

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 489**

51 Int. Cl.:

A61K 9/28 (2006.01)

A61K 9/30 (2006.01)

A61K 38/02 (2006.01)

A61K 38/09 (2006.01)

A61K 38/23 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 38/29 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2004 E 04704114 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 1585503**

54 Título: **Administración oral de péptidos mejorada**

30 Prioridad:

21.01.2003 US 441856 P

20.01.2004 US 761481

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

15.03.2016

73 Titular/es:

ENTERIS BIOPHARMA, INC. (100.0%)

83 Fulton Street

Boonton, NJ 07005, US

72 Inventor/es:

MEHTA, NOZER M.;

STERN, WILLIAM y

GILLIGAN, JAMES P.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 563 489 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

Administración oral de péptidos mejorada

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a productos farmacéuticos peptídicos administrados por vía oral donde los compuestos activos incluyen en sus estructuras moleculares una pluralidad de aminoácidos y al menos un enlace peptídico, y a métodos de potenciación de la biodisponibilidad de tales compuestos activos peptídicos cuando se administran por vía oral.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

15 Numerosas hormonas, neurotransmisores, citocinas, factores de crecimiento y otros compuestos biológicos humanos importantes, tienen péptidos como una parte sustancial de sus estructuras moleculares. Muchas enfermedades responden de forma positiva a la elevación del nivel de estos compuestos peptídicos en los pacientes. Se pueden administrar a pacientes en diversos modos cantidades terapéuticamente eficaces de tales péptidos biológicamente relevantes. Sin embargo, como se discute adicionalmente a continuación, la administración oral preferente es muy difícil para este tipo de compuestos activos.

20 Por ejemplo, la calcitonina de salmón es una hormona peptídica que disminuye la liberación de calcio del hueso. Cuando se utiliza para tratar enfermedades óseas y trastornos del calcio (tales como osteoporosis, enfermedad de Paget, hipercalcemia maligna, 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, elcatonina, calcitonina porcina, y calcitonina de pollo). Entre los diversos tipos de calcitonina hay una no homología estructural significativa. Por ejemplo, entre los aminoácidos que integran la calcitonina humana y los que integran la calcitonina de salmón, solamente hay una identidad del 50 %. A pesar de la diferencia en la estructura molecular, la calcitonina de salmón se puede utilizar en el tratamiento en el ser humano de las enfermedades sensibles a calcitonina indicadas anteriormente.

25 Otro ejemplo de hormona peptídica es la hormona paratiroidea (HPT). La HPT se produce por la glándula paratiroidea y es un regulador principal de los niveles de calcio sanguíneos. La HPT es un polipéptido y los polipéptidos sintéticos se pueden preparar mediante el método que divulgan Erickson y Merrifield, *The Proteins*, Neurath *et al.*, Eds., Academic Press, New York, 1976, página 257, y como se modifica mediante el método de Hodges *et al.* (1988), *Peptide Research* 1, 19, o por Atherton, E. y Sheppard, R. C., *Solid Phase Peptide Synthesis*, IRL Press, Oxford, 1989.

40 Cuando se reduce el calcio sérico por debajo de un nivel normal, la glándula paratiroidea libera HPT y el nivel de calcio aumenta por la reabsorción de calcio óseo, por la absorción aumentada de calcio en el intestino, y por la reabsorción renal aumentada de calcio de la orina que se produce en los túbulos renales. Aunque niveles bajos de HPT infundidos de forma continua pueden eliminar calcio óseo, las mismas dosis bajas, cuando se inyectan de forma intermitente, pueden de hecho promover el crecimiento óseo.

45 Tregear, patente de Estados Unidos n.º: 4.086.196, describe análogos de HPT humana y reivindica que los primeros 27 a 34 aminoácidos son los más eficaces en términos de la estimulación de la adenilil ciclasa en un ensayo celular *in vitro*. Rosenblatt, patente de Estados Unidos n.º: 4.771.124, divulga la propiedad de los análogos de HPT donde el Trp²³ se sustituye por los aminoácidos fenilalanina, leucina, norleucina, valina, tirosina, (β-naftilalanina o α-naftilalanina, como un agonista de HPT. Estos análogos de HPT modificados también tienen eliminados los aminoácidos terminales 2 y 6, dando como resultado la pérdida de la mayoría de las actividades agonistas cuando se utilizan para tratar la osteoporosis. Estos análogos se concibieron como inhibidores de la HPT y de péptidos relacionados con HPT. Los análogos se reivindican como posiblemente útiles en el tratamiento de la hipercalcemia asociada con algunos tumores.

50 55 Pang *et al.*, documento WO93/06845, publicado el 15 de abril de 1993, describen análogos de HPT que implican sustituciones de Arg²⁵, Lys²⁶, Lys²⁷ con numerosos aminoácidos, incluyendo alanina, asparragina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, o valina. Estos se reivindican como eficaces en el tratamiento de la osteoporosis con efectos mínimos sobre la tensión arterial y el músculo liso.

60 65 La HPT opera a través de la activación de dos sistemas de segundos mensajeros, la proteína G_s que activa a la adenilil ciclasa (AC) y la fosfolipasa C_β que activa a la proteína G_q. Lo último da como resultado una estimulación de la actividad de la proteína quinasa Cs (PKC) unida a membrana. Se ha demostrado que la actividad de PKC necesita los restos 29 a 32 de la HPT (Jouishomme *et al.* (1994) *J. Bone Mineral Res.* 9, (1179-1189). También se ha establecido que el aumento del crecimiento óseo, es decir, el efecto que es útil en el tratamiento de la

osteoporosis, está acoplado a la capacidad de la secuencia peptídica de aumentar la actividad AC. La secuencia de HPT natural ha mostrado tener todas estas actividades. La secuencia de HPTH-(1-34) humana normalmente se muestra como:

5 Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys
Leu Gln Asp Val His Asn Phe-OH (SEC ID N°: 1).

Diversos análogos de HPT se divulgan en las patentes de Estados Unidos n°.: 5.955.425 y 6.110.892. El siguiente análogo lineal (HPTH truncada), HPTH-(1-31)-NH₂, tiene solamente actividad estimulante de la AC y ha mostrado
10 que es completamente activo en la restauración de la pérdida ósea en el modelo de rata ovariectomizada (Rixon, R. H. *et al.* (1994) *J. Bone Miner. Res.* 9, 1179-1189; Whitfield *et al.* (1996), *Calcified Tissue Int.* 58, 81-87; y Willick *et al.*, patente de Estados Unidos n°.: 5.556.940):

15 Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys
Leu Gln Asp Val-NH₂ (SEC ID N°: 2).

Los productos farmacéuticos peptídicos utilizados en la técnica anterior se han administrado de forma frecuente mediante por inyección o por administración nasal. La insulina es un ejemplo de un producto farmacéutico peptídico que se administra de forma frecuente mediante inyección. La administración oral, más preferente y conveniente,
20 tiende a ser problemática debido a que los compuestos activos peptídicos son muy susceptibles a la degradación en el estómago y los intestinos. Por ejemplo, mientras la técnica anterior ha descrito una capacidad para lograr niveles sanguíneos reproducibles de calcitonina de salmón y de hormona paratiroidea cuando se administran por vía oral, estos niveles son bajos. Se cree que esto se debe a que estas hormonas peptídicas carecen de estabilidad suficiente en el tracto gastrointestinal, y tienden a transportarse de mal a través de las paredes intestinales hacia la
25 sangre. Sin embargo, la inyección y la administración nasal son significativamente menos convenientes e implican más disconformidad del paciente que la administración oral. A menudo esta inconveniencia o incomodidad da como resultado un incumplimiento sustancial del paciente con el plan de tratamiento. Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica de una administración oral más eficaz y reproducible de productos farmacéuticos peptídicos como insulina, calcitonina de salmón, hormona paratiroidea y otros que se analizan con más detalle en el presente documento.

30 Las enzimas proteolíticas del estómago y los intestinos pueden degradar péptidos, haciéndolos inactivos antes de que puedan absorberse en el torrente sanguíneo. Cualquier cantidad de péptido que sobreviva a la degradación proteolítica de las proteasas del estómago (que normalmente tienen un pH óptimo ácido) más tarde se confronta con proteasas del intestino delgado y enzimas secretadas en el páncreas (que tienen normalmente pH óptimo neutro a
35 básico). Las dificultades específicas que surgen de la administración oral de un péptido como la calcitonina de salmón implican el tamaño relativamente grande de la molécula, y la distribución de cargas que porta. Esto puede hacer más difícil a la calcitonina de salmón penetrar la mucosidad a lo largo de las paredes del intestino o atravesar la membrana del borde en cepillo intestinal hacia la sangre.

40 Un modo para mejorar la eficacia de la administración oral de péptidos es protegerlos de las enzimas proteolíticas en el estómago y el intestino así como potenciar su absorción en el intestino, potenciando de este modo su biodisponibilidad. Mejorar la eficacia oral es importante por varias razones. Primero, los péptidos y las proteínas son caros de fabricar por síntesis química o tecnología del ADN recombinante. Por lo tanto, cuanto más se aumenta la biodisponibilidad, menores cantidades se necesitarán en una formulación oral de un fármaco terapéutico.

45 Segundo, cuanto mayor es la biodisponibilidad de un péptido oral, menor es la variabilidad de la dosificación que un individuo absorbe en una base diaria.

50 Tercero, cuanto mayor es la biodisponibilidad de un péptido oral, menor es la preocupación sobre productos de degradación del péptido debido a que tales productos de degradación pueden actuar como agonistas o antagonistas de los receptores donde el péptido se une para producir actividad biológica.

