina-EDTA. Los matraces estériles T75, placas de cultivo de 24 pocillos, placas de microtitulación de 96 pocillos, tubos de centrifuga e hisopos se adquirieron de Life Technologies Inc. (Auckland, Nueva Zelanda). La sulforrodamina B (SRB), ácido tricloroacético (TCA), ácido acético, base de Tris no tamponada (pH 10,5) y D-glucosa se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Auckland, Nueva Zelanda). El tripán azul y N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[4-ácido butanosulfónico] (HEPES) eran de Gibco. Las inserciones de 12 pocillos Transwell (membrana permeable de policarbonato, 24 y 12 mm de diámetro, 0,4 μ m de tamaño de poro) y las placas se adquirieron de Corning Costar Corp. (NY, EE.UU.).

[0069] El GPE y el G-2MePE se incubaron con células Caco-2 en placas de 96 pocillos durante 24, 48, 72, 96 ó 120 h. Las células se fijaron por TCA y se añadió SRB a cada pocillo. El colorante unido a las células se extrajo con tampón de Tris base para solubilizar el colorante y se determinó la absorbancia mediante un lector de placas a 570 nm. La inhibición del crecimiento se expresó como la viabilidad relativa (% de control) y se calculó la IC_{50} a partir de las curvas de concentración-respuesta después de la transformación de log/unidad de probabilidad.

Resultados

[0070] Se observó que la IC_{50} de G-2MePE (24-120 horas) sobre el crecimiento de células Caco-2 fue de 1 a 4,6 mM. El GPE, incluso a una concentración de 15 mM, inhibió el crecimiento de células Caco-2 en sólo el 35%; por lo tanto, la IC_{50} del crecimiento de células Caco-2 por GPE fue ≥ 15 mM (tabla 1).

Tabla 1: (IC_{50}) del crecimiento de células Caco-2 en presencia de G-2MePE

Tiempo (horas)	IC_{50} de G-2MePE (mM)
24	4,64
48	3,66
72	2,24
96	1,09
120	1,01

[0071] En la patente de EE.UU. N°: 7.041.314, se ha encontrado que el G-2MePE era un compuesto neuroprotector eficaz in vitro a concentraciones que variaban de 10 nM a 1 mM, con una amplia zona estabilizada de concentraciones eficaces de 10 nM a 10 μ M (véase la figura 15 de la patente de EE.UU. N°: 7.041.314).

Conclusiones

[0072] La IC_{50} para G-2MePE es mayor que las concentraciones de G-2MePE conocidas por ser neuroprotectoras in vitro. Por lo tanto, se llega a la conclusión de que el uso de G-2MePE in vivo a concentraciones equivalentes a las halladas como eficaces in vitro no sería tóxico para las células epiteliales intestinales.

Ejemplo 6: Permeabilidad de fluoresceína a través de células Caco-2**Objetivo**

[0073] El objetivo de este estudio fue determinar el coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) y la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) a través de cultivos confluentes de células epiteliales Caco-2 causados por un material hidrófilo típico.

Métodos

[0074] La integridad de cultivos de células Caco-2 se evaluó mediante la medición de la TEER y la pérdida de ^{14}C -manitol o fluoresceína a través de cultivos confluentes. Los insertos con cultivos de células confluentes y una resistencia eléctrica superior a $300\Omega/\text{cm}^2$, se consideraron apropiados para estos estudios. Se añadió fluoresceína o $0,5\ \mu\text{Ci}/50\ \mu\text{l}$ de ^{14}C -manitol a la célula apical y se incubaron durante 1-4 horas. La pérdida aceptable se consideró que era $<0,5\text{-}1\%$. Se eligieron 6 insertos con una buena integridad y después se lavaron con tampón de transporte. Se extrajo el medio de todos los pocillos apical y basolateral. Los cultivos celulares se lavaron dos veces con tampón de transporte caliente a 37°C .

[0075] Para determinar los efectos de los potenciadores de la permeación, se incubó fluoresceína de sodio (PM = 376) en la parte del donante (por encima de la membrana) de los cultivos "transwell" que contenían células Caco-2 en ausencia o presencia de diversos potenciadores de la permeación. Se tomaron muestras (0,4 ml) de la parte del receptor (parte bajo la membrana) a los 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 y 360 min, respectivamente. A continuación, la solución en la parte del receptor de "transwell" se reemplazó con 0,4 ml de HBSS nuevo, y se recogieron 0,1 ml de la parte del donante (a continuación reemplazada con 0,1 ml de fluoresceína de sodio a la misma concentración). La reacción se terminó de la parte del donante mediante la adición del mismo volumen de HCl (0,2 M) o acetonitrilo/metanol 3:1 con 2% de ácido acético a cada muestra. Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 15 min. Los sobrenadantes se recogieron, se secaron mediante Speed Vacuum, se diluyeron con fase móvil y la muestra resultante se analizó mediante espectrofluorofotómetro. El coeficiente de permeabilidad aparente se utilizó para comparar la permeabilidad entre los grupos de control y de tratamiento (figura 4). La resistencia eléctrica transepitelial (TEER) se midió usando un medidor de tensión de Millipore en diferentes puntos de tiempo. Los promedios de los valores de TEER de 30-180 min se compararon entre el grupo de control y el grupo de tratamiento (figura 5).

Resultados

[0076] El caprato de sodio (10 o 20 mM), taurocolato de sodio (30 mM), EDTA (40 mM) y SDA (1 mM), cada uno de manera significativa ($P < 0,05$), aumentaron la permeabilidad de la capa de células epiteliales Caco-2 a la fluoresceína y redujeron la TEER durante el experimento de transporte de 3 h (figuras 4 y 5). Sin embargo, el efecto del caprato de sodio (20 mM) fue mayor que el efecto de la misma concentración de taurocolato (figura 4).

Conclusión

[0077] Se podían utilizar el taurocolato de sodio ($\geq 20\text{ mM}$), caprato de sodio ($\geq 10\text{ mM}$), EDTA (40 mM) o SDA (1 mM) para mejorar la permeabilidad de un compuesto hidrófilo (fluoresceína) a través de capas de células epiteliales Caco-2 al afectarlas vías transcelular y paracelular.

Ejemplo 7: Captación de G-2MePE por células Caco-2**Objetivo**

[0078] El objetivo de este estudio fue evaluar la captación de G-2MePE por células Caco-2 para explorar el transporte activo de péptidos a través de células intestinales y determinar los efectos del pH del medio de incubación, el tiempo, la temperatura y la concentración de sustrato en la captación de G-2MePE por células Caco-2.

Métodos

[0079] Se desarrollaron cultivos de Caco-2 (5×10^5 células en 5 ml de medio DMEM) en placas de cultivo de 60 mm de plástico. El medio nuevo fue reemplazado cada 2-3 días. Las células se cultivaron a 37°C durante 12-14 días para el estudio de ensayo de captación. El estudio de ensayo de captación se inició después de que las células alcanzaran la confluencia, es decir, después de 12 a 14 días en cultivo. Cada placa se lavó con HEPES (pH 7,4). Se añadió G-2MePE a cada placa de cultivo de 60 mm y se incubó a 37°C . Se tomaron muestras a 5 s, 15 s, 30 s, 45 s, 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min y 30 min y 120 min después de la adición de G-2MePE. Las células se rasparon con un raspador de células en una solución de extracción y se centrifugaron a 20.000 g durante 20 min. El sobrenadante se analizó mediante HPLC para identificar G-2MePE y sus metabolitos. El sedimento celular se diluyó con NaOH para determinar el contenido de proteína mediante el ensayo de Lowry.

Resultados y discusión

[0080] Este estudio demostró que el G-2MePE era captado por células Caco-2 (es decir, 1,3%; figura 6). La captación de G-2MePE era dependiente del tiempo y de la dosis.

5 **Ejemplo 8: Permeabilidad de G-2MePE a través de células Caco-2: Efectos de potenciadores de la permeación**

Objetivo

10 [0081] El objetivo de este estudio fue determinar si los potenciadores de permeabilidad pueden aumentar el transporte de G-2MePE a través de capas de células Caco-2.

Métodos

15 [0082] La integridad de los cultivos celulares se confirmó tal como se describe en el ejemplo 6. Se añadió G-2MePE en tres o seis réplicas a las partes del donante de "Transwells" que contenían células Caco-2 en ausencia o en presencia de diversos potenciadores de la permeación (figura 4). Se añadieron 1,5 ml de tampón de transporte a la parte del receptor. A continuación, se dejaron incubarse los "Transwells". Se tomaron muestras (0,4 ml cada una) de la parte del receptor en diferentes puntos (15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 y 360 min). Después de tomar cada muestra, se añadieron 0,4 ml de tampón HBSS nuevo a la parte del "Transwell" de donde se tomó la muestra. 20 Posteriormente, se recogieron 0,1 ml de solución donante para medir la concentración del G-2MePE intacto. Después de cada toma de muestras, se sustituyeron 0,1 ml de G-2MePE a la misma concentración.

25 [0083] La peptidólisis se terminó añadiendo el mismo volumen de HCl (0,2 M) a cada muestra. Las muestras resultantes se centrifugaron a 3000 g durante 15 min. Los sobrenadantes se recogieron, se secaron mediante Speed Vacuum, se diluyeron con fase móvil y se analizaron mediante un espectrofluorofotómetro. Se calculó el coeficiente de permeabilidad aparente y se utilizó para comparar la permeabilidad entre el grupo de control y el grupo de tratamiento (figura 7). Se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) usando un medidor de tensión de Millipore en diferentes puntos de tiempo. Los promedios de los valores TEER de 30-180 min se compararon entre el grupo de control y el grupo de tratamiento.

Resultados

35 [0084] El EDTA (30 mM), caprato de sodio (20 mM), taurocolato (20 y 30 mM), ácido cítrico (30 mM) y bacitracina (3,5 mM), aumentaron significativamente la permeabilidad de la células Caco-2 de la membrana epitelial a G-2MePE (figura 7). La TEER se redujo significativamente mediante el uso de EDTA (30 mM) o caprato de sodio (20 mM), taurocolato (20 y 30 mM), o ácido cítrico (30 mM) (datos no mostrados).

Conclusiones

40 [0085] El taurocolato de sodio (≥ 20 mM), caprato (≥ 10 mM), EDTA (40 mM) o SDA (1 mM) se pueden utilizar para mejorar la permeabilidad de G-2MePE a través de los cultivos epiteliales de células Caco-2, presumiblemente al afectar las vías transcelular y paracelulares (figura 7).

45 [0086] De manera destacada y bastante inesperada, los efectos de caprato y taurocolato en la captación de fluoresceína y G-2MePE fueron bastante diferentes. Tal como se ha indicado anteriormente para la fluoresceína (figura 4), el caprato 20 mM tuvo un efecto mayor que el taurocolato 20 mM. Sorprendentemente, sin embargo, el taurocolato 20 mM tenía un efecto drásticamente mayor sobre la captación de G-2MePE que el caprato 20 mM (figura 7). Aunque el mecanismo para esta observación no es conocido, demuestra una propiedad inesperada de G-2MePE que lo diferencia de fluoresceína.

50 **Ejemplo 9: Unión a proteínas de GPE y G-2MePE in vitro**

Objetivo

55 [0087] El objetivo de este estudio fue si la unión de proteínas séricas a GPE y G-2MePE podría alterar la biodisponibilidad de los fármacos in vivo. El razonamiento es que si estos fármacos están unidos por las proteínas plasmáticas, entonces podría reducirse la biodisponibilidad del fármaco libre (no unido), disminuyendo así la eficacia neuroprotectora.

Métodos

60 [0088] Se utilizó una técnica de ultrafiltración para medir la fracción de GPE y G-2MePE libres en presencia de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, EE.UU.). Se prepararon triplicados de cada sistema (10 ml como volumen total) mezclando diferentes volúmenes de GPE y G-2MePE (1g/L) con albúmina (88 g/L) o agua MilliQ juntos. Las fracciones unida y no unida de cada sistema se separaron de albúmina de suero bovino mediante una unidad de ultrafiltración (Centrisart^(R)) con un peso molecular de corte de 10.000 daltons, Sartorius, Biolab). 65

[0089] El sistema 1 (tres columnas de la izquierda que se muestran en las figuras 8 y 9) se preparó mediante la mezcla de 5 ml GPE o 5 ml de G-2MePE con 5 ml de albúmina en la proporción de 1:88, respectivamente.

