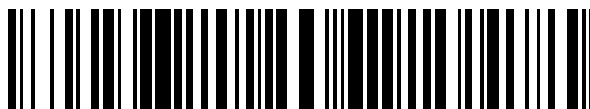


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 628**

51 Int. Cl.:

A61K 47/64 (2007.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61K 38/23 (2006.01)
A61K 38/29 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2001 PCT/US2001/44980**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2002 WO02043767**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2001 E 01996021 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 1339431**

54 Título: **Suministro oral mejorado de péptidos, mediante la utilización de translocadores de membrana, segmentables mediante una enzima**

30 Prioridad:

30.11.2000 US 250055 P
29.11.2001 US 997465

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

STERN, WILLIAM;
MEHTA, NOZAR M. y
RAY, MARTHA V.L.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 642 628 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

Suministro oral mejorado de péptidos, mediante la utilización de translocadores de membrana, segmentables mediante una enzima.

ANTECEDENTES Y TRASFONDO DE LA INVENCÓN

Sector de la invención

La presente invención, se refiere a fármacos orales, peptídicos, en donde, los compuestos activos, incluyen una pluralidad de aminoácidos y por lo menos un enlace peptídico, en sus estructuras moleculares, y a procedimientos para la mejora de la biodisponibilidad de tales tipos de compuestos activos peptídicos, cuando éstos se suministran oralmente.

DESCRIPCIÓN DEL ARTE ESPECIALIZADO DE LA TÉCNICA RELACIONADO

Numerosas hormonas humanas, neurotransmisores humanos, y otros importantes compuestos biológicos, tienen péptidos como una parte substancial de sus moléculas estructurales. Muchas enfermedades, responden de una forma positiva al aumento del nivel de estos compuestos peptídicos, en pacientes. Pueden administrarse cantidades terapéuticamente efectivas de tales tipos de péptidos biológicamente relevantes, a pacientes, en una gran variedad de vías de administración. Sin embargo, no obstante, tal y como se discutirá posteriormente, más abajo, en este documento de solicitud de patente, la forma preferida de administración oral, es muy difícil, con este tipo de compuesto activo.

La calcitonina del salmón, por ejemplo, es una hormona peptídica, la cual disminuye la liberación o pérdida de calcio de los huesos. Cuando se utiliza para tratar las enfermedades relacionadas con los huesos, y los trastornos o desórdenes del calcio (tales como la osteoporosis, la enfermedad de Paget, la hipercalcemia por malignidad, y por el estilo), ésta tiene el efecto de ayudar en el mantenimiento de la densidad ósea. Se han aislado muchos tipos de calcitonina (la calcitonina humana, la calcitonina del salmón, la calcitonina de la anguila, la calcitonina porcina, y la calcitonina de la gallina). Existe una significativa no homología estructural, entre los varios tipos de calcitonina. Así, por ejemplo, existe únicamente un porcentaje de identidad del 50 %, entre los aminoácidos que forman la calcitonina humana, y aquéllos que forman la calcitonina del salmón. Sin embargo, no obstante, a pesar de la diferencia en la estructura molecular, la calcitonina del salmón, puede utilizarse en el tratamiento humano de las enfermedades sensibles a la calcitonina, las cuales se han discutido anteriormente arriba.

Los fármacos o medicamentos a base de péptidos los cuales se han venido utilizando en el arte anterior de la técnica especializada, de una forma frecuente, se han venido administrando mediante inyección o mediante administración nasal. La insulina, es un ejemplo de un fármaco o medicamento peptídico, la cual, de una forma frecuente, se administra mediante inyección. Una administración oral más preferida, tiende a ser diplomática, debido al hecho de que, los compuestos activos peptídicos, son muy susceptibles a la degradación en el estómago y en los intestinos. Así, por ejemplo, mientras que el arte anterior de la técnica especializada se ha informado sobre una capacidad para lograr nos niveles reproducibles en sangre de la calcitonina del salmón, cuando ésta se administra oralmente, sin embargo, no obstante, estos niveles son bajos. Se cree que, ello, es debido al este hecho de que, la calcitonina del salmón, carece de una estabilidad suficiente, en el tracto gastrointestinal, y ésta tiene una tendencia a ser sólo débilmente transportada, a través de las paredes de las paredes intestinales, a la sangre. Sin embargo, no obstante, la administración por inyección y nasal, son significativamente menos convenientes que la administración oral, y éstas involucran una incomodidad o molestia superior que ésta última. De una forma frecuente, esta inconveniencia o incomodidad, tiene como resultado una disconformidad o falta de observancia del paciente, con respecto al régimen del tratamiento. Así, de este modo, existe una necesidad, en el arte especializado de la técnica, en cuanto al hecho de poder disponer de una administración oral más efectiva y reproducible, de los fármacos o medicamentos a base de péptidos, tales como los consistentes en la insulina, en la calcitonina del salmón, y en otros fármacos o medicamentos peptídicos, los cuales se discuten aquí, en mayor detalle, en este documento de solicitud de patente.