El documento US 6 086 918 A se refiere a formulaciones orales que comprenden un agente activo peptídico tal como calcitonina de salmón, vasopresina o insulina, junto con un agente reductor del pH, un potenciador de la
55 absorción, y un vehículo protector resistente al ácido. El documento WO 02/43767 A1 se refiere a formulaciones orales que comprenden un agente activo peptídico, tal como calcitonina de salmón unida a un translocador de membrana, junto con un agente reductor del pH y/o un inhibidor de proteasa, y un vehículo protector resistente al ácido. Los documentos US 6 086 918 A y WO 02/43767 A1 divulgan la amidación enzimática de precursores de calcitonina de salmón recombinantes para producir un producto idéntico a la calcitonina de salmón natural.

60 Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica oral terapéuticamente eficaz para administrar péptidos farmacéuticos de forma fiable, por ejemplo, agentes peptídicos fisiológicamente activos tales como insulina, calcitonina de salmón, hormona paratiroidea, vasopresina, o análogos de los mismos y otros analizados en el presente documento.

65 En el presente documento se divulgan métodos terapéuticos para potenciar la biodisponibilidad de tales péptidos.

En el presente documento se divulgan métodos de tratamiento de enfermedades óseas y trastornos del calcio mediante la administración de HPT1-31NH₂ por vía oral.

5 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para la administración oral de un agente peptídico fisiológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en péptido similar al glucagón humano 1, péptido similar al glucagón humano 2, insulina, hormona paratiroidea humana, análogo de la hormona paratiroidea humana HPT 1-31NH₂ y análogo de la hormona paratiroidea humana HPT 1-34NH₂, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho péptido activo, donde dicho péptido activo esta amidado en el extremo C-terminal; al menos un agente reductor del pH farmacéuticamente aceptable; y
10 al menos un potenciador de la absorción, en el que dicho potenciador de la absorción es un agente tensioactivo.

Especialmente preferente como agente peptídico es la hormona paratiroidea y los análogos de la misma.

15 La presente invención se cree que reduce la probabilidad de degradación proteolítica del compuesto activo peptídico mediante la protección de forma simultánea del péptido del ataque proteolítico mediante (1) proteasas del estómago que normalmente son más activas a pH ácidos y (2) proteasas del intestino o pancreáticas (que normalmente son más activas a pH básico o neutro).

20 También, se cree que la invención promueve el proceso mediante el cual el péptido atraviesa la membrana del borde en cepillo intestinal hacia la sangre debido a la presencia de la amida, mientras continua protegiendo el péptido de la degradación proteolítica.

25 Un revestimiento protector resistente al ácido de la cápsula o el comprimido protege al agente activo peptídico de las proteasas que actúan en ácido del estómago. Posteriormente, después de que la formulación pasa al intestino, donde el pH es menos ácido, el revestimiento entérico se disuelve para liberar los contenidos de la formulación para liberarlo. Cantidades significativas de ácido (con el que el agente activo peptídico está entremezclado) reducen la actividad de la proteasas que actúan en pH neutro o básico (por ejemplo, proteasas lumenales o digestivas y proteasas de la membrana del borde en cepillo) mediante la disminución del pH de forma local en el sitio de liberación de la formulación por debajo de su intervalo de actividad óptimo.
30

Otras características y ventajas de la presente invención serán obvias a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

35 De acuerdo con la invención, se proporciona a pacientes que necesitan tratamiento con principios activos peptídicos una composición farmacéutica oral de los mismos (a la dosificación apropiada), preferentemente pero no necesariamente, en forma de comprimido o cápsula de un tamaño habitual en la industria farmacéutica. Las dosificaciones y frecuencia de administración de los productos se analizan con más detalle a continuación. Los pacientes que pueden beneficiarse son cualquiera de los pacientes que padecen trastornos que responden de forma favorable a los niveles aumentados de un compuesto que contiene péptido. La invención se puede utilizar, por ejemplo, para tratar la osteoporosis, la enfermedad de Paget y la hipercalcemia maligna, con hormona paratiroidea oral, preferentemente HPT_h 1-31NH₂ y HPT_h 1-34NH₂.
40

45 Sin pretender ligarse a la teoría, se cree que la composición farmacéutica de la invención supera una serie de barreras naturales distintas y no relacionadas con la biodisponibilidad. Diversos componentes de las composiciones farmacéuticas actúan para superar distintas barreras mediante mecanismos apropiados para cada una, y da como resultado efectos sinérgicos en la biodisponibilidad de un principio activo peptídico.

50 El componente activo peptídico puede administrarse por vía oral. De acuerdo con la invención, la presencia de al menos un grupo amida protegería al péptido o la proteína de la degradación proteolítica, mejorando de este modo la biodisponibilidad. El grupo amida puede también potenciar la permeabilidad de membrana de la proteína a través de la luz del intestino. También son posibles otros mecanismos para aumentar la biodisponibilidad mediante la presencia del grupo amida.

55 Existen diversas técnicas para la producción recombinante de productos peptídicos, es decir cualquier compuesto cuya estructura molecular incluye una pluralidad de aminoácidos unidos mediante un enlace peptídico.

Visión general de un vector de expresión preferente

60 En la patente de Estados Unidos n.º 6.210.925 se describe un vector de expresión preferente. En la Figura 9 de la patente de Estados Unidos n.º: 6.210.925 se muestra un ejemplo de un vector preferente para expresar calcitonina de salmón. Para la expresión de otros productos peptídicos, el ácido nucleico que codifica la calcitonina de salmón sustituiría a un ácido nucleico que codifica el producto peptídico deseado.

65 El vector de expresión preferente comprende una región codificante y una región de control. La región codificante comprende ácidos nucleicos de un producto peptídico de interés acoplados en marco de lectura aguas abajo del ácido nucleico que codifica un péptido señal. La región de control está operativamente unida a la región codificante y

comprende una pluralidad de promotores y al menos un sitio de unión de ribosoma, en la que al menos uno de los promotores se selecciona del grupo que consiste en tac y lac.

5 Preferentemente, el vector comprende una pluralidad de casetes de transcripción colocados en tándem, teniendo cada casete la región de control y la región codificante de la presente invención. Se cree que tal vector digénico o vector multigénico proporciona mejor expresión que un vector de expresión dicistrónico o multicistrónico. Esta es una mejora sorprendente sobre la expresión dicistrónica o multicistrónica que no se cree que esté sugerida en la técnica antecedente.

10 Adicionalmente, el vector puede de forma opcional comprender ácidos nucleicos que codifican un péptido represor que reprime operadores asociados con uno o más de los promotores en la región de control, una región terminadora de la transcripción, una región de marcador de selección y/o una región que codifica al menos un péptido potenciador de la secreción. De forma alternativa, en algunas realizaciones, pueden estar presentes ácidos nucleicos que codifican un péptido represor y un péptido potenciador de la secreción, en un vector separado que se coexpresa en la misma célula hospedadora que el vector que expresa el producto peptídico.

15 Se pueden utilizar muchos vectores disponibles de forma comercial como vectores iniciales para los vectores preferentes de la invención. Algunas de las regiones preferentes de los vectores de la invención pueden estar ya incluidas en el vector de partida, de forma que el número de modificaciones necesarias para obtener el vector de la invención sea relativamente modesto.

La región de control

25 La región de control está unida operativamente a la región codificante y comprende una pluralidad de promotores y al menos un sitio de unión de ribosoma, en la que al menos uno de los promotores se selecciona del grupo que consiste en lac y tac. La anterior combinación de promotores en una única región de control aumenta de forma significativa el rendimiento del producto peptídico que produce la región codificante (como se describe con más detalle en el presente documento). Se conocen otros promotores en la técnica, y se pueden utilizar en combinación con un promotor tac o lac. Tales promotores incluyen, pero sin limitación, lpp, ara B, trpE, gal K.

30 Preferentemente, la región de control comprende exactamente dos promotores. Cuando uno de los promotores es tac, es preferente que el promotor tac esté 5' de otro promotor en la región de control. Cuando uno de los promotores es lac, el promotor lac está preferentemente 3' de otro promotor en la región de control. También preferente, la región de control comprende un promotor tac y un promotor lac, estando preferentemente el promotor lac 3' del promotor tac.

La región codificante

40 La región codificante comprende ácidos nucleicos que codifican un producto peptídico de interés acoplado en marco de lectura río debajo de los ácidos nucleicos que codifican un péptido señal, por lo cual la región codificante codifica un péptido que comprende, respectivamente, desde el extremo N al extremo C la señal y el producto peptídico. Sin pretender ligarse a teoría alguna, se cree que la señal puede proporcionar alguna protección al producto peptídico de la degradación proteolítica además de participar en su secreción al periplasma.

45 Se conocen muchas secuencias péptido señal, y se pueden usar de acuerdo con la invención. Estas incluyen secuencias señal de proteínas de membrana externa de células hospedadoras bien caracterizadas, y cualquiera de las secuencias capaces de traslocar el producto peptídico al periplasma y de que el hospedador las escinda de forma postraduccional como resultado de la translocación. Los péptidos señal útiles incluyen, pero sin limitación, Omp A, pel B, Omp C, Omp F, Omp T, β -la, Pho A, Pho S y Staph A.

50 Preferentemente, el producto peptídico es suficientemente pequeño como para que usualmente necesite un compañero de fusión que utilice tecnología de la anterior técnica. Normalmente, el producto peptídico tiene un peso molecular de menos de 10 KDa. Más preferentemente, el producto peptídico tiene una glicina C-terminal, y se utiliza como un precursor de una reacción de amidación enzimática que convierte la glicina C-terminal en un grupo amino, dando como resultado un péptido amidado. Tal conversión se describe con más detalle posteriormente. Numerosos hormonas peptídicas y neurotransmisores biológicamente importantes son péptidos amidados de este tipo.

60 También podrían producirse análogos de hormona paratiroidea de acuerdo con la invención. Por ejemplo, un péptido que tenga los primeros 34 aminoácidos de la hormona paratiroidea puede proporcionar una función semejante a la de la propia hormona paratiroidea, como podría una versión amidada del análogo de 34 aminoácidos. Lo último se puede producir mediante la expresión de los primeros 34 aminoácidos de la hormona paratiroidea, seguidos de glicina-35, de acuerdo con uno o más de los sistemas de expresión y métodos descritos en el presente documento. Después, la amidación enzimática según se divulga en el presente documento podría convertir la glicina a un grupo amino.