[0090] El sistema 2 (tres columnas centrales que se muestran en las figuras 8 y 9) se preparó mediante la mezcla de 5 ml de albúmina, 2,5 ml de GPE o G-2MePE y 2,5 ml de agua MilliQ ya que la proporción de fármaco frente a la albúmina era de 1:176, respectivamente.

[0091] El sistema 3 (tres columnas de la derecha que se muestran en las figuras 8 y 9) se preparó mezclando 2,5 ml de albúmina, 5 ml de GPE o G-2MePE y 2,5 ml de agua MilliQ ya que la proporción de fármaco frente a la albúmina era de 1: 44, respectivamente. Se preparó un control no específico mezclando 2,5 ó 5 ml de GPE o G-2MePE y 7,5 ó 5 ml de agua, respectivamente, como cantidad inicial total de GPE o G-2MePE en presencia de sistemas de variables. Todos los sistemas se mezclaron bien y se dejaron reposar durante una hora y media a 4°C.

[0092] Se tomó una muestra de 2 ml de cada sistema individual y se transfirió a una unidad de ultrafiltración separada. Todas las muestras se equilibraron a 25°C antes de la centrifugación. Se precentrifugaron las muestras por triplicado a 1000 g durante 5 minutos para dar tiempo de contacto suficiente entre las muestras con las membranas de las unidades. Después de la precentrifugación, todas las muestras se centrifugaron a 2500 g durante 30 min. A continuación, se extrajo con precaución el GPE o G-2MePE no unido (el filtrado) de cada sistema individual en el ultrafiltrado (Cu) en tubos etiquetados secos y se analizaron mediante HPLC en una columna C18 Aqua 5u 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Auckland, Nueva Zelanda) conectada a un modelo de separación Waters 2695 Alliance y un detector PDA Waters 2996 con una absorbancia medida a 210 nm. El porcentaje de GPE o G-2MePE unido se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ GPE o G-2MePE unido} = [1 - \text{Cu/Ct}] \times 100$$

en la que:

Ct indica la concentración total de GPE o G-2MePE presente en la unidad de ultrafiltración antes de su incubación con albúmina;

Cu indica la concentración de GPE o G-2MePE no unido presente en la unidad de ultrafiltración después de la incubación con albúmina.

Resultados

[0093] Las columnas de la izquierda mostradas para cada sistema en la figura 8 representan las cantidades de GPE (en mg) presentes en los respectivos sistemas: 1, 2 y 3, antes de la incubación con albúmina. Las columnas centrales mostradas para cada sistema en la figura 8 representan la cantidad de albúmina (en mg) presente en los sistemas 1, 2 y 3, antes de la incubación con GPE. Las columnas de la derecha para cada sistema en la figura 8 representan el porcentaje de unión de GPE a la albúmina.

[0094] Las columnas de la izquierda mostradas para cada sistema en la figura 8 representan las cantidades de G-2MePE (en mg) presentes en los respectivos sistemas: 1, 2 y 3, antes de la incubación con albúmina. Las columnas centrales mostradas para cada sistema en la figura 8 representan la cantidad de albúmina (en mg) presente en los sistemas 1, 2 y 3, antes de la incubación con G-2MePE. Las columnas de la derecha para cada sistema en la figura 8 representan el porcentaje de unión de G-2MePE a la albúmina.

[0095] El G-2MePE mostró menos unión a proteína que GPE, siendo el nivel de unión proporcional a la cantidad de proteína utilizada (figuras 8 y 9).

Conclusiones

[0096] Se observó inesperadamente que el G-2MePE tiene una menor unión a proteína que el GPE, haciendo el G-2MePE adecuado para su uso in vivo. Tal como se puede discernir mediante la comparación de las figuras 8 y 9, a la proporción más alta de fármaco con respecto a proteína (1:88 y 1:44), menos G-2MePE se unió a la albúmina. Por el contrario, a la misma proporción de fármaco:proteína (1:88 y 1:44), más GPE permaneció unido. Aunque el mecanismo de este fenómeno sorprendente permanece sin explicación, el grado de unión de la proteína de plasma-fármaco puede afectar notablemente a las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de un fármaco. Esto es debido al hecho de que tiene un tamaño molecular más bajo, el fármaco no unido puede penetrar más fácilmente la pared del vaso sanguíneo, mientras que el fármaco unido a proteína no puede debido a su mayor tamaño molecular. Además, la unión de la proteína de plasma a fármaco es también estereoselectiva en su naturaleza debido a la quiralidad inherente de las proteínas del plasma, tales como albúmina de suero humano (HSA) y alfa-1-glucoproteína ácida (AGP). Además, muchas moléculas terapéuticas no son tan activas si se unen a la proteína.

[0097] De este modo, una mayor unión a proteína puede disminuir la concentración eficaz del agente y, de ese modo, disminuir su eficacia terapéutica. Debido a que G-2MePE puede tener una alta biodisponibilidad, el G-2MePE puede por lo tanto ser un agente neuroprotector eficaz para el uso oral in vivo.

Ejemplo 10: Micropartículas de G-2MePE**Objetivo**

- 5 [0098] El objetivo de este estudio fue determinar si las micropartículas pueden proteger el G-2MePE de la degradación por enzimas, tales como pepsina, en el estómago. Para ello, se llevaron a cabo una serie de experimentos in vitro en soluciones que tenían diferente pH.

Métodos

- 10 [0099] Se disolvieron varias cantidades de G-2MePE o fluoresceína de sodio en una dispersión al 30% de EUDRAGIT(R) FS30D y se transfirieron a tubos de centrifugación. Los tubos que contenían muestras se congelaron a -80°C y a continuación se transfirieron a liofilizador para secar las muestras durante la noche. Después del secado, se pesaron los tubos de centrifugación. Se añadieron 20 mg cada una de las preparaciones de micropartículas
- 15 (proporción de polímero y fármaco de aproximadamente 20:1; 10:1; 1:5 y 1:2,5) a una solución que contenía 200 ml de HCl 0,1 M o tampón fosfato 0,2 M a pH 7. Se recogieron muestras a diferentes puntos de tiempo.

- [0100] Para el análisis de la fluoresceína de sodio, se añadieron muestras por triplicado en una placa de 96 pocillos. A continuación, la placa se leyó usando una longitud de onda de excitación de 495 nm y leyendo la fluorescencia a 520 nm usando un lector de microplacas de fluorescencia (Wallac 1420, Victor, múltiples lectores). Las muestras por triplicado de G-2MePE se analizaron por HPLC en una columna C 18 Aqua 5 u 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Auckland, Nueva Zelanda) conectada a un modelo de separación Waters 2695 Alliance y un detector PDA Waters 2996 con una absorbancia fijada a 210 nm.
- 20

Resultados y conclusiones

- [0101] Las micropartículas se prepararon y ensayaron en medios ácidos y básicos in vitro. Las micropartículas que incluían el polímero de recubrimiento entérico EUDRAGIT(R) eran resistentes al ácido del estómago y se liberaron en todo el tracto intestinal. La liberación a partir de micropartículas de la fluoresceína de sodio, un modelo de compuesto hidrófilo, a pH 7 fue de aproximadamente 4 veces más rápido que en un medio a pH 1. Este resultado confirmó que el polímero de recubrimiento entérico puede aumentar la eficiencia terapéutica de G-2MePE después de la administración oral. Las micropartículas también controlaban el momento en que las sustancias se liberaban permitiendo una liberación controlada (figuras 10A y 10B).
- 30
- [0102] Se concluye que un recubrimiento entérico puede retrasar la liberación de G-2MePE en el estómago, donde el pH es bajo (por ejemplo, <3,0) y aumentar la liberación en el duodeno, yeyuno, íleon o colon, donde el pH es cercano a la neutralidad.
- 35

Ejemplo 11: Microemulsiones de G-2MePE**Objetivo**

- [0103] El objetivo de este estudio fue formular microemulsiones de agua en aceite que contenían G-2MePE.

Materiales y métodos

- [0104] *Aceites*: triglicéridos de caprílico/cáprico (Crodamol GTCC[®]) fueron suministrados por Chemcolour Industries (NZ) Ltd (Auckland, NZ). Monoglicéridos/diglicéridos C8/C10 de ácido caprílico (Capmul MCM[®]) fueron suministrados por Abitec Corporation (Janesville, WI).
- 50

- [0105] *Tensoactivos*: Monooleato sorbitán de polioxietileno (20) (Tween 80[®]) y monooleato de sorbitán (Span 80[®]) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

- [0106] *Fármacos y otros productos químicos*: El G-2MePE se fabricó de acuerdo con los métodos descritos en la patente de EE.UU. No.: 7.041.314. El dihidrógeno de potasio, cloruro de potasio y ácido ortofosfórico se adquirieron de Scharlau Chemic. (Barcelona, España).
- 55

- [0107] *Construcción de diagrama de fases pseudo-terciario*: Se pesaron por separado Crodamol GTCC[®] y Capmul MCM[®], se mezclaron en la proporción de 3 a 1, respectivamente (45 g:15 g) y se agitaron para la mezcla completa. Se pesaron por separado los tensoactivos Tween 80[®] y Span 80[®], se mezclan en peso hasta una proporción de 3 a 2, respectivamente (36g:24 g) y se mezclaron bien. Se preparó una solución madre de G-2MePE 300 mg/ml mediante la suspensión de 900 mg de G-2MePE en 3 ml de solución salina y la dilución posterior de la solución con 3 ml de tampón de fosfato de pH 3 (fuerza iónica igual a 0,1 mol/litro) (1:1) hasta la concentración de G-2MePE (150 mg/ml). La fase acuosa que contenía G-2MePE se dejó durante la noche a temperatura ambiente para equilibrarse. Se prepararon un gran número de muestras (más de 250 muestras) que contenían aceite (mezcla de Crodamol GTCC[®] y Capmul MCM[®] en la proporción de 3:1), tensoactivos no iónicos (mezcla de Tween 80[®] y Span 80[®] en la proporción de 3:2) y la fase acuosa que contenía G-2MePE a una concentración de 150 mg/ml y se dejaron durante
- 60
- 65

la noche a temperatura ambiente para equilibrarse. Se utilizó microscopía de luz normal y de luz polarizante para identificar las combinaciones que dieron origen a la microemulsión, cristales líquidos o emulsiones gruesas.

[0108] *Preparación de microemulsiones que contienen G-2MePE*: Se mezclaron Crodamol GTCC® y Capmul MCM® en las proporciones descritas anteriormente. Se mezclaron los tensoactivos no iónicos en la proporción descrita anteriormente. La solución madre que contenía G-2MePE se preparó tal como se ha descrito anteriormente. Se añadió la mezcla de Crodamol/Capmul (7,6 g) en un pequeño vaso de precipitados, seguido de la adición de la mezcla de Tween 80®/Span 80® (2 g) y se mezclaron los dos componentes con intensidad utilizando un agitador magnético a 1000 rpm durante 10 min.

[0109] Se añadió gota a gota la solución de G-2MePE (0,4 g) (10 ul por gota) a la mezcla preparada anteriormente. La proporción de Crodamol/Capmul:Tween 80®/Span 80®:G-2MePE fue de 7,6:2:0,4 en un sistema de microemulsión de 10 g. Las microemulsiones que contenían 6 mg de G-2MePE por ml de microemulsión se identificaron visualmente como soluciones isotrópicas, transparentes, siendo termodinámicamente estables. Las emulsiones gruesas se identificaron por su turbidez e isotropía, y los cristales líquidos se identifican por su birrefringencia característica (es decir, no isotrópicos) y la aparición de patrones de interferencia en la luz polarizada. Tales características de los cristales líquidos pueden estar relacionadas con la orientación de las moléculas paralelas entre sí en grupos grandes, visibles bajo un microscopio.