Las enzimas proteolíticas de ambos, el estómago y el intestino, pueden degradar los péptidos, convirtiendo en éstos últimos en activos, antes de que se hayan absorbido hacia el interior de la corriente sanguínea. Cualquier cantidad de péptido la cual sobreviviera a la degradación proteolítica por mediación de las proteasas del estómago (que, de una forma típica, tenga un óptimo valor pH ácido), se confronta, posteriormente, con las proteasas del intestino delgado y las enzimas secretadas por el páncreas (el cual, de una forma típica, tiene un valor pH óptimo, de neutro a básico). Las dificultades específicas las cuales se generan mediante la administración oral de un péptido, tal como el consistente en la calcitonina del salmón, involucran el tamaño relativamente grande de la molécula, y la distribución de carga que ello conlleva. Este hecho, puede convertir en más dificultoso, para la calcitonina del salmón, el que ésta penetre el moco, a lo largo de las paredes intestinales, o que atravesara la membrana del borde en cepillo, intestinal, hacia el interior de la sangre.

Normalmente, la membrana plasmática de las células eucarióticas, es impermeable, a los péptidos grandes o proteínas. Sin embargo, no obstante, ciertas secuencias de aminoácidos hidrofóbicos, denominados, de una forma diversa, como péptidos de transporte o secuencias de translocación de membrana, cuando se fusionan al término N ó al término C de proteínas funcionales, pueden actuar como translocadores de membrana, y mediar en el transporte de estas proteínas, al interior de células vivas. Este procedimiento de suministro de proteínas al interior de las células, si bien es potencialmente de mucha utilidad, al mismo tiempo, tiene dos importantes inconvenientes. En primer lugar, la proteína, no puede objetivizarse como diana, a ningún tipo de célula específica. Así, de este modo, una vez que ésta se inyecta, y que entra en la circulación, ésta entrará, de una forma presumible, en todos los tipos de células, de una forma no específica, no mediatizada por receptores. Este hecho, provocaría un enorme efecto de dilución, de tal forma que, deben ser inyectadas unas altas concentraciones de proteína, con objeto de conseguir una concentración efectiva en el tipo de célula objetivizada como diana. Así mismo, también, la proteína en cuestión, podría ser extremadamente tóxica, cuando ésta entra en las células, en los tejidos no objetivizados como diana. Un tercer inconveniente, es el consistente en el hecho de que, la presencia continuada del péptido de transporte, podría convertir a la proteína en muy antigénica y así, de este modo, podría también interferir con su actividad biológica. Estos inconvenientes descritos anteriormente, arriba, aparecerían tanto si la fusión se hubiese suministrado por vía de inyección, o por vía nasal, o por vía oral.

El documento de solicitud de patente internacional WO 97 / 33 531 A, se refiere a composiciones farmacéuticas para el suministro oral, las cuales incorporan un péptido fisiológicamente activo, un agente reductor del valor pH, un vehículo protector resistente a los ácidos, y un mejorador de la absorción. El documento de solicitud de patente internacional WO 95 / 34 295 A, se refiere a la conjugación de péptidos biológicamente activos, con un péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi, para facilitar la absorción a partir de la boca, del estómago, o del tracto intestinal.