65 Otros aspectos opcionales de un vector preferente de la invención o de otros vectores a expresar en el mismo

hospedador que el vector de la invención

Represor

- 5 De forma opcional, el vector preferente puede contener ácidos nucleicos que codifican un péptido represor capaz de reprimir la expresión que controla al menos uno de los promotores. De forma alternativa, sin embargo, los ácidos nucleicos que codifican un péptido represor pueden estar presentes en un vector separado en una célula hospedadora con el vector de la presente invención. Se conocen en la técnica represores apropiados para un gran número de operadores. Preferentemente, los ácidos nucleicos que codifican el represor codifican un represor lac en realizaciones preferentes de la invención debido a que reprime el operador lac que está incluido con los promotores tac y lac, al menos uno de cuyos promotores está siempre presente en los vectores preferentes de la invención.

Marcador de selección

- 15 Es preferente que cualquiera de un gran número de genes de marcadores de selección (por ejemplo, un gen que codifica la resistencia a kanamicina) esté presente en el vector. Esto permitirá la selección específica apropiada de las células hospedadoras transformadas o transfectadas de forma eficaz con el vector nuevo de la invención.

Péptido potenciador de la secreción

- 20 De forma opcional están presentes en el vector de la presente invención ácidos nucleicos que codifican al menos un péptido potenciador de la secreción. De forma alternativa, los ácidos nucleicos que codifican un péptido potenciador de la secreción pueden estar presentes en un vector separado que se expresa en la misma célula hospedadora que el vector que codifica el producto peptídico. Preferentemente, el péptido potenciador de la secreción se selecciona del grupo que consiste en SecY (prlA) o prlA-4. Se indica que SecY y prlA son idénticos, siendo los dos términos utilizados como sinónimos en la técnica. prlA-4 es una modificación conocida de prlA y tiene una función semejante. Otro péptido potenciador de la secreción preferente es SecE, también conocido como "prlG", un término utilizado como un sinónimo de "SecE". Muy preferentemente, está codificada una pluralidad de péptidos potenciadores de la secreción, de los que al menos uno es SecE y el otro se selecciona del grupo que consiste en SecY (prlA) y prlA-4. Se cree que los dos interactúan para ayudar a la translocación del producto peptídico del citoplasma al periplasma. Sin pretender ligarse a teoría alguna, estos péptidos potenciadores de la secreción pueden ayudar a proteger al producto peptídico de las proteasas citoplásmicas, además de sus funciones potenciadoras de la secreción.

- 35 La amidación de péptidos y proteínas, preferentemente en el extremo C, proporciona un aumento significativo de la biodisponibilidad oral según se demuestra a continuación en el presente documento. La técnica anterior indica que la amidación natural de péptidos biológicamente activos puede aumentar la unión a receptor y mejorar la estabilidad de estos péptidos (Eipper *et al.*, Annu. Rev. Neurosci., 15:57-85, 1992; Merkler, Enzyme Micob. Technol., 16:450-456, en particular la página 51,1994). El aumento significativo de la biodisponibilidad que proporciona la amidación de estos péptidos era inesperada, debido a que el conocimiento actual establece que los determinantes principales de la biodisponibilidad oral de péptidos y proteínas son el tamaño, la estructura secundaria y terciaria, y la carga de las moléculas.

- 45 Normalmente, la membrana plasmática de las células eucariotas es impermeable a péptidos y proteínas grandes. Sin embargo, ciertos restos hidrofóbicos, tales como secuencias de aminoácidos, ácidos grasos, y ácidos biliares llamados de forma diversa péptidos transbordadores o secuencias o restos translocadores de membrana, cuando se fusionan con las proteínas o péptidos funcionales, en particular en el extremo N o C, pueden actuar como translocadores de membrana, y mediar el transporte de estas proteínas hacia el interior de células vivas. Para el fin de la presente invención una proteasa del sistema circulatorio o del linfático es capaz de escindir, al menos parcialmente, estos translocadores de membrana (TM).

- 50 De acuerdo con otro aspecto de la invención, la presencia de al menos un translocador de membrana (TM), preferentemente de dos TM, más preferentemente de dos TM peptídicos, potenciaría la permeabilidad de membrana del péptido fusionado al/los TM a través de la luz del intestino, y proporcionaría una biodisponibilidad mejorada. Debido a que una enzima del sistema circulatorio o del linfático puede escindir al TM unido al péptido activo, esto deja al péptido activo libre para alcanzar su diana.

- 60 También, de acuerdo con la invención, la degradación proteolítica del péptido y del translocador de membrana mediante enzimas del estómago (la mayoría de las cuales está activa en el intervalo de pH ácido) y de proteasas del intestino o del páncreas (la mayoría de las cuales está activa en el intervalo de pH neutro o básico) está reducida.

- 65 De nuevo, sin pretender ligarse teoría alguna, parece que, de acuerdo con la presente invención, el péptido se transporta a través del estómago bajo la protección de un vehículo protector apropiado resistente a ácido para evitar de forma sustancial el contacto entre el péptido activo y cualquiera de las proteasas del estómago capaces de degradarlo. Una vez que la composición farmacéutica de la invención pasa a través del estómago y entra en la región intestinal donde predomina el pH básico a neutro, y donde las proteasas tienden a tener un óptimo de pH básico a neutro, el revestimiento entérico u otro vehículo libera el péptido y los inhibidores de ácido o de proteasa

(en estrecha proximidad uno del otro).

Se cree que el ácido reduce el pH local intestinal (donde el agente activo se ha liberado) a niveles por debajo del intervalo óptimo para muchas proteasas del intestino y para otras enzimas del intestino. Esta disminución del pH reduce la actividad proteolítica de las proteasas del intestino, proporcionando así protección de la degradación potencial al péptido y al translocador de membrana. La actividad de estas proteasas se disminuye mediante el ambiente temporalmente ácido proporcionado por la invención. Es preferente que se proporcione suficiente ácido para que el pH local intestinal se reduzca de forma temporal a 5,5 o por debajo, preferentemente a 4,7 o por debajo y más preferentemente a 3,5 o por debajo. La prueba del bicarbonato de sodio descrita a continuación (en la sección titulada "el agente reductor del pH") es indicativa de la cantidad de ácido necesaria. Preferentemente, las condiciones de pH intestinal reducido persisten durante un período de tiempo suficiente para proteger al agente peptídico y al translocador de membrana de la degradación proteolítica hasta que al menos alguno de los agentes peptídicos haya tenido la oportunidad de atravesar la pared intestinal hacia el torrente sanguíneo.

Se cree que los inhibidores de proteasas reducen la actividad proteolítica de las proteasas del intestino, proporcionando así protección de la degradación potencial prematura al péptido y al translocador de membrana.

Las composiciones de la presente invención contienen potenciadores de la absorción. Los potenciadores de la absorción de la invención promueven de forma sinérgica la absorción del péptido hacia la sangre mientras predominen las condiciones de actividad proteolítica reducida.

El mecanismo mediante el cual la invención se cree que lleva a cabo el objetivo de la disponibilidad potenciada, está asistido por liberación conjunta, lo más simultáneamente posible, de los componentes activos de la composición farmacéutica. Con este fin, es preferente mantener el volumen del revestimiento entérico lo más bajo posible, consecuente con proporcionar protección de las proteasas del estómago. Por lo tanto, es menos probable que el revestimiento entérico interfiera con la liberación del péptido, o con la liberación de otros componentes en proximidad temporal estrecha con el péptido. Normalmente, el revestimiento entérico debería añadir menos del 30 % al peso del resto de la composición farmacéutica (es decir, los otros componentes de la composición excluyendo el revestimiento entérico). Preferentemente, menos del 20 % y, más preferentemente, el revestimiento entérico añade entre el 10 % y el 20 % al peso de los ingredientes no recubiertos.

El potenciador de la absorción, que es un agente tensioactivo y puede ser un potenciador de la solubilidad y/o un potenciador del transporte (según se describe con más detalle a continuación) ayuda al transporte del agente peptídico del intestino a la sangre, y puede promover el proceso de tal forma que, mejor, se produzca durante el período de tiempo de pH intestinal reducido y de actividad proteolítica intestinal reducida. Muchos agentes tensioactivos pueden actuar como potenciadores de la solubilidad y como potenciadores del transporte (captación). Otras vez, sin pretender ligarse a una teoría dada, se cree que potenciar la solubilidad proporciona (1) una liberación más simultánea de los componentes activos de la invención en la porción acuosa del intestino, (2) mejor solubilidad del péptido en, y mejor transporte a través de, una capa mucosa a lo largo de las paredes intestinales. Una vez que el principio activo peptídico alcanza las paredes intestinales, un potenciador de la captación proporciona mejor transporte a través de la membrana del borde en cepillo del intestino hacia la sangre, a través de transporte transcelular o paracelular. Como se discute con más detalle a continuación, muchos compuestos preferentes pueden proporcionar ambas funciones. En esos casos, realizaciones preferentes que utilizan las dos funciones pueden hacer eso mediante la adición a la composición farmacéutica de solo un compuesto adicional. En otras realizaciones, potenciadores de la absorción separados pueden proporcionar las dos funciones de forma separada.

Cada uno de los ingredientes preferentes de la composición farmacéutica de la invención se discute de forma separada a continuación. Se pueden utilizar combinaciones de múltiples agentes reductores del pH o de múltiples potenciadores, así como utilizar solo un único agente reductor del pH y/o un único potenciador. Algunas combinaciones preferentes se discuten a continuación.

Principios activos peptídicos

Los principios activos peptídicos que se pueden beneficiar de la administración 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, y un sitio que se pueda amidar. La amidación del péptido se puede lograr por medios químicos o enzimáticos, o por una combinación de ambos. Un método preferente de amidación es mediante la acción de la monooxigenasa amidante de peptidilglicina.

