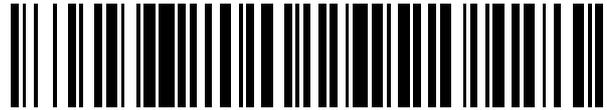


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 010**

51 Int. Cl.:

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2010** **E 10722162 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015** **EP 2410997**

54 Título: **Composición para la administración de fármacos poliméricos**

30 Prioridad:

23.03.2009 GB 0904942

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

10.02.2016

73 Titular/es:

**NORWEGIAN UNIVERSITY OF SCIENCE AND
TECHNOLOGY (NTNU) (100.0%)
7491 Trondheim, NO**

72 Inventor/es:

**DRAGET, KURT LNGAR y
TAYLOR, CATHERINE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 559 010 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para la administración de fármacos poliméricos

5 La presente invención se refiere a mejoras en y relativas a composiciones farmacéuticas para la administración oral de sustancias farmacológicas biológicas poliméricas y a métodos de tratamiento que usan dichas composiciones.

10 La aceptación del tratamiento farmacológico por parte de los pacientes y la facilidad de la administración del fármaco son significativamente superiores cuando la sustancia farmacológica se puede administrar por vía oral que cuando, por ejemplo, se tiene que inyectar. Por consiguiente, la mayoría de las composiciones farmacéuticas suministradas comercialmente se formulan para la administración oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, cápsulas o en forma líquida.

15 Sin embargo, la administración oral no siempre es viable o sencilla, por ejemplo, cuando la sustancia farmacológica es inestable en los jugos gástricos y, por tanto, no llega a los intestinos desde donde puede ser absorbida. La metodología convencional para abordar la inestabilidad en los jugos gástricos ha sido la de administrar dichas sustancias farmacológicas en forma de comprimido, cápsula o dispersión, proporcionándose los comprimidos, las cápsulas o las partículas con un recubrimiento entérico, es decir, un recubrimiento de un material que es insoluble en el estómago, pero que se descompone más abajo del intestino para liberar la sustancia farmacológica que se ha usado para la encapsulación. Los materiales de recubrimiento entérico son bien conocidos y se encuentran ampliamente disponibles en el mercado. Sin embargo, a pesar de que el suministro de dichos recubrimientos de liberación retardada es una tecnología bien establecida, todavía se han de formular de manera satisfactoria sustancias farmacológicas biológicas poliméricas, por ejemplo, hormonas y otros péptidos, para la administración oral.

25 Así pues, existe la necesidad continua de formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para la administración oral de sustancias farmacológicas biológicas poliméricas.

30 Se ha encontrado ahora que esta necesidad se cubre mediante la inclusión de la sustancia farmacológica biológica polimérica en una forma de administración oral con recubrimiento entérico de un oligouronato, que es un oligosacárido lineal que consiste mayoritariamente en residuos monoméricos de uronato. La invención se basa, en parte, en el sorprendente hallazgo de que la capacidad de penetración del mucus intestinal es aumentada espectacularmente por los oligouronatos. Este hallazgo ha permitido el desarrollo de formulaciones farmacológicas para la administración oral de fármacos poliméricos, fármacos macromoleculares, en particular, según lo reivindicado en el presente documento que aprovechan dicho efecto recién descubierto de los oligouronatos.

40 Para ciertos tratamientos, las sustancias farmacológicas se pueden administrar por vía mucosa, es decir, se ponen en contacto con una superficie mucosa del cuerpo humano o animal, por ejemplo, una superficie del interior de la superficie gastrointestinal, las vías respiratorias o la vagina. En el caso de los peces, la superficie mucosa puede ser la piel, y es posible administrar vacunas por vía mucosa a peces tales como el salmón, mediante la aplicación tópica en la piel o la aplicación en el agua circundante. Las composiciones de la invención son adecuadas para la aplicación mucosa y la invención se reivindica en consecuencia. Sin embargo, se prefieren las composiciones y la administración orales.

45 Por lo tanto, vista desde un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica oral y/o mucosa que comprende una sustancia farmacológica con recubrimiento entérico, en la que dicha composición también comprende un oligouronato con recubrimiento entérico y en la que dicha sustancia farmacológica es una sustancia farmacológica biológica polimérica.

50 Vista desde un aspecto adicional, la invención también proporciona un método de tratamiento de un sujeto humano o no humano (por ejemplo, aviar, reptiliano, pez o preferentemente mamífero), método que comprende administrar por vía oral o por vía mucosa a dicho sujeto una dosis eficaz de una sustancia farmacológica para combatir una afección sensible a dicha sustancia farmacológica, mejora que comprende la administración de dicha sustancia farmacológica en forma de una composición de acuerdo con la invención.

55 Vista desde otro aspecto, la invención proporciona el uso de un oligouronato para la fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención o su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la invención.

60 Las composiciones de la invención pueden estar en cualquier forma administrable por vía oral o por vía mucosa en la que la sustancia farmacológica biológica polimérica y el oligouronato pueden transitar por el estómago y ser liberados en la misma sección de partes posteriores del tracto gastrointestinal al mismo tiempo. Así pues, la forma farmacéutica puede ser una dispersión, un comprimido, una cápsula, un gel masticable, etc. Preferentemente, sin embargo, la composición tendrá la forma de un comprimido o de una cápsula, recubierta como una sola unidad con el recubrimiento entérico, es decir, resistente a los jugos gástricos, y/o que contenga partículas más pequeñas suministradas con dichos recubrimientos. Preferentemente, el oligouronato y la sustancia farmacológica biológica polimérica se proporcionan con el/los mismo/s recubrimiento/s pues, aunque sin el deseo de quedar ligados a la

teoría, se cree que el oligouronato sirve para potenciar la bioabsorción de la sustancia farmacológica biológica polimérica mediante la modificación de la permeabilidad de la capa mucosa del lumen intestinal, de manera que el fármaco polimérico es más capaz de pasar a través y llegar a las superficies de las células del lumen intestinal. También se postula que la biodisponibilidad y la absorción del fármaco polimérico se verán afectadas de manera sinérgica por la administración conjunta con un oligouronato en una formulación con recubrimiento entérico. En particular, cuando el oligouronato y los fármacos se liberan sustancialmente de forma simultánea, se espera que el nivel de oligouronato conduzca a una biodisponibilidad y una absorción del fármaco ventajosamente mayores.

El material usado para el recubrimiento entérico puede ser, por ejemplo, cualquiera de los materiales convencionalmente usados para retrasar la liberación de sustancias farmacológicas hasta después de que la composición haya salido del estómago. Los ejemplos incluyen polímeros sintéticos y semisintéticos tales como ftalato de acetato de celulosa y los disponibles con el nombre comercial de Eudragit. El recubrimiento debe ser insoluble en el estómago y debe evitar el paso de los componentes de los jugos gástricos, tales como los ácidos, que puedan romper la sustancia farmacológica biológica polimérica. Dichos recubrimientos se pueden aplicar de manera convencional y en espesores/cantidades convencionales. Si se desea, se puede incluir un tampón con la sustancia farmacológica biológica, o dentro de una capa de recubrimiento, para proteger la sustancia farmacológica aún más de cualquier posible fuga de ácido antes de completarse el tránsito por el estómago.