RESUMEN DE LA INVENCION

Así, de una forma correspondientemente en concordancia, es un objeto de la presente invención, el proporcionar una composición farmacéutica oral, terapéuticamente efectiva, para suministrar péptidos farmacéuticos de una forma fidedigna, tratándose éste del péptido semejante al glucagón del tipo 1, humano, de la calcitonina del salmón, de la insulina, y de la hormona paratiroidea humana.

Es un objeto adicional de la presente invención, el proporcionar medicamentos para su uso en procedimientos terapéuticos para mejorar la biodisponibilidad de tales tipos de péptidos.

Es un objeto adicional de la presente invención, el proporcionar medicamentos para su utilización en procedimientos para el tratamiento enfermedades relacionados con los huesos, y desórdenes o trastornos del calcio, mediante la administración, por vía oral, de la calcitonina del salmón.

En un aspecto, la presente invención, proporciona una composición farmacéutica oral, para el suministro oral de un agente peptídico, fisiológicamente activo, la cual comprende: (A) una cantidad terapéuticamente efectiva del citado péptido activo, unida a un translocador de membrana, en donde, el citado péptido activo, se selecciona de entre un péptido semejante al glucagón del tipo 1, humano, la calcitonina del salmón, la insulina, y una hormona paratiroidea humana, y en donde, el citado translocador de membrana, es un péptido señal, el cual es capaz de sementarse, por lo menos parcialmente, mediante una proteasa del sistema sanguíneo, o del sistema linfático; (B) por lo menos un agente reductor del valor pH, y / o un inhibidor de proteasa, farmacéuticamente aceptable, y (C) un vehículo protector resistente a los ácidos, para transportar la citada composición farmacéutica, a través del estómago de un paciente, al mismo tiempo que prevenir el contacto entre el citado péptido activo y las proteasas del estómago.

Los agentes peptídicos activos de la presente invención, son la insulina, la vasopresina, la calcitonina del salmón, el péptido semejante al glucagón del tipo 1, humano, y la hormona paratiroidea humana se prefieren, de una forma especial, la calcitonina del salmón.

Se proporciona un procedimiento para mejorar la biodisponibilidad de un agente peptídico terapéuticamente activo, suministrado oralmente, comprendiendo, el procedimiento en cuestión: (A) unir el citado agente peptídico a un translocador de membrana, siendo éste un péptido señal, y siendo capaz de segmentarse, por lo menos parcialmente, mediante una proteasa plasmática; y (B) liberar de una forma selectiva el citado agente peptídico activo, ligado al citado translocador de membrana, conjuntamente con por lo menos un agente reductor del valor pH y / o un inhibidor de proteasa, hacia el interior del intestino de un paciente, subsiguientemente al paso de los citados agente peptídico activo, agente reductor del valor pH / inhibidor de proteasa, a través de la boca y del estómago del citado paciente, bajo la protección de un vehículo protector resistente a los ácidos, el cual prevenga o evite, de una forma substancial, el contacto entre las proteasas del estómago y el citado agente peptídico.

Se cree que, la presente invención, reduce la probabilidad de la degradación proteolítica del compuesto peptídico activo, protegiendo, de una forma simultánea, al péptido, contra un ataque proteolítico por parte de (1) proteasas del estómago, las cuales, de una forma típica, son más activas a valores de pH ácidos, y (2) proteasas intestinales o pancreáticas, (las cuales, de una forma típica, son más activas a valores pH básicos o neutros).

Adicionalmente, además, se cree que, la presente invención, fomenta el proceso mediante el cual, el péptido, cruza la membrana del borde intestinal en cepillo, entrando en la sangre, debido a la presencia del translocador de membrana, mientras que al mismo tiempo, continúa protegiendo al péptido, contra la degradación proteolítica.

Un vehículo protector resistente a los ácidos, protege al agente peptídico activo, contra las proteasas de acción ácida del estómago. Cantidades significativas de ácido (con las cuales se entremezcla el agente peptídico activo) reducen, entonces, la actividad de las proteasas de acción neutra a acción básica, en el intestino (tal como, por ejemplo, la proteasa luminal o digestiva y las proteasas de la membrana del borde en cepillo), mediante la reducción del rango óptimo de actividad de estas proteasas individuales.