Preferentemente, el péptido se extiende mediante una glicina en el extremo C-terminal cuando se produce mediante tecnología recombinante y el extremo C se amida mediante reacción enzimática. De forma alternativa, también se pueden amidar mediante reacción química cadenas laterales de aminoácidos adecuadas para amidación.

También, preferentemente, estos principios activos peptídicos están unidos a una secuencia de TM para facilitar su absorción del intestino. Antes de su absorción, el TM debe estar protegido de la escisión mediante proteasas en el estómago y en el intestino. Sin embargo, una vez absorbido, las proteasas deberían ser capaces de eliminar el TM,

al menos de forma parcial, para liberar el péptido activo.

El TM puede comprender una secuencia de aminoácidos, preferentemente un péptido señal o secuencia señal. Un "péptido señal", según se usa en el presente documento, es una secuencia de aminoácidos en general, pero no necesariamente, de una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 o más restos de aminoácidos, muchos residuos de los cuales (normalmente aproximadamente el 55-60 %) son hidrófobos, de tal manera que tienen una porción liposoluble hidrófoba. La porción hidrófoba es un motivo principal común del péptido señal, y con frecuencia es una parte central del péptido señal de las proteínas secretadas de la célula. Un péptido señal es una secuencia de aminoácidos que facilita la exportación de proteínas citoplasmáticas. Los péptidos señales de esta invención, como se descubre en el presente documento, también son "competentes para importación", es decir, capaces de penetrar a través de la membrana celular desde el exterior de la célula al interior de la célula. Los restos de aminoácidos se pueden mutar y/o modificar (es decir, para formar miméticos) siempre que las modificaciones no afecten a la función de mediación de la translocación del péptido. Por lo tanto, la palabra "péptido" incluye miméticos y la apalabra "aminoácido" incluye aminoácidos modificados, según se usa en el presente documento aminoácidos atípicos, y aminoácidos de forma D. Todos los péptidos señal competentes para importación que esta invención abarca tienen la función de mediar la translocación a través de una membrana celular desde el exterior de la célula al interior de la célula. También pueden conservar su capacidad de permitir la exportación de una proteína desde la célula hacia el entorno externo. Un supuesto péptido señal puede fácilmente probarse para esta actividad de importación siguiendo los contenidos proporcionados en el presente documento, incluyendo la prueba de la especificidad por cualquier tipo celular seleccionado.

La siguiente Tabla 1 ejemplifica secuencias de aminoácidos, cada una de las cuales se puede utilizar como un TM.

Tabla 1 - Secuencias de aminoácidos de algunos péptidos TM y sus fuentes.

SECUENCIA	DERIVACIÓN DE LA SECUENCIA	FUENTE
ALA-ALA-VAL-ALA-LEU-LEU-PRO-ALA-VAL-LEU-LEU-ALA-LEU-LEU-ALA-PRO-VAL-ASN-ARG-LYS-ARG-ASN-LYS-LEU-MET-PRO (SEC ID N°: 3)	Péptido señal del factor de crecimiento del fibroblasto de Kaposi	Patente de Estados Unidos 5.807.746
TYR-GLY-ARG-LYS-LYS-ARG-ARG-GLN-ARG-ARG-ARG (SEC ID N°: 4)	Dominio de transducción de proteína de la proteína TAT de VIH	Schwarz <i>et al.</i> (1999), Science 285:1569
VAL-THR-VAL-LEU-ALA-LEU-GLY-ALA-LEU-ALA-GLY-VAL-GLY-VAL-GLY (SEC ID N°: 5)	Secuencia señal de la integrina β_3 humana	Zhang <i>et al.</i> (1988) PNAS 95:9184
Proteína de 38 kDa	Proteína VP22-HSV	Phelan <i>et al.</i> (1998), Nature Biotechnology 16:440
ALA-ALA-VAL-LEU-LEU-PRO-VAL-LEU-LEU-ALA-ALA-PRO (SEC ID N°: 6)	Modificado a partir de la región hidrófoba de 16 restos de la secuencia señal del factor de crecimiento del fibroblasto de Kaposi	Rojas <i>et al.</i> (1998) Nature Biotechnology 16:370

El TM también puede comprender ácidos grasos y/o ácidos biliares. Tales moléculas, cuando se utilizan, están unidas al péptido activo mediante un puente de aminoácidos que se somete a escisión mediante proteasas en el plasma. De forma alternativa, el TM puede estar unido al péptido activo mediante una unión que no sea peptídica, en cuyo caso la enzima *in vivo* que escinde la unión puede ser una enzima que no sea proteasa. El puente de aminoácidos debe ser una diana para escisión de al menos una proteasa plasmática. Las proteasas plasmáticas, así como sus secuencias diana, son bien conocidas en la técnica. La Tabla 2 ilustra algunas de estas enzimas así como sus dianas específicas.

Tabla 2 - Proteasas plasmáticas y sus dianas específicas

PROTEASA	DIANA ESPECIFICA	OBSERVACIONES
Caspasa-1	Tyr-Val-Ala-Asp- Xaa * (SEC ID N°: 7)	
Caspasa-3	Asp- Xaa -Xaa-Asp- Xaa (SEC ID N°: 8)	
Proteína convertasa 1	Arg-(Xaa) _n -Arg- Xaa (SEC ID N°: 9)	n=2, 4 o 6
	Lys-(Xaa) _n -Arg- Xaa (SEC ID N°: 10)	n=2, 4, o 6
	Arg-Arg- Xaa	
	Lys-Arg- Xaa	
Proteína convertasa 2	Lo mismo que proteína convertasa 1	
Proteína convertasa 4	Gly-Arg-Thr-Lys-Arg- Xaa (SEC ID NO:11)	
Proteína convertasa 4 PACE 4	Arg-Val-Arg-Arg- Xaa (SEC ID N°: 12)	

	Decanoil-Arg-Val-Arg-Arg- Xaa (SEC ID N°:13)	
Oligopeptidasa de prolilo	Pro-Xaa	
Enzima escindidora de endotelina seguida de dipeptidil-peptidasa IV	Trp- Val-Pro -Xaa (SEC ID N°: 14) Trp- Val-Ala -Xaa (SEC ID N°: 15)	
Peptidasa señal		Depende del aminoácido cercano
Neprilisina seguida de dipeptidil-peptidasa IV	Xaa- Phe-Xaa -Xaa (SEC ID N°: 16)	Especificidad amplia, longitud máx = 40 aminoácidos
	Xaa- Tyr-Xaa -Xaa (SEC ID N°: 17)	
	Xaa- Trp-Xaa -Xaa (SEC ID N°: 18)	
Renina seguida de dipeptidil-peptidasa IV	Asp-Arg-Tyr-Ile-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser (SEC ID N°: 19)	sustituir Pro o Ala por Val y Ser
* El lado N-terminal de los aminoácidos en negrita para la escisión de la proteasa.		

La invención suprime mediante varios mecanismos la degradación del principio activo mediante la proteasa, que de otra forma tendería a escindir uno o más de los enlaces peptídicos del principio activo.

- 5 Los agentes activos peptídicos deberían estar presentes a concentraciones mayores o menores dependiendo de las concentraciones sanguíneas diana deseadas para el compuesto activo y de su biodisponibilidad en el sistema de administración oral de la invención.

10 Se pueden producir precursores de agentes activos peptídicos amidados mediante síntesis químicas o recombinantes conocidas en la técnica. Se cree que la producción recombinante es significativamente más rentable. Las reacciones de amidación se conocen en la técnica. Por ejemplo, se describe la amidación enzimática en la patente de Estados Unidos 4.708.934 y en las publicaciones de patente europea 0 308 067 y 0 382 403. Tal producción recombinante se discute en *Biotechnology*, Vol. 11 (1993) página 64-70, la que describe adicionalmente una conversión de un precursor a un producto amidado.

15 Cuando se une un TM a un principio activo peptídico de la invención, esto se puede llevar a cabo por síntesis químicas o recombinantes conocidas en la técnica. Según se usa en el presente documento, por "unir" se entiende que el péptido biológicamente activo está asociado con el TM de tal manera que cuando el TM atraviesa la membrana celular, el péptido activo también es importado a través de la membrana celular. Ejemplos de tales medios de unión incluyen (A) unir el TM al péptido activo mediante un enlace peptídico, es decir, los dos péptidos (la parte peptídica del TM y el péptido activo) se pueden sintetizar de forma contigua; (B) unir el TM al péptido activo mediante un enlace covalente no peptídico (tal como conjugar un péptido señal a una proteína con un reactivo entrelazante); (C) se pueden emplear métodos de ligación química para crear un enlace covalente entre el aminoácido carboxilo terminal de un TM, tal como un péptido señal, y el péptido activo.

20 Se muestran a continuación ejemplos de método (A), en los que un péptido se sintetiza, mediante medios convencionales conocidos en la técnica (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154, 1963; y Lin *et al.*, *Biochemistry* 27:5640-5645, 1988) y contiene, en orden lineal desde el extremo amino-terminal, una secuencia de péptido señal (el TM), una secuencia de aminoácidos que se puede escindir mediante una proteasa plasmática, y una secuencia de aminoácidos biológicamente activa. Tal péptido podría también producirse a través de técnicas de ADN recombinante, expresado a partir de una construcción recombinante que codifique los anteriormente descritos aminoácidos para crear el péptido (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

35 Para el método (B), se puede utilizar un enlace peptídico, como anteriormente, o se puede utilizar un enlace covalente no peptídico para unir el TM con el péptido, el polipéptido o la proteína biológicamente activo. Se puede formar este enlace covalente no peptídico mediante métodos convencionales en la técnica, tal como mediante conjugación del TM al péptido, el polipéptido o la proteína a través de un reactivo entrelazante, por ejemplo, glutaraldehído. Tales métodos son convencionales en la técnica. (Walter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5197; 1980).