La sustancia farmacológica biológica polimérica de las composiciones de la invención puede ser cualquier material que sea susceptible a la degradación por los fluidos gástricos, que sea un polímero de origen biológico, o un análogo o derivado de un polímero de origen biológico, que tenga una actividad fisiológica deseada como sustancia farmacológica (en lugar de simplemente como un nutriente, por ejemplo), y que no sea un oligosacárido. El peso molecular de la sustancia farmacológica será preferentemente 500 Da a 500 kDa, particularmente de 1 a 50 kDa, especialmente de 3 a 25 kDa. Por lo general, la sustancia farmacológica biológica será un péptido, por ejemplo, un oligopéptido o un polipéptido, por ejemplo, una proteína o un fragmento de proteína, y en particular, una hormona. El polímero puede ser un derivado, por ejemplo, una sal, un éster, una amida, un complejo o un conjugado. Dichos derivados todavía se consideran sustancias farmacológicas biológicas poliméricas, pues su farmacóforo, es decir, el componente responsable de la actividad fisiológica deseada, sigue siendo el componente biológico polimérico. Las hormonas/proteínas/péptidos particularmente preferidos incluyen:

insulina;

factor de necrosis antitumoral (anti-TNF);

interferones;

factores de coagulación (por ejemplo, factor VII, factor VIII y factor IX);

hormonas estimulantes de folículos (FSH);

eritropoyetina;

β -glucosidasa humana; y

agentes contra el cáncer tales como:

factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF);

herceptina, y

anti-CD20.

Otras sustancias farmacológicas preferidas incluyen antígenos para la vacunación oral o mucosa, por ejemplo, fragmentos de proteínas de especies parasitarias o infecciosas opcionalmente conjugados a un vehículo inmunogénico. Dichas especies pueden ser, por ejemplo, bacterias, virus, levaduras u hongos. Las vacunas se pueden usar para la vacunación humana; sin embargo, se prefieren particularmente para la administración a animales de granja, especialmente a peces y mariscos, por ejemplo, salmón, trucha, bacalao y gambas.

La mayoría de estas sustancias farmacológicas biológicas poliméricas se encuentran disponibles en el mercado, ya sea de forma genérica o con nombres comerciales tales como: Enbrel, Remicade, Humira, Avonex, Rebif, Betaseron, Pegasys, Procrit, Epogen, Reconorm, Epogin, Epomax, Eprex, Trazumab, Rituxan, Neupogen, Neulastra, y Cerezyme. Las afecciones que se tratan engloban una amplia selección, por ejemplo, la diabetes, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la infertilidad y la enfermedad de Gaucher.

La posología de la sustancia biológica polimérica de las composiciones de la invención estará normalmente en el intervalo del 5 al 100 %, especialmente del 10 al 60 %, más particularmente del 20 al 50 % de la dosis diaria

deseada por unidad de dosificación (o por volumen de dosificación prescrito para una composición no en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, una dispersión líquida). La dosis diaria deseada será generalmente de 1 a 10 veces, por ejemplo, de 2 a 6 veces, la dosis diaria tomada por inyección, es decir, las dosis fácilmente determinables a partir de las hojas de datos de productos actuales. La proporción entre la dosis de inyección conocida y la dosis oral de acuerdo con la invención se puede determinar mediante experimentación convencional, por ejemplo, tras la determinación del porcentaje de captación de un análogo marcado tomado por vía oral y por inyección en un modelo animal. En general, cabe esperar que la dosis oral sea del 500 al 2.000 %, por ejemplo, aproximadamente 1.000 %, de la dosis normalmente administrada por inyección (es decir, una dosis de 5 a 20 veces, especialmente de aproximadamente 10 veces la dosis normal de la inyección). Como es evidente, la dosis concreta también dependerá, como con la administración por inyección conocida, de la especie y del tamaño del receptor, de la naturaleza y de la gravedad de la afección que se vaya a tratar, y de la propia sustancia farmacológica biológica específica.

El oligouronato, como se ha mencionado anteriormente, preferentemente se recubre con un recubrimiento de liberación retardada de la misma manera que o, más preferentemente, junto con, la sustancia farmacológica biológica polimérica. Esto tiene el fin de garantizar que tanto el oligouronato como la sustancia farmacológica biológica polimérica se liberen sustancialmente en el mismo sitio y a la vez. Dado que se cree que la función del oligouronato es, en gran medida, la de modificar la superficie mucosa del tracto gastrointestinal, la dosis será preferentemente superior, en términos molares, a la de la sustancia farmacológica biológica polimérica, pero no tiene que ser proporcional a la dosis de la sustancia farmacológica. La dosis de oligouronato será preferentemente de 10 a 1.200 mg, especialmente de 50 a 1.000 mg, en particular de 100 a 750 mg, por unidad de dosis. Aunque el tratamiento previo del tracto gastrointestinal con el oligouronato, es decir, la administración secuencial de oligouronato seguido de la sustancia farmacológica biológica polimérica, podría pensarse que equivale a la administración simultánea, se cree que la administración simultánea es preferible, ya que la captación potenciada se limita más estrechamente a la sustancia farmacológica biológica polimérica deseada.

Los contraiones para el oligouronato pueden ser cualquiera de los iones fisiológicamente tolerables comúnmente usados para las sustancias farmacológicas cargadas, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, cloruro, mesilato, meglumina, etc. Sin embargo, preferentemente, no se usarán los iones que potencien la gelificación del alginato, por ejemplo, los metales del grupo 2. Es deseable que dichos iones del grupo 2 estén esencialmente ausentes del resto de los componentes de las composiciones de la invención.

Aunque el oligouronato, que es lineal, puede ser un material sintético, es preferentemente un derivado que tiene un peso molecular medio en peso inferior a 100.000 Da, de un polisacárido de origen natural. Es preferentemente un de 3- a 28-mero, en particular, un de 4- a 25-mero, especialmente un de 6- a 22-mero, en particular, un de 8 a 15-mero, especialmente un 10-mero, por ejemplo, que tiene un peso molecular en el intervalo de 350 a 6.000 Da, especialmente de 750 a 4.500 Da. Puede ser un solo compuesto o puede ser una mezcla de oligouronatos, por ejemplo, de una selección de grados de polimerización. Por otra parte, los residuos monoméricos del oligouronato, es decir, los grupos de monosacárido, pueden ser iguales o diferentes.

Los oligouronatos se pueden obtener fácilmente de fuentes naturales, ya que muchos polisacáridos naturales contienen residuos de ácidos urónicos tales como residuos de ácido gularónico y galacturónico.

La escisión del polisacárido a oligosacárido para producir los oligouronatos que se pueden usar de acuerdo con la presente invención se puede realizar usando técnicas de lisis de polisacáridos convencionales tales como la digestión enzimática y la hidrólisis ácida. Entonces, los oligouronatos se pueden separar de los productos de degradación de polisacáridos cromatográficamente usando una resina de intercambio iónico o por precipitación fraccionada o solubilización.

Los ejemplos de polisacáridos que contienen uronatos incluyen polisacáridos naturales (tales como xantano, pectina, alginatos, ácido hialurónico, heparina y sulfato de condroitina) y polisacáridos modificados químicamente, incluyendo, pero sin limitación, polisacáridos modificados para añadir grupos cargados (tales como glicanos carboxilados o carboximetilados) y polisacáridos modificados para modificar la flexibilidad (por ejemplo, por oxidación con peryodato). Los polisacáridos adecuados se describen, por ejemplo, en "Handbook of Hydrocolloids", Ed. Phillips y Williams, CRC, Boca Ratón, Florida, EE.UU., 2000. Sin embargo, se prefiere especialmente el uso de alginatos, ya que estos ocurren de manera natural como copolímeros de bloque de ácidos manurónico (M) y gularónico (G), y es posible producir fácilmente oligómeros de bloques de G a partir de materiales de partida de alginato. De hecho, en general, el oligouronato es preferentemente un ácido oligogularónico, o menos preferentemente un ácido oligogalacturónico.

Cuando se usan alginatos como material de partida para la preparación del oligouronato, si se desea, es posible aumentar el contenido de ácido gularónico por epimerización con manouronano C-5 epimerasas de *A. vinelandii*.

Los ácidos oligogularónicos adecuados para su uso de acuerdo con la invención pueden producirse convenientemente mediante hidrólisis ácida de ácido alginico de *Laminaria hyperborea*, disolución a pH neutro,

adición de ácido mineral para reducir el pH hasta 3, 4 para precipitar el ácido oligogulurónico, lavado con ácido débil, resuspensión a pH neutro y liofilización.