Resultados y Conclusiones

[0110] Se construyó un diagrama de fases pseudo-terciario (figura 11) para los componentes y se identificaron los límites de las diferentes regiones. ME: microemulsión, LC: cristal líquido, coarse: emulsión gruesa. El área punteada en el triángulo representa las proporciones que forman emulsiones gruesas. El área marcada con un patrón de ladrillo representa formulaciones de cristal líquido y el área marcada con un patrón de diamantes negros representa microemulsiones.

[0111] Se observó que las microemulsiones de G-2MePE tenían un tamaño de gota uniforme de menos de 200 nm. Las microemulsiones basadas en lípidos ofrecen ventajas para la administración oral de fármacos, incluyendo péptidos mediante la mejora de la estabilidad de los fármacos, ya que protegen los fármacos contra la degradación enzimática y mejoran la absorción de fármacos mediante los aumentos inducidos por tensoactivos en la fluidez de membrana. Se concluye que las microemulsiones, emulsiones gruesas y formulaciones de cristal líquido se pueden utilizar para suministrar G-2MePE disponible por vía oral.

Ejemplo 12: G-2MePE en nanocápsulas poliméricas (Nac)

Objetivo

[0112] El objetivo de estos estudios fue desarrollar sistemas de administración de nanocápsulas para G-2MePE para proteger el compuesto de la degradación y facilitar su transporte a través del epitelio intestinal.

Métodos

[0113] Las nanocápsulas poliméricas (Nac) se prepararon utilizando métodos de polimerización interfacial. En primer lugar, se preparó una microemulsión utilizando los métodos descritos en el ejemplo 11.

[0114] A continuación, se prepararon 10 g de microemulsión 2 (MC2) tal como se describe en el Ejemplo 13 a continuación. Se mezclaron 100 mg, 150 mg ó 300 mg de monómero de ECA (2-cianoacrilato de etilo) (Sigma, St Louis, MO) con 300 mg de cloroformo en un tubo Eppendorf y se agitó. La solución de monómero se añadió lentamente gota a gota a la MC2 bajo agitación magnética a 4°C a aproximadamente 800 rpm y a continuación se dejó reposar durante la noche para permitir que se produjera la polimerización.

[0115] Los productos resultantes se centrifugaron a 51.500 g durante 60 minutos a 25°C (centrífuga Beckman L-70, rotor 70Ti) para aislar las Nac. Después de extraer el sobrenadante, el precipitado se secó al aire y a continuación se dispersó en etanol mediante agitación intensa, seguido de ultrasonificación para eliminar el exceso de aceite y tensoactivo. A continuación, esto se centrifuga a ~ 1.600 xg durante 15 minutos a 25°C (microcentrífuga Sigma 1-13). El proceso de lavado se repitió tres veces con cada muestra para asegurar la eliminación de todos los residuos.

[0116] El producto resultante a continuación se volvió a dispersar en agua Milli-Q, se congeló durante la noche a -20°C (Fisher y Paykel Ltd NZ, congelador de Leonard) y a continuación se liofilizó durante 1 día a -52°C y un vacío de 30×10^{-3} mbar utilizando un FreeZone® Bulk Tray Dryer System (Labconco, EE.UU.).

Resultados y Conclusiones

[0117] Las nanocápsulas poliméricas que contenían microemulsiones de G-2MePE eran cápsulas pequeñas esféricas y generalmente variaban en tamaño entre 100-200 nm de diámetro (figuras 12A y 12B). Las nanocápsulas se han utilizado para mejorar la biodisponibilidad oral de los péptidos, ya que pueden proteger a los péptidos de la degradación proteolítica. Además, pueden pasar a través de la mucosa intestinal; y por lo tanto facilitan la absorción de péptidos a partir del lumen intestinal. Se ha observado que las nanopartículas se trasladan a través de la mucosa intestinal por tres vías diferentes: a través de parches de Peyer al GALT, y a través de las vías intercelulares e intracelulares.

[0118] Se llega a la conclusión de que las nanocápsulas que contienen G-2MePE se pueden utilizar para la administración oral eficaz de G-2MePE.

5 **Ejemplo 13: Liberación de G-2MePE de las microemulsiones, cristales líquidos y emulsiones gruesas**

Objetivo

10 [0119] El objetivo de estos estudios fue determinar las características de liberación de G-2MePE de diferentes sistemas de fases de la presente invención.

Métodos

15 [0120] Se realizaron estudios de liberación de fármacos con celdas Franz verticales (modelo VTC-200). Se eligió una formulación de cada uno de los tres sistemas de fases diferentes preparados de acuerdo con el Ejemplo 11. La microemulsión 1 (MCL) estaba compuesta de 60% de GTCC:MCM (3:1), 30% de tensoactivos (Tween 80[®]:Span 80[®]) (3:2) y 10% de 150 mg/ml de G-2MePE en tampón fosfato de pH 3. La microemulsión 2 (MC2) estaba compuesta de 45% de GTCC:MCM (3:1), 25% de tensoactivos (Tween 80[®]:Span 80[®]) (3:2) y 30% de 150 mg/ml de G-2MePE en tampón fosfato de pH 3. Los cristales líquidos estaban compuestos de 15% de GTCC:MCM (3:1), 70% de tensoactivos (Tween 80[®]:Span 80[®]) (3:2) y 15% de 150 mg/ml de G-2MePE en tampón fosfato, pH 3. Una emulsión gruesa estaba compuesta de 16% de GTCC:MCM (3:1), 14% de tensoactivos (Tween 80[®]:Span 80[®]) (3:2) y 70% de 150 mg/ml de G-2MePE en tampón fosfato de pH 3. Se transfirieron muestras por triplicado de 0,25 g de G-2MePE en varios volúmenes de las formulaciones anteriores a celdas Franz para los estudios de liberación de fármacos.

25 [0121] Se sumergieron tubos de diálisis de membrana en agua durante 24 horas antes del inicio de estos experimentos. Esta membrana permite selectivamente la permeación de G-2MePE y evita la difusión de los constituyentes de MC en el compartimento donante. A lo largo de este estudio, se obtuvieron perfiles de liberación de fármaco usando celdas Franz verticales. Una celda Franz vertical está comprendida de una cámara donante en la parte superior y una cámara receptora por debajo de la cual está separada por la membrana de diálisis. Se tomaron muestras periódicamente de la cámara receptora a través del puerto de muestreo. La pared de la cámara receptora estaba rodeada por una camisa de agua conectada a un calentador para mantener una temperatura constante dentro de la celda.

35 [0122] El compartimento receptor de cada una de las celdas Franz se rellenó con tampón de fosfato a pH 7,4, mientras que el compartimento donante contenía la formulación seleccionada de G-2MePE. A continuación, el compartimento donante se selló con una película oclusiva (Parafilm "M", Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL). A lo largo del experimento, se asignaron tres celdas Franz para cada formulación preparada tal como se indica anteriormente, en que el medio receptor se mantuvo a una temperatura de ~ 37°C. Se recogieron muestras (400 µl) del compartimento receptor a 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 480, 600, 720 y 1440 minutos y se rellenaron con el mismo volumen de tampón fresco en el receptor. La absorbancia de cada muestra se midió utilizando un espectrofotómetro UV (Biochrom Libra S32 PC) a la longitud de onda de 210 nm. A continuación, se utilizó una curva estándar para calcular la concentración de G-2MePE en cada muestra. Los perfiles de liberación de fármaco se muestran en la figura 13.

Resultados

50 [0123] Los perfiles de liberación de fármaco mostraron que las microemulsiones y formulaciones de cristal líquido liberaron G-2MePE de forma sostenida, mientras que las emulsiones gruesas liberaron de forma inesperada G-2MePE muy rápidamente (figura 13). Se seleccionó MC2 para los estudios in vivo descritos en los Ejemplos 16 y 17.

Conclusiones

55 [0124] Se llegó a la conclusión a partir de estos estudios que todos los sistemas de tres fases pueden tener utilidad en el tratamiento usando G-2MePE. En primer lugar, se pueden utilizar microemulsiones y cristales líquidos en situaciones en las que se desea la liberación controlada relativamente lenta de G-2MePE. A continuación, se pueden utilizar emulsiones gruesas cuando se desea una liberación de G-2MePE relativamente rápida. Por último, las combinaciones de microemulsiones más emulsiones gruesas o cristales líquidos más emulsiones gruesas pueden utilizarse de manera deseable cuando se desea tanto una liberación rápida como una liberación controlada de G-2MePE.

Ejemplo 14: Biodisponibilidad de G-2MePE administrado por vía oral

Objetivo

65 [0125] El objetivo de estos estudios fue investigar la liberación de G-2MePE desde diversos sistemas de liberación in

vivo.

Métodos

[0126] Se utilizaron ratas Wistar macho de 7-9 semanas de edad en los experimentos. Los animales se anestesiaron usando una mezcla de halotano al 5%/oxígeno y se mantuvo bajo una mezcla de halotano al 3%/oxígeno durante todo el experimento. Se realizó una incisión de 10 mm a lo largo de la línea media del cuello. Se utilizaron fórceps quirúrgicos romos para separar los músculos a lo largo del lado derecho de la tráquea para exponer la vena yugular del lado derecho. Se introdujo un catéter de polietileno (DO 1,5 mm, DI 0,6 mm) en la vena yugular y se mantuvo en el lugar por medio de suturas. Este catéter permitió recoger muestras (100 µl) en los puntos de tiempo seleccionados para el estudio farmacocinético de G-2MePE. El catéter se llenó con solución salina heparinizada (40 IU/ml) para evitar su oclusión por coágulos de sangre. El muestreo se llevó a cabo mientras las ratas estaban bajo anestesia general completa y las ratas se sacrificaron al final del experimento.

Muestreo del líquido cefalorraquídeo

[0127] Las ratas que se sometieron a un muestreo de líquido cefalorraquídeo (CSF) se anestesiaron con halotano al 5%/oxígeno. Sus cabezas se colocaron en un marco estereotáxico. Se realizó una incisión en la parte superior de la cabeza y se expuso la base de la zona del cráneo. Se tomaron muestras de CSF de la cisterna magna utilizando una aguja ultrafina de calibre 29 y una jeringa. Los animales se sacrificaron a continuación mediante una sobredosis de pentobarbital (i.p. 180 mg/kg), se perfundieron a través del corazón con solución salina al 0,9% y los tejidos se recogieron para su análisis.

Farmacocinética y biodisponibilidad de G-2MePE in vivo

[0128] Se cribó G-2MePE en diversas formulaciones para evaluar su efecto sobre la biodisponibilidad oral. Se analizaron las siguientes formulaciones:

Formulación 1 (G-2MePE disuelto en 35,3 mM de ácido taurocólico (TA), administrado a 10 mg/kg, n = 6);

Formulación 2 (G-2MePE formulado en micropartículas (MP) y dispersado en TA 35,3 mM, administrado a 10 mg/kg, n = 6);

Formulación 3 (G-2MePE formulado en MP y dispersado en TA 35,3 mM que contenía bacitracina 5 mM, administrado a 30 mg/kg, n = 6);

Formulación 4 (G-2MePE formulado como una microemulsión (MC), administrado a 30 mg/kg, n = 6);

Formulación 5 (G-2MePE formulado como una MC que contenía bacitracina 5 mM, administrado a 30 mg/kg, n = 6);

Formulación 6 (G-2MePE disuelto en TA 35,3 mM para formular MC, a continuación adición de monómero ECA a la microemulsión como en el Ejemplo 12, administrado a 30 mg / kg, n = 6);

Formulación 7 (G-2MePE disuelto en TA 35,3 mM para formular MC primero, a continuación, adición de monómero ECA, bacitracina 5 mM, administrado a 30 mg/kg, n = 6).

También se analizó un grupo de control (n = 6) al que se administró G-2MePE disuelto en solución salina a una dosis de 30 mg/kg.

[0129] Las muestras de sangre recogidas se centrifugaron a 3.300 g durante 15 minutos para obtener plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a -80°C. Las muestras de plasma se descongelaron a continuación y se analizaron por cromatografía líquida/espectrometría de masas (LCMS). Se calcularon la biodisponibilidad de G-2MePE y sus vidas medias después de la administración oral de diferentes formulaciones (tabla 2 y figura 14).

