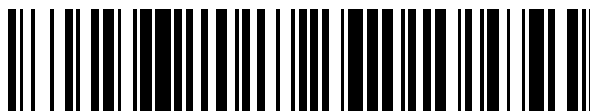


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 309**

51 Int. Cl.:

A61K 9/48 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 5/50 (2006.01)
A61K 9/24 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61P 5/18 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2006 E 06839273 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1957054**

54 Título: **Productos farmacéuticos peptídicos orales de acción rápida**

30 Prioridad:

09.12.2005 US 748954 P
06.12.2006 US 567454

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2015

73 Titular/es:

ENTERIS BIOPHARMA, INC. (100.0%)
83 Fulton Street
Boonton, NJ 07005, US

72 Inventor/es:

STERN, WILLIAM

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 541 309 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

Productos farmacéuticos peptídicos orales de acción rápida

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a productos farmacéuticos peptídicos orales en los que los compuestos activos incluyen una pluralidad de aminoácidos y al menos un enlace peptídico en sus estructuras moleculares, para proporcionar rápidamente una buena biodisponibilidad de dichos compuestos activos peptídicos cuando se administran por vía oral.

2. Descripción de la técnica relacionada

- 10 Numerosas hormonas humanas, neurotransmisores y otros compuestos biológicos importantes tienen péptidos como parte sustancial de sus estructuras moleculares. Muchas enfermedades responden de forma positiva a la elevación del nivel de estos compuestos peptídicos en pacientes. Se pueden administrar a los pacientes cantidades terapéuticamente eficaces de dichos péptidos biológicamente relevantes de varias formas. No obstante, como se trata más adelante, la administración oral, que es el método preferido, es muy difícil con este tipo de compuesto activo.

- 15 La calcitonina de salmón, por ejemplo, es una hormona peptídica que disminuye la captación del calcio por el hueso. Cuando se usa para tratar enfermedades relacionadas con los huesos y trastornos del calcio (tales como osteoporosis, enfermedad de Paget, hipercalcemia de las neoplasias malignas y similares), tiene el efecto de ayudar a mantener la densidad ósea. Se han aislado muchos tipos de calcitonina (calcitonina humana, calcitonina de salmón, calcitonina de anguila, calcitonina, calcitonina porcina y calcitonina de pollo). Existe una no homología estructural significativa entre los diversos tipos de calcitonina. Por ejemplo, solo hay un 50 % de identidad entre los aminoácidos que forman la calcitonina humana y los que forman la calcitonina de salmón. A pesar de la diferencia en la estructura molecular, la calcitonina de salmón se puede usar en el tratamiento humano de las enfermedades que responden a la calcitonina tratadas anteriormente.

- 25 Los productos farmacéuticos peptídicos usados en la técnica anterior se han administrado con frecuencia mediante inyección o mediante administración nasal. La insulina es un ejemplo de un producto farmacéutico peptídico que se administra con frecuencia mediante inyección. No obstante, las administraciones por inyección y nasal son significativamente menos cómodas e implican más molestias para el paciente que, por ejemplo, la administración oral. A menudo, esta incomodidad o molestia es el resultado de una falta sustancial de cumplimiento del régimen terapéutico por parte del paciente. La administración oral más preferida tiende a ser problemática, ya que los compuestos activos peptídicos son muy sensibles a la degradación en el estómago y los intestinos. Por tanto, en la técnica existe la necesidad de una administración oral más eficaz y reproducible de productos farmacéuticos peptídicos como la insulina, la calcitonina de salmón y otros que se tratan más detalle en el presente documento.

- 35 Las enzimas proteolíticas tanto del estómago como de los intestinos pueden degradar los péptidos y convertirlos en inactivos antes de que puedan ser absorbidos por la circulación sanguínea. Cualquier cantidad de péptido que sobreviva a la degradación por las proteasas del estómago (que normalmente tienen un pH óptimo ácido), se enfrenta más adelante con las proteasas del intestino delgado y las enzimas secretadas por el páncreas (que normalmente tienen un pH óptimo neutro o básico). Las dificultades específicas producidas por la administración oral de un péptido como la calcitonina de salmón implican el tamaño relativamente grande de la molécula y la distribución de la carga que porta. Esto dificulta más la entrada de la calcitonina de salmón en la mucosa a lo largo de las paredes intestinales o que atraviese la membrana de borde en cepillo intestinal y llegue a la sangre. Estos problemas adicionales pueden además contribuir a la limitada biodisponibilidad.

- 45 Las formas de dosificación oral que superan al menos parcialmente muchas de las dificultades descritas anteriormente se divulgan y reivindican en el documento EP-0517211 A1 (1992) y las patentes de EE.UU. N° 5,912,014 y 6,086,918 de Stern et al., expedidas el 15 de junio de 1999 y el 11 de julio de 2000, respectivamente..

- 50 Estas patentes describen formulaciones farmacéuticas peptídicas dirigidas a la liberación del péptido en el intestino y que potencian la biodisponibilidad administrando el péptido en una formulación farmacéutica oral que comprende, además del péptido, al menos un agente reductor del pH farmacéuticamente aceptable y al menos un potenciador de la absorción para estimular la biodisponibilidad del péptido. La formulación farmacéutica está recubierta con un recubrimiento entérico capaz de conducir al péptido, el potenciador de la absorción y el agente reductor del pH a través el estómago de un paciente, al tiempo que protege al péptido de la degradación por las proteasas del estómago. A continuación, el recubrimiento se disuelve y el péptido, el potenciador de la absorción y el agente reductor del pH se liberan juntos en el intestino del paciente.

- 55 No obstante, en algunos casos, la afección que se va a tratar con el péptido oral se beneficiaría de un remedio más rápido que el proporcionado por la disolución relativamente lenta de un recubrimiento entérico y la liberación relacionada del o los componentes activos en el interior del intestino. Un ejemplo concreto de una afección que se

beneficia de un remedio rápido de este tipo implica el área de del alivio del dolor, en la que la velocidad a la cual se logra el alivio es, obviamente, un factor, sino crucial, importante para un paciente. Adicionalmente, no siempre es necesario que el o los agentes peptídicos activos se transporten hasta el estómago y hacia el intestino. Es decir, en el caso de determinados agentes peptídicos, incluidos, aunque sin limitaciones, varios analgésicos, puede ser de lo más eficaz que la absorción del agente activo se produzca antes de la entrada de la formulación en el intestino, por ejemplo a medida que el material pasa por el esófago o cuando está dentro del estómago del paciente. En estas circunstancias, aunque la biodisponibilidad oral sigue siendo un factor a tener en cuenta, los pacientes y/o clínicos pueden querer aceptar una reducción limitada de la biodisponibilidad dicha reducción está equilibrada con un correspondiente incremento de la velocidad de absorción y, por tanto, de la acción, mediante el agente o agentes activos contenidos dentro de la formulación.

Por consiguiente, desde hace tiempo existe la necesidad de una formulación de un péptido oral que sea capaz de una acción terapéutica más rápida, es decir en contraste con las formulaciones descritas en las patentes tratadas anteriormente, al tiempo que siga proporcionando un grado de biodisponibilidad deseable.

Sumario de la invención

De acuerdo con lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar un producto farmacéutico acabado como se define en las reivindicaciones, para la liberación oral rápida de un agente peptídico activo fisiológicamente, incluidas hormonas paratiroideas, el péptido H-tirosina-D-arginina-fenilalanina-L-lisina-H₂ (DALDA) y sus derivados (en lo sucesivo en el presente documento denominados derivados de "DALDA", incluidos, entre otros, DMT-DALDA (es decir, H-2,6-dimetiltirosina-D-arginina-fenilalanina-lisina-NH₂), insulina, calcitonina, vasopresina. Como se usa en el presente documento, los términos "acabado" y "completamente acabado" se definen de modo que significan que el producto se proporciona en la forma final en la que se va a administrar.

En un aspecto, la enfermedad o trastorno se trata mediante la administración de un producto farmacéutico acabado adaptado para liberación oral de un agente peptídico fisiológicamente activo, en el que el producto acabado comprende:

el producto definido por la reivindicación 1.

Los agentes peptídicos activos preferidos incluyen, DALDA, DMT-DALDA, insulina, hormonas paratiroideas, incluidos fragmentos hormonales truncados, en la forma de ácido libre o amidada, vasopresina, calcitoninas tales como calcitonina de salmón.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para potenciar la velocidad de liberación de un agente peptídico activo terapéutico liberado por vía oral, en el que el procedimiento comprende liberar de forma selectiva el agente peptídico activo junto con al menos un agente reductor del pH y al menos un potenciador de la absorción, dentro del canal de alimentación de un paciente desde un producto farmacéutico acabado del tipo descrito anteriormente que está adaptado para la liberación del agente peptídico activo, en el que una superficie externa del producto farmacéutico acabado está sustancialmente libre de un vehículo protector resistente al ácido y en el que dicho agente reductor del pH y otros compuestos liberados del mismo se liberan en una cantidad que, si se añade a 10 mililitros de una solución 0,1 M de bicarbonato sódico acuoso, sería suficiente para disminuir el pH de dicha solución a no más de 5,5. Se cree que la falta de un recubrimiento externo resistente al ácido sobre el producto farmacéutico conduce a un incremento significativo de la velocidad a la cual el agente peptídico activo se absorbe en el plasma de la sangre del paciente respecto a un producto farmacéutico con recubrimiento entérico correspondiente. Como se usa en el presente documento, debe tomarse que la palabra "correspondiente", por ejemplo una composición correspondiente, un producto farmacéutico correspondiente, etc., significa, por ejemplo, una composición o producto farmacéutico que es exactamente idéntico al de la presente invención pero que tiene un recubrimiento entérico, en el que la formulación reivindicada por la presente carece completamente de dicho recubrimiento entérico.