5 Se prefiere especialmente el uso de oligouronatos del tipo descrito en el documento WO2008/125828, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia.

10 La composición de la invención se puede producir y administrar de forma convencional. Además del material de recubrimiento entérico, la oligouronato y la sustancia farmacológica biológica polimérica, las composiciones pueden contener otros vehículos y excipientes farmacéuticos convencionales, por ejemplo, disolventes, diluyentes, tampones, modificadores de la viscosidad, colorantes, antioxidantes, etc.

15 En particular, cuando las composiciones son para la administración a animales de granja, pueden estar en forma de una composición de pienso que contenga las sustancias con recubrimiento entérico, por ejemplo, gránulos de pienso. Dichas composiciones se pueden preparar mediante la inclusión de las sustancias con recubrimiento entérico con el resto de componentes del pienso o las sustancias con recubrimiento entérico se pueden absorber en el pienso previamente preparado. Esto se puede hacer, por ejemplo, de la manera desvelada en el documento WO02/28199, usando una dispersión de partículas con recubrimiento entérico en el agua usada para empapar los microgránulos de pienso.

20 Cuando los antígenos se van a administrar por vía mucosa, si se desea, se puede prescindir de la inclusión de un recubrimiento entérico. No obstante, dicho tratamiento y las composiciones adecuadas para usarlas en el mismo forman aspectos de la invención. Por lo tanto, vista desde un aspecto, la invención proporciona una composición de vacuna por vía mucosa que comprende un antígeno, especialmente un antígeno peptídico, y un oligouronato fisiológicamente tolerable, opcionalmente junto con un vehículo o excipiente tolerable. Vista desde un aspecto adicional, la invención proporciona un kit de vacuna por vía mucosa que comprende un antígeno e, incluido por separado, un oligouronato. Vista desde un aspecto adicional, la invención proporciona un método de vacunación por vía mucosa de un animal, especialmente un pez, método que comprende exponer una superficie mucosa de dicho animal de forma simultánea o secuencial a una cantidad eficaz de un antígeno, especialmente un antígeno hidrosoluble, y una cantidad eficaz de un oligouronato.

30 La invención se describirá ahora además con referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes, en los que:

Las Figuras 1A-1C muestran la captación celular de microperlas en células secretoras de mucosidad;

35 Las Figuras 2A-2B muestran los efectos del oligouronato sobre la transfección de células HEK y HeLa;

Las Figuras 3A-3C muestran la captación de transferrina marcada en células MDCK;

40 Las Figuras 4A-4C muestran la captación de transferrina marcada en células MDCK tratadas con oligouronato;

Las Figuras 5A-5C muestran la captación de transferrina marcada en células MDCK tratadas con oligouronato que posteriormente se lava;

45 La Figura 6 muestra la captación de transferrina marcada en células HeLa con y sin tratamiento de oligouronato;

La Figura 7 muestra la difusión de microperlas de 0,5 µm en mucosidad tras el fotoblanqueamiento;

La Figura 8 muestra la difusión de microperlas de 0,1 µm en mucosidad tras el fotoblanqueamiento;

50 La Figura 9 muestra la difusión de microperlas de 0,2 µm en mucosidad tras el fotoblanqueamiento; y

Las Figuras 10-13 son micrografías electrónicas de barrido de mucina gástrica de cerdo a concentraciones de 20 y 25 mg/ml, con y sin tratamiento de oligouronato.

55 Ejemplo 1

Comprimidos de insulina

Los siguientes componentes se mezclan bien y se presionan para formar núcleos de comprimidos:

60 Talco	350 mg/comprimido
Estearato de magnesio	350 mg/comprimido
Insulina*	100 Unidades
Guluronato de sodio**	300 mg/comprimido

*disponible en Alfa Chem, Kings Point, NY, EE.UU.

****Polímero de bloques de G, DP10, preparado según lo descrito en el documento WO2008/125828.**

Se recubren los núcleos de comprimidos de manera convencional con un agente de recubrimiento entérico, por ejemplo, Eudragit® FS30D, disponible en Evonik Industries AG, Essen, Alemania.

Ejemplo 2

5

Captación de microperlas en células con capa de mucosidad

Se evaluó la capacidad de las células HT29-MTX secretoras de mucosidad para captar microperlas. Se examinaron células que tenían una capa discontinua de mucosidad y células que tenían una capa continua de mucosidad de la siguiente manera.

10

Se cultivaron células HT29-MTX (*Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* (2003) 28(1): pág. 39-42) hasta la confluencia en placas de 24 pocillos. Se usó medio de Eagle modificado de Dulbecco, DMEM (Gibco). Para los pocillos designados confluentes, se cultivaron células de capa de mucosidad bajo filtros Transwell™ de tamaño de poro de 3 µm (Corning), y todos los cambios de medio se realizaron a través de la membrana del filtro para proteger la capa de mucosidad subyacente.

15

Se retiró el medio de crecimiento y se reemplazó con 750 µl de medio recién preparado y 250 µl de bien un oligouronato (bloque G que tiene un grado de polimerización DP = 20) o solución salina (control).

20

Se añadieron 40 µl de microperlas (microesferas modificadas con carboxilato FluoSpheres®, 0,02 µm, de color amarillo-verde fluorescente; Invitrogen) a los pocillos de ensayo en forma de una suspensión al 0,02 %.

Se realizó la incubación a 37 °C durante 2 horas y se detuvo lavando las células (2 veces) en PBS frío (2 ml). Se usó tripsina/EDTA frío para separar las células (2 ml), se añadió medio (2 ml) y se centrifugaron las células. Se lavaron las células (2 veces) en PBS frío (2 ml) y se suspendieron en PBS (0,5 ml).

25

Se realizó la citometría de flujo con excitación de fluoróforo usando la línea de 488 nm de un láser de argón con detectores optimizados para el fluoróforo.

30

Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 1A, 1B y 1C. Las Figuras 1A y 1B muestran que una capa de mucosidad continua es una barrera para la captación celular de microperlas. La Figura 1C muestra que la adición de un oligouronato aumenta significativamente la captación de microperlas en las células con una capa de mucosidad continua.

35

Ejemplo 3

Efecto del oligouronato en la captación celular de un lipoplexo de ARNip

Se cultivaron células HeLa o HEK (disponibles en el mercado) hasta la confluencia en placas de 6 pocillos usando medio de crecimiento optiMEM® (Invitrogen).

40

Se retiró el medio de crecimiento y se reemplazó con 750 µl de medio recién preparado y 250 µl de bien un oligouronato (bloque G que tiene un grado de polimerización DP = 20) o solución salina (control).

45

A continuación, se añadieron lipoplexos de ARNip/Lipofectamina™ RNAimax fluorescentes (Invitrogen) para ensayar los pocillos de acuerdo con el protocolo recomendado por los fabricantes, y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. No se añadió reactivo de transfección a los pocillos de control.

Se detuvo la incubación mediante el lavado de las células (2 veces) en PBS frío (2 ml). Se usó tripsina/EDTA frío para separar las células (2 ml), se añadió medio (2 ml) y se centrifugaron las células y se lavaron (2 veces) en PBS frío (2 ml). A continuación, las células se suspendieron en PBS (0,5 ml).

50

Se realizó la citometría de flujo con excitación de fluoróforo usando la línea de 488 nm de un láser de argón con detectores optimizados para el fluoróforo.

55

Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 2A y 2B. La Figura 2A muestra el efecto del oligouronato en la transfección de las células HEK - se observa cierta captación de ácido nucleico sin oligouronato, pero se observa una mayor captación cuando hay oligouronato presente. La Figura 2B muestra el efecto del oligouronato sobre la transfección de células HeLa - no se observa la captación de los ácidos nucleicos en ausencia de oligouronato, sin embargo, se observa una captación significativa cuando hay oligouronato presente.

60

Ejemplo 4

Efecto del oligouronato sobre la captación celular de transferrina

Se cultivaron células MDCK o HeLa (disponibles en el mercado) hasta la confluencia en placas de 6 pocillos usando medio de crecimiento optiMEM® (Invitrogen).