El translocador de membrana, cuando éste se encuentra unido al agente peptídico activo, tiene la capacidad de mejorar el transporte de del agente peptídico, a través de las capas de mocos, a través de la membrana del borde en cepillo, y hacia el interior de la sangre. Subsiguientemente, el translocador de metralla, se segmenta mediante una proteasa del sistema sanguíneo o linfático, liberando así, de este modo, el agente peptídico activo, en sistema de un paciente.

Otros rasgos distintivos y características y ventajas de la presente invención, resultarán evidentes, a raíz de la siguiente descripción detallada de la invención:

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LOS DIBUJOS

La figura 1, muestra el mapa de plásmido circular del Vector de Clonación Universal pUSEC – 05.

La Figura 2 muestra el mapa de plásmido circular de pMT3-sCT-01, un vector para la expresión de la secuencia de fusión MT-sCT.

La Figura 3, muestra el mapa de plásmido circular del vector pSCT025 que contiene el gen sCT.

La Figura 4, muestra el mapa de plásmido circular del Vector de Clonación Universal pUSEC - 06.

La Figura 5, muestra el mapa de plásmido circular de pMT3-sCT - 02, un vector para la expresión de la secuencia de fusión MT-sCT.

La Figura 6, muestra el mapa de plásmido circular de pMT3-sCT - 03, un vector para la expresión de la secuencia de fusión MT-sCT.

La Figura 7, muestra un gel de SDS-PAGE de gradiente del 10 - 20% para las siguientes muestras:

Pista 1 Muestra total de material de lisado = control negativo

Pista 2 Estándares BioRad Precision TM;

Pista 3 Material de lisado celular insoluble (OmpA-MT3-sCTgly recombinante purificado), entrada a la purificación;

Pista 4 Análisis RP analítico de solubilización;

Pista 5 Muestra de purificación preparativa después de la solubilización, 4 µl;

Pista 6 Muestra de purificación preparativa después de la solubilización, 1,5 µl; y

Pista 7 GST-sCTgly estándar = control positivo.

La figura 8, muestra una transferencia western, estándar, utilizando el anticuerpo sCT- específico, para las siguientes muestras:

Pista 1 Muestra total de material de lisado = control negativo;

Pista 2 Estándares BioRad Precision TM;

Pista 3 Material de lisado celular insoluble (OmpA-MT3-sCTgly recombinante purificado), entrada a la purificación;

Pista 4 Análisis RP analítico de solubilización;

Pista 5 Muestra de purificación preparativa después de la solubilización, 4 µl;

Pista 6 Muestra de purificación preparativa después de la solubilización, 1,5 µl; y

Pista 7 GST-sCTgly estándar = control positivo.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

5 Tal y como se ha discutido anteriormente, arriba, en concordancia con la presente invención, a los pacientes los cuales se encuentren en necesidad de un tratamiento con ingredientes peptídicos activos, se les administrará una composición farmacéutica oral de los mismos (a una dosificación la cual sea apropiada), de una forma preferible pero no necesariamente en forma de comprimido o cápsula, de un tamaño usual en la industria farmacéutica. Las dosificaciones y la frecuencia de la administración de los productos se discuten con más detalle, abajo, a

10 continuación. Los pacientes que pueden beneficiarse son aquellos los cuales sufran de trastornos o desórdenes, los cuales responden favorablemente a niveles aumentados de un compuesto que contenga péptidos. Así, por ejemplo, la calcitonina del salmón, oral, en concordancia con la presente invención, puede usarse para tratar pacientes que sufran de trastornos o desórdenes del calcio o de enfermedades óseas. Así, de este modo, la presente invención, puede utilizarse, por ejemplo, para tratar la osteoporosis, la enfermedad de Paget, la hipercalcemia por malignidad y similares, con calcitonina oral, de una forma preferible, con calcitonina del salmón.

La calcitonina del salmón, es un ingrediente activo preferido, debido a varias razones. Así, por ejemplo, ésta proporciona una serie de ventajas sobre incluso la calcitonina humana, si bien ésta se utiliza como agente farmacéutico para pacientes humanos. Entre las ventajas proporcionadas mediante la utilización de la calcitonina del salmón en lugar de la calcitonina humana, para el tratamiento de la osteoporosis humana, se encuentran el aumento de la potencia, la analgesia y el aumento de la vida media. La calcitonina del salmón es más eficaz que la calcitonina humana natural, en el tratamiento, ya que son necesarias dosificaciones más bajas que con la calcitonina humana. Existe una no homología sustancial entre la calcitonina del salmón y la calcitonina humana, con sólo un porcentaje del 50 % de identidad, en las secuencias de aminoácidos de las dos calcitoninas.