En un aspecto adicional de la invención el agente peptídico activo terapéutico, el al menos un agente reductor del pH y el al menos un potenciador de la absorción se liberan desde el producto farmacéutico acabado con más rapidez que desde una composición farmacéutica correspondiente que comprende un vehículo protector resistente a ácido (por ejemplo, un recubrimiento entérico). En una realización adicional más, se alcanza una concentración plasmática máxima del agente peptídico activo en el paciente en 60 minutos o menor.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para potenciar la biodisponibilidad de la calcitonina de salmón liberada por vía oral a través del producto farmacéutico acabado descrito anteriormente, en el que el procedimiento comprende liberar de forma selectiva dicha calcitonina de salmón junto con al menos un agente reductor del pH y al menos un potenciador de la absorción en el canal de alimentación del paciente tras el paso del producto farmacéutico acabado a través de la boca del paciente; en el que el compuesto reductor del pH se libera mediante dicho producto en una cantidad que, si el producto se añadiera a 10 mililitros de una solución 0,1 M de bicarbonato sódico acuoso, sería suficiente para reducir el pH de dicha solución a no más de 5,5.

En un aspecto adicional de la invención, la calcitonina de salmón, el al menos un agente reductor del pH y el al menos un potenciador de la absorción se liberan desde el producto farmacéutico acabado con más rapidez que

desde una composición farmacéutica correspondiente que comprende un vehículo protector resistente a ácido. En una realización adicional más, se alcanza una concentración plasmática máxima de la calcitonina de salmón en el paciente en 60 minutos o menos.

Se cree que la presente invención reduce la probabilidad de degradación proteolítica del compuesto peptídico activo. El efecto de las proteasas del estómago, que normalmente son más activas a pH ácido, puede minimizarse, si no eliminarse por completo, mediante la administración del producto farmacéutico acabado al paciente con el estómago vacío, en el que el estómago contendrá pocas de estas proteasas. Después, se cree que el péptido está protegido adicionalmente del ataque proteolítico de las proteasas intestinales o pancreáticas, que normalmente son más activas a pH básico o neutro. Se cree que cantidades significativas de ácido (con el que el agente peptídico activo está mezclado) reducen la actividad de las proteasas de acción a pH neutro o básico en el intestino (por ejemplo, las proteasas lumbales o digestivas y las proteasas de la membrana del borde en cepillo) disminuyendo el pH por debajo del intervalo de actividad óptimo de estas proteasas intestinales.

Los potenciadores de la absorción dentro del producto farmacéutico acabado se usan para potenciar el transporte del agente peptídico a través de las capas mucosas intestinales, a través de la membrana del borde en cepillo y a la sangre. De este modo, se cree que la invención estimula el proceso por el cual el péptido atraviesa la membrana del borde en cepillo intestinal en la sangre al tiempo que continúa protegiendo el péptido de la degradación proteolítica.

El uso simultáneo de potenciadores de la absorción junto con un compuesto reductor del pH, de acuerdo con la invención, proporciona un efecto sorprendentemente sinérgico sobre la biodisponibilidad con respecto al potenciador de la absorción solo o al compuesto reductor de pH solo. Compárese la Tabla 4 (más adelante), la formulación I (calcitonina de salmón sola), la Tabla 3, formulación I (calcitonina de salmón y compuesto reductor del pH) y la Tabla 4, formulación II (calcitonina de salmón y potenciador de la absorción) con la formulación III de la Tabla 4 (calcitonina de salmón, compuesto reductor del pH y potenciador de la absorción).

Otras características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

25 Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente se ha descubierto que la administración de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, sin un recubrimiento entérico, aumenta la velocidad de absorción del péptido (respecto a los productos farmacéuticos con recubrimiento entérico correspondientes) sin reducir la biodisponibilidad por debajo de niveles prácticos. Aunque se produce alguna reducción de la biodisponibilidad, no se espera que esta reducción impida un tratamiento médico eficaz o que excluya indebidamente las ventajas de mayor velocidad, especialmente en aplicaciones en las que dicha velocidad es particularmente ventajosa, es decir, en el caso del alivio del dolor. La presente invención permite una absorción más rápida del péptido activo debido a la reducción del tiempo necesario para disolver el vehículo (por ejemplo, una cápsula o comprimido) y los ingredientes activos que se van a liberar. También permite dicha liberación más allá aguas arriba en el canal de alimentación, por ejemplo en el esófago y/o el estómago, en lugar de esperar el paso del material en el intestino. Se proporcionan ingredientes con el producto farmacéutico acabado de la invención, preferentemente, aunque no necesariamente, en forma de comprimido de un tamaño habitual en la industria farmacéutica, formado por una composición farmacéutica oral que comprende uno o más de dichos ingredientes peptídicos activos (a dosis adecuadas). El producto farmacéutico acabado puede prepararse adicionalmente, si se desea, en (por ejemplo), forma de cápsula. Las dosis y la frecuencia de la administración de los productos se tratan con más detalle más adelante. Los pacientes que se pueden beneficiar son cualquiera que sufra trastornos que responden favorablemente a niveles incrementados de un compuesto que contiene péptido. Por ejemplo, de acuerdo con la invención se puede usar calcitonina de salmón, para tratar pacientes que sufren trastornos del calcio o enfermedades óseas. La invención se puede usar, por ejemplo, para tratar la osteoporosis, la enfermedad de Paget, la hipercalcemia de las neoplasias malignas y similares, con calcitonina oral, preferentemente calcitonina de salmón. Como alternativa, el agente peptídico activo puede comprender en su lugar un agente anabólico óseo tal como una hormona paratiroidea, ya sea de longitud completa o troncada, que se puede administrar en forma de ácido libre o amidada. Una realización concreta se refiere a la administración de PTH[1-31]NH₂, es decir, una hormona paratiroidea amidada troncada. Además, se pueden obtener efectos analgésicos y/o cardiovasculares a través de la administración de péptidos que incluyen los denominados derivados de DALDA, tales como dmt-DALDA (H-2,6-dimetiltirosina-D-arginina-fenilalanina-lisina-NH₂). Los derivados de DALDA y otros péptidos útiles se describen con detalle en la solicitud de número de serie 11/144,580 presentada el 2 de junio de 2005, concedida al propietario de la presente solicitud.

La calcitonina de salmón es un ingrediente activo para su uso de acuerdo con la invención. Por ejemplo, proporciona una serie de ventajas, incluso sobre la calcitonina humana, aunque se use como agente farmacéutico para pacientes humanos. Entre las ventajas proporcionadas por el uso de calcitonina de salmón en lugar de calcitonina humana para el tratamiento de la osteoporosis humana son la mayor potencia, la analgesia y la mayor semivida. La calcitonina de salmón es más eficaz que la calcitonina humana natural en el tratamiento, ya que se necesitan dosis menores que de calcitonina humana. Existe una no homología sustancial entre la calcitonina de salmón y la humana, con una identidad de únicamente el 50 % en las secuencias de aminoácidos de las dos calcitoninas.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la composición farmacéutica de la que está compuesto el producto farmacéutico acabado de la invención supera una serie de barreras naturales diferentes y no relacionadas a la biodisponibilidad. Varios componentes de las composiciones farmacéuticas actúan superando diferentes barreras mediante mecanismos adecuados a cada una y tienen como resultado efectos sinérgicos sobre la biodisponibilidad de un ingrediente peptídico activo. Como se trata más adelante, las propiedades físicas y químicas inherentes de los péptidos hacen que determinados potenciadores de la absorción sean más eficaces que otros en el refuerzo de su biodisponibilidad.

El compuesto peptídico activo está contenido dentro de una formulación adoptada para administración oral. De acuerdo con la invención, la degradación proteolítica del péptido por las proteasas del estómago (la mayoría de las cuales son activas en el intervalo de pH ácido) se reduce, preferentemente, debido a la administración de la formulación al paciente con el estómago vacío (aunque esto no es necesario para alcanzar resultados adecuados), mientras que la degradación por proteasas intestinales o pancreáticas (la mayoría de las cuales son activas en el intervalo de pH de neutro a básico) se reduce debido al efecto del agente reductor del pH en el ajuste del pH del ambiente intestinal a niveles subóptimos. Los potenciadores de la solubilidad ayudan al paso del agente peptídico activo a través de la barrera epitelial intestinal.