Resultados

[0130] Hubo un aumento significativo de la biodisponibilidad de G-2MePE cuando se administró en las formulaciones 1-7 en comparación con G-2MePE administrado en solución salina (P <0,05). De las siete formulaciones, G-2MePE en microemulsiones y micropartículas mostró la biodisponibilidad más elevada (figura 14).

Tabla 2: Vida media y biodisponibilidad de G-2MePE

Formulación utilizada	Vida media	Biodisponibilidad %
Control (30 mg/kg en solución salina)	1,67 ± 0,10	5,48 ± 0,45
Formulación 1 (10 mg/kg en TA)	7,86 ± 1,50**	15,94 ± 1,27**
Formulación 2 (10 mg/kg en micropartículas)	4,97 ± 0,24**	8,74 ± 0,90**
Formulación 3 (30 mg/kg en micropartículas + bacitracina)	26,56 ± 5,74**	41,75 ± 6,52**
Formulación 4 (30 mg/kg en microemulsión)	2,33 ± 0,40	32,75 ± 4,58**
Formulación 5 (30 mg/kg en	16,31 ± 1,00**	19,12 ± 2,53**

microemulsión + bacitracina)		
Formulación 6 (30 mg/kg en microemulsión + ECA)	13,62 ± 0,48**	24,15 ± 3,25**
Formulación 7 (30 mg/kg en microemulsión + ECA + bacitracina)	18,18 ± 4,52**	24,19 ± 4,28**
** representa P < 0,01		

Conclusiones

[0131] La biodisponibilidad de G-2MePE aumentó significativamente mediante las formulaciones 2-7 en comparación con la formulación acuosa 1. La biodisponibilidad oral más alta de G-2MePE se encontró mediante el uso de micropartículas y microemulsiones (figura 14). De este modo, se llega a la conclusión que las emulsiones y formas encapsuladas de G-2MePE pueden ser formulaciones neuroprotectoras eficaces administradas por vía oral.

Ejemplo 15: Oclusión de la arteria cerebral media inducida por endotelina-1

Objetivo

[0132] El objetivo de estos estudios fue determinar si el G-2MePE oral puede ser eficaz en el tratamiento de afecciones neurodegenerativas.

[0133] Por lo tanto, se llevaron a cabo una serie de estudios en un modelo reconocido en la técnica de apoplejía en ratas, a saber, la oclusión de la arteria coronaria media (MCAO) inducida por la endotelina-1. Este sistema es conocido por imitar los signos neurológicos y de comportamiento y los síntomas de apoplejía en los seres humanos, y por lo tanto, los resultados obtenidos son predictivos de los efectos terapéuticos en seres humanos con apoplejía. Se midió el tamaño del infarto y el cambio en el peso entre el día de la inducción de MCAO y el día 3 después de la inducción de MCAO.

Materiales y Métodos

Oclusión de la arteria cerebral media inducida por la endotelina-1

[0134] Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales llevados a cabo en este estudio habían sido aprobados por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Auckland. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar cualquier sufrimiento de los animales y el número de animales utilizados. Se utilizaron ratas macho adultas Sprague-Dawley (280 – 350 g).

[0135] Se coadministró un anestésico por inhalación (halotano) con oxígeno para anestesiarse las ratas. Inicialmente se aplicó halotano al 5%/oxígeno para anestesiarse al animal, y a continuación, se utilizó halotano al 2,5% para mantener la anestesia. Una vez bajo anestesia, se implantó una cánula guía en el cráneo de las ratas anestesiadas, que se fijó en su posición con cemento dental. Después de esta implantación, también se canuló la vena yugular del animal. Dos o tres días más tarde, las ratas se anestesiaron de nuevo como antes y se sometieron a MCAO de acuerdo con el método de Sharkey y colaboradores (Sharkey et al., 1993). Esto implicaba colocar la cabeza de cada rata en un marco estereotáxico y bloquearla en su posición. Los animales también se colocaron en una almohadilla de calefacción, que está diseñada para mantener la temperatura corporal dentro del rango fisiológico durante la duración del procedimiento quirúrgico.

[0136] Se recortó el pelo sobre el cuero cabelludo con un par de tijeras, se lavó con una esponja y se limpió en seco con una solución de Betadine® (yodo). Después de esto, se realizó una incisión en la piel en la línea media a través del cuero cabelludo para exponer la línea de sutura coronal (bregma) del cráneo. A continuación, se realizó una pequeña abertura a través del hueso craneal utilizando las siguientes coordenadas: 0,2 mm anterior y 5,2 mm lateral al bregma. A través de una cánula guía, se conectó una aguja de perfusión de calibre 28 a una jeringa de 10 µl que contenía 100 pmol de endotelina-1 porcina (Et-1; Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, Missouri, EE.UU.) en 3 µl de solución salina y se insertó verticalmente a una profundidad de 8,7 mm por debajo de la superficie del cráneo.

[0137] Para constreñir la arteria cerebral media, se inyectó la solución que contenía la endotelina a una velocidad de 1 µl por minuto durante tres minutos. Después de la perfusión, la aguja se dejó en el lugar durante cinco minutos más antes de ser extraída del cerebro. Se suturó la incisión de la piel y los animales se trasladaron a una incubadora calentada (37°C) para recuperarse de la cirugía. Una vez despiertos, los animales se transfirieron a continuación a sus jaulas donde tenían pleno acceso a alimento y agua. Un animal fue eliminado del estudio en el segundo día después de la inducción de la MCAO debido a una pérdida de peso inaceptablemente alta (15%).

Procedimientos histológicos

[0138] Tres días después del tratamiento con fármacos, los animales se sacrificaron utilizando una sobredosis de pentobarbital de sodio y se recogieron los cerebros para la evaluación histológica de la supervivencia neuronal. Las ratas se perfundieron transcardialmente con una solución salina normal al 0,9% seguido por formalina al 10%. Se extrajo el cerebro del cráneo y se almacenó en la misma solución de fijación durante al menos 24 horas. Se cortaron tres secciones coronales de 2 mm usando una matriz de cerebro de roedores (RBM-3000C/RBM-4000C, ASI Instruments, EE.UU.). Sección A: directamente delante del quiasma óptico, sección B: inmediatamente después de la sección A por detrás del quiasma óptico y la sección C inmediatamente después de la sección B. Los cortes se mantuvieron en formalina al 10% durante al menos 24 horas, se procesaron en un porcentaje creciente de alcohol y en cloroformo y se bañaron en parafina para su posterior corte. Con un espesor de 8 μ m, se cortaron secciones coronales en un microtomo Leica® (Leica Instruments, Nussloch, Alemania), montado sobre portamuestras recubiertas de microscopio Polysine™ (BioLab científicos, NZ) y se tiñeron con tiónina-fucsina ácida antes de la evaluación microscópica.

Medición de Peso

[0139] El porcentaje de cambio de peso se calculó utilizando la fórmula: $(w_2 - w_1) / w_1 \times 100\%$, donde w_2 es el peso 3 días después de la inyección de endotelina y w_1 es el peso en el momento de la inyección de endotelina.

Análisis estadístico

[0140] Todos los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism™ (Versión 3.02, GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EE.UU.). Los datos se presentan como el promedio $\pm$ SEM y la significación se definió a $p < 0,05$.

Ejemplo 16: La administración oral de microemulsión de G-2MePE trata MCAO

Materiales y Métodos

Oclusión de la arteria cerebral media inducida por endotelina

[0141] Se utilizó el método de inducción de MCAO descrito en el Ejemplo 15 anterior. Se canularon 24 animales, todos recibieron inyecciones de Et-1, a las 2 y a continuación, a las 4 horas, 12 animales fueron tratados por vía oral con una microemulsión que contenía G-2MePE y los 12 animales restantes fueron tratados con vehículo.

Preparación de microemulsiones

[0142] Las microemulsiones que contenían G-2MePE se prepararon de acuerdo a los métodos descritos en el Ejemplo 11.

Tratamiento con G-2MePE

[0143] Se administraron las ratas con agua miliQ ($n = 12$) o microemulsión que contenía G-2MePE (volumen de G-2MePE igual a 12 mg/ml de microemulsión) a las 2 horas y 4 horas después de la MCAO, en un total de 80 mg/kg de G-2MePE por rata.

Procedimientos histológicos, mediciones del peso y análisis estadístico

[0144] Las mediciones histológicas y del peso son tal como se describen en el Ejemplo 15.

Resultados

[0145] La figura 15A muestra que la formulación en microemulsión de G-2MePE redujo el tamaño del infarto. La dosis total fue de 80 mg/kg. Vehículo ($n = 12$); G-2MePE ($n = 11$). Prueba t no apareada, $p < 0,0001$.

[0146] La figura 15B muestra que la formulación en microemulsión de G-2MePE disminuyó la pérdida de peso asociada con la MCAO. Vehículo ($n = 12$); G-2MePE ($n = 11$). Los animales tratados con G-2MePE perdieron menos peso que los animales de control tratados con vehículo. $P = 0,0035$.

Conclusión

[0147] Se llegó a la conclusión a partir de este estudio que las microemulsiones de G-2MePE pueden ser tratamientos efectivos para MCAO en ratas después de la administración oral. Debido a que este sistema experimental es predictivo de los efectos observados en los seres humanos con apoplejías, también se concluyó que las microemulsiones de G-2MePE pueden ser activas por vía oral para el tratamiento de seres humanos que sufren de apoplejías.

Ejemplo 17: Microemulsión de G-2MePE: estudio de la respuesta a la dosis oral**Objetivo**

- 5 [0148] El objetivo de este estudio fue establecer la curva de dosis-respuesta para la microemulsión que contiene 6 mg de G-2MePE por 1 ml de microemulsión.

Materiales y métodos

- 10 *Oclusión de la arteria cerebral media inducida por endotelina*

[0149] Se utilizó el método de inducción de MCAO descrito en el Ejemplo 15 anterior. Se canularon 39 animales, todos recibieron las inyecciones Et1, 7 animales murieron o fueron sacrificados antes del final del período de supervivencia de 3 días después de la MCAO.

- 15 *Preparación de microemulsiones*

[0150] Las microemulsiones se prepararon tal como se describe en el Ejemplo 11.

- 20 *Tratamiento con G-2MePE*

[0151] Los animales fueron tratados por vía oral 3 horas después de inducir la MCAO. Los animales se trataron con la microemulsión que contenía 6 mg de G-2MePE/ml o agua milliQ como vehículo. El fármaco se administró a un volumen ajustado para el peso corporal con el fin de suministrar 15, 30 ó 60 mg/kg.

- 25 *Procedimientos histológicos, mediciones del peso y análisis estadístico*

[0152] La determinación del tamaño del infarto, el peso corporal y el análisis estadístico se llevaron a cabo tal como se describe en el Ejemplo 15.

- 30 **Resultados**

[0153] El G-2MePE administrado por vía oral causó una reducción dependiente con la dosis en el tamaño del infarto cerebral. A la dosis más alta de G-2MePE, el grado de inhibición fue del 94,5% (figura 16A). También se observó que el G-2MePE administrado por vía oral redujo la pérdida de peso asociada con la MCAO (figura 16B).

- 35 **Conclusiones**

[0154] Se llegó a la conclusión de que las formulaciones en microemulsión administradas por vía oral que contenían G-2MePE pueden ser eficaces en la reversión de los efectos perjudiciales de las apoplejías en ratas. También se concluyó que otras formulaciones de G-2MePE de la presente invención pueden ser eficaces en la reversión de los efectos perjudiciales de la MCAO. Además, debido a que el sistema de la MCAO estudiado aquí es razonablemente predictivo de los efectos terapéuticos observados en los seres humanos, se concluye que las formulaciones de la presente invención que contienen G-2MePE pueden ser eficaces en el tratamiento de seres humanos con trastornos neurológicos crónicos y/o agudos, incluyendo apoplejías u otras lesiones y enfermedades cerebrales, incluyendo hipoxia/isquemia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas crónicas. Por último, también se concluye que las formulaciones de G-2MePE de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de los efectos neurodegenerativos asociados con lesiones agudas, incluyendo lesión cerebral traumática, infartos coronarios, hipoxia aguda o isquemia u otros trastornos caracterizados por la degeneración neuronal o muerte celular.