La calcitonina del salmón, goza de una biodisponibilidad inesperadamente más alta cuando ésta se administra oralmente, en concordancia con la presente invención, con respecto a lo que se esperaría por su peso molecular. En una formulación oral, la biodisponibilidad de la calcitonina del salmón cuando ésta se encuentra unida a un translocador de membrana (MT), en concordancia con la presente invención, aumenta de una forma significativa.

Sin pretender ligarlo a ninguna teoría, se cree que, la composición farmacéutica de la invención, supera una serie de barreras naturales diferentes y no relacionadas con la biodisponibilidad. Varios componentes de las composiciones farmacéuticas actúan para superar diferentes barreras, mediante mecanismos apropiados para cada uno de ellos, y dan como resultado efectos sinérgicos sobre la biodisponibilidad de un ingrediente peptídico activo. El compuesto péptido activo puede administrarse por vía oral. En concordancia con la presente invención, la presencia de al menos un MT, de una forma preferible de dos MTs, y de una forma más preferible, de dos MTs de péptidos aumentaría la permeabilidad de la membrana del péptido de fusión a través del lumen del intestino y proporcionaría una biodisponibilidad mejorada. Dado que la unión del MT con el péptido activo puede segmentarse mediante una enzima, en el sistema sanguíneo o en el sistema linfático, con ello, se consigue dejar libre el péptido activo, para alcanzar su diana.

Adicionalmente, además, se reduce la degradación proteolítica del péptido y del translocador de membrana, mediante enzimas estomacales (la mayoría de las cuales son activas en el intervalo o rango de un valor pH ácido) y las proteasas intestinales o pancreáticas (la mayoría de las cuales son activas en un intervalo o rango de un el pH neutro a básico).

De nuevo, sin pretender ligarlo a ninguna teoría, parece ser que, el péptido se transporta a través del estómago, bajo la protección de un vehículo protector apropiado, resistente a los ácidos, con objeto de evitar, de una forma substancial, el contacto entre la calcitonina del salmón u otro péptido activo, y cualquier proteasa del estómago capaz de degradarla. Una vez que la composición farmacéutica de la invención pasa a través del estómago y entra en la región intestinal en la que predomina un valor pH básico a neutro y donde las proteasas tienden a tener un óptimo valor pH, de básico a neutro, el recubrimiento entérico u otro vehículo, libera el péptido e inhibidores de ácido o proteasa En estrecha proximidad entre sí). Se cree que, el ácido disminuye el valor pH intestinal local (en donde se ha liberado el agente activo) a unos niveles los cuales se encuentra por debajo del intervalo o rango óptimo para muchas proteasas intestinales y otras enzimas intestinales. Esta disminución del valor pH, reduce la actividad proteolítica de las proteasas intestinales, proporcionando así, de este modo, una protección al péptido y al translocador de membrana, frente a la degradación potencial. La actividad de estas proteasas, disminuye, mediante el entorno medioambiental proporcionado, temporalmente ácido. Se prefiere el hecho de que se suministre suficiente ácido, de tal forma que, el valor pH intestinal, local, se reduzca, de una forma temporal, a un valor de 5,5, a un valor inferior, de una forma preferible, a un valor de 4,7 ó menos, y de una forma más preferible, a un valor de 3,5 ó inferior. El test de ensayo del bicarbonato sódico, el cual se describe posteriormente, más abajo, a continuación en este documento de solicitud de patente (en la sección titulada "El agente reductor del pH") es indicativo de la cantidad de ácido la cual se requiere. De una forma preferible, Las condiciones de un valor pH intestinal reducido persisten, durante un período de tiempo suficiente como para proteger al agente peptídico y al translocador de membrana, de la degradación proteolítica, hasta que al menos una parte del agente peptídico haya tenido la oportunidad de atravesar la pared intestinal, hacia el torrente sanguíneo. Para la calcitonina del salmón, los

experimentos que se han llevado a cabo, han demostrado una T. a. (T_{Raax}) de 5 - 15 minutos, para los niveles sanguíneos de calcitonina del salmón, cuando los componentes activos se inyectan directamente en el duodeno, en el íleon o en el colon de las ratas.