5 Se retiró el medio de crecimiento y se reemplazó con 750 μ l de medio recién preparado y 250 μ l de bien un oligouronato (bloque G que tiene un grado de polimerización DP = 20) o solución salina (control).

Se preincubaron las células a 37 °C durante 2 horas y luego se lavaron los pocillos (células MDCK para muestras lavadas solamente) dos veces con PBS.

10 Se añadieron 5 μ g o 10 μ g de transferrina marcada con Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) para ensayar los pocillos. Los pocillos sin transferrina se usaron como controles de autofluorescencia. A continuación, se incubaron las células a 37 °C durante 2 horas.

15 Se detuvo la incubación mediante el lavado de las células (2 veces) en PBS frío (2 ml). Se usó tripsina/EDTA frío para separar las células (2 ml), se añadió medio (2 ml) y se centrifugaron las células. A continuación, se lavaron las células (2 veces) en PBS frío (2 ml) y se suspendieron en PBS (0,5 ml).

20 Se realizó la citometría de flujo con excitación de fluoróforo usando la línea de 488 nm de un láser de argón con detectores optimizados para el fluoróforo. Los resultados se muestran en las Figuras 3-6.

25 Las Figuras 3A-3C muestran los resultados de la citometría de flujo de las células MDCK tratadas con el control de solución salina (es decir, sin oligouronato). Las Figuras 4A-4C muestran los resultados de la citometría de flujo de las células MDCK tratadas con oligouronato. Las Figuras 5A-5C muestran los resultados de la citometría de flujo de las células MDCK tratadas con oligouronato con la etapa de lavado incluida como se ha descrito anteriormente. En cada caso, la Figura A es la curva de control sin transferrina; la Figura B es una superposición de la curva de control y la curva de muestra de 5 μ g de transferrina; y la Figura C es una superposición de la curva de control y la curva de muestra de 10 μ g de transferrina.

30 La Figura 6 muestra los resultados de la citometría de flujo de las células HeLa tratadas. Esta figura es una superposición de la curva de control sin transferrina (pico de la izquierda), la curva de muestra de 5 μ g de transferrina sin tratamiento de oligouronato (pico central gris claro) y la curva de muestra de transferrina de 5 μ g con el tratamiento de oligouronato (pico de la derecha gris oscuro).

35 A la luz de estos datos, se puede ver claramente que el tratamiento con oligouronato mejoró la captación de transferrina (Fig. 4A, 4B y 6). La administración simultánea mejoró la captación (Fig. 4), pero el tratamiento previo con oligouronato seguido por el lavado de las células no aumentó la captación de la transferrina administrada posteriormente (Fig. 5).

40 Ejemplo 5

Movilidad de las microperlas en la mucosidad del intestino delgado

45 Se raspó mucosidad de intestino delgado porcino de la mucosa de cerdos recién sacrificados y se congeló hasta su uso. Antes de su uso, la mucosidad congelada se descongeló durante 24 horas a 4 °C.

Las microperlas usadas fueron microesferas modificadas con carboxilato FluoSpheres® de color amarillo-verde fluorescente (Invitrogen) de 0,1, 0,2 y 0,5 μ m de diámetro.

50 5.1 Experimentos usando microperlas de 0,1 y 0,5 μ m de diámetro:

55 Se prepararon muestras de control mediante la adición de 32 μ l de solución de NaCl 0,05 M a 260 μ g de mucosidad de intestino delgado (preparada como se ha descrito anteriormente), se agitó bien durante 1 hora y se dejó equilibrar durante 1 hora. Se agitaron en vórtex 8 μ l de microperlas (suspensión al 2 %) y después se añadieron al preparado de mucosidad. Se agitó bien la mezcla durante 1 hora y se dejó equilibrar durante la noche a 4 °C.

60 Se prepararon muestras que incluían oligouronato como para la muestra de control, a excepción de que se usaron 32 μ l de oligouronato a 40 mg/ml (bloque G que tiene un grado de polimerización DP = 20) en NaCl 0,05 M en lugar de la solución de NaCl 0,05 M.

Se usaron las muestras para llenar cámaras de formación de imágenes confocales.

65 A continuación, se blanqueó una región de interés usando la línea de 488 nm de un láser de argón a plena potencia, y se monitorizó la recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueamiento (FRAP) por difusión a una potencia del láser del 2 %.

5.2 Experimentos usando microperlas de 0,2 μm de diámetro:

Se solubilizó mucina (preparada como se ha descrito anteriormente) en NaCl 50 mM a una concentración de 25 mg/ml. Se solubilizó oligouronato (bloque G que tiene un grado de polimerización DP = 20) en NaCl 50 mM a una concentración de 30 mg/ml

- Muestra de microperlas (sin mucina)

Se sometieron a vórtice 16 μl de suspensión de microperlas, y se añadieron a 384 μl de NaCl 50 mM. Concentración final de $1,8 \times 10^{11}$ perlas/ml.

- Muestra de mucina (sin oligouronato)

Se sometieron a vórtice 16 μl de suspensión de microperlas, y se añadieron a 64 μl de NaCl 50 mM y 320 μl de solución de mucina. Concentración final de $1,8 \times 10^{11}$ perlas/ml; 20 mg/ml de mucina.

- Muestra de mucina y oligouronato

Se sometieron a vórtice 16 μl de suspensión de microperlas, y se añadieron a 64 μl de solución de oligouronato. A continuación, se añadieron 320 μl de solución de mucina. Concentración final de $1,8 \times 10^{11}$ perlas/ml; 20 mg/ml de mucina, 4,8 mg/ml de oligouronato.

Se usaron las muestras para llenar cámaras de formación de imágenes confocales.

A continuación, se blanqueó una región de interés usando la línea de 488 nm de un láser de argón a plena potencia, y se monitorizó la FRAP por difusión a una potencia del láser del 5 %.

5.3 Resultados:

Los resultados se muestran en las Figuras 7, 8 y 9.

La Figura 7 muestra la FRAP de microperlas de 0,5 μm en mucosidad de intestino delgado. La línea inferior negra es la muestra de control (sin oligouronato) y la línea superior gris muestra la recuperación de la fluorescencia en la muestra tratada con oligouronato.

La Figura 8 muestra la FRAP de microperlas de 0,1 μm en mucosidad de intestino delgado. La línea inferior negra es la muestra de control (sin oligouronato) y la línea superior gris muestra la recuperación de la fluorescencia en la muestra tratada con oligouronato.

La Figura 9 muestra la FRAP de microperlas de 0,2 μm en mucosidad de intestino delgado. La línea inferior negra es la muestra de control (sin oligouronato) y la línea superior gris muestra la FRAP de la muestra sin mucina, y las dos líneas interiores (oscura y clara) muestran la recuperación de la fluorescencia en muestras de mucina tratadas con oligouronato.

Estos datos indican que la mucosidad de intestino delgado es una barrera importante para la difusión de partículas con dimensiones submicrométricas. La adición de oligouronato reduce significativamente la barrera de difusión representada por la mucosidad.

Ejemplo 6

Microscopía electrónica de barrido (SEM) de mucina gástrica

Se solubilizó mucina (mucina gástrica porcina preparada como se ha descrito anteriormente) en NaCl 50 mM a una concentración de 25 mg/ml y 30 mg/ml.

Se solubilizó oligouronato (como se ha descrito en el Ejemplo 5) en NaCl 50 mM a una concentración de 30 mg/ml.

Se prepararon muestras para SEM de la siguiente manera:

- Mucina (25 mg/ml)

Se añadieron 336 μl de mucina a 30 mg/ml a 64 μl de NaCl 0,05 M, y se mezclaron.

- Mucina (20 mg/ml)

Se añadieron 320 μl de mucina a 25 mg/ml a 80 μl de NaCl 0,05 M, y se mezclaron.