Se cree que el agente reductor del pH disminuye el pH local (en el que el agente activo se ha liberado) a niveles por debajo del intervalo óptimo para muchas proteasas intestinales. Esta disminución del pH reduce la actividad proteolítica de las proteasas intestinales, de modo que confiere protección al péptido frente a la potencial degradación si el péptido está presente en el intestino. La actividad de estas proteasas se reduce a causa del ambiente temporalmente ácido proporcionado por la invención. Se prefiere proporcionar suficiente ácido para reducir temporalmente el pH intestinal local a 5,5, o menor, preferentemente a 4,7 o menor y, más preferentemente, a 3,5 o menor. La prueba del bicarbonato sódico descrita más adelante (en la sección titulada "el agente reductor del pH") es indicativo de la cantidad de ácido requerida. Preferentemente, las condiciones de pH reducido persisten durante un periodo de tiempo suficiente para proteger al agente peptídico de la degradación proteolítica hasta que al menos parte del agente peptídico haya tenido la oportunidad de pasar a la circulación sanguínea. Para la calcitonina de salmón, los experimentos han demostrado una $T_{\text{máx}}$ de 5-15 minutos para niveles en sangre de calcitonina de salmón cuando los componentes activos se inyectan directamente en el duodeno, el íleon o el colon. Los potenciadores de la absorción de la invención estimulan de forma sinérgica la absorción del péptido en la sangre, mientras prevalecen las condiciones de actividad proteolítica reducida. El mecanismo por el cual se cree que la invención logra el objetivo de una biodisponibilidad potenciada se ve ayudado por la liberación de los componentes activos del producto farmacéutico acabado juntos del modo más simultáneo posible. El potenciador (como se describe con mayor detalle más adelante) ayuda al transporte del agente peptídico desde el canal de alimentación a la sangre y puede estimular el proceso de modo que se produzca mejor durante el periodo de tiempo de pH intestinal reducido y de actividad proteolítica intestinal reducida. Muchos agentes de superficie activa pueden actuar tanto como potenciadores de la solubilidad y potenciadores del transporte (captación). De nuevo, sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que potenciar la solubilidad proporciona (1) una liberación más simultánea de los componentes activos de la invención en la porción acuosa del tracto alimentario, (2) mejor solubilidad del péptido en, y transporte a través de, una capa mucosa tal como la que se encuentra a lo largo de las paredes intestinales. Una vez que el ingrediente peptídico activo alcanza, por ejemplo, las paredes intestinales, un potenciador de la captación proporciona mejor transporte a través de la membrana del borde en cepillo del intestino a la sangre, mediante transporte transcelular o paracelular. Como se trata con mayor detalla más adelante, muchos compuestos preferidos pueden proporcionar ambas funciones. En estos casos, las realizaciones preferidas que usan ambas de estas funciones pueden hacerlo añadiendo solo un compuesto adicional a la composición farmacéutica. En otras realizaciones, otros potenciadores de la absorción pueden proporcionar las dos funciones por separado.

Cada uno de los ingredientes preferidos del producto farmacéutico acabado de la invención se trata por separado más adelante. Se pueden usar combinaciones de varios agentes reductores o múltiples potenciadores, además de usar solo un agente reductor del pH y/o un solo potenciador. Algunas combinaciones preferidas también se tratan más adelante.

Ingredientes peptídicos activos

Los ingredientes peptídicos activos que se pueden beneficiar de la liberación oral de acuerdo con la invención incluyen cualquier agente terapéutico que sea fisiológicamente activo y tenga una pluralidad de aminoácidos y al menos un enlace peptídico en su estructura molecular. La invención, a través de varios mecanismos, suprime la degradación de los ingredientes activos por la proteasa que, de otro modo, tendería a escindir uno o más de los enlaces peptídicos del ingrediente activo. La estructura molecular puede además incluir otros sustituyentes o modificaciones. Por ejemplo, la calcitonina de salmón, como agente peptídico activo útil en el presente documento, está amidada en su extremo C. Los péptidos tanto hechos por el hombre como naturales se pueden liberar por vía oral de acuerdo con la invención.

Los compuestos peptídicos activos de la invención insulina, vasopresina, calcitonina (incluyendo no solo calcitonina de salmón sino también otras calcitoninas). Otros ejemplos incluyen, entre otros, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, la hormona paratiroidea (de longitud completa o truncada, amidada o en forma de ácido libre, modificada adicionalmente o no), derivados de DALDA tal como dmt-DALDA y similares. En la técnica se conocen

muchos otros. Se espera que cualquier compuesto farmacéutico que tiene enlaces peptídicos que sería objeto de escisión en el tracto gastrointestinal se beneficie de la liberación oral de acuerdo con la presente invención por la reducción en dicha escisión proporcionada por la presente invención.

- 5 Cuando se usa calcitonina de salmón, preferentemente comprende de 0,02 a 0,2 por ciento en peso respecto al peso total de la composición farmacéutica global. La calcitonina de salmón está disponible comercialmente (por ejemplo, en BACHEM, Torrance, CA). Como alternativa, la calcitonina se puede sintetizar mediante procedimientos conocidos, algunos de los cuales se tratan brevemente más adelante. Otros agentes peptídicos activos deberían estar presentes a concentraciones más altas o más bajas en función de las concentraciones en sangre diana deseadas y su biodisponibilidad en el sistema de liberación oral de la invención (varios se indican en la Tabla 6).
- 10 Los precursores de la calcitonina de salmón se pueden fabricar mediante síntesis química o recombinante conocida en la materia. Los precursores de otros agentes peptídicos activos amidados pueden fabricarse de un modo similar. Se cree que la producción recombinante es significativamente más rentable. Los precursores se convierten en calcitonina de salmón activa mediante reacciones de amidación que también se conocen en la materia. Por ejemplo, la amidación enzimática se describe en la patente de EE.UU. N° 4.708.934 y las publicaciones de patente europea 0 308 067 y 0 382 403. Se prefiere la producción recombinante tanto para el precursor como para la enzima que cataliza la conversión del precursor en calcitonina de salmón. Dicha producción recombinante se trata en
- 15 Biotechnology, Vol. 11 (1993) pág. 64-70, que describe adicionalmente una conversión de un precursor en un producto amidado. El producto recombinante notificado en dicha referencia es idéntico a la calcitonina de salmón natural y a la calcitonina de salmón producida usando síntesis peptídica química en solución y en fase sólida.
- 20 Durante la amidación se puede usar un ceto-ácido tal como un alfa-cetoácido, o sal o éster del mismo, en el que el alfa-cetoácido tiene la estructura molecular $RC(O)C(O)OH$, y en el que R se selecciona del grupo que consiste en arilo, un resto hidrocarburo C1-C4, un resto hidrocarburo C1-C4 halogenado o hidroxilado y un ácido carboxílico C1-C4 en lugar de un cofactor de la catalasa. Ejemplos de estos cetoácidos incluyen, entre otros, piruvato de etilo, ácido pirúvico y sales del mismo, piruvato de metilo, ácido benzoilfórmico y sales del mismo, ácido 2-cetobutírico y sales del mismo,
- 25 ácido 3-metil-2-oxobutanoico y sales del mismo y ácido 2-cetoglutarico y sales del mismo.

La producción de la calcitonina de salmón recombinante preferida (CTsr) puede proceder, por ejemplo, produciendo el precursor de la calcitonina de salmón con extensión de glicina en *E. coli* como una proteína de fusión soluble con glutatión-S-transferasa. El precursor de glicina extendida tiene una estructura molecular que es idéntica a la calcitonina de salmón activa, a excepción del extremo C (cuando la calcitonina de salmón termina -pro-NH₂, mientras que el precursor termina -pro-gly. Una enzima α -amidante descrita en las publicaciones anteriores cataliza la conversión de los precursores en calcitonina de salmón. Dicha enzima se produce, preferentemente, de forma recombinante, por ejemplo, en células de ovario de hámster chino (CHO)) como se describe en el artículo de Biotechnology citado anteriormente. Otros precursores de otros péptidos amidados se pueden producir de un modo similar. Los péptidos que no requieren amidación u otras funcionalidades adicionales también se pueden producir de un modo similar. Otros agentes peptídicos activos están disponibles comercialmente o se pueden producir mediante técnicas conocidas en la materia.