5 De una forma alternativa, se cree que, los inhibidores de proteasa, reducen la actividad proteolítica de las proteasas intestinales, proporcionando así, de este modo, una protección al péptido y al translocador de membrana, a partir de una degradación potencial prematura.

10 Las composiciones de la presente invención pueden contener, de una forma opcional, potenciadores o estimulantes de la absorción. Los potenciadores o estimulantes de la absorción, de la invención, fomentan, de una forma sinérgica, la absorción de péptidos en la sangre, mientras prevalecen las condiciones de una actividad proteolítica reducida.

15 El mecanismo mediante el cual se cree que la invención cumple con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad se ayuda al tener componentes activos de la composición farmacéutica liberados juntos tan simultáneamente como sea posible. Con este fin, se prefiere mantener el volumen de revestimiento entérico tan bajo como sea posible, consistente con proporcionar protección contra las proteasas estomacales. Así, por lo tanto, el recubrimiento entérico es menos probable que interfiera con la liberación del péptido, o con la liberación de otros componentes en estrecha proximidad temporal con el péptido. El recubrimiento entérico, normalmente, debe añadir menos de un porcentaje del 30 %, al peso del resto de la composición farmacéutica (es decir, los otros componentes de la composición excluyendo, el recubrimiento entérico). De una forma preferible, dicho recubrimiento entérico, debe añadir un porcentaje inferior a un 20 %, a peso de los ingredientes no recubiertos, añadiendo, de una forma preferible, dicho recubrimiento entérico, un porcentaje correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales se encuentran situados entre un 10 % y un 20% al peso de los ingredientes sin recubrir.

25 El potenciador o estimulante de la absorción, el cual puede ser un potenciador o estimulante de la solubilidad y / o un potenciador o estimulante del transporte (tal y como se describe con más detalle más adelante, en este documento de solicitud de patente), ayuda en el transporte del agente peptídico, desde el intestino a la sangre y puede fomentar el proceso, de tal forma que, éste, acontezca de un modo mejor, durante el periodo de tiempo de la Reducción del valor pH intestinal y la reducción de la actividad proteolítica intestinal. Muchos agentes tensioactivos, pueden actuar como ambos, como intensificadores de la solubilidad y como potenciadores del transporte (captación). Aquí, de nuevo, y sin pretender vincularlo a ninguna teoría, se cree que, la mejora de la solubilidad, proporciona (1) una liberación más simultánea de los componentes activos de la invención en la porción acuosa del intestino, (2) una mejor solubilidad del péptido en la capa de moco y en el transporte a través de la capa mucosa en cuestión, a lo largo de las paredes intestinales. Una vez que el ingrediente activo del péptido haya alcanzado las paredes intestinales, un potenciador de la estimulante de captación proporciona un mejor transporte a través de la membrana del borde en cepillo del intestino hacia la sangre, a través de ambos, un transporte transcelular o un transporte paracelular. Tal y como se describirá en mayor abajo, a continuación, en este documento de solicitud de patente, muchos compuestos preferidos, pueden proporcionar ambas funciones. En estos casos, las formas preferidas de realización, las cuales utilizan ambas funciones, pueden actuar de este modo, añadiendo sólo un compuesto adicional, a la composición farmacéutica. En otras formas de realización, los intensificadores de absorción separados pueden proporcionar las dos funciones por separado. Las realizaciones preferidas que utilizan ambas funciones pueden hacerlo añadiendo solamente un compuesto adicional a la composición farmacéutica. En otras formas de realización, intensificadores de absorción separados, pueden proporcionar las dos funciones, por separado.

50 Cada uno de los ingredientes preferidos de la composición farmacéutica de la invención se discute separadamente abajo, a continuación. Pueden utilizarse combinaciones de múltiples agentes reductores del valor pH, o múltiples potenciadores, así como también utilizar sólo un agente reductor individual del valor pH y / o potenciador individual. Algunas combinaciones preferidas también se discuten abajo, a continuación, en este documento de solicitud de patente.