- Mucina (25 mg/ml) + oligouronato

Se añadieron 336 μl de mucina a 30 mg/ml a 64 μl de oligouronato en NaCl 0,05 M, y se mezclaron.

ES 2 559 010 T3

- Mucina (20 mg/ml) + oligouronato

Se añadieron 320 μ l de mucina a 30 mg/ml a 64 μ l de bloque G en NaCl 0,05 M y 16 μ l de NaCl 0,05 M, y se mezclaron.

- 5 Se deshidrataron las muestras en acetona graduada/agua, se secaron usando secado de punto crítico y se visualizaron mediante microscopía electrónica de barrido.

Los resultados se muestran en las Figuras 10-13.

- 10 Las Figuras 10 y 11 muestran la estructura de las muestras de mucina a 20 mg/ml sin y con oligouronato a 4,8 mg/ml, respectivamente. Las Figuras 12 y 13 muestran la estructura de las muestras de mucina a 25 mg/ml sin y con oligouronato a 4,8 mg/ml, respectivamente.

- 15 Estos datos indican que la adición de oligouronato a la mucosidad gástrica genera una abertura de la estructura de red de la matriz de mucina y un aumento del tamaño de poro.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica oral que comprende una sustancia farmacológica con recubrimiento entérico, en la que dicha composición también comprende un oligouronato con recubrimiento entérico y en la que dicha sustancia farmacológica es una sustancia farmacológica biológica polimérica.
2. Una composición según la reivindicación 1, en la que dicha sustancia farmacológica es un péptido.
- 10 3. Una composición según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha sustancia farmacológica es insulina.
4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en la que dicha sustancia farmacológica es un antígeno.
- 15 5. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en forma de comprimido o cápsula con recubrimiento.
- 20 6. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método de tratamiento de un sujeto humano o no humano, método que comprende la administración oral a dicho sujeto de una dosis eficaz de una sustancia farmacológica para combatir una afección sensible a dicha sustancia farmacológica, en la que dicha sustancia farmacológica se proporciona en forma de dicha composición.
7. El uso de un oligouronato para la fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método de tratamiento según lo definido en la reivindicación 6.
- 25 8. Una sustancia farmacológica con recubrimiento entérico según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto humano o no humano, método que comprende la administración oral a dicho sujeto de una dosis eficaz de dicha sustancia farmacológica para combatir una afección sensible a la misma, en la que la sustancia farmacológica es para la administración simultánea con un oligouronato con recubrimiento entérico y en la que dicha sustancia farmacológica es una sustancia farmacológica biológica polimérica.
- 30 9. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en terapia.