30

35

El agente reductor del pH

La cantidad total del compuesto reductor del pH que se va a administrar con cada administración de calcitonina de salmón debería ser, preferentemente, una cantidad que, cuando se libera en el intestino, por ejemplo, es suficiente para reducir el pH intestinal local sustancialmente por debajo del pH óptimo para las proteasas que se encuentran aquí. La cantidad requerida variará necesariamente con varios factores, incluido el tipo de agente reductor del pH (que se trata más adelante) y los equivalentes de protones proporcionados por un agente reductor del pH dado. En la práctica, la cantidad requerida para proporcionar una buena biodisponibilidad es una cantidad que, cuando el producto farmacéutico de la invención se añade a una solución de 10 mililitros de bicarbonato sódico 0,1 M, disminuye el pH de dicha solución de bicarbonato sódico hasta no más de 5,5 y, preferentemente, no superior a 4,6, lo más preferentemente no superior a 3,5. En algunas realizaciones se ha usado suficiente ácido para disminuir el pH, en la prueba anterior, hasta aproximadamente 2,8. Preferentemente, en la composición farmacéutica de la invención se usan al menos 300 miligramos y, más preferentemente, al menos 400 miligramos del agente reductor del pH. Las preferencias anteriores se refieren al peso combinado total de todos los agentes reductores del pH en los que se usan dos o más de estos agentes en combinación. La formulación oral no debe incluir una cantidad de ninguna base que, cuando se libera junto con el compuesto reductor del pH, prevendría la disminución del pH de la prueba de bicarbonato sódico descrita anteriormente a 5,5 o menor.

40

45

50

El agente reductor del pH de la invención puede ser cualquier compuesto farmacéuticamente aceptable que no sea tóxico en el tracto gastrointestinal y que sea capaz de liberar iones hidrógeno (un ácido tradicional) o de inducir un contenido en iones hidrógeno superior del ambiente local. También puede ser cualquier combinación de estos compuestos. Se prefiere que al menos un agente reductor del pH usado en la invención tenga una pKa no superior a 4,2 y, preferentemente, no superior a 3,0. También se prefiere que el agente reductor del pH tenga una solubilidad en agua de al menos 30 gramos por 100 mililitros de agua a temperatura ambiente.

55

El agente reductor del pH que alcanza el nivel de pH requerido no superior a 5,5 en la prueba de bicarbonato sódico tratada anteriormente es un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido tartárico y una sal de ácido de un aminoácido.

5 Cuando el agente peptídico activo es calcitonina de salmón, determinadas proporciones entre el agente reductor del pH y la calcitonina de salmón han demostrado ser especialmente eficaces. Se prefiere que la proporción en peso del agente reductor del pH y la calcitonina de salmón supere 200:1, preferentemente 800:1 y lo más preferentemente 2000:1.

El potenciador de la absorción

10 Los potenciadores de la absorción están preferentes, preferentemente, en una cantidad que constituye de 0,1 a 20,0 por ciento en peso, respecto al peso global de la composición farmacéutica. Los potenciadores de la absorción preferidos son agentes de superficie activa que actúan tanto como potenciadores de la solubilidad como potenciadores de la captación. En términos generales, los "potenciadores de la solubilidad" mejoran la capacidad de los componentes de la invención para solubilizarse en el ambiente acuoso en el que se liberan inicialmente o en, por ejemplo, el ambiente lipofílico de la capa mucosa que reviste las paredes intestinales, o en ambos. Los
15 "potenciadores del transporte (captación)" (que con frecuencia son los mismos agentes de superficie activa usados como potenciadores de la solubilidad) son aquellos que facilitan la facilidad con la cual los agentes peptídicos atraviesan la pared intestinal.

20 Uno o más potenciadores de la absorción pueden realizar una función solo (por ejemplo, solubilidad) o uno o más potenciadores de la absorción pueden realizar la otra función solo (por ejemplo, captación), dentro del alcance de la invención. También es posible tener una mezcla de varios compuestos, algunos de los cuales proporcionan una solubilidad mejorada, algunos de los cuales proporcionan una captación mejorada y/o algunos de los cuales hacen ambas cosas. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los potenciadores de la captación pueden actuar (1) aumentando el trastorno de la región hidrofóbica del exterior de la membrana de las células, lo que
25 permite un aumento del transporte transcelular o (2) extrayendo las proteínas de la membrana, lo que produce un incremento del transporte transcelular; o (3) ampliando el radio del poro entre las células para un incremento del transporte paracelular.

30 Se cree que los agentes de superficie activa son útiles tanto como potenciadores de la solubilidad como como potenciadores de la captación. Por ejemplo, los detergentes son útiles en (1) la solubilización de todos los componentes activos rápidamente en el ambiente acuoso en el que se liberan inicialmente (2) la potenciación de la lipofilicidad, especialmente el agente peptídico activo, que ayuda a su paso al interior y a través del moco intestinal, (3) la potenciación de la capacidad del agente peptídico activo normalmente polar para atravesar la barrera epitelial de la membrana del borde en cepillo; y (4) el aumento del transporte transcelular o paracelular como se ha descrito anteriormente.

35 Cuando los agentes de superficie activa se usan como potenciadores de la absorción, se prefiere que sean polvos de flujo libre para facilitar la mezcla y la carga de cápsulas durante el proceso de fabricación. Debido a las características inherentes de la calcitonina de salmón y otros péptidos (por ejemplo, su punto isoeléctrico, peso molecular, composición de aminoácidos etc.), determinados agentes de superficie activa interaccionan mejor con determinados péptidos. De hecho, algunos pueden interaccionar de forma indeseable con las porciones cargadas de la calcitonina de salmón y prevenir su absorción, de modo que se produce una disminución de la biodisponibilidad. Al
40 intentar aumentar la biodisponibilidad de la calcitonina de salmón u otros péptidos que el agente de superficie activa usado como potenciador de la absorción se selecciona del grupo que consiste en carnitinas.

Una combinación especialmente preferida que ha funcionado bien con la calcitonina de salmón mezcla agentes de superficie activa catiónicos con agentes de superficie activa aniónicos que son derivados de colesterol, ambos solubles a pH ácido.

45 Una combinación particularmente preferida es un ácido biliar soluble en ácido junto con un agente de superficie activa catiónico. Una acilcarnitina y éster de sacarosa es una buena combinación. Cuando un potenciador de la absorción concreto se usa solo, se prefiere que sea un agente de superficie activa catiónico. Las acilcarnitinas (por ejemplo, lauroilcarnitina), fosfolípidos y ácidos biliares son potenciadores de la absorción particularmente buenos, especialmente la acilcarnitina. Los tensioactivos aniónicos que son derivados de colesterol también se usan en
50 algunas realizaciones. Es intención de estas preferencias evitar las interacciones con el agente peptídico que interfieran con la absorción del agente peptídico en la sangre.

55 Para reducir la probabilidad de efectos secundarios, los detergentes preferidos, cuando se usan como potenciadores de la absorción de la invención, son biodegradables o reabsorbibles (por ejemplo, compuestos biológicamente reciclables, tales como ácidos biliares, fosfolípidos y/o acilcarnitinas), preferentemente biodegradables. Se cree que las acilcarnitinas son particularmente útiles en la potenciación del transporte paracelular. Cuando un ácido biliar (u otro detergente aniónico que carece de hidrocarburos lineales) se usa en combinación con un detergente catiónico, la calcitonina de salmón se transporta mejor a y a través de la pared intestinal.

En algunas realizaciones preferidas y sin intentar quedar ligado a la teoría, se incluyen agentes de intercambio de iones catiónicos (por ejemplo, detergentes) para proporcionar potenciación de la solubilidad por otro posible mecanismo. En particular, pueden prevenir la unión de la calcitonina de salmón u otros agentes peptídicos activos al moco. Los agentes de intercambio de iones catiónicos preferidos incluyen cloruro de protamina o cualquier otro policationión.

Otros ingredientes opcionales

En algunas realizaciones preferidas se incluye otro péptido (tal como albúmina, caseína, proteína de soja, otras proteínas animales o vegetales y similares) para reducir la adsorción inespecífica (por ejemplo, la unión del péptido a la barrera de moco intestinal), de modo que se reduce la concentración necesaria del caro agente peptídico activo. Cuando se añade, el péptido es, preferentemente, de 1,0 a 10,0 por ciento en peso respecto al peso de la composición farmacéutica global. Preferentemente, este segundo péptido no es fisiológicamente activo y, lo más preferentemente, es un péptido alimentario tal como un péptido de soja o similar. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, este segundo péptido puede aumentar también la biodisponibilidad actuando como un secuestrante de proteasas que compite deseablemente con el agente peptídico activo por la interacción con la proteasa. El segundo péptido también puede ayudar al paso del compuesto activo a través del hígado.

Todas las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir opcionalmente también diluyentes, glicantes, lubricantes, cápsulas de gelatina, conservantes, colorantes y similares farmacéuticos frecuentes en sus tamaños y cantidades conocidos habituales.

Otras preferencias

Se prefiere que la proporción en peso del o los agentes reductores del pH y el o los potenciadores de la absorción esté entre 3:1 y 20:1, preferentemente 4:1-12:1, y, lo más preferentemente, 5:1-10:1. El peso total de todos los agentes reductores del pH y el peso total de todos los potenciadores de la absorción en una composición farmacéutica dada están incluidos en las proporciones preferidas anteriores. Por ejemplo, si una composición farmacéutica incluye dos agentes reductores del pH y tres potenciadores de la absorción, las proporciones anteriores se computarán sobre el peso combinado total de ambos agentes reductores del pH y el peso total combinado de los tres potenciadores de la absorción.