- 50 **Ejemplo 18: Administración oral de formulación acuosa de G-2MePE**

Objetivo

- 55 [0155] Para proporcionar una base para la comparación de las eficacias de las microemulsiones con formulaciones acuosas que contienen G-2MePE, se realizaron estudios comparables a los descritos anteriormente, pero usando G-2MePE disuelto en solución salina en lugar de las formulaciones de microemulsión.

Materiales y métodos

- 60 [0156] Se utilizó el método de inducción de MCAO descrito en el ejemplo 15 anterior.

Tratamiento con G-2MePE

- 65 [0157] Se disolvió G-2MePE liofilizado en agua a 10 mg/ml. A las cinco horas después de la inyección con Et-1, se administraron 2 ml de la formulación de G-2MePE, es decir, 60 mg/kg (n = 11) ó 2 ml de agua milliQ (grupo tratado

con vehículo, n = 13) a cada animal por sonda oral 3 horas después de MCAO.

Procedimientos histológicos, mediciones del peso y análisis estadístico

- 5 [0158] Los métodos histológicos, mediciones del peso y análisis estadístico se llevaron a cabo tal como se describe en el Ejemplo 15.

Resultados

10 Efecto de las soluciones acuosas de G-2MePE en el tamaño del infarto

- [0159] La administración oral de soluciones acuosas de G-2MePE (60 mg/kg) redujo significativamente la zona del infarto en comparación con el grupo tratado con vehículo (n = 13, * P <0,05) (figura 17A). La inhibición producida por las soluciones acuosas de G-2MePE fue de aproximadamente el 63% de los animales tratados con vehículo (figura 17A). En cambio, la inhibición producida por la formulación en microemulsión de G-2MePE fue superior que la producida por la formulación acuosa (véase la figura 16 A; es decir, inhibición de 94%).

Efecto de las soluciones acuosas de G-2MePE en el porcentaje del cambio de peso

- 20 [0160] La administración oral de soluciones acuosas de G-2MePE (60 mg/kg) redujo la pérdida de peso en los animales con la MCAO en aproximadamente 3/4, aunque el efecto no fue estadísticamente significativo (p <0,2) (Figura 17B). Sin embargo, en los animales tratados con G-2MePE, el cambio de peso no fue estadísticamente diferente de cero.

25 Conclusiones

- [0161] Se concluye a partir de estos estudios que las formulaciones en emulsión de G-2MePE pueden mejorar la biodisponibilidad del fármaco en comparación con soluciones acuosas simples, y pueden dar lugar a concentraciones controladas del fármaco en animales, haciendo que estas formulaciones sean útiles para el uso in vivo en seres humanos y otros animales.

- [0162] Se ha encontrado sorprendentemente que el grado de neuroprotección ofrecido por microemulsiones suministradas por vía oral (95%) fue casi completo tal como se mide por el tamaño del infarto. Este efecto inesperadamente mayor en comparación con las soluciones acuosas de G-2MePE administradas por vía oral (63%) significa que las formulaciones de G-2MePE de la presente invención pueden ser ventajosas con respecto a las preparaciones acuosas. De este modo, las preparaciones encapsuladas o en microemulsión de G-2MePE pueden ser útiles en el tratamiento de una variedad de afecciones caracterizadas por la neurodegeneración, incluyendo apoplejía, hipoxia/isquemia, TBI, CABG y afecciones neurodegenerativas crónicas.

40 Ejemplo 19: Comparación de G-2MePE administrado por vía intravenosa y oral

Objetivo

- 45 [0163] El objetivo de este estudio fue comparar los efectos de la administración intravenosa de una preparación acuosa de G-2MePE con los observados en el estudio anterior utilizando G-2MePE en formulaciones en microemulsión (figura 16A).

Métodos

- 50 [0164] Se utilizaron animales preparados como en el ejemplo 15 para la MCAO inducida por endotelina-1. Sin embargo, aquí, el G-2MePE se suministró por vía intravenosa como una solución acuosa en dosis de 1,2, 12 y 120 mg/kg administrados en un período de 4 horas de tiempo después de la MCAO.

- 55 [0165] Se trataron 12 animales con vehículo (solución salina) y se trataron 11 animales con soluciones acuosas de G-2MePE (i.v.).

Resultados

- 60 [0166] Los resultados de este estudio se muestran en la figura 18, que es un gráfico que representa el área promedio del infarto observado después de la MCAO inducida por endotelina-1. Las soluciones acuosas administradas por vía intravenosa de G-2MePE causaron una reducción dependiente de la dosis en el tamaño del infarto, observándose el mayor efecto con una dosis total de 120 mg/kg G-2MePE. La cantidad de neuroprotección proporcionada por esta dosis de G-2MePE acuosa fue aproximadamente del 74,4% en comparación con animales de control tratados con vehículo. Los datos se presentan como el promedio $\pm$ SEM; ** P <0,01 usando ANOVA y la prueba post hoc de Dunnett.

- 65 [0167] Se encontró sorprendentemente que las formulaciones en emulsión de G-2MePE administradas por vía oral a

½ de esta dosis (es decir, 60 mg/kg) produjeron una inhibición sustancialmente mayor del tamaño del infarto (inhibición del 94,5%) que la observada para las soluciones acuosas de G-2MePE. Este resultado fue completamente inesperado en base al entendimiento previo de los efectos de G-2MePE.

- 5 **[0168]** Se concluye a partir de estos estudios que nuestras nuevas formulaciones de G-2MePE pueden ser beneficiosas para la administración oral in vivo a animales, incluyendo los seres humanos, para el tratamiento de la neurodegeneración que resulta de trastornos neurológicos agudos y/o crónicos. De este modo, estas formulaciones proporcionan avances en la terapia para tratar enfermedades y lesiones neurológicas hasta ahora difíciles de tratar.
- 10 **[0169]** Se puede apreciar que las descripciones, ejemplos y figuras en el presente documento se utilizan para ilustrar realizaciones específicas de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica, que comprende:
una emulsión de agua en aceite que tiene:
5 una fase hidrofóbica continua que incluye al menos un aceite,
 al menos un tensoactivo; y
una fase hidrofílica acuosa discontinua que contiene glicil-2 metilprolil glutamato (G-2MePE).
2. Composición, según la reivindicación 1, en la que dicho tensoactivo se selecciona del grupo que consiste en
10 monooleato de polioxietileno (20) sorbitán (Tween 80[®]), monooleato de sorbitán (Span 80[®]) y mezclas de los
 mismos.
3. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende además un potenciador de la
 permeabilidad seleccionado del grupo que consiste en caprato de sodio y taurocolato de sodio.
- 15 4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición es una microemulsión.
5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición es una emulsión
 gruesa.
- 20 6. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición es un cristal líquido.
7. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una micropartícula o una
 nanopartícula, comprendiendo dicha micropartícula o dicha nanopartícula G-2MePE rodeado por un recubrimiento.
- 25 8. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un inhibidor enzimático.
9. Composición farmacéutica, que comprende:
una formulación que contiene uno o más composiciones de la reivindicación 4 o la reivindicación 6 en combinación
30 con una composición de la reivindicación 5.
10. Composición oral para el tratamiento de un trastorno neurológico, que comprende:
una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; y
un agente neuroprotector adicional.
- 35 11. Utilización de cualquier composición, según las reivindicaciones 1 a 10, para la fabricación de un medicamento
 para el tratamiento de un trastorno neurológico.
12. Utilización, según la reivindicación 11, en la que dicho trastorno se selecciona del grupo que consiste en lesión
40 cerebral traumática, apoplejía, hipoxia/isquemia, cirugía de bypass en arteria cardíaca, infarto de miocardio,
 enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.
13. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para utilizar en el tratamiento de un trastorno
 neurológico.
- 45 14. Composición, según la reivindicación 13, en la que dicho trastorno se selecciona del grupo que consiste en
 lesión cerebral traumática, apoplejía, hipoxia/isquemia, cirugía de bypass en arteria cardíaca, infarto de miocardio,
 enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.