40 Para el método (C), se pueden utilizar métodos de ligación química convencionales, tal como el uso de entrelazantes químicos que interactúan con el aminoácido carboxilo terminal de un péptido señal. Tales métodos son convencionales en la técnica (Goodfriend *et al.*, *Science* 143:1344; 1964, que utiliza carbodiimida soluble en agua como reactivo ligante) y se pueden realizar fácilmente para unir el extremo carboxilo terminal del péptido señal a cualquier molécula biológicamente activa seleccionada.

50 La producción de calcitonina de salmón recombinante (CTsr) puede proceder, por ejemplo, mediante la producción del precursor de la calcitonina de salmón extendido con glicina en *E. coli* como una proteína de fusión soluble con la glutatión-S-transferasa. El precursor extendido con glicina tiene una estructura molecular que es idéntica a la

calcitonina de salmón activa, excepto en el C-terminal (donde la calcitonina de salmón acaba -pro-NH₂, mientras que el precursor acaba -pro-gly). Una enzima α -amidante descrita en las publicaciones anteriores cataliza la conversión de los precursores a calcitonina de salmón. Preferentemente, la enzima se produce de forma recombinante, por ejemplo, en células de ovario de hámster chino (CHO) según se describe en el artículo de Biotechnology citado anteriormente. Se pueden producir de forma semejante otros precursores de otros péptidos amidados.

También se pueden producir de manera semejante péptidos que no están amidados de forma natural, y se pueden amidar de una forma semejante de acuerdo con la invención.

10 El agente reductor del pH y el inhibidor de proteasa

La cantidad total del compuesto reductor del pH a administrarse debería estar preferentemente en una cantidad que, cuando se libera en el intestino, es suficiente para disminuir el pH local intestinal de forma sustancial por debajo del pH óptimo para las proteasas encontradas allí. De forma necesaria la cantidad necesaria variará con diversos factores incluyendo el tipo de agente reductor del pH utilizado (discutido posteriormente) y los equivalentes de protones proporcionados por un dado agente reductor del pH. En la práctica, la cantidad necesaria para proporcionar buena biodisponibilidad es una cantidad que, cuando se añade a una solución de 10 mililitros de bicarbonato de sodio 0,1M, reduce el pH de esa solución de bicarbonato de sodio hasta no más de 5,5, y preferentemente no más de 4,7, muy preferentemente no más de 3,5. En la anterior prueba puede usarse suficiente ácido para reducir en algunas realizaciones el pH a 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 de pH donde dos o más de tales agentes se usan en combinación. La formulación oral no debería incluir una cantidad de cualquier base que, cuando se libera junto con el compuesto reductor del pH, evitaría la caída del pH de la prueba de bicarbonato de sodio anteriormente descrita a 5,5 o por debajo.

El agente reductor del pH de la invención puede ser cualquier compuesto farmacéuticamente aceptable que no sea tóxico en el tracto gastrointestinal y es capaz de administrar iones hidrógeno (un ácido tradicional) o de inducir mayor contenido de ion hidrógeno a partir del ambiente local. También puede ser cualquier combinación de tales compuestos. Es preferente que al menos un agente reductor del pH utilizado en la invención tenga un pKa no mayor de 4,2, y preferentemente no mayor de 3,0. También es preferente que el agente reductor del pH tenga una solubilidad en agua de al menos 30 gramos por 100 mililitros de agua a temperatura ambiente.

Los ejemplos de compuestos que inducen mayor contenido de ion hidrógeno incluyen cloruro de aluminio y cloruro de zinc. Los ácidos tradicionales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, sales de ácido de aminoácidos (por ejemplo, clorhidratos de aminoácidos) o derivados de las mismas. Ejemplos de estas sales de ácido de ácido acetilglutámico, alanina, arginina, asparragina, ácido aspártico, betaína, carnitina, carnosina, citrulina, creatinina, ácido glutámico, glicina, histidina, hidroxilisina, hidroxiprolina, hipotaurina, isoleucina, leucina, lisina, metilhistidina, norleucina, ornitina, fenilalanina, prolina, sarcosina, serina, taurina, treonina, triptofano, tirosina y valina.

Otros ejemplos de compuestos reductores del pH útiles incluyen ácidos carboxílicos tales como acetilsalicílico, acético, ascórbico, cítrico, fumárico, glucurónico, glutárico, glicérico, glicocólico, glioxílico, isocítrico, isovalérico, láctico, maleico, oxaloacético, oxalosuccínico, propiónico, pirúvico, succínico, tartárico, y valérico.

Otros agentes reductores del pH útiles, que usualmente podrían no ser llamados "ácidos" en la técnica, pero que sin embargo pueden ser útiles de acuerdo con la invención son ésteres de fosfato (por ejemplo, fructosa 1,6 difosfato, glucosa 1,6 difosfato, ácido fosfoglicérico, y ácido difosfoglicérico). También se pueden usar para reducir el pH CARBOPOL® (Trademark BF Goodrich) y polímeros tales como policarbófilo.

En la prueba de bicarbonato de sodio discutida anteriormente se puede utilizar cualquier combinación de agente reductor del pH que logre el nivel de pH necesario de no más de 5,5. Una realización preferente utiliza, como al menos uno de los agentes reductores del pH de la composición farmacéutica, un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido tartárico y una sal ácida de un aminoácido.

Un suplemento al uso de agentes reductores del pH es el uso de inhibidores de proteasa, en particular inhibidores de proteasas del intestino. La Tabla 3 a continuación ilustra algunas de las proteasas del intestino conocidas.

Tabla 3 - Proteasas del intestino y sus dianas específicas

PROTEASA	SITIO DIANA	pH ÓPTIMO	OBSERVACIONES
Tripsina	Lys-Xaa	8	
	Arg-Xaa		
Quimotripsina	Tyr-Xaa	7,0 - 9,0	
	Phe-Xaa		
	Trp-Xaa		

Elastasa	Ala-Xaa	8,8	
	Val-Xaa		
	Leu-Xaa		
	Ile-Xaa		
	Gly-Xaa		
	Ser-Xaa		
Calicreína	Arg-Xaa	7,0 - 8,0	
	Phe-Arg-Xaa		preferente
	Leu-Arg-Xaa		preferente
Carboxipeptidasa	Xaa-Xaa	7,0 - 9,0	desde C-terminal

El potenciador de la absorción

5 Los potenciadores de la absorción están preferentemente presentes en una cantidad que constituye desde el 0,1 al 20,0 por ciento por peso, con respecto al peso global de la composición farmacéutica (exclusiva del revestimiento entérico). Los potenciadores de la absorción preferentes son agentes tensioactivos que actúan como potenciadores de la solubilidad y como potenciadores de la captación. Hablando de forma genérica, los "potenciadores de la solubilidad" mejoran la capacidad de los componentes de la invención de solubilizarse en el ambiente acuoso en el que originalmente se liberan o en el ambiente lipófilo de la capa mucosa que recubre las paredes intestinales, o en ambos. Los "potenciadores del transporte (captación)" (los que de forma frecuente son los mismos agentes tensioactivos utilizados como potenciadores de la solubilidad) son los que posibilitan la facilidad con la que los agentes peptídicos atraviesan la pared intestinal.

15 Dentro del alcance de la invención, uno o más potenciadores de la absorción pueden realizar solo una función (por ejemplo, solubilidad), o uno o más potenciadores de la absorción pueden realizar solo la otra función (por ejemplo, captación). También es posible tener una mezcla de varios compuestos, algunos de los cuales proporcionan solubilidad mejorada, algunos de los cuales proporcionan captación mejorada y/o algunos de los cuales realizan ambas. Sin pretender ligarse a teoría alguna, se cree que los potenciadores de la captación pueden actuar por (1) el aumento del desorden de la región hidrófoba de la membrana exterior de las células intestinales, permitiendo el aumento del transporte transcelular; o (2) filtrando proteínas de membrana dando como resultado un aumento del transporte transcelular; o (3) ensanchando radios de los poros entre células para un transportes paracelular aumentado.

25 Se cree que los agentes tensioactivos son útiles como potenciadores de la solubilidad y como potenciadores de la captación. Por ejemplo, los detergentes son útiles en (1) la solubilización de todos los componentes activos de forma rápida en el ambiente acuoso donde se liberan originalmente, (2) la potenciación de la lipofilidad de los componentes de la invención, especialmente del agente activo peptídico, ayudando a su pasaje hacia y a través de la mucosa intestinal, (3) la potenciación de la capacidad del agente activo peptídico, normalmente polar, para atravesar la barrera epitelial de la membrana del borde en cepillo; y (4) el aumento del transporte transcelular o paracelular según se describe anteriormente.

35 Para los agentes tensioactivos utilizados como los potenciadores de la absorción, es preferente que estos sean polvos sueltos para facilitar la mezcla y la carga de las cápsulas durante el procedimiento de fabricación. Debido a las características inherentes de los péptidos (por ejemplo, su punto isoeléctrico, peso molecular, composición de aminoácidos, etc.) ciertos agentes tensioactivos interactúan mejor con ciertos péptidos. De hecho, algunos pueden actuar de forma no deseada con las porciones cargadas y evitar la absorción, dando como resultado así una disminución no deseada de la biodisponibilidad. Es preferente, cuando se intenta aumentar la biodisponibilidad de los péptidos, que cualquier agente activo usado como un potenciador de la absorción se seleccione del grupo que consiste en (i) agentes tensioactivos aniónicos que son derivados del colesterol (por ejemplo, ácidos biliares), (ii) agentes de superficie catiónicos (por ejemplo, acilcarnitinas, fosfolípidos), (iii) agentes tensioactivos no iónicos, y (iv) mezclas de agentes tensioactivos aniónicos (especialmente los que tienen regiones lineales de hidrocarburos) junto con neutralizadores de cargas negativas. Los neutralizadores de cargas negativas incluyen, pero sin limitación, acilcarnitinas y cloruro de cetilpiridinio. También es preferente que el potenciador de la absorción sea soluble a pH ácido, en particular en el intervalo de 3,0 a 5,0.