Se prefiere que el agente reductor del pH, el agente peptídico activo y el potenciador de la absorción (ya sean compuestos individuales o una pluralidad de compuestos en cada categoría) esté disperso de forma uniforme en el producto farmacéutico acabado. En una realización, el producto farmacéutico acabado se puede producir en forma de un laminado que tenga dos o más capas, en el que el agente peptídico activo esté contenido dentro de una primera capa y el agente reductor del pH y el potenciador de la absorción estén contenidos dentro de una segunda capa laminada con dicha primera capa. En otra realización, la composición del producto comprende gránulos que incluyen un aglutinante farmacéutico que tiene el agente peptídico activo, el agente reductor del pH y el potenciador de la absorción dispersados de forma uniforme dentro del aglutinante. Los gránulos preferidos también pueden consistir en un núcleo ácido rodeado por una capa uniforme de ácido orgánico, una capa de potenciador y una capa de péptido rodeada por una capa externa de ácido orgánico. Los gránulos se pueden preparar a partir de una mezcla acuosa que consiste en aglutinantes farmacéuticos, tales como polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, junto con los agentes reductores del pH, los potenciadores de la absorción y los agente peptídicos activos usados en la invención.

Procedimiento de fabricación

La forma de dosificación de la presente invención comprende, en una realización preferida, un comprimido que comprende una laminación de al menos dos capas. Como se usa en el presente documento, el término "laminación" tendrá su significado convencional como algo que está compuesto por capas de material firmemente unido pero que implica pocas, si algunas, interacciones entre las capas. El componente principal de la primera capa es normalmente el agente reductor del pH descrito anteriormente. Los principales componentes de la segunda capa normalmente son el péptido y el potenciador de la absorción. Cuando se combinan de la forma descrita más adelante, los constituyentes forman un comprimido que tiene al menos dos capas. Las capas pueden estar adyacentes entre sí, por ejemplo, la primera capa encima del producto farmacéutico acabado con la segunda capa en la parte inferior o, como alternativa, la primera capa puede estar dentro y, de este modo, estar contenida por la segunda capa. Aunque se prefiere un comprimido de dos capas debido a su relativa facilidad de fabricación, también es posible tener tres o más capas, en las que la segunda capa está sustancialmente compuesta por el péptido y la tercera capa comprende el tensioactivo.

La primera capa se fabrica mediante granulación de al menos un agente reductor del pH para formar un primer material de capa. Aunque el ácido cítrico es el agente reductor del pH preferido, el ácido cítrico solo no exhibe las características de compresibilidad requeridas. Por tanto, durante y después de la granulación se pueden añadir otros materiales al agente reductor del pH para mejorar sus propiedades mecánicas. Específicamente, durante la granulación en un lecho fluido, se pueden añadir materiales de carga tales como celulosa microcristalina y un aglutinante de povidona en cantidades bien conocidas en la materia. Después, la granulación resultante se seca y,

opcionalmente, se dimensiona en un molino de cualquier forma bien conocida para los expertos en la materia. Adicionalmente, la granulación se puede combinar con deslizantes y lubricantes tales como talco y estearato de magnesio, tal como se ha descrito anteriormente, para mejorar más la compresibilidad y la fluidez de la granulación, de modo que se forma el material de la primera capa.

5 El material de la segunda capa se forma combinando un péptido y al menos un potenciador de la absorción (es decir un tensioactivo). La segunda capa también se puede fabricar en un lecho fluido. Dado que el péptido exhibe una actividad biológica relativamente alta en cantidades pequeñas, la segunda capa se produce pulverizando el péptido y un agente de unión, tal como povidona, sobre un tensioactivo o una mezcla de al menos un excipiente y el tensioactivo. Como se ha descrito anteriormente, el tensioactivo normalmente es una acilcarnitina, prefiriéndose en la presente invención la lauroil-1-carnitina. El excipiente opcional normalmente comprende una cantidad de una carga, tal como celulosa microcristalina, suficiente para proporcionar una adherencia adecuada entre las capas, como entiende un experto en la técnica. A continuación, la granulación resultante se seca y, opcionalmente, se dimensiona en un molino de cualquier forma bien conocida para los expertos en la materia. Por último, la granulación se transfiere opcionalmente a un mezclador en el que la granulación se mezcla opcionalmente con un disgregante tal como croscarmelosa sódica o uno o más de otros disgregantes adecuados en cantidades de hasta aproximadamente 10,0 % del peso de la granulación, prefiriéndose aproximadamente 2,0 % en peso. Aunque opcionales, se prefieren los disgregantes porque se cree que potencian la biodisponibilidad del péptido facilitando una liberación más completa del péptido casi al mismo tiempo que la liberación del agente reductor del pH.

20 También se pueden añadir otros lubricantes y aditivos, tales como estearato de magnesio y ácido esteárico, así como otros excipientes tales como dióxido de silicio coloidal y povidona para mejorar las propiedades del material de la segunda capa de un modo conocido en la materia.

Después, en una prensa de compresión de dos capas estándar se introduce una porción del material de la primera capa y se carga en un troquel o un molde. Después, el material de la primera capa se comprime parcialmente para crear una primera capa. La compresión parcial normalmente es necesaria para prevenir la mezcla sustancial entre el material de la primera capa y el material de la segunda capa cuando el material de la segunda capa se añade al troquel. Después de la compresión parcial del material de la primera capa, el material de la segunda capa se añade después al troquel que contiene la primera capa. Los materiales de la primera y la segunda capa se comprimen después juntos para formar un comprimido que tiene dos capas.

30 Normalmente, el material de la primera capa constituye aproximadamente del 50 % al 90 % del peso total del comprimido final. Preferentemente, el material de la primera capa constituye aproximadamente el 70 % del peso total del comprimido. Normalmente, el material de la segunda capa constituye aproximadamente del 50 % al 10 % del peso total del comprimido final. Preferentemente, el material de la segunda capa constituye aproximadamente el 30 % del peso total del comprimido final.

35 Dado que el material de la primera capa se había comprimido parcialmente antes en una capa, se evita el mezclado sustancial del material de la segunda capa con el material de la primera capa. La estructura de dos capas de la presente invención impide sustancialmente el contacto entre el agente reductor del pH y el péptido y el tensioactivo. Específicamente, en la interfaz entre las dos capas, normalmente menos del 0,1 % del péptido contacta con el agente reductor del pH.

40 En una realización alternativa, el producto farmacéutico acabado de la invención (por ejemplo, calcitonina de salmón) puede incluir una cápsula de gelatina de tamaño 00 cargada con 0,25 mg de péptido, 400 mg de ácido cítrico granular (disponible, por ejemplo en Archer Daniels Midland Corp.); 50 mg de ácido taurodesoxicólico (disponible, por ejemplo, en SIGMA) y 50 mg de lauroilcarnitina (SIGMA). Todos los ingredientes se adaptan, preferentemente, para la inserción eventual en la cápsula de gelatina y son, preferentemente, polvos que se pueden añadir a un mezclador en cualquier orden. Después, el mezclador se acciona durante aproximadamente 5 minutos hasta que los polvos se mezclan completamente. Después, los polvos mezclados se cargan en un extremo grande de las cápsulas de gelatina. El otro extremo de la cápsula se añade después y las cápsulas se cierran instantáneamente.

50 Dada la biodisponibilidad potenciada proporcionada por la presente invención, la concentración del agente peptídico activo relativamente caro (por ejemplo, "calcitonina de salmón, PTH, vasopresina, DALDA, DMT-DALDA, insulina, etc.) en la preparación farmacéutica de la invención se puede mantener relativamente baja. Ejemplos de formulación específicos se exponen en los ejemplos que se proporcionan a continuación.

Tratamiento de pacientes

55 Cuando se elige calcitonina de salmón como ingrediente activo para el tratamiento de la osteoporosis, se recomienda la administración periódica. La calcitonina de salmón se metaboliza rápidamente con una semivida de únicamente 20-40 minutos tras la administración subcutánea en un hombre. No obstante, su efecto beneficioso sobre los osteoclastos es mucho más duradero y puede durar hasta más de 24 horas, a pesar de la rápida disminución en los niveles sanguíneos. Normalmente no hay niveles detectables en sangre más de dos horas después de la inyección de la calcitonina de salmón a dosis convencionales. De acuerdo con lo anterior, se prefiere

la administración periódica de una dosis aproximadamente 5 días a la semana. La administración subcutánea de calcitonina de salmón (100 unidades internacionales) con frecuencia ha dado lugar a una concentración máxima en suero de aproximadamente 250 picogramos por mililitro. Se ha demostrado que la calcitonina de salmón administrada por vía nasal (200 unidades internacionales) es eficaz contra la osteoporosis a niveles máximos tan bajos como de 10 picogramos por mililitro. Algunos pacientes han notificado algunas molestias gastrointestinales a niveles máximos altos (por ejemplo, a o por encima de 200 picogramos por mililitro). De acuerdo con lo anterior, se prefiere que la calcitonina de salmón alcance un pico sérico entre 10 y 150 picogramos por mililitro, más preferentemente entre 10 y 50 picogramos por mililitro. Los niveles en suero pueden medirse mediante técnicas de radioinmunoensayo conocidas en la materia. El médico responsable puede vigilar la respuesta del paciente, los niveles en sangre de calcitonina de salmón o los marcadores sustitutos de enfermedad ósea (tales como piridinolina o desoxipiridinolina), especialmente durante la fase inicial del tratamiento (1-6 meses). Después, podrá alterar la dosis algo para contar con el metabolismo individual de cada paciente y la respuesta.