50

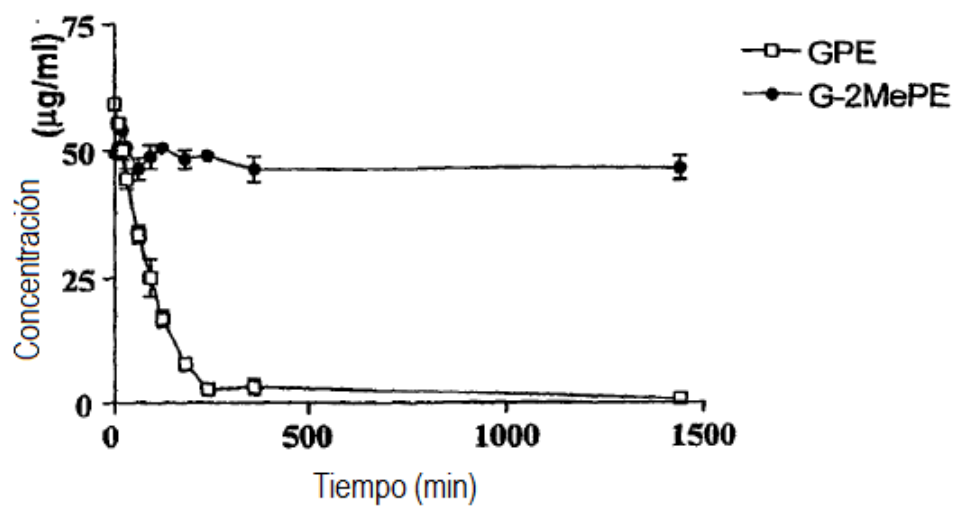


FIG. 1

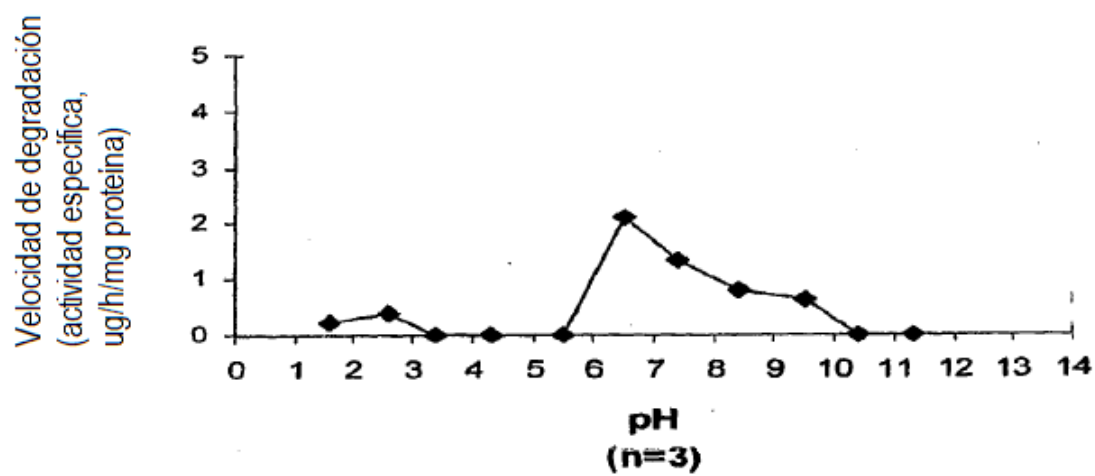


FIG. 2

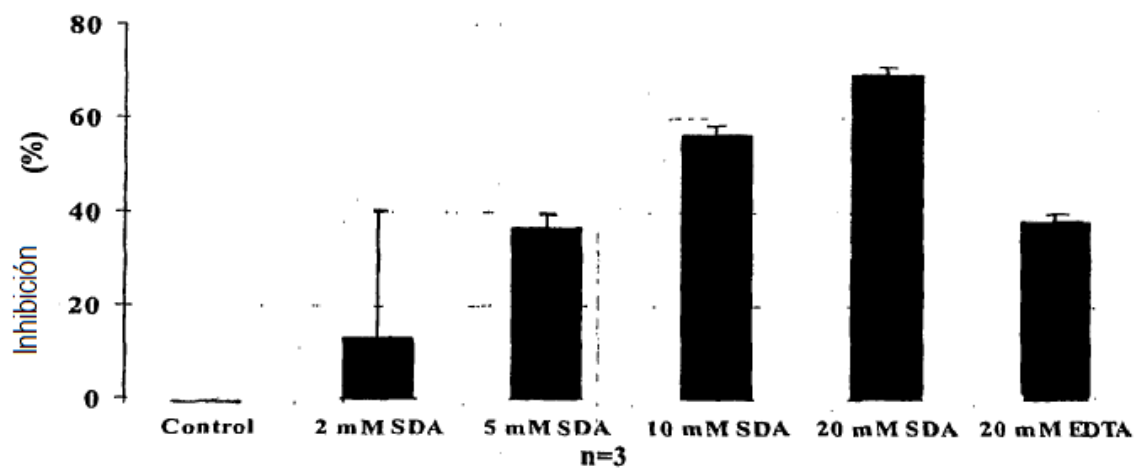


FIG. 3

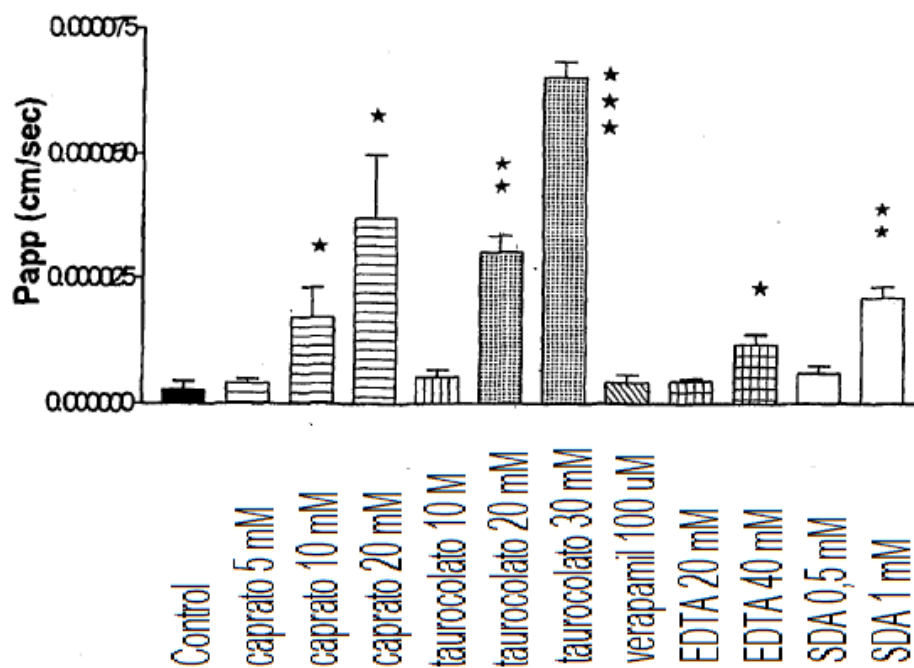


FIG. 4

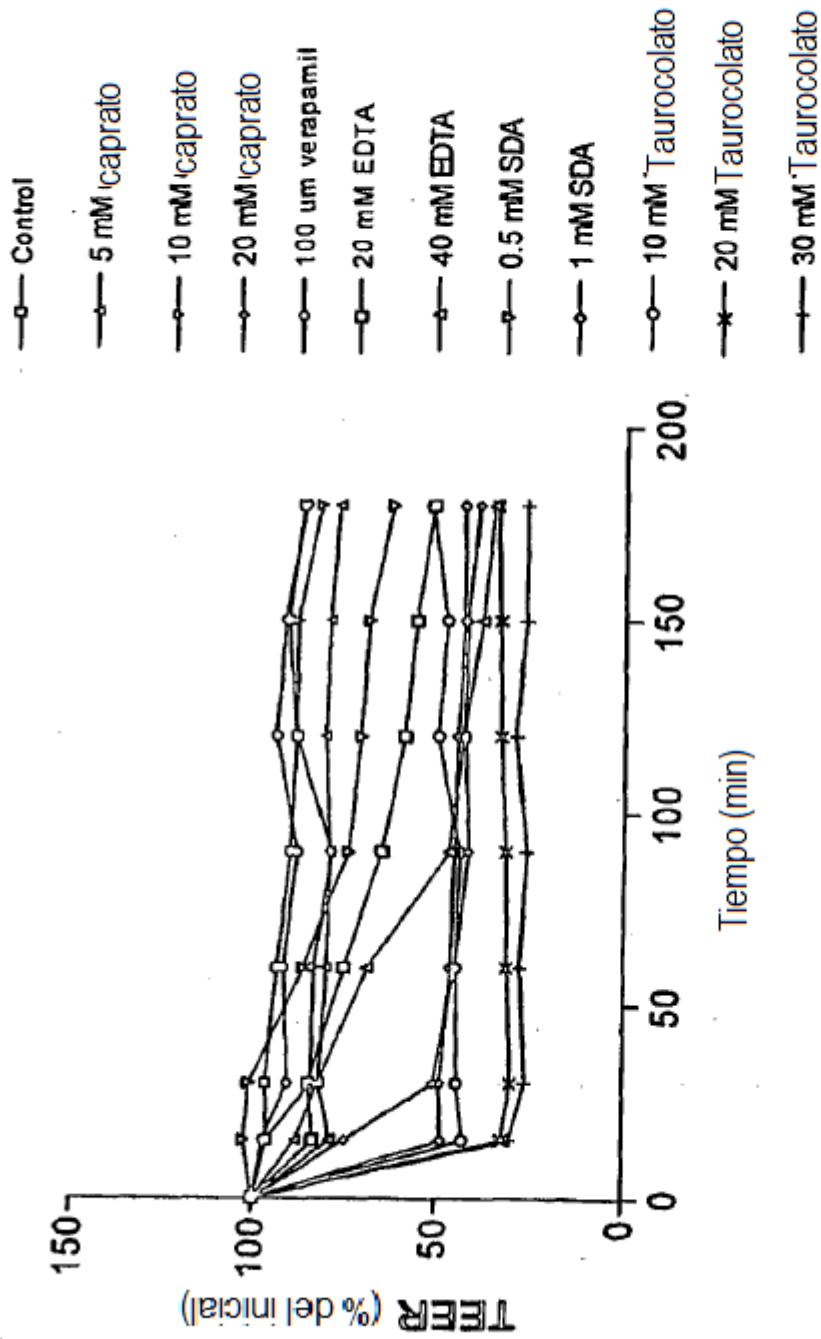


FIG. 5

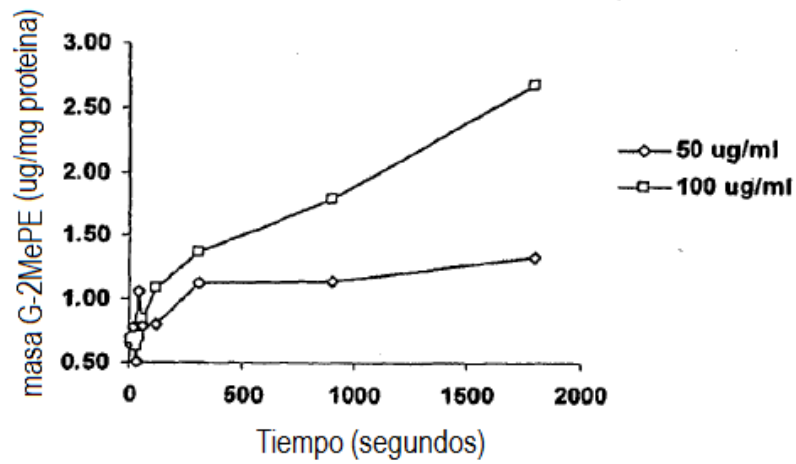
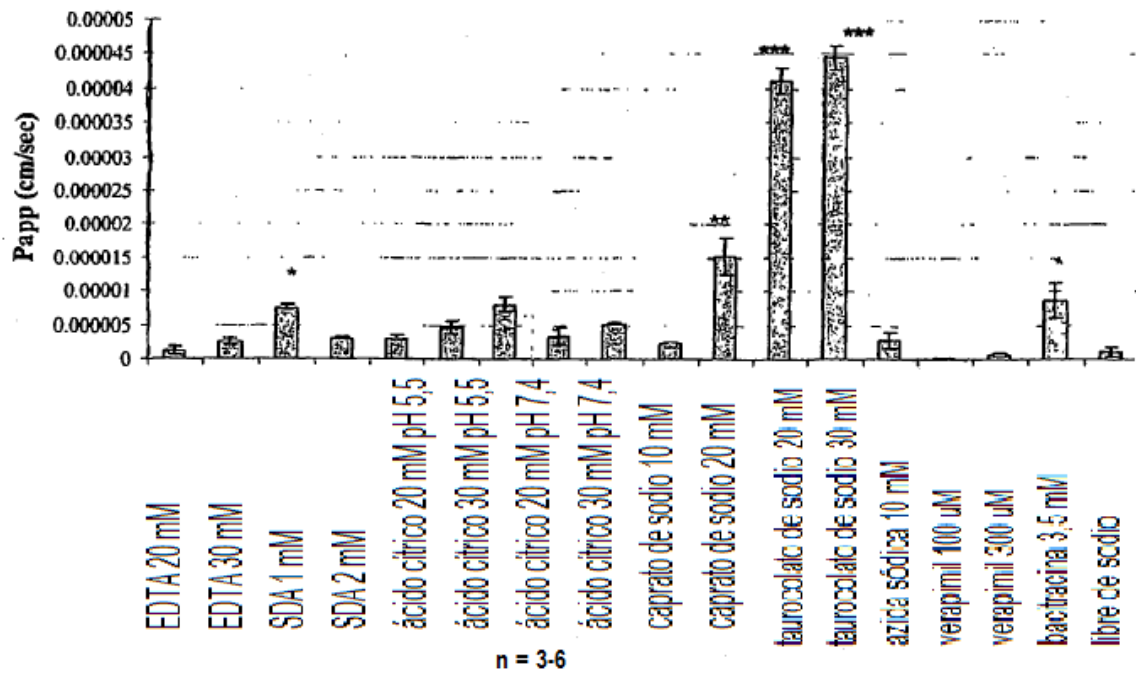