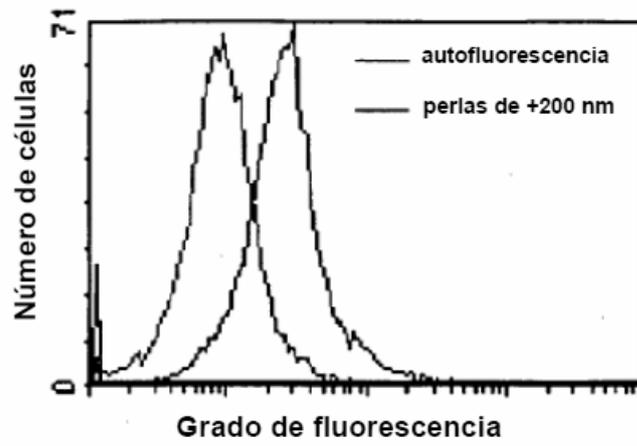


FIG. 1A

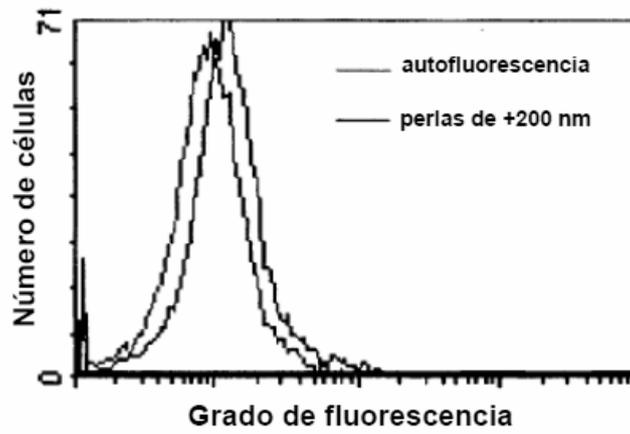


FIG. 1B

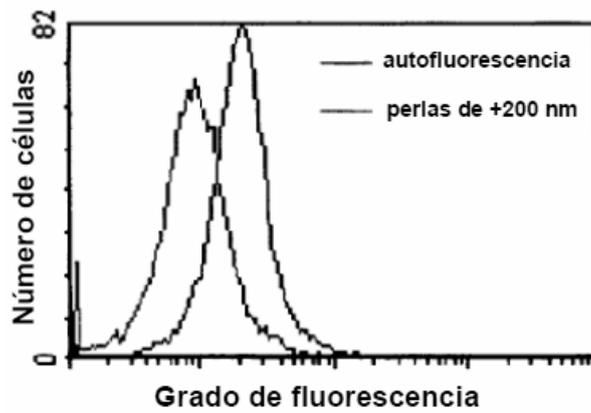


FIG. 1C

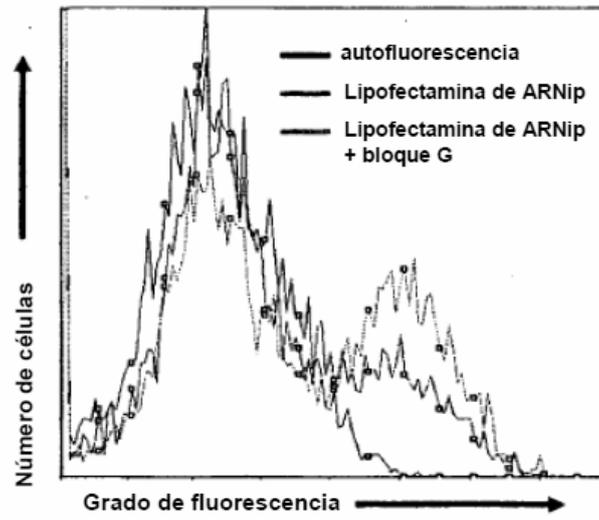


FIG. 2A

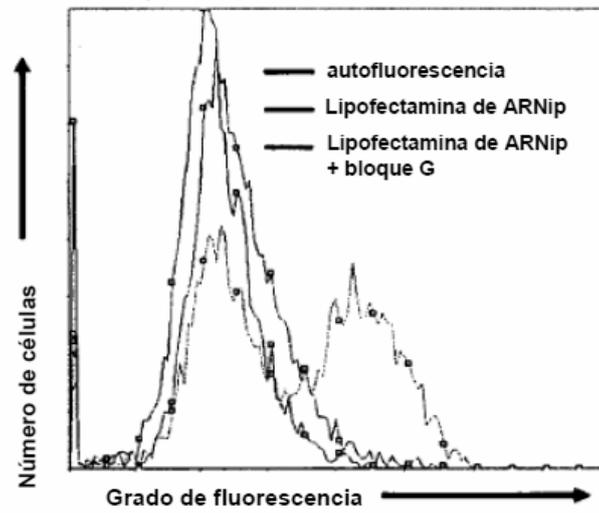


FIG. 2B

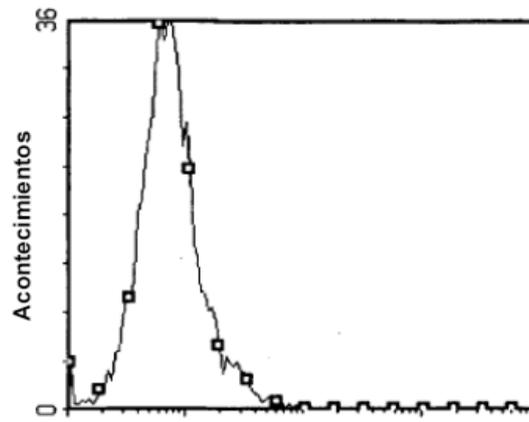


FIG. 3A

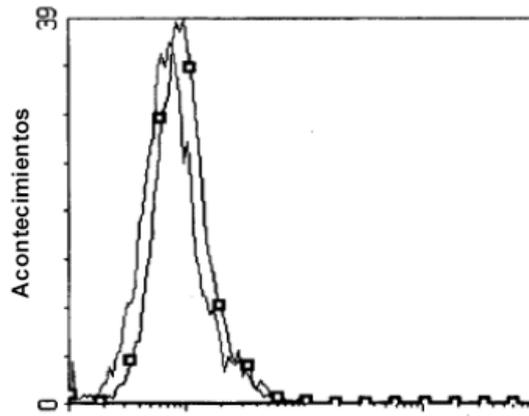


FIG. 3B

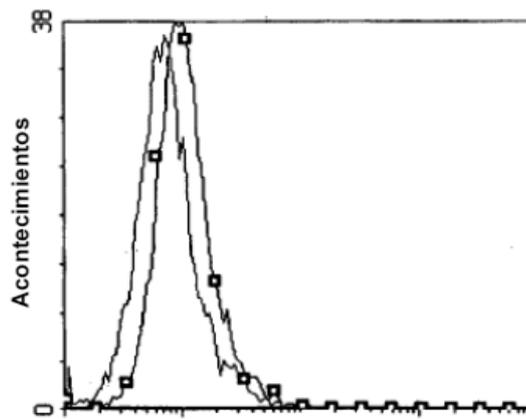


FIG. 3C

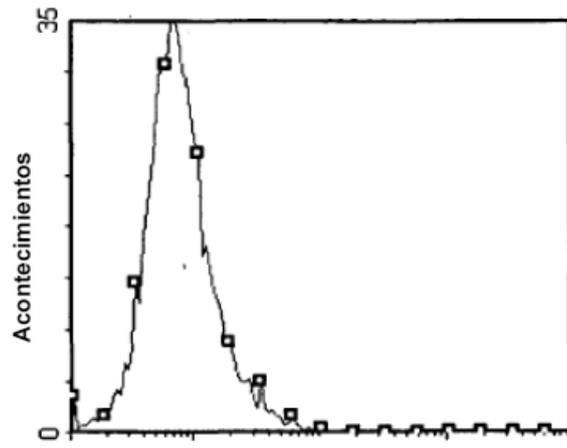