45 Una combinación especialmente preferente que ha funcionado bien con calcitonina de salmón mezcla agentes tensioactivos catiónicos con agentes tensioactivos aniónicos que son derivados del colesterol, que son los dos solubles a pH ácido.

50 Una combinación particularmente preferente es un ácido biliar soluble en ácido junto con un agente tensioactivo catiónico. Una acilcarnitina y un éster de sacarosa es una buena combinación. Cuando un potenciador de la absorción particular se utiliza solo, es preferente que sea un agente tensioactivo catiónico. Las acilcarnitinas, (por ejemplo, lauroilcarnitina), los fosfolípidos y los ácidos biliares son potenciadores de la absorción particularmente buenos, especialmente la acilcarnitina. También se utilizan en algunas realizaciones surfactantes aniónicos que son

derivados de colesterol. Es la intención de estas preferencias evitar interacciones con el agente peptídico que interfieran con la absorción del agente peptídico en la sangre.

5 Para reducir la probabilidad de efectos secundarios, los detergentes preferentes, cuando se utilizan 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 para potenciar el transporte paracelular.

10 Los potenciadores de la absorción preferentes incluyen: (a) salicilatos tales como salicilato de sodio, 3-metoxisalicilato, 5-metoxisalicilato y homovanilato; (b) ácidos biliares tales como taurocólico, taurodeoxicólico, deoxicólico, cólico, glicólico, litocolato, quenodesoxicólico, ursodesoxicólico, ursocólico, dehidrocólico, fusídico, etc.; (c) surfactantes no iónicos tales como éteres de polioxietileno (por ejemplo, Brij 36T, Brij 52, Brij 56, Brij 76, Brij 96, Texaphor A6, Texaphor A14, Texaphor A60 etc.), p-t-octil fenol polioxietilenos (Tritón X-45, Tritón X-100, Tritón X-114, Tritón X-305 etc.) nonilfenoxi polixietilenos (por ejemplo, serie Igepal CO), ésteres de polioxietileno de sorbitano (por ejemplo, Tween-20, Tween-80 etc.); (d) surfactantes aniónicos tales como sulfosuccinato de dioctilo y sodio; (e) lisofosfolípidos tales como lisolecitina y lisofosfatidiletanolamina; (f) acilcarnitinas, acilcolinas y acil-aminoácidos tales como lauroilcarnitina, miristoilcarnitina, palmitoilcarnitina, lauroilcolina, miristoilcolina, palmitoilcolina, hexadecil lisina, N-acilfenilalanina, N-acilglicina etc.;

20 g) fosfolípidos solubles en agua; (h) glicéridos de cadena media que son mezclas de mono, di, y triglicéridos que contienen ácidos grasos de longitud de cadena media (ácidos caprílico, cáprico y laúrico); (i) ácido etilendiamintetracético; (j) surfactantes catiónicos tales como cloruro de cetilpiridinio; (k) derivados de ácidos grasos de polietilenglicol tales como Labrasol, Labrafac, etc.; y (l) alquilsacáridos tales como lauril maltósido, lauroil sacarosa, miristoil sacarosa, palmitoil sacarosa, etc.

25 En algunas realizaciones preferentes, y sin pretender ligarse a teoría alguna, se incluyen agentes de intercambio iónico catiónicos (por ejemplo, detergentes) para proporcionar potenciación de la solubilidad mediante otro mecanismo posible. En particular, estos evitan la unión de la calcitonina de salmón u otros agentes activo peptídicos a la mucosa. Los agentes de intercambio iónico catiónicos preferentes incluyen cloruro de protamina o cualquier otro polication. 30

Otros ingredientes opcionales

35 Es preferente que una barrera soluble en agua separe los inhibidores de proteasa y/o los agentes reductores de pH de los vehículos protectores resistentes a ácido. Con el fin de proporcionar esta barrera se puede utilizar una cápsula farmacéutica convencional. Se conocen en la técnica muchas barreras solubles en agua e incluyen, pero sin limitación, hidroxipropil metilcelulosa y gelatinas farmacéuticas convencionales.

40 En algunas realizaciones preferentes, se incluye otro péptido (tal como albúmina, caseína, proteína de soja, otras proteínas animales o vegetales) para reducir la absorción no específica (por ejemplo, unión del péptido a la barrera de la mucosa intestinal), reduciendo de este modo la concentración necesaria del caro agente activo peptídico. Cuando se añade, el péptido está preferentemente del 1,0 al 10,0 por ciento por peso con respecto al peso de la composición farmacéutica global (excluyendo el vehículo protector). Preferentemente, este segundo péptido no es fisiológicamente activo y es muy preferentemente un péptido alimentario tal como péptido de semilla de soja. Sin pretender ligarse a teoría alguna, este segundo péptido puede también aumentar la biodisponibilidad actuando como un eliminador de proteasa que, de forma deseable, compite con el agente activo peptídico por la interacción con la proteasa. El segundo péptido también puede ayudar en el pasaje del compuesto activo a través del hígado.

50 De forma opcional, todas las composiciones farmacéuticas de la invención pueden también incluir diluyentes farmacéuticos comunes, antiapelmazantes, lubricantes, cápsulas de gelatina, conservantes y colorantes en sus tamaños y cantidades conocidos usuales.

El vehículo protector

55 Es adecuado cualquier transportador o vehículo que proteja al agente peptídico de las proteasas del estómago y después se disuelva, de tal manera que los otros ingredientes de la invención se puedan liberar en el intestino. Se conocen en la técnica muchos de tales revestimientos entéricos, y son útiles de acuerdo con la invención. Los ejemplos incluyen acetato de celulosa ftalato, hidroxipropil metilcelulosa succinato, hidroxipropil metilcelulosa ftalato, carboxil metilcelulosa, y copolímero de ácido metacrílico-metil metacrilato. En algunas realizaciones, el péptido activo, los potenciadores de la absorción tales como potenciador/potenciadores de la solubilidad y/o la captación, y compuesto/compuestos reductor/reductores del pH, se incluyen en un jarabe protector suficientemente viscoso para permitir el pasaje protegido de los componentes de la invención a través del estómago.

65 Los revestimientos entéricos adecuados para proteger al agente peptídico de las proteasas del estómago se pueden aplicar, por ejemplo, a cápsulas después de haber cargado los restantes componentes de la invención dentro de la cápsula. En otras realizaciones, el revestimiento entérico se recubre en el exterior de un comprimido o se recubre en

la superficie exterior de partículas de componentes activos que después se prensan en forma de comprimido, o se cargan en una cápsula, que está preferentemente ella misma recubierta con un revestimiento entérico.

5 Es muy deseable que todos los componentes de la invención se liberen del transportador o vehículo, y se solubilizan en el ambiente intestinal lo más simultáneamente posible. Es preferente que el vehículo o transportador libere los componentes activos en el intestino delgado donde los potenciadores de la captación que aumentan el transporte transcelular o paracelular es menos probable que provoquen efectos secundarios no deseados que si los mismos potenciadores de la captación fueran liberados más tarde en el colon. Sin embargo, se enfatiza que se cree que la presente invención es eficaz en el colon así como en el intestino delgado. Se conocen en la técnica numerosos vehículos y transportadores, además de los discutidos anteriormente. Es deseable (especialmente en la optimización de que tan simultáneamente los componentes de la invención se liberan) mantener la cantidad de revestimiento entérico baja. Preferentemente, el revestimiento entérico añade no más del 30 % al peso de la composición farmacéutica restante (siendo el "restante" la composición farmacéutica exclusiva del propio revestimiento entérico). Más preferentemente, añade menos del 20 %, especialmente desde el 12 % al 20 % al peso de la composición no recubierta. Preferentemente, el revestimiento entérico debería ser suficiente para evitar la degradación de la composición farmacéutica de la invención en HCl 0,1 N durante al menos 2 horas, después ser capaz de permitir la liberación completa de todos los componentes de la composición farmacéutica dentro de los treinta minutos después de que el pH se aumente a 6,3 en un baño de solución en el que dicha composición está rotando a 100 revoluciones por minuto.

20 Otras preferencias

Es preferente que la proporción de peso del agente/agentes reductores del pH y/o los inhibidores de proteasa con respecto al potenciador/potenciadores de la absorción, cuando está presente, sea de entre 3:1 y 20:1, preferentemente de 4:1- 12:1, y muy preferentemente 5:1- 10:1. El peso total de todos los agentes reductores del pH y/o de los inhibidores de proteasa y el peso total de todos los potenciadores de la absorción en una dada composición farmacéutica, están incluido en las anteriores proporciones preferentes. Por ejemplo, si una composición farmacéutica incluye dos agentes reductores del pH y tres potenciadores de la absorción, las anteriores proporciones serán computadas en el peso total combinado de los agentes reductores del pH y el peso total combinado de los tres potenciadores de la absorción.

Es preferente que el agente reductor del pH y/o inhibidor de proteasa, el agente activo peptídico y el potenciador de la absorción, cuando está presente (ya sea compuestos únicos o una pluralidad de compuestos en cada categoría), estén dispersos de forma uniforme en la composición farmacéutica. En una realización, la composición farmacéutica comprende gránulos que incluyen un aglutinante farmacéutico que tiene el agente activo peptídico, el agente reductor del pH y el potenciador de la absorción dispersos de forma uniforme en dicho aglutinante. Los gránulos preferentes también pueden consistir de un núcleo ácido, rodeado de una capa uniforme de ácido orgánico, una capa de potenciador y una capa de péptido que está rodeada de una capa externa de ácido orgánico. Los gránulos pueden estar preparados de una mezcla acuosa que consiste en aglutinantes farmacéuticos tales como polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa, junto con los agentes reductores del pH, los potenciadores de la absorción y los agentes activos peptídicos de la invención.