La biodisponibilidad que se puede conseguir de acuerdo con la presente invención permite la liberación oral de calcitonina de salmón en la sangre a la concentración preferida identificada anteriormente, usando solo 300-3.000 microgramos de calcitonina de salmón por cápsula, preferentemente 300-1.200 microgramos, especialmente entre 300 y 600 microgramos.

Se prefiere usar un solo comprimido o cápsula en cada administración porque una sola dosis del producto proporciona mejor la liberación simultánea del polipéptido, el agente reductor del pH y los potenciador de la absorción. Esto es altamente deseable porque el ácido es mejor capaz de reducir el ataque proteolítico indeseable sobre el polipéptido cuando el ácido se libera en una proximidad estrecha de tiempo para liberar el polipéptido. Por tanto, la liberación casi simultánea se consigue mejor administrando todos los componentes de la invención como un solo comprimido o cápsula. No obstante, la invención también incluye, por ejemplo, dividir la cantidad requerida de ácido y potenciadores entre dos o más comprimidos o cápsulas que se pueden administrar juntos de forma que proporcionan juntos la cantidad necesaria de todos los ingredientes. La expresión "composición farmacéutica", como se usa en el presente documento, incluye una dosificación completa adecuada para una administración concreta a un paciente humano, con independencia de cómo se subdivide siempre que sea para la administración sustancialmente simultánea.

A continuación, se expone una serie de tablas que muestran el efecto sobre la biodisponibilidad causado variando determinados parámetros. Excepto en lo que respecta a los estudios humanos notificados en el presente documento, las cantidades de los ingredientes se pueden modificar con respecto a las reivindicadas en el presente documento para justificar las diferencias entre seres humanos y los animales usados en los modelos animales.

Tabla 1

Efecto del pH tampón sobre la absorción de calcitonina de salmón en el duodeno de rata			
Formulación	pH*	Calcitonina máxima en plasma ng/ml	Biodisponibilidad absoluta en porcentaje
I. Citrato/ácido cítrico (77 mg) Calcitonina (0,1 mg)	5	0,4	0,02
II. Citrato/ácido cítrico (77 mg) Calcitonina (0,1 mg)	4	1,9	0,10
III. Citrato/ácido cítrico (77 mg) Calcitonina (0,1 mg)	3	4,1	0,64
IV. Citrato/ácido cítrico (77 mg) Calcitonina (0,1 mg)	2	4,8	0,69
pH tampón			

Procedimiento:

Se anestesió a ratas Wistar hembra (250-275 g) (n=3 para cada formulación) con ketamina y xilazina antes de la inserción de una cánula en la arteria carótida. La cánula estaba provista de una válvula de tres vías a través de la cual se obtuvieron las muestras de sangre y se sustituyó por solución salina fisiológica. Se realizó una incisión central en la cavidad abdominal y se inyectaron 0,5 ml de la formulación directamente en el duodeno expuesto. El pH de la formulación se ajustó mezclando cantidades variables de concentraciones molares iguales de ácido cítrico y citrato sódico. Se obtuvo sangre (0,5 ml) antes y a 5, 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de la formulación. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 minutos a 2.600 g y el sobrenadante de plasma resultante se almacenó a -20 °C. La concentración de calcitonina en plasma se determinó mediante un radioinmunoensayo competitivo. La biodisponibilidad absoluta (es decir, respecto a una dosis intravenosa de calcitonina) se calculó a partir de las áreas bajo la curva obtenidas de los gráficos de la concentración plasmática de calcitonina en función del tiempo.

Resultados y discusión:

Cuando el pH del tampón se redujo de 5 (formulación I) a 4 (formulación II), la biodisponibilidad absoluta aumentó 5 veces de 0,02 % a 0,1 %. Cuando el pH se redujo a 3 (formulación III), la biodisponibilidad absoluta aumentó 6,4 veces más. Se produjo muy poco incremento en la biodisponibilidad de calcitonina cuando el pH se redujo a 2. La biodisponibilidad global de la calcitonina aumentó 32 veces cuando el pH del tampón se redujo de 5 a 3.

Tabla 2

Efecto de la concentración de ácido cítrico sobre la biodisponibilidad de la calcitonina de salmón en el duodeno de rata		
Formulación	Calcitonina máxima en plasma ng/ml	Biodisponibilidad absoluta en porcentaje
I. Ácido cítrico (9,6 mg) Ácido taurodesoxicólico (5 mg) Manitol (22 mg) Calcitonina (0,1 mg)	3,65	0,25
II. I. Ácido cítrico (48 mg) Ácido taurodesoxicólico (5 mg) Manitol (22mg) Calcitonina (0,1mg)	17,44	2,43

Procedimiento:

Formulaciones que consisten en una cantidad constante de ácido taurodesoxicólico y 2 cantidades diferentes de ácido cítrico en un volumen total de 0,5 ml se administraron en los duodenos de ratas anestesiadas como se describe en la leyenda de la Tabla 1. En las formulaciones se incluyó manitol como marcador para medir el transporte paracelular. Se extrajeron muestras de sangre a varios tiempos y se analizaron para determinar la calcitonina como se ha descrito anteriormente.

Resultados y discusión:

La biodisponibilidad de la calcitonina de salmón administrada en presencia de 9,6 mg de ácido cítrico (I) fue del 0,25 %, mientras que en presencia de 48 mg de ácido cítrico (II) la biodisponibilidad fue de 2,43 %. En presencia de una cantidad fija de ácido taurodesoxicólico, la biodisponibilidad de la calcitonina de salmón aumentó casi 19 veces cuando la cantidad de ácido cítrico en la formulación solo se incrementó 5 veces.

Tabla 3

Efecto de los potenciadores en presencia de ácido cítrico sobre la absorción de calcitonina de salmón en el duodeno de rata		
Formulación	Calcitonina máxima en plasma ng/ml	Biodisponibilidad absoluta en porcentaje

I. Ácido cítrico (77 mg) Calcitonina (0,1 mg)	4,8	0,69
II. I. Ácido cítrico (48 mg) Ácido taurodesoxicólico (5 mg) Calcitonina (0,1 mg)	26,59	3,03
III. I. Ácido cítrico (48 mg) Ácido taurodesoxicólico (5 mg) Cloruro de cetilpiridinio (5 mg) Calcitonina (0,1 mg)	36,48	4,54
IV. I. Ácido cítrico (48 mg) Tween-20 (5 mg) Calcitonina (0,1 mg)	15,50	3,10
V. Ácido cítrico (48 mg) Éster de sacarosa-15 (5 mg) Manitol (22 mg) Calcitonina (0,1 mg)	38,93	5,83
VI. Ácido cítrico (48 mg) Cloruro de lauroilcarnitina (5 mg) Calcitonina (0,1 mg)	38,89	4,53
VII. Ácido cítrico (48 mg) Diheptanoilfosfatidilcolina (5 mg) Calcitonina (0,1 mg)	20,93	2,97

Procedimiento:

5 Formulaciones que consisten en ácido cítrico, calcitonina y varias clases de potenciadores en un volumen total de 0,5 ml se administraron en los duodenos de ratas anestesiadas como se describe en la leyenda de la Tabla 1. En la formulación V se incluyó manitol como marcador para medir el transporte paracelular. Se extrajeron muestras de sangre a varios tiempos y se analizaron para determinar la calcitonina como se ha descrito anteriormente.

Resultados y discusión:

10 En ausencia de un potenciador, la biodisponibilidad absoluta de la calcitonina fue del 0,69 %. La inclusión de un fosfolípido hidrosoluble (formulación VII) aumentó la biodisponibilidad 4,3 veces a 2,97 %. El potenciador más eficaz fue la clase de éster de azúcar (formulación V) en la que la biodisponibilidad de la calcitonina fue 5,83 %. El uso de una mezcla de ácido biliar y un detergente catiónico (formulación III), un detergente no iónico (formulación IV) y una acilcarnitina (formulación VI) tuvo como resultado biodisponibilidades intermedias que varían de 3,03 % a 4,53 %.

15 Las diferencias en las biodisponibilidades de la calcitonina en presencia de varias clases de potenciadores son menores en comparación con las observadas cuando solo hay ácido cítrico y ningún potenciador presente en la formulación.