FIG. 4A

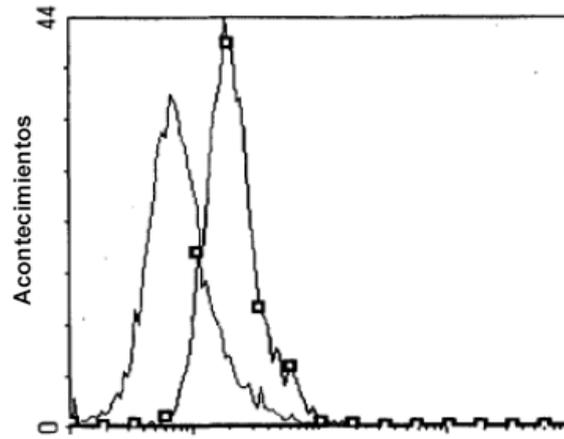


FIG. 4B

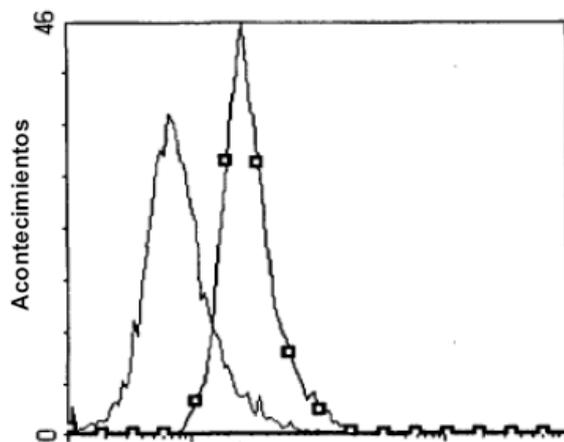


FIG. 4C

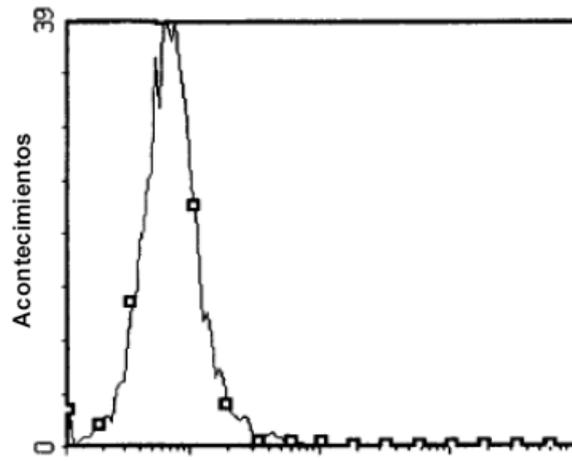


FIG. 5A

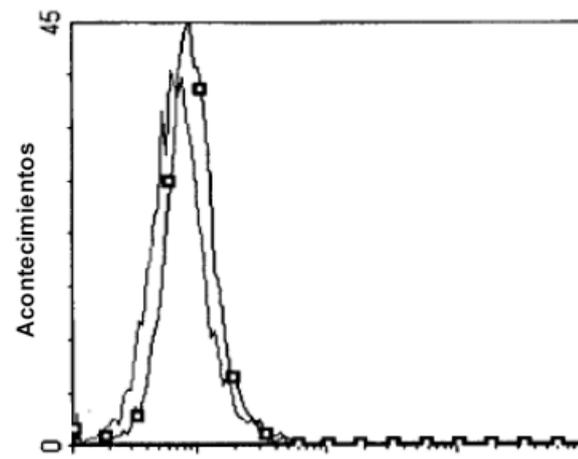


FIG. 5B

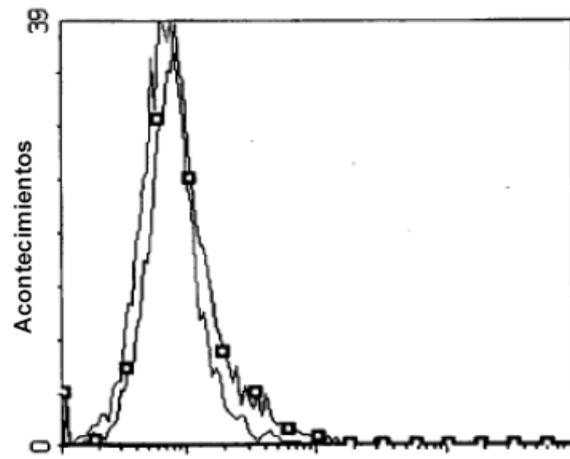


FIG. 5C

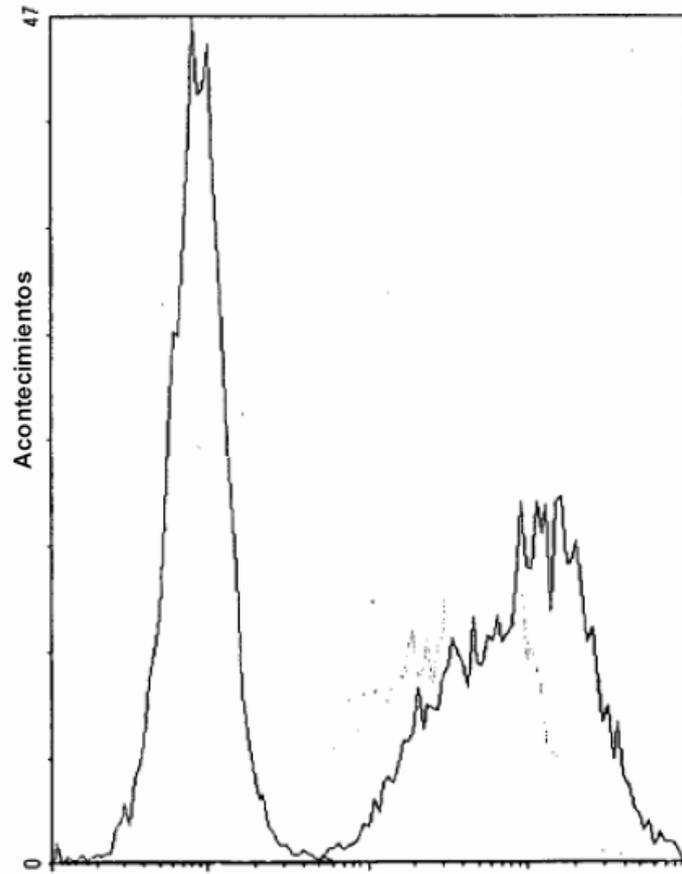


FIG. 6

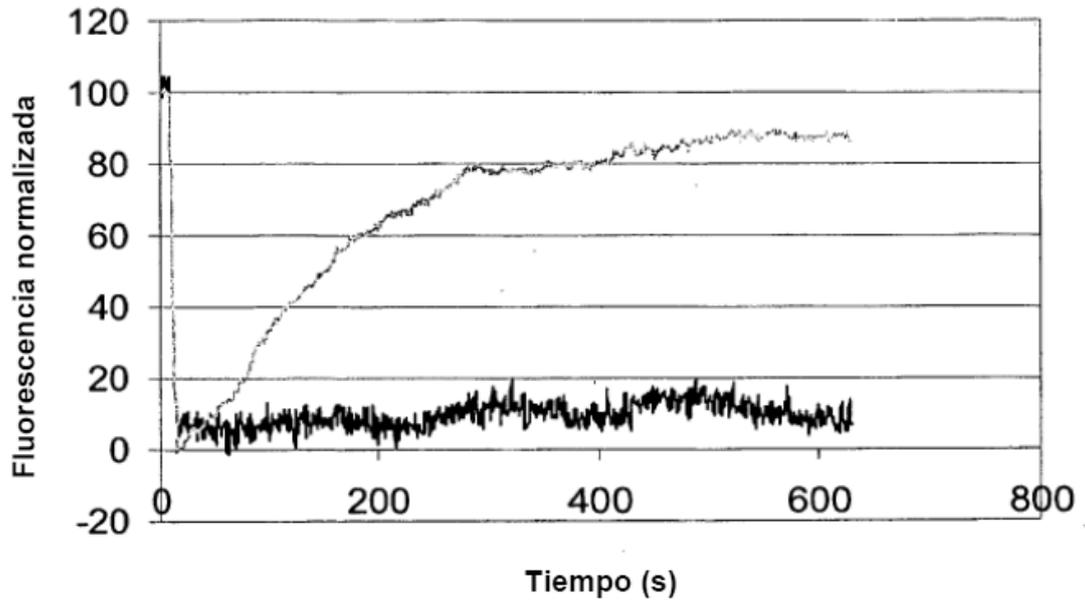


FIG 7.

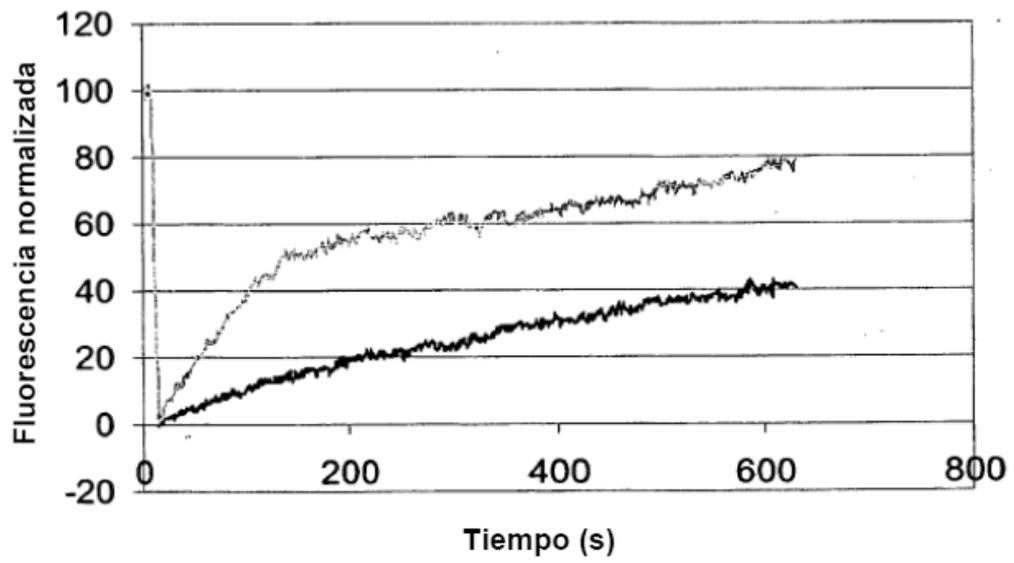


FIG 8.