FIG. 6



n = 3-6

FIG. 7

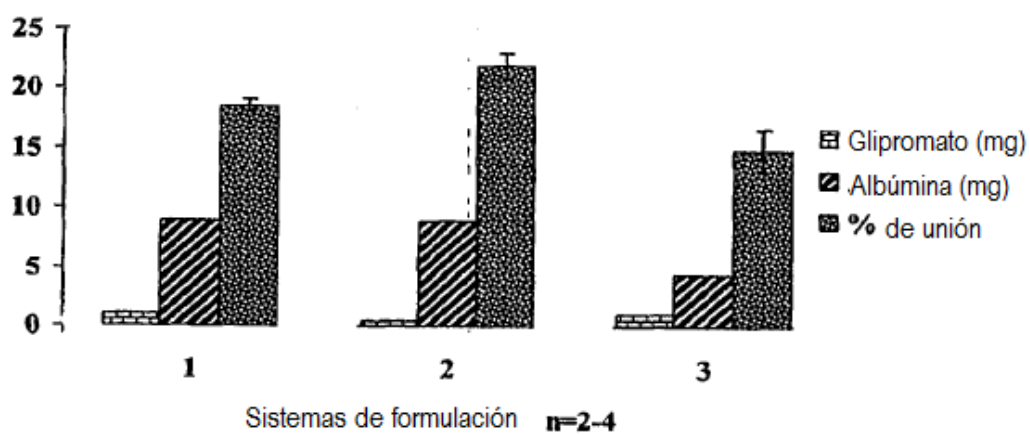


FIG. 8

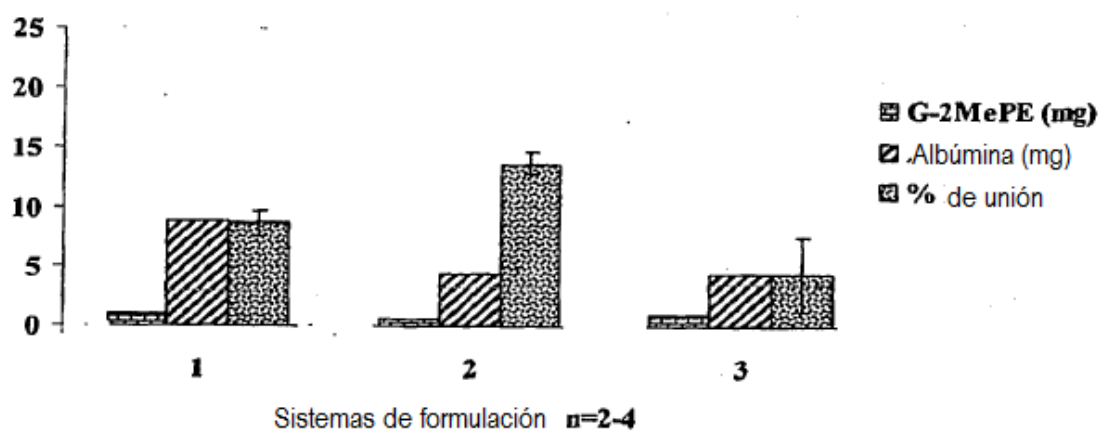


FIG. 9

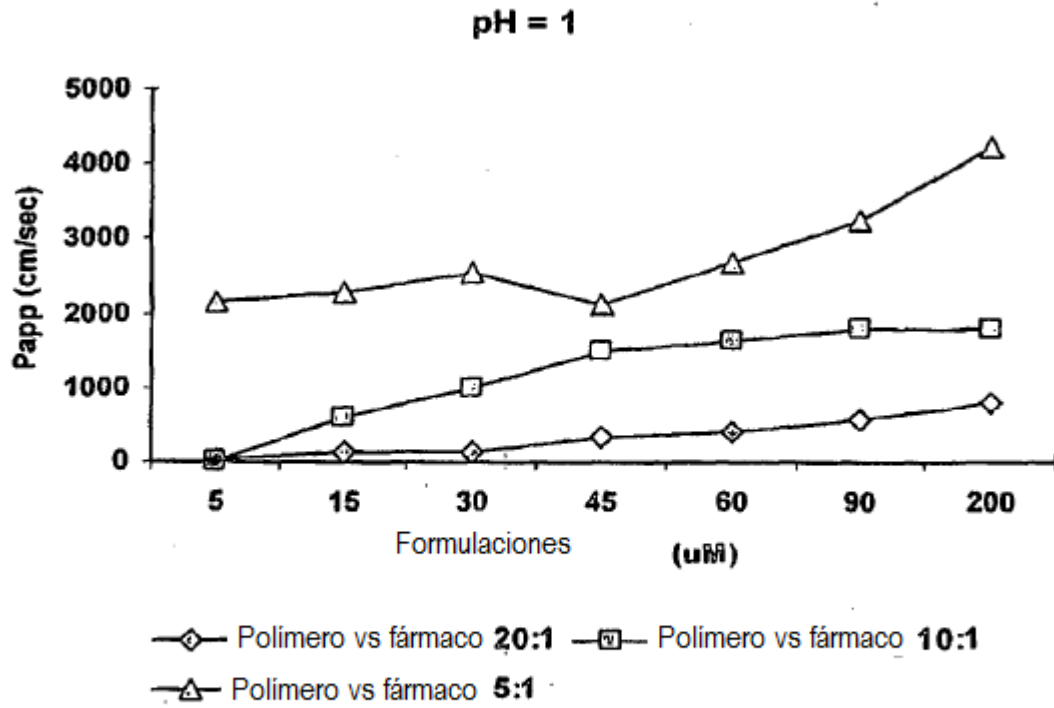


FIG. 10A

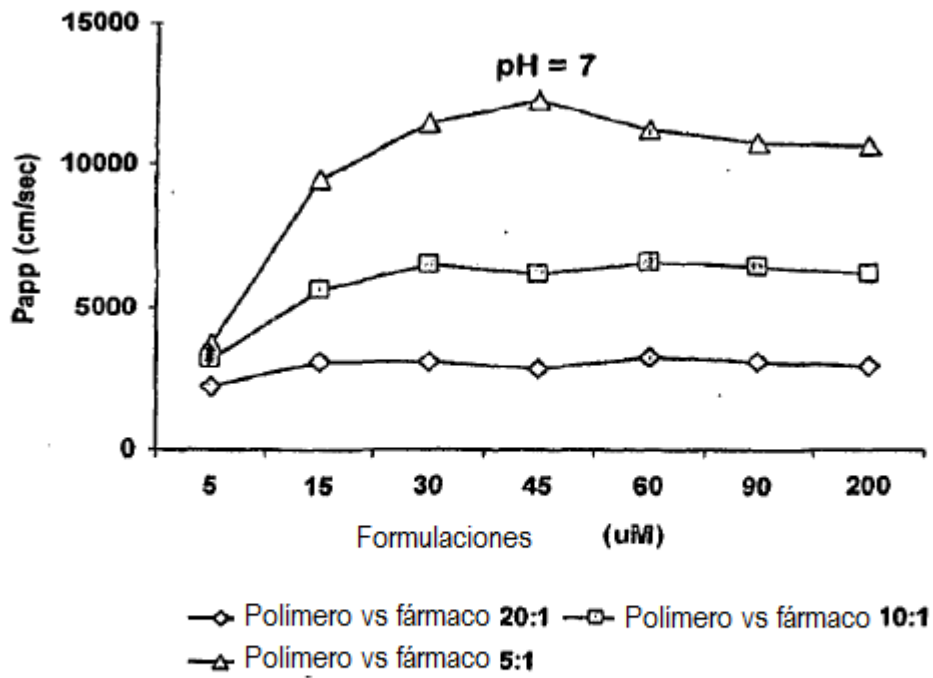


FIG. 10B

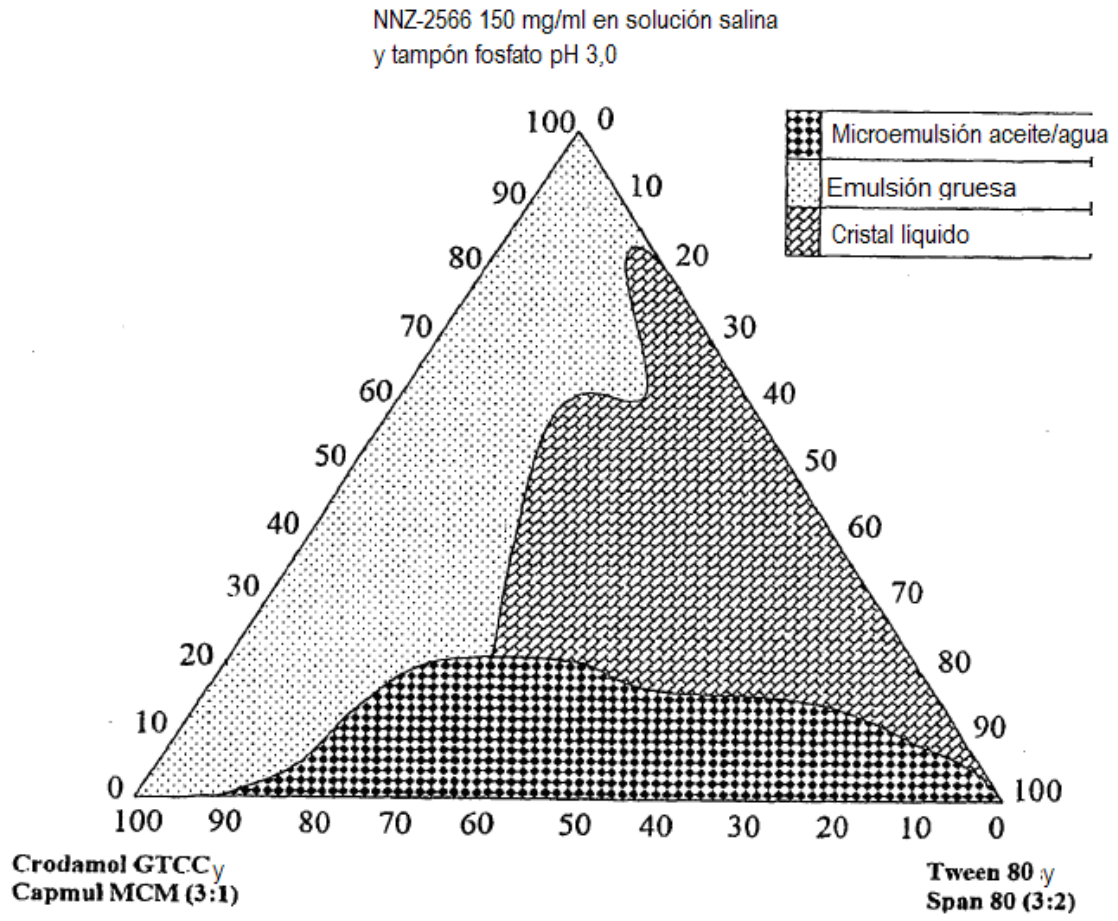


FIG. 11



FIG. 12A

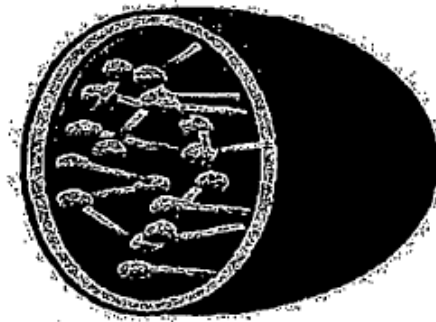


FIG. 12B

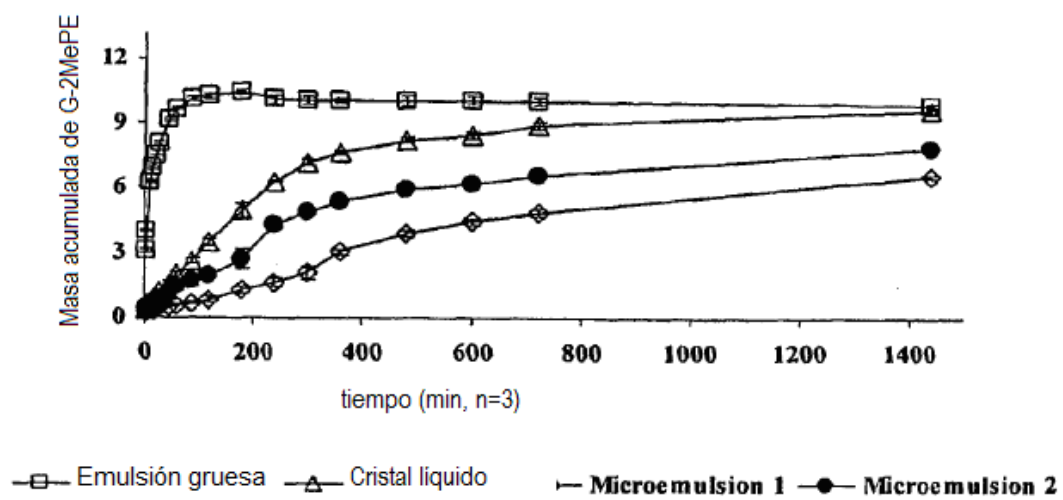


FIG. 13