Tabla 4

Efecto de la lauroilcarnitina en presencia de varios aditivos sobre la absorción de calcitonina de salmón en el duodeno de rata		
Formulación	Calcitonina máxima en plasma ng/ml	Biodisponibilidad absoluta en porcentaje
I. Calcitonina (1 mg)	9,44	0,096
II. Cloruro de lauroilcarnitina (5 mg) Calcitonina (0,1 mg)	2,27	0,17
III. Cloruro de lauroilcarnitina (5 mg) Ácido cítrico (48 mg) Calcitonina (0,1 mg)	38,89	4,53
IV. Cloruro de lauroilcarnitina (1mg) Ácido cítrico (48 mg) Calcitonina (0,1mg)	27,72	4,81
V. Cloruro de lauroilcarnitina (5 mg) Diheptanoilfosfatidilcolina (5 mg) Ácido cítrico (48 mg) Calcitonina (0,1mg)	44,89	6,45
VI. Cloruro de lauroilcarnitina (5 mg) Seroalbúmina bovina (25 mg) Calcitonina (0,1 mg)	4,58	0,42

Procedimiento:

5 Formulaciones que consisten en lauroilcarnitina, calcitonina y varios otros compuestos en un volumen total de 0,5 ml se administraron en los duodenos de ratas anestesiadas como se describe en la leyenda de la Tabla 1. Se extrajeron muestras de sangre a varios tiempos y se analizaron para determinar la calcitonina como se ha descrito anteriormente.

Resultados y discusión:

10 En ausencia de ácido cítrico o cualquier potenciador (formulación I), la biodisponibilidad absoluta de la calcitonina fue del 0,096 %. En presencia de 5 mg de cloruro de lauroilcarnitina (formulación II), la biodisponibilidad aumentó 1,8 veces a 0,17 %. Cuando se incluyó ácido cítrico con lauroilcarnitina (formulación III), la biodisponibilidad aumentó 27 veces más a 4,53 %. Una reducción de 5 veces en la cantidad de lauroilcarnitina pero no de ácido cítrico (formulación IV) no redujo significativamente la biodisponibilidad de la calcitonina de salmón. La inclusión de 5 mg de diheptanoilfosfatidilcolina en la formulación III para producir la formulación V aumentó la biodisponibilidad ligeramente (1,4 veces). La sustitución de 25 mg de seroalbúmina bovina por ácido cítrico (formulación VI) redujo la
15 biodisponibilidad de 4,53 % (formulación III) a 0,42 %. Estos resultados, en conjunto, muestran el efecto sinérgico entre una sustancia reductora del pH como el ácido cítrico y un potenciador como la lauroilcarnitina.

Tabla 5

Efecto de la formulación sobre la absorción de calcitonina de salmón en el duodeno de perro		
Formulación	Calcitonina máxima en plasma ng/ml	Biodisponibilidad absoluta en porcentaje
I. Calcitonina (25mg)	1,15	0,015
II. Ácido cítrico (192 mg) Calcitonina (10 mg)	10,65	0,37
III. Ácido cítrico (192mg) Ácido taurodesoxicólico (20 mg) Calcitonina (5 mg)	14,99	0,81

Procedimiento:

Se implantaron quirúrgicamente puertos de acceso vascular modificados en el duodeno, íleon y colon de perros beagle macho. El septo/cuerpos reservorio de los puertos se implantaron bajo la piel y se usaron como sitios de administración de las formulaciones de calcitonina. Antes y después de la administración de formulaciones de calcitonina en perros conscientes, los puertos se lavaron con 2 ml de la formulación sin calcitonina. Se extrajo sangre (2 ml) a través de tubos de angiocatéter en la vena de la para a t= 30,15 y 0 antes de la administración de calcitonina y a 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y cada 15 minutos después de 2 horas. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 minutos a 2.600 g y el sobrenadante de plasma resultante se almacenó a -20 °C. La concentración de calcitonina en plasma se determinó mediante un radioinmunoensayo competitivo. La biodisponibilidad absoluta (es decir, respecto a una dosis intravenosa de calcitonina) se calculó a partir de las áreas bajo la curva obtenidas de los gráficos de la concentración plasmática en función del tiempo obtenida.

Resultados y discusión:

La biodisponibilidad absoluta de la calcitonina administrada en agua (I) fue 0,015 %. En presencia de 192 mg de ácido cítrico (II), la biodisponibilidad de la calcitonina aumentó 25 veces. La inclusión de 20 mg de ácido taurodesoxicólico en la formulación (III) produjo un incremento adicional por 2,2 veces de la biodisponibilidad absoluta a 0,81 %. La combinación de un compuesto reductor del pH, ácido cítrico y un potenciador, ácido taurodesoxicólico, tuvo como resultado un incremento global de 54 veces de la biodisponibilidad absoluta de la calcitonina de salmón.

Tabla 6

Efecto del ácido cítrico y lauroilcarnitina sobre la biodisponibilidad de la vasopresina, la calcitonina y la insulina en ratas			
Péptido	Formulación	Péptido máximo en plasma ng/ml	Biodisponibilidad absoluta en porcentaje
[Arg ⁸]-Vasopresina	Vasopresina (1 mg)	0,62	0,38
	Vasopresina (0,1 mg)	24,3	8,10
	Ácido cítrico (48 mg) Lauroilcarnitina (5 mg)		
Calcitonina de salmón	Calcitonina (1 mg)	9,44	0,096
	Calcitonina (0,1 mg)	27,72	4,81
	Ácido cítrico (48 mg) Lauroilcarnitina (5 mg)		
Insulina humana	Insulina (1 mg)	0,56	0,07

	Ácido cítrico (48 mg)		
	Insulina (1 mg)		
	Ácido cítrico (48 mg)	18,3	0,76
	Lauroilcarnitina (5 mg)		

Procedimiento:

5 Formulaciones que consisten en [Arg⁸]-vasopresina, calcitonina de salmón recombinante o insulina humana y se administraron los aditivos indicados en un volumen total de 0,5 ml en los duodenos de ratas anestesiadas como se describe en la leyenda de la Tabla 1. Se extrajeron muestras de sangre a varios tiempos y se analizaron para determinar el péptido indicado como se ha descrito anteriormente.

Resultados y discusión:

10 En ausencia de cualquier aditivo, la biodisponibilidad absoluta de la [arg.sup.8]-vasopresina administrada intraduodenalmente fue del 0,38 %. Cuando se añadieron ácido cítrico y lauroilcarnitina a la formulación, la biodisponibilidad de la vasopresina aumentó a 8,1 %. La biodisponibilidad de calcitonina en ausencia de un ácido y un potenciador fue de 0,096 %, que fue menor que para la vasopresina no formulada. No obstante, cuando se incluyeron ácido cítrico y lauroilcarnitina a la formulación, la biodisponibilidad aumentó 50 veces a a 4,53 %. En ausencia de ácido cítrico, la insulina humana ni siquiera se pudo disolver en agua. En presencia de ácido cítrico, todo el péptido se disolvió fácilmente y la biodisponibilidad absoluta de la insulina humana administrada intraduodenalmente fue del 0,07 %. La biodisponibilidad absoluta de la insulina aumentó 10 veces cuando se incluyó lauroilcarnitina en la formulación. Estos resultados indican que la biodisponibilidad de los péptidos no formulados fue, como máximo, 0,38 % y que la inclusión de un ácido orgánico, tal como ácido cítrico, y un potenciador, tal como lauroilcarnitina, aumentó la biodisponibilidad del péptido hasta 8,1 %.

Tabla 7

Efecto del recubrimiento entérico sobre la absorción de CTs a partir de cápsulas en perros:					
Recubrimiento entérico	Ácido cítrico (mg)	Lauroil-carnitina (mg)	CTs (mg)	C _{max} [*] (pg/ml ± sem)	T _{max} ^{**} (min ± sem)
Sí	632	65	12,84	15763 ± 4196	98 ± 13
No	643	66	13,07	3295 ± 823	28 ± 4

Concentración plasmática máxima de CTs corregida a una dosis de 1 mg.

** Tiempo cuando la Concentración plasmática máxima de CTs detectada.

20 Las cápsulas de HPMC tamaño 00 (hidroxipropilmetilcelulosa) se llenaron cada una con una mezcla en polvo que consiste en ácido cítrico, lauroilcarnitina y calcitonina de salmón (CTs). La mitad de las cápsulas se recubrieron con una solución de recubrimiento entérico de EUDRAGIT L30D-55 (un copolímero de ácido metacrílico con éster metílico de ácido metacrílico, un recubrimiento entérico disponible en ROHM Tech Inc., Malden, Mass.), y las cápsulas restantes no se recubrieron con recubrimiento entérico. El procedimiento de recubrimiento correspondió al enseñado en el documento USP 6,086,918 en la col. 11, línea 50 a col. 12, línea 11. El contenido promedio de la cápsula para las cápsulas con recubrimiento entérico y sin recubrimiento entérico se muestra en la tabla. A ocho perros en ayunas se administró por vía oral 1 cápsula sin recubrir y 2 semanas después se les administró por vía oral una cápsula con recubrimiento entérico. Tras la administración de cada cápsula se extrajeron muestras de sangre a intervalos de 15 minutos a partir de un catéter integrado durante hasta 4 horas. Las muestras de sangre se centrifugaron y los sobrenadantes de plasma resultantes se almacenaron congelados a -20 °C. Las muestras de sangre se analizaron después para determinar la CTs mediante un ELISA directo. Los resultados resumidos en la tabla como la concentración plasmática máxima de CTs normalizada a una dosis de 1 mg indica que la CTs se detectó en perros a los que se administró por vía oral cápsulas con recubrimiento entérico así como cápsulas sin recubrir. En el plasma de perros a los que se administraron cápsulas con recubrimiento entérico se detectó casi tres veces más CTs que en los que recibieron cápsulas sin recubrimiento. La concentración máxima de CTs en los perros a los que se administraron por vía oral cápsulas sin recubrir se observó a los 30 minutos de su administración. La concentración máxima de CTs en los perros a los que se administraron cápsulas con recubrimiento entérico se observó a los 98 minutos de su administración. Estos resultados demuestran que una

5 cantidad terapéuticamente eficaz de CTs puede absorberse a partir de cápsulas que no tienen recubrimiento entérico y en un marco de tiempo mucho más rápido, mientras que la cantidad de CTs detectada en la sangre es menos que la observada a partir de cápsulas con recubrimiento entérico. La mayor velocidad puede ser una ventaja, especialmente en el caso de los péptidos en los que la velocidad es más importante que la biodisponibilidad global (por ejemplo, analgésicos). También puede haber una ventaja en la eficiencia de la producción cuando no se requiere el recubrimiento entérico.