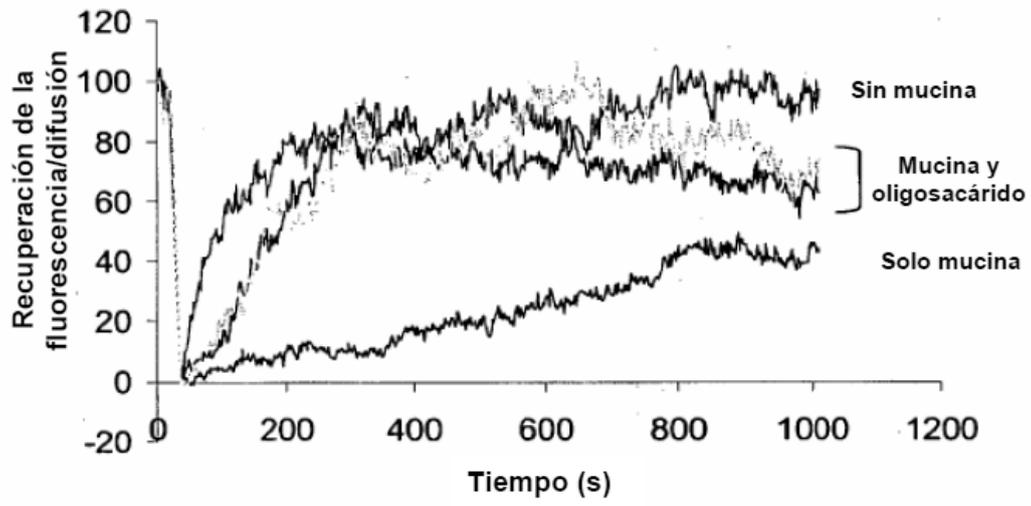


FIG. 9

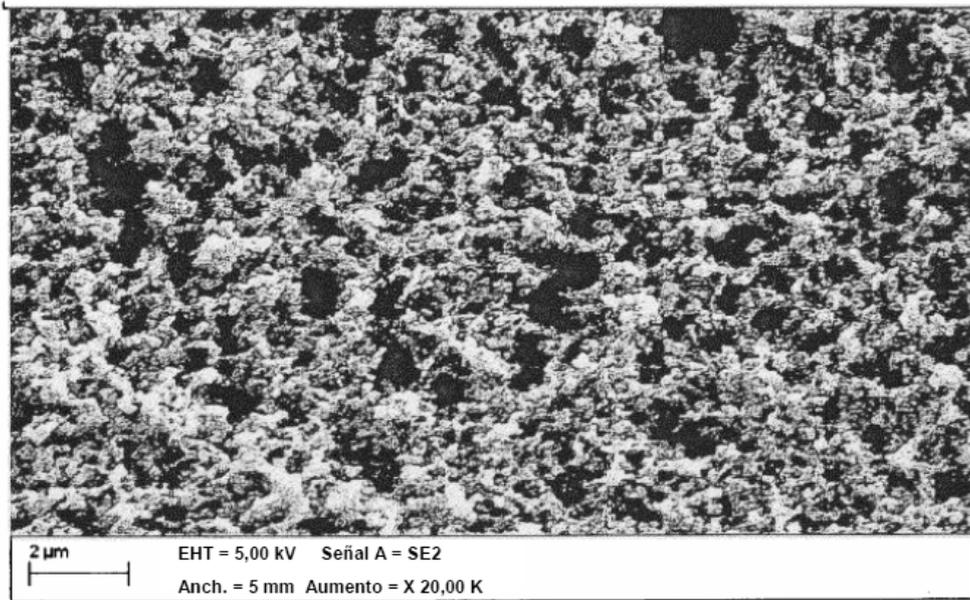


FIG. 10

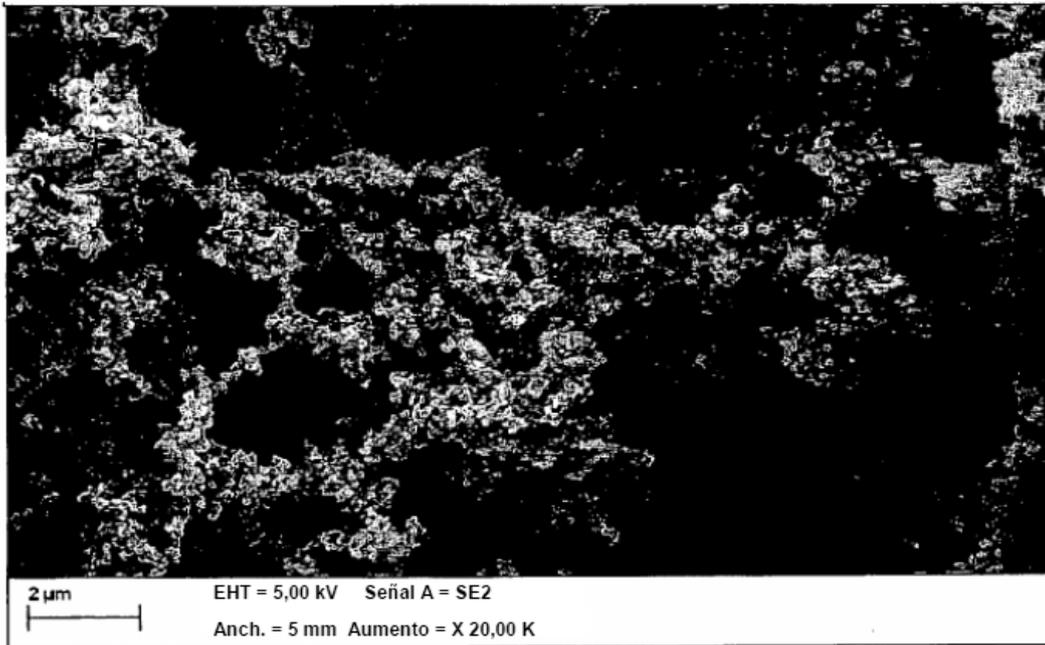


FIG. 11

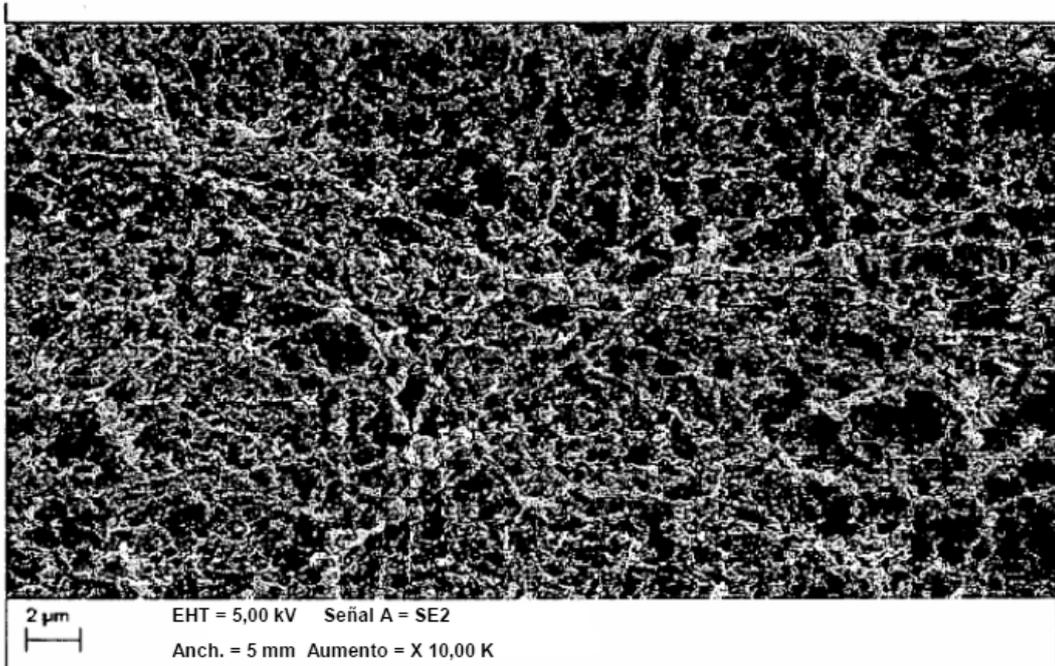


FIG. 12

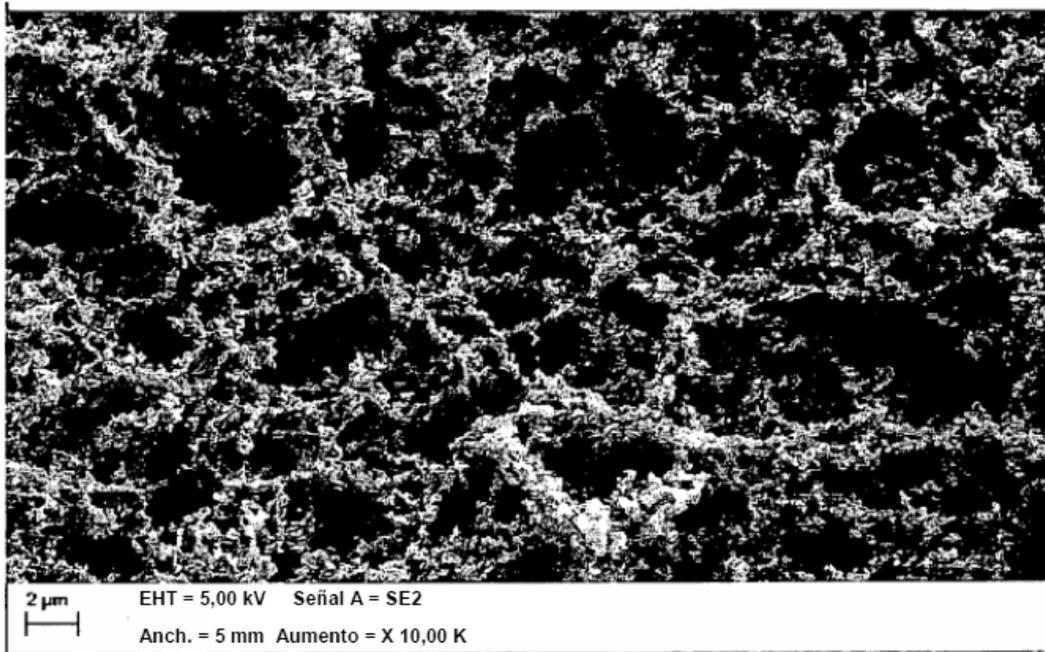


FIG. 13