40 Procedimiento de fabricación

45 Una composición farmacéutica preferente de la invención incluye una cápsula de gelatina de tamaño 00 rellena con 0,25 mg de calcitonina de salmón unida a un TM, 400 mg de ácido cítrico granular (disponible por ejemplo de Archer Daniels Midland Corp.), 50 mg de ácido taurodeoxicólico (disponible por ejemplo de SIGMA), 50 mg de laurilcarnitina (SIGMA).

50 Todos los ingredientes son preferentemente para la inserción eventual en la cápsula de gelatina, y son preferentemente polvos que pueden añadirse a un mezclador en cualquier orden. Posteriormente, el mezclador se pone a funcionar durante aproximadamente tres minutos hasta que los polvos están meticulosamente entremezclados. Después, los polvos mezclados se cargan en el extremo grande de las cápsulas de gelatina. Después se añade el otro extremo de la cápsula, y la cápsula se cierra a presión. Se pueden añadir 500 o más de tales cápsulas a un dispositivo de revestimiento (por ejemplo, Vector LDCS 20/30 Laboratory Development Coating System (disponible de Vector Corp., Marion, Iowa)).

60 Una solución revestidora entérica se produce como sigue. 500 gramos de EUDRAGIT L30 D-55 (un copolímero de ácido metacrílico con ácido metacrílico de metil éster, un revestimiento entérico disponible de ROHM Tech Inc., Maidan, Mass.). Se añaden 411 gramos de agua destilada, 15 gramos de trietil citrato y 38 gramos de talco. Esta cantidad de revestimiento será suficiente para revestir aproximadamente 500 cápsulas de tamaño 00.

65 Las cápsulas se pesan y colocan en el tambor de la máquina revestidora. La máquina se pone en funcionamiento para hacer rotar el tambor (ahora conteniendo las cápsulas) a 24-28 rpm. Preferentemente, la temperatura del pulverizador interior es de aproximadamente 45 °C. Preferentemente, las temperaturas de escape son de aproximadamente 30 °C. Preferentemente, la temperatura de la cápsula no revestida es de aproximadamente 25 °C.

El flujo de aire es de aproximadamente 1076,18 decímetros cúbicos por minuto.

Después se inserta un tubo de la máquina en la solución revestidora preparada como se discute anteriormente. La bomba se pone en funcionamiento para suministrar solución al dispositivo revestidor. Después, el revestido procede de forma automática. La máquina se puede detener en cualquier momento para pesar las cápsulas para determinar si la cantidad de revestimiento es suficiente. Normalmente se permite que el revestido proceda durante 60 minutos. Después, la bomba se desactiva durante aproximadamente cinco minutos mientras la máquina está todavía funcionando para ayudar al secado de las cápsulas revestidas. Después la máquina se desactiva. Entonces, el revestido de las cápsulas está completo, aunque se recomienda que las cápsulas se sequen al aire durante aproximadamente dos días.

Es preferente que se utilice una única cápsula en cada administración debido a que una única cápsula proporciona la mejor liberación simultánea del polipéptido, del agente reductor del pH y de los potenciadores de la absorción. Es altamente deseable debido a que el ácido es el que mejor puede reducir el ataque proteolítico no deseado del polipéptido cuando el ácido se libera en una proximidad temporal estrecha a la liberación del polipéptido. La liberación casi simultánea se logra mejor mediante la administración de todos los componentes de la invención como una única píldora o cápsula. Sin embargo, la invención también incluye, por ejemplo, dividir la cantidad necesaria de ácido y de potenciadores, cuando se utilizan, entre dos o más cápsulas que se pueden administrar juntas de tal forma que juntas proporcionen la cantidad necesaria de todos los ingredientes. "Composición farmacéutica", según se utiliza en el presente documento, incluye una dosificación completa apropiada para una administración particular a un paciente humano, independientemente de cómo esté subdividida en tanto sea para administración sustancialmente simultánea.

Ejemplo de referencia 1- Efecto de la amidación carboxilo terminal sobre la biodisponibilidad oral de la calcitonina de salmón (CTs)

Se llevó a cabo un estudio en un modelo de perro para comparar los parámetros farmacocinéticos de la CTs extendida con glicina (CTsgly) administrada por vía oral, con las de las CTs amidadas (CTs-NH₂).

Se utilizaron en este estudio ocho machos adultos de perros Beagle, pesando entre 12 y 16 kg. Los perros se mantuvieron en ayunas durante toda la noche antes de la administración del péptido de prueba, pero se les permitió el acceso al agua a demanda. Entre experimentos tuvo lugar un periodo de eliminación de al menos una semana para cada perro. Cada perro recibió una cápsula de gelatina con revestimiento entérico, administrada por vía oral, que contenía 1,11 mg de CTsgly en la semana 1 y 1,11 mg de CTs-NH₂ en la semana 2. La composición total de cada cápsula se muestra en la Tabla 4. Antes de la administración de la cápsula, se insertó en una vena braquial un catéter intravenoso de calibre 20 (IV) para la recolección de las muestras de sangre. Se recogieron de la vena braquial dos muestras de pre dosis, de 3 ml cada una.

Tabla 4 - La composición de las cápsulas de CTs-gly y de CTsNH₂

Cápsula	Ácido cítrico granular (mg)	LLC (mg)	CTs-gly (mg)	CTs-NH ₂ (mg)	Talco (mg)
Cápsula de CTs-gly	596	62	1,11		30
Cápsula de CTsNH ₂	576	58		1,11	29

Después de la administración de la cápsula, se recogieron muestras de sangre de 3 ml de la vena braquial a intervalos de 15 minutos hasta los 240 minutos post administración. Se recogieron las muestras de sangre en jeringas de muestreo heparinizadas Monovette nuevas. Las muestras se colocaron en hielo antes de centrifugarse durante 10 minutos a aproximadamente 2750 rpm a 2-8 °C. El plasma sobrenadante se transfirió a tubos de microcentrífuga clasificados por color, marcados con el punto temporal y se almacenaron congelados a -20 °C antes del análisis para determinar la concentración de CTsgly o de CTs-NH₂.

La concentración de CTsgly plasmática se determinó mediante radioinmunoensayo con un kit RIA de Peninsula Laboratories. La concentración plasmática de CTs-NH₂ se determinó mediante un inmunoensayo ELISA tipo sándwich utilizando un kit de Diagnostic Systems Laboratories Inc. A partir del perfil farmacocinético de CTsgly o de CTs-NH₂ plasmático, se determinaron los parámetros de C_{máx} (pico de concentración plasmática en pg/ml) y el ABC (área bajo la curva). Todos los valores medidos se normalizaron para una dosis de 1 mg de péptido para los dos péptidos. La media para cada uno de estos parámetros se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

Péptido	C _{máx} media* ± EEM (pg/ml)	ABC* media ± EMM (pg·min/ml)
CTsgly	485 ± 106	25.125 ± 5.525
CTs-NH ₂	3.199 ± 602	148.000 ± 18.200
* Ajustado a una dosis de 1 mg		

La $C_{\text{máx}}$ media de la CTs con una amida C-terminal es 6,6 veces mayor que la de CTsgly. La ABC media, que es una medida indirecta de la biodisponibilidad, es 5,9 veces mayor para CTs-NH₂ que para CTsgly. Por lo tanto, para estos dos péptidos, que son idénticos excepto por la presencia de una glicina o de un grupo amida en el extremo C, hay una diferencia dramática en la cantidad de péptido plasmática medida después de la administración oral, y esto se puede atribuir de forma directa a la presencia del grupo amida C-terminal.

Ejemplo 2: Comparación de la biodisponibilidad de análogos amidados y no amidados de la hormona paratiroidea (HPT)

Se llevaron a cabo dos estudios separados en un modelo de perro para determinar los parámetros farmacocinéticos de los análogos de HPT administrados por vía oral. El análogo utilizado en el primer estudio fue HPT1-34-OH. En el segundo estudio, se utilizó un análogo ligeramente más pequeño, HPT1-31NH₂. Además de esta pequeña diferencia de tamaño (tres aminoácidos), la principal diferencia entre las dos moléculas es que el péptido 1-34 tiene un ácido libre en el extremo C y el péptido 1-31 tiene un extremo C amidado.

Se utilizaron en el estudio para HPT1-34-OH, ocho perros Beagle machos adultos. En el estudio de HPT1-31NH₂, se utilizaron seis de estos mismos perros. Se mantuvo a los perros en ayunas durante toda la noche antes de la administración del péptido de prueba, pero se les permitió el acceso al agua a demanda. Tuvo lugar un periodo de eliminación de al menos una semana entre los experimentos para cada perro. Cada perro recibió una cápsula de gelatina con revestimiento entérico, administrada por vía oral, que contenía 2,64 mg de HPT1-34-OH en el primer estudio y en el segundo estudio 2,38 mg de HPT1-31NH₂. La composición total de cada cápsula se muestra en la Tabla 6. Antes de la administración de la cápsula, se insertó en una vena braquial un catéter intravenoso de calibre 20 (IV) para la recolección de muestras de sangre. Se recogieron de la vena braquial dos muestras pre dosis de 3 ml cada una.

Tabla 6 - La composición de las cápsulas de HPT1-34-OH y de HPT1-31NH₂

Cápsula	Ácido cítrico granular (mg)	LLC (mg)	HPT1-34-OH (mg)	HPT1-31NH ₂ (mg)	Talco (mg)
Cápsula de HPT1-34-OH	472	47	2,64		24
Cápsula de HPT1-31NH ₂	576	58		2,38	29

Después de la administración de la cápsula, se recogieron de la vena braquial muestras de sangre de 3 ml a intervalos de 15 minutos hasta los 240 minutos post administración. Las muestras de sangre se recogieron en jeringas de muestreo heparinizadas Monovette nuevas. Las muestras se colocaron en hielo antes de centrifugarse durante 10 minutos a aproximadamente 2750 rpm a 2-8 °C. El plasma sobrenadante se transfirió a tubos de microcentrífuga clasificados por color marcados con el punto temporal y se almacenaron congelados a -20 °C antes del análisis de la concentración de HPT1-34-OH o de HPT1-31NH₂.