Tabla 8

Efecto de la formulación sobre la absorción de CTs a partir de cápsulas sin recubrimiento entérico en perros:					
Ácido cítrico (mg)	Lauroil-carnitina (mg)	Sacarosa (mg)	CTs (mg)	C _{max} [*] (pg/ml ± sem)	T _{max} ^{**} (min ± sem)
679	67	0	5,37	5430 ± 3203	26 ± 2,8
824	0	0	5,31	4612 ± 2766	24 ± 3,9
0	70	712	6,17	1020 ± 570	41 ± 9,3
0	0	805	5,31	18 ± 12	225 ^{***}

* Concentración plasmática máxima de CTs corregida a una dosis de 1 mg.
 ** Tiempo cuando la Concentración plasmática máxima de CTs detectada.
 *** Solo se detectó CTs en 1 de 8 perros.

10 Las cápsulas de HPMC tamaño 00 (hidroxipropilmetilcelulosa) se llenaron cada una con una mezcla en polvo que consiste en ácido cítrico, lauroilcarnitina, sacarosa y calcitonina de salmón (CTs). El contenido promedio de la cápsula para las cápsulas se muestra en la tabla. Cada semana se administró por vía oral a ocho perros en ayunas 1 de las cápsulas sin recubrir. Tras la administración de la cápsula se extrajeron muestras de sangre a intervalos de 15 minutos a partir de un catéter integrado durante hasta 4 horas. Las muestras de sangre se centrifugaron y los sobrenadantes de plasma resultantes se almacenaron congelados a -20 °C. Las muestras de sangre se analizaron después para determinar la CTs mediante un ELISA directo. Los resultados resumidos en la tabla como la
 15 concentración plasmática máxima de CTs normalizada a una dosis de 1 mg indican que la concentración más alta de CTs se detectó en perros a los que se administró por vía oral cápsulas sin recubrir que contenían ácido cítrico. En ausencia de ácido cítrico pero en presencia de lauroilcarnitina, la concentración máxima de CTs en el plasma de perros disminuyó un 80 %. En ausencia de ácido cítrico y lauroilcarnitina, la concentración máxima de CTs en perros disminuyó un 99 %. Estos resultados indican la importancia de un ácido y un potenciador de la absorción.

Tabla 9

Absorción de péptidos sin CTs de cápsulas sin recubrimiento entérico en perros:			
Péptido	Dosis mg	C _{max} [*] (pg/ml ± sem)	T _{max} ^{**} (min ± sem)
Dmt-DALDA	2,40	7484 ± 1486	28 ± 4
PTH (1-31) NH ₂	15,8	240 ± 78	15
Insulina	6,98	460 ± 95	15

* Concentración plasmática máxima de CTs corregida a una dosis de 1 mg.
 ** Tiempo cuando la Concentración plasmática máxima de CTs detectada.

20 Las cápsulas de HPMC de tamaño 00 se llenaron cada una con una mezcla en polvo que consiste en al menos 500 mg de ácido cítrico, 50 mg de lauroilcarnitina y 1 de los péptidos indicados. Cada semana se administró por vía oral a ocho perros en ayunas 1 de las cápsulas sin recubrir. Tras la administración de la cápsula se extrajeron muestras de sangre a intervalos de 15 minutos a partir de un catéter integrado durante hasta 4 horas. Las muestras de sangre se centrifugaron y los sobrenadantes de plasma resultantes se almacenaron congelados a -20 °C. Las muestras de plasma se analizaron después para detectar Dmt-DALDA, PTH(1-31)NH₂ o insulina, respectivamente. Los resultados resumidos en la tabla indican que los 3 péptidos pudieron detectarse en plasma de perros a concentraciones
 25

suficientes para permitir un uso terapéutico. No obstante, la concentración máxima del péptido detectado parece depender del tamaño, la secuencia y/o la estructura.

REIVINDICACIONES

1. Un producto farmacéutico acabado adaptado para liberación oral de un agente peptídico fisiológicamente activo, comprendiendo dicho producto:
 - 5 (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho péptido activo seleccionado del grupo que consiste en calcitoninas, hormonas paratiroideas, H-tirosina-D-Arginina-fenilalanina-lisina-NH₂ y sus derivados, insulina y vasopresina;
 - (b) al menos un agente reductor del pH farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido tartárico y una sal ácida de un aminoácido; y
 - (c) al menos un potenciador de la absorción seleccionado del grupo que consiste en acilcarnitinas,
- 10 en el que el agente reductor del pH está presente en dicho producto farmacéutico acabado en una cantidad que, si dicho producto se añadiera a 10 mililitros de una solución de bicarbonato sódico acuoso 0,1M, sería suficiente para disminuir el pH de dicha solución a no más de 5,5, y

en el que una superficie externa de dicho producto carece de un vehículo protector resistente a ácido, a condición de que dicho producto no comprenda una mezcla que consiste en ácido cítrico, lauroilcarnitina, talco,
- 15 calcitonina de salmón y H-2,6-dimetiltirosina-D-arginina-fenilalanina-lisina-NH₂ ("Dmt-DALDA").
2. El producto farmacéutico acabado de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto reductor del pH está presente en una cantidad que, si dicho producto se añadiera a 10 mililitros de una solución de bicarbonato sódico 0,1M, sería suficiente para disminuir el pH de dicha solución a no más de 3,5.
3. El producto farmacéutico acabado de la reivindicación 1, que además comprende una cantidad de un segundo péptido que no es un péptido fisiológicamente activo eficaz para potenciar la biodisponibilidad de dicho agente peptídico activo.
- 20 4. El producto farmacéutico acabado de la reivindicación 1, en el que al menos un agente reductor del pH tiene una solubilidad en agua de al menos 30 gramos por 100 mililitros de agua a temperatura ambiente.
5. El producto farmacéutico acabado de la reivindicación 1, en el que dicho producto comprende gránulos que contienen un aglutinante farmacéutico y, disperso uniformemente en dicho aglutinante, dicho agente reductor del pH, dicho potenciador de la absorción y dicho agente peptídico activo.
- 25 6. El producto farmacéutico acabado de la reivindicación 1, en el que dicho producto comprende una laminación que tiene una primera capa que comprende el al menos un agente reductor del pH farmacéuticamente aceptable y una segunda capa que comprende la cantidad terapéuticamente eficaz de dicho péptido activo; comprendiendo además dicho producto dicho al menos un potenciador de la absorción, en el que la primera y la segunda capa están unidas entre sí, pero el al menos un agente reductor del pH y el péptido están separados dentro de la laminación de forma que menos del 0,1 % del péptido está en contacto con el agente reductor del pH.
- 30 7. El producto farmacéutico acabado de la reivindicación 1, en el que el agente reductor del pH es seleccionado del grupo que consiste en ácido cítrico y ácido tartárico.
- 35 8. El producto farmacéutico acabado de la reivindicación 1, en la que el agente reductor del pH está presente en una cantidad de no menos de 300 miligramos.
9. El producto farmacéutico acabado de la reivindicación 1, en el que dicho agente peptídico es seleccionado del grupo que consiste en calcitoninas y hormonas paratiroideas.
- 40 10. El producto farmacéutico acabado de la reivindicación 1, en el que dicha hormona paratiroidea es seleccionada del grupo que consiste en hormonas paratiroideas de longitud completa y amidadas.
11. El producto farmacéutico acabado de la reivindicación 1, en el que dicha hormona paratiroidea está incluida en su forma de ácido libre o como un derivado amidado.
12. El producto farmacéutico acabado de la reivindicación 1, en el que la hormona paratiroidea es PTH[1-31]NH₂.
- 45 13. El producto farmacéutico acabado de la reivindicación 1, en el que dicho agente peptídico es seleccionado del grupo que consiste en vasopresina, insulina y H-tirosina-D-arginina-fenilalanina-lisina-NH₂ y sus derivados.