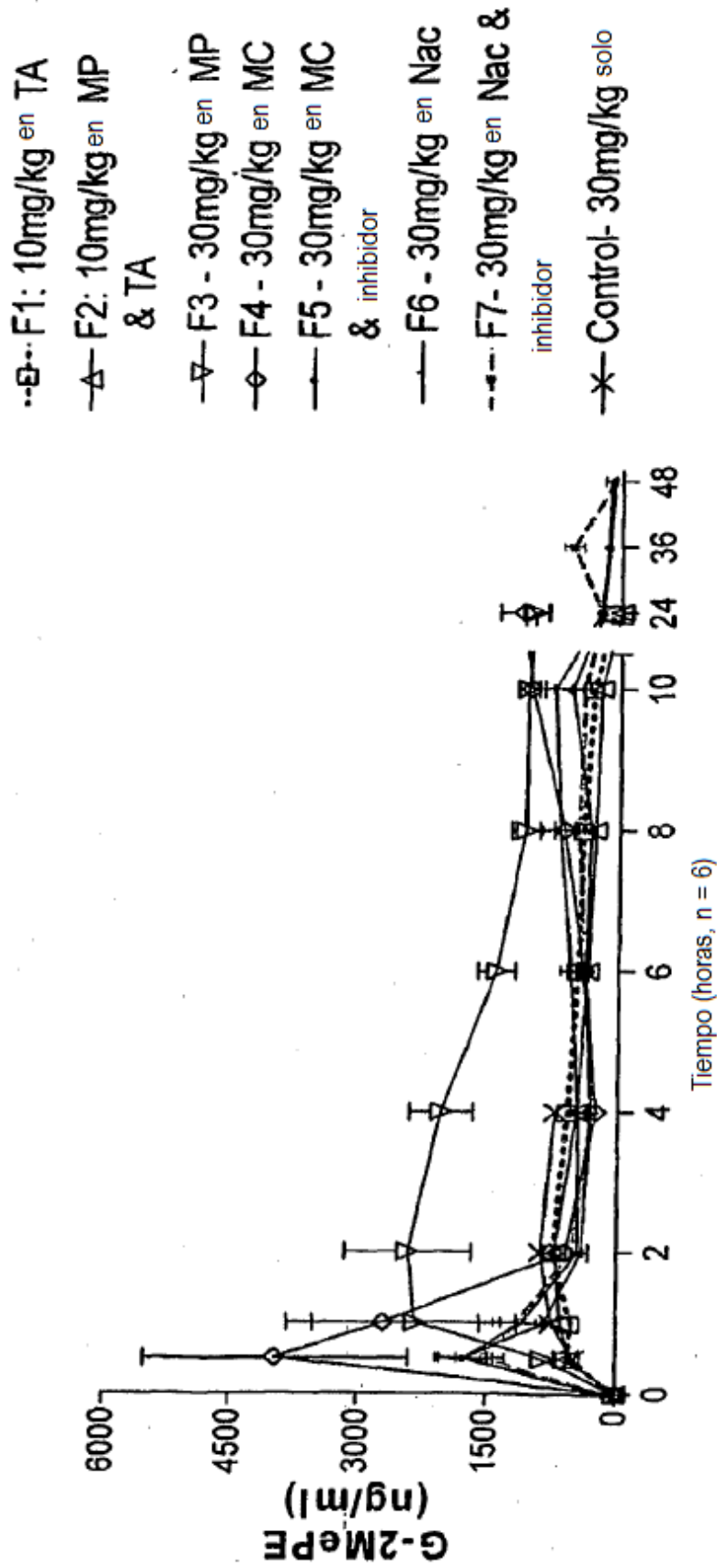


FIG. 14

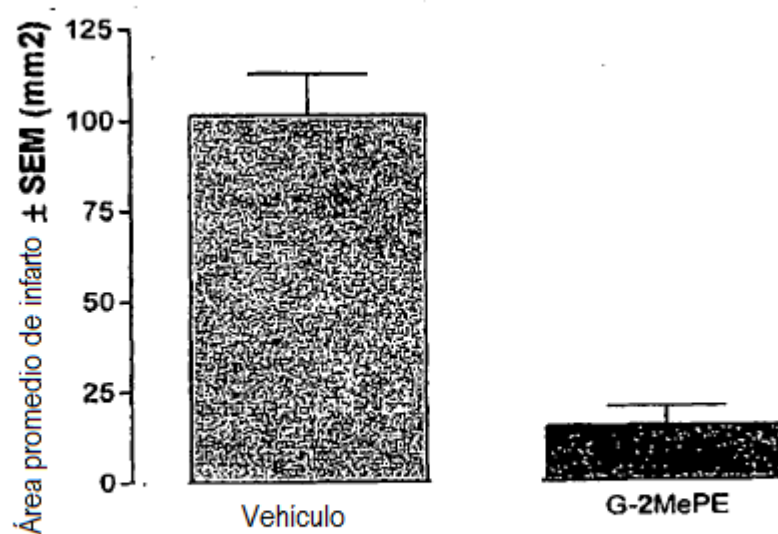


FIG. 15A

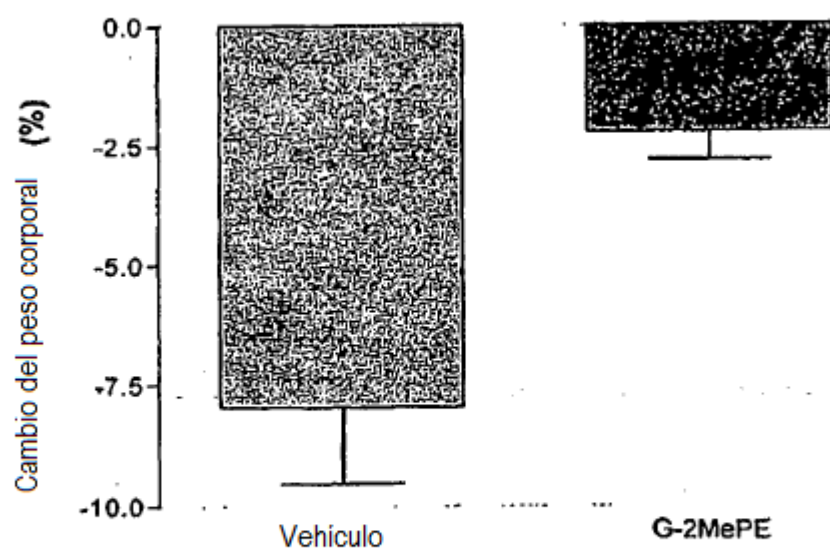


FIG. 15B

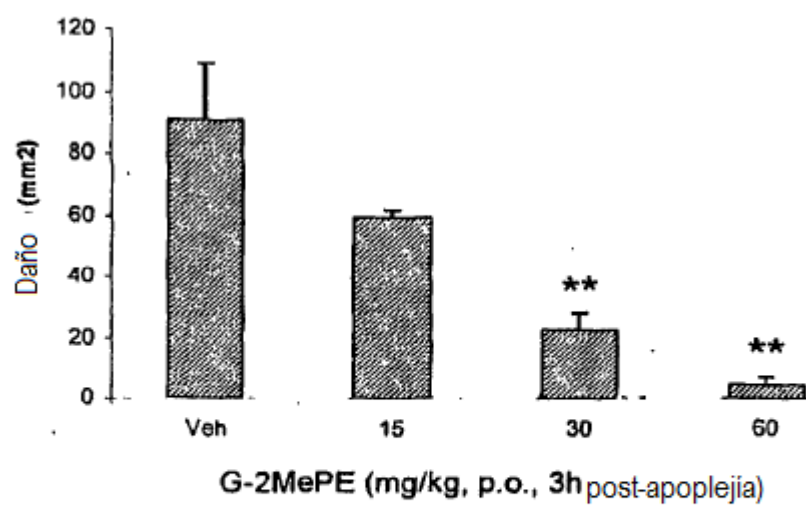


FIG. 16A

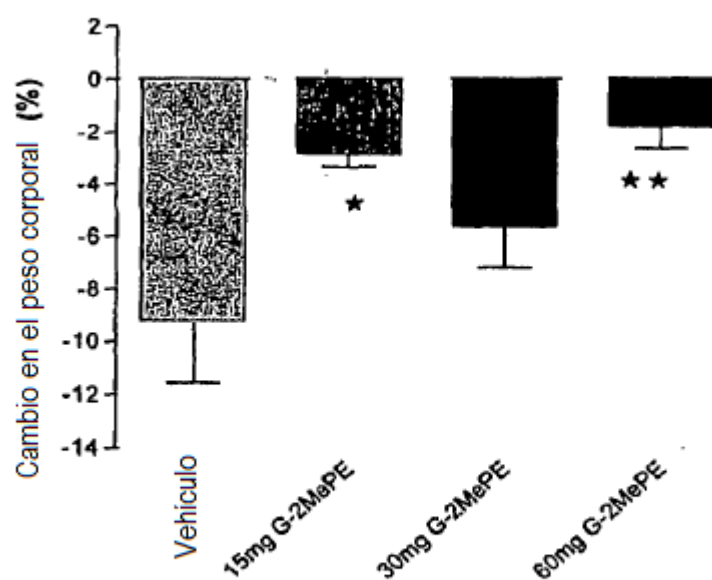


FIG. 16B

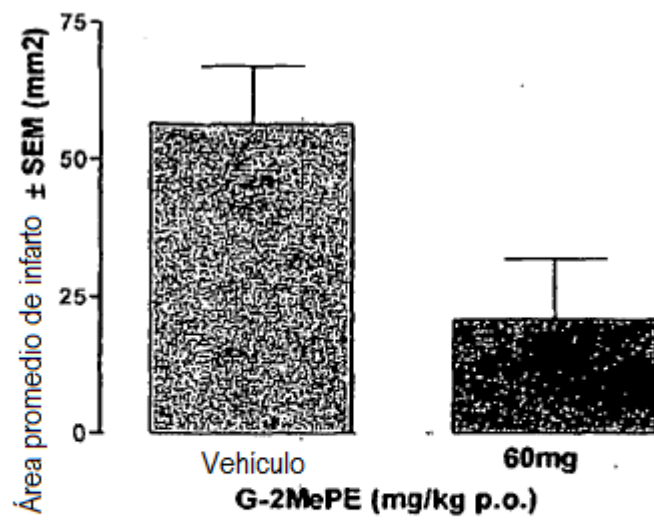


FIG. 17A

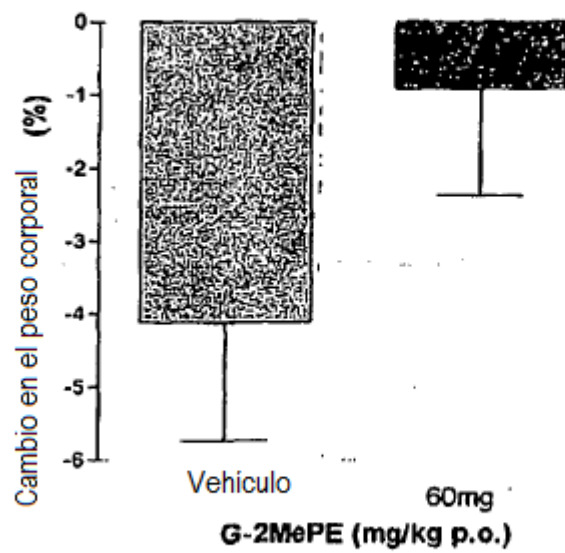


FIG. 17B

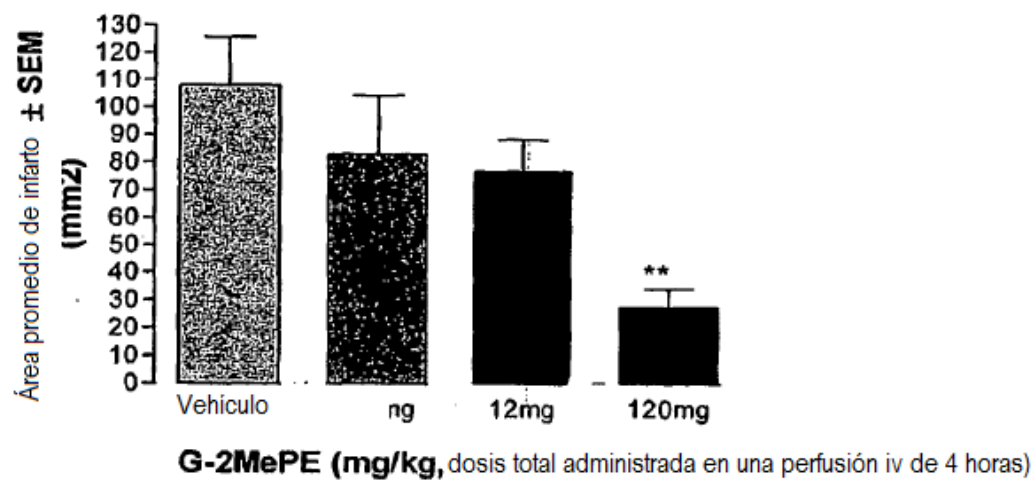


FIG. 18