Se determinó la concentración plasmática de HPT1-34-OH utilizando un kit de RIA de Penninsula Laboratories. Se cuantificó HPT1-31NH₂ utilizando un ELISA competitivo desarrollado en Unigene Laboratories. Se calcularon a partir del perfil farmacocinético de HPT1-34-OH o de HPT1-31NH₂ plasmáticos, los parámetros de $C_{\text{máx}}$ (pico de concentración plasmática en pg/ml) y el ABC (área bajo la curva). Los valores de la media para cada uno de estos parámetros se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Péptido	$C_{\text{máx}}^*$ media \pm EEM (pg/ml)	ABC* media \pm EEM (pg·min/ml)
HPT1-34-OH	314 \pm 117	11.893 \pm 3.366
HPT1-31NH ₂	2.155 \pm 456	116.400 \pm 32.100
* Ajustado a una dosis de 1 mg		

La $C_{\text{máx}}$ media de HPT1-31NH₂ es aproximadamente 6,25 veces más grande que la de HPT1-34-OH, y la ABC media, una medida indirecta de la biodisponibilidad, es 9,8 veces más grande para HPT1-31NH₂. Aunque la molécula HPT1-31NH₂ es 3 aminoácidos más pequeña que HPT1-34-OH, esta pequeña diferencia en el peso molecular entre los dos péptidos (3718 Daltons y 4118 Daltons, respectivamente) no explica la diferencia observada en las biodisponibilidades. Por lo tanto, la importante diferencia entre los dos péptidos es la presencia o ausencia del grupo amida C-terminal.

Ejemplo 3 - Comparación de la biodisponibilidad de un análogo de la hormona paratiroidea, HPT1-34, con y sin un grupo amida C-terminal, mediante administración intraduodenal en ratas

Se anestesiaron con quetamina y xilacina ratas Sprague-Dawley hembras (250-275 g) (n=6 para HPT1-34-OH y n=7 para HPT1-34NH₂) antes de la inserción de una cánula en la arteria carótida. La cánula se ajustó a una válvula de tres vías a través de la que se tomó muestras de sangre y se reemplazó con solución salina fisiológica. Se hizo una incisión en la línea media de la cavidad abdominal y se inyectó 0,5 ml de formulación directamente en el duodeno expuesto. La formulación para cada péptido contenía ácido cítrico (0,5 M), lauroilcarnitina (10 mg/ml), calcitonina de

salmón (incluida como un marcador interno) (0,5 mg/ml) y HPT1-34-OH o HPT1-34NH₂ (0,5 mg/ml). Se recogió sangre (0,5 ml) antes y a los 5, 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de las formulaciones. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 min a 2600 x g, y el plasma sobrenadante resultante se almacenó a -20 °C. La concentración plasmática de los péptidos se determinó mediante un inmunoensayo ligado a enzima competitivo (ELISA). La biodisponibilidad absoluta (es decir, con respecto a una dosis intravenosa de cada péptido) se calculó a partir de las áreas bajo la curva obtenidas de diagramas de la concentración plasmática de HPT1-34-OH o de HPT1-34NH₂ en función del tiempo.

HPT1-34-OH y HPT1-34NH₂ se absorbieron rápidamente del duodeno de rata dentro de los 5 minutos después de su administración. La concentración máxima de HPT1-34-OH fue de 3,05 ng/ml y la de HPT1-34NH₂ fue de 26,7 ng/ml, que fue aproximadamente 9 veces mayor que la de la forma de ácido libre de HPT (1-34). Después de 60 minutos, la concentración de HPT1-34NH₂ todavía era casi 9 veces mayor que la de HPT1-34-OH (Tabla 8). La biodisponibilidad absoluta de HPT1-34NH₂ fue del 3,68 % y la de HPT1-34-OH fue del 0,45 %. Estos resultados sugieren que la sustitución del grupo amida del extremo C por el grupo OH mejora la concentración plasmática máxima del péptido en 8,75 veces y la biodisponibilidad absoluta de HPT1-34 en 8,2 veces.

Tabla 8 - Efecto de la amida C- terminal sobre el perfil farmacocinético de HPT1-34

Tiempo (Min)	HPT1-34-OH ng/ml ± error estándar	HPT1-34NH ₂ ng/ml ± error estándar
0	0,00	0,00
5	2,69 ± 1,35	26,70 ± 7,84
15	3,05 ± 1,31	21,03 ± 4,07
30	1,90 ± 0,81	13,13 ± 3,36
60	0,62 ± 0,36	5,39 ± 3,08
120	0,83 ± 0,35	1,18 ± 1,08
Biodisponibilidad absoluta (%)	0,45 ± 0,18	3,68 ± 0,76

Ejemplo de referencia 4 - Efecto de la amida C- terminal sobre la absorción intraduodenal de HLHL en ratas

Se examinó el efecto de la amidación C-terminal sobre la absorción de la hormona liberadora de hormona luteinizante (HLHL-NH₂) del duodeno de ratas anestesiadas. En este estudio las características de absorción de HLHL-NH₂, un decapeptido de origen natural amidado en el C-terminal, se compararon con las de HLHL-COOH, un decapeptido con la misma secuencia de aminoácidos que la de HLHL-NH₂, excepto que el aminoácido C-terminal de HLHL-COOH es gly-COOH en lugar de gly-NH₂. Se anestesiaron doce ratas hembra y se les implantó una cánula en la arteria carótida para tomar muestras de sangre a diversos tiempos. Se inyectaron 0,5 ml de HLHL-NH₂ (5 mg/ml) en ácido cítrico 0,5 M y lauroilcarnitina (10 mg/ml) en el duodeno en seis ratas a través de una aguja de calibre 27 y 0,5 ml de HLHL-COOH (5 mg/ml) con la misma formulación en el duodeno en seis ratas. Se tomaron muestras de sangre antes de la administración de HLHL-NH₂ o HLHL-COOH formulados, y a los 5, 15, 30, 60, y 120 minutos después de la administración del péptido. Se analizó HLHL-NH₂ o HLHL-COOH en las muestras de plasma resultantes mediante cromatografía líquida de alto rendimiento equipada con un detector de fluorescencia para medir la concentración plasmática de péptido. La concentración máxima (C_{máx}) de HLHL amidada y no amidada se detectó en plasma cinco minutos después de la administración de péptido. Aunque se administró a las ratas cantidades iguales de ambas formas de HLHL, a los cinco minutos se detectó en plasma 5 veces más de HLHL amidada, HLHL-NH₂, que la forma de ácido libre, HLHL-COOH (Tabla 9). El área bajo la curva (ABC), una medida de la extensión de la absorción y la biodisponibilidad del péptido, fue 6 veces mayor para HLHL amidada que para la forma de ácido libre de HLHL (Tabla 9). Estos resultados indican que en una formulación que contiene un ácido y un potenciador, los péptidos amidados tienen mayor biodisponibilidad que los péptidos no amidados.

Tabla 9 - Efecto de la amida C- terminal en la absorción intraduodenal de HLHL en ratas

min	HLHL-NH ₂ ng/ml ± eem	HLHL-COOH ng/ml ± eem
0	0	0
5	3276 ± 893	654 ± 103
15	2897 ± 612	391 ± 81
30	1282 ± 282	163 ± 68
60	382 ± 103	56 ± 19
120		
C _{máx}	3276 ± 893	654 ± 103
ABC	109350 ± 23652	17731 ± 4002

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para la administración oral de un agente peptídico fisiológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en péptido similar a glucagón humano 1, péptido similar a glucagón humano 2, 5 insulina, hormona paratiroidea humana, análogo de hormona paratiroidea humana HPT 1-31 NH₂ y análogo de hormona paratiroidea humana HPT 1-34NH₂, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho péptido activo, en donde dicho péptido activo está amidado en el extremo C- terminal; al menos un agente reductor del pH farmacéuticamente aceptable; y al menos un potenciador de la absorción, en donde dicho potenciador de la absorción es un agente tensioactivo.
- 10 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un inhibidor de proteasa del estómago y/o del intestino y un vehículo protector resistente a ácido eficaz para transportar dicha composición farmacéutica a través del estómago de un paciente mientras se evita el contacto entre dicho agente peptídico activo y las proteasas del estómago, en donde dicho vehículo protector es un jarabe protector viscoso.
- 15 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que dicho inhibidor de proteasa del estómago y/o del intestino inhibe una enzima seleccionada del grupo que consiste en pepsina, tripsina, quimotripsina, elastasa, calicreína y carboxipeptidasa.
- 20 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho péptido está preparado como precursor extendido con glicina y posteriormente se convierte a un grupo amida C- terminal.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho agente reductor del pH está presente en dicha composición farmacéutica en una cantidad que, si dicha composición se añadió a diez mililitros de solución de bicarbonato de sodio acuosa 0,1 M, sería suficiente para reducir el pH de dicha solución a no más de 5,5.
- 25 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que dicho vehículo protector está presente en un peso que no es más del 30 % del peso del resto de dicha composición farmacéutica.
- 30 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho agente tensioactivo es absorbible o biodegradable.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho agente tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en acilcarnitinas, fosfolípidos y ácidos biliares.
- 35 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho agente tensioactivo es una acilcarnitina y adicionalmente incluye un éster de sacarosa.
- 40 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho potenciador de la absorción es un agente tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en (i) un agente aniónico que es un derivado de colesterol, (ii) una mezcla de un neutralizador de cargas negativas y un agente tensioactivo aniónico, (iii) agentes tensioactivos no iónicos y (iv) agentes tensioactivos catiónicos.
- 45 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende un péptido de semilla de soja.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho agente reductor del pH se selecciona del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido tartárico y una sal de ácido de un aminoácido.
- 50 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho agente reductor del pH está presente en una cantidad no menor de 300 miligramos.