Ingredientes Peptídicos Activos

55 Los ingredientes activos peptídicos, los cuales pueden beneficiarse de la administración oral en concordancia con la presente invención incluyen a cualquier agente terapéutico el cual sea fisiológicamente activo y que tenga una pluralidad de aminoácidos y al menos un enlace peptídico en su estructura molecular. Los péptidos activos los cuales forman parte de la presente invención, son el péptido semejante al glucagón del tipo 1, humano, la calcitonina del salmón, la insulina, y la hormona paratiroidea humana. Estos ingredientes peptídicos activos, están unidos a una secuencia de MT (translocador de membrana) para facilitar su absorción desde el intestino. El MT debe protegerse de la segmentación por proteasas en el estómago y en el intestino, antes de su absorción. Sin embargo, no obstante, una vez absorbido, el MT (translocador de membrana), éste debe ser al menos parcialmente eliminado, mediante proteasas para liberar el péptido activo.

65 El translocador de membrana (MT), es un péptido señal o secuencia señal. Un "péptido señal", tal como se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, es una secuencia de aminoácidos generalmente pero no

necesariamente, de una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 o más residuos aminoácidos, muchos (típicamente aproximadamente 55 - 60%) residuos de los cuales, son hidrofóbicos, de tal forma que, éstos tienen una porción hidrofoba, soluble en lípidos. La porción hidrofoba, es un motivo o formación común, principal, del péptido señal, y a menudo, es una parte central del péptido señal de la proteína secretada de las células. Un péptido señal es un péptido capaz de penetrar a través de la membrana celular para permitir la exportación de proteínas celulares. Los péptidos señal de la presente invención, como se ha descubierto aquí, en este documento de solicitud de patente, son también "competentes para la importación", es decir, capaces de penetrar a través de la membrana celular desde fuera de la célula hasta el interior de la célula. Los residuos de aminoácidos, pueden ser mutados y / o modificados (es decir, formar miméticos) siempre y cuando las modificaciones no afecten a la función de mediación de translocación del péptido. Así, por lo tanto, la palabra péptido, incluye a los miméticos y la palabra aminoácido, incluye a los aminoácidos modificados, tal y como se usan aquí, a los aminoácidos inusuales y a los aminoácidos en forma de D. Todos los péptidos de señal competentes de importación, abarcados por la presente invención, tienen la función de mediar la en la translocación a través de una membrana celular desde fuera de la célula hasta el interior de la célula. Así mismo, también, éstos pueden conservar su capacidad para permitir la exportación de una proteína de la célula al medio externo. Un péptido señal putativo, puede someterse fácilmente a un test de ensayo, para esta actividad de importación, siguiendo las enseñanzas las cuales se proporcionan aquí, en este documento de solicitud de patente, incluyendo el sometimiento a un test de ensayo para la especificación para cualquier tipo de célula seleccionada.

La siguiente tabla 1, ejemplifica secuencias de aminoácidos, cada una de las cuales puede usarse como un MT (translocador de membrana). El MT de la presente invención, es un péptido señal. El péptido HIV TAT, y la proteína HSV-VP22, citados en la Tabla 1, la cual se facilita abajo, a continuación, son compuestos de referencia, y no parte del MT de la presente invención.

Tabla 1 - Secuencias de aminoácidos de algunos péptidos MT 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 (SEQ ID No. 1)	Péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi	Documento de patente estadounidense U S 5. 807. 746
TYR-GLY-ARG-LYS-LYS-ARG-ARG-GLN-ARG-ARG-ARG (SEQ ID No. 2)	Dominio de transducción de proteínas de la proteína HIV TAT	Schwarz et al. (1999), Science 285: 1569
VAL-THR-VAL-LEU-ALA-LEU-GLY-ALA-LEU-ALA-GLY-VAL-GLY-VAL-GLY (SEQ ID No. 3)	Secuencia señal de la Integrina Humana β_3	Zhang et al. (1988) PNAS 95: 9184
Proteína de 38 kDa	Proteína HSV-VP22	Phelan et al. (1998), Nature Biotechnology 16: 440
ALA-ALA-VAL-LEU-LEU-PRO-VAL-LEU-LEU-ALA-ALA-PRO (SEQ ID No. 4)	Modificada, de la región hidrofóbica de 16 residuos de la secuencia señal del factor de crecimiento de fibroplastos de Kaposi	Rojas et al (1998) Nature Biotechnology 16: 370

El MT, puede también encontrarse unido a ácidos grasos y / o ácidos biliares. Tales tipos moléculas, cuando se usan, están unidas al péptido activo, mediante un puente de aminoácidos, el cual se encuentra sujeto a segmentación, mediante proteasas, en el plasma. De una forma alternativa, el MT puede estar unido al péptido activo mediante un enlace no peptídico, en cuyo caso, la enzima in vivo, la cual segmenta o escinde el enlace, puede ser una enzima distinta de la proteasa. El puente de aminoácidos, debe ser una diana objetivizada para la segmentación, o escisión, mediante por al menos una proteasa plasmática. Las proteasas plasmáticas, así como sus secuencias objetivizadas como diana, son bien conocidas, en arte especializado de 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 ESPECÍFICA	OBSERVACIONES
Caspasa - 1	Tyr-Val-Ala-Asp-Xaa* (SEQ ID No. 5)	
Caspasa - 3	Asp-Xaa-Xaa-Asp-Xaa (SEQ ID No. 6)	
Proteína convertasa 1	Arg-(Xaa)n-Arg-Xaa (SEQ ID No. 7) n=2, 4 ó 6	n = 2, 4, ó 6
	Lys-(Xaa)n-Arg-Xaa (SEQ ID No. 8)	n = 2, 4, ó 6
	Arg-Arg-Xaa	
	Lys-Arg-Xaa	
Proteína convertasa 2	Igual que la proteína convertase 1	
Proteína convertasa 4	Glp-Arg-Thr-Lys-Arg-Xaa (SEQ ID No. 9)	
Proteína convertasa 4 PACE 4	Arg-Val-Arg-Arg-Xaa (SEQ ID No. 10)	
	Decanoil-Arg-Val-Arg-Arg-Xaa (SEQ ID No. 11)	
Prolil oligopeptidasa	Pro-Xaa	
Enzima de segmentación de la endotelina, seguido de dipeptidil-peptidasa IV	Trp-Val-Pro-Xaa (SEQ ID No. 12) Trp-Val-Ala-Xaa (SEQ ID No. 13)	
Peptidasa señal		Depende del aminoácido cercano
Neprilisina, seguido de dipeptidil-peptidasa IV	Xaa-Phe-Yaa-Xaa (SEQ ID No. 14)	Amplia especificidad, longitud máxima = 40 aminoácidos
	Xaa-Tyr-Yaa-Xaa (SEQ ID No. 15)	
	Xaa-Trp-Yaa-Xaa (SEQ ID No. 16)	
Renina, seguido de dipeptidil-peptidasa IV	Asp-Arg-Tyr-Ile-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser (SEQ ID No. 17)	Sustituto Pro ó Ala para Val & Ser
* El lado N-terminal de los aminoácidos, en negrita, es la diana específica para la segmentación de la proteasa.		

- 5 La presente invención, suprime, mediante varios mecanismos, la degradación del ingrediente activo unido a un MT mediante la proteasa que de otro modo tendería a escindir o segmentar uno o más de los enlaces peptídicos del ingrediente activo. La estructura molecular del ingrediente activo puede incluir además otros sustituyentes o modificaciones. Así, por ejemplo, la calcitonina del salmón, el cual es un agente peptídico activo preferido en la presente invención, puede amidarse en su extremo C-terminal. Ambos péptidos, los péptidos sintéticos y los
- 10 péptidos naturales pueden administrarse oralmente, en concordancia con la presente invención.

Los compuestos peptídicos activos de la presente invención incluyen, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a la insulina, a la vasopresina, a la calcitonina (la cual incluye no sólo a la calcitonina del salmón, la cual es la preferida, sino que ésta incluye, así mismo, también, a otras calcitoninas). Otros ejemplos, incluyen al péptido relacionado con el gen de calcitonina, a la hormona paratiroidea, al factor de liberación de hormona luteinizante, a la eritropoyetina, a los activadores del plasminógeno tisular, a la hormona de crecimiento humano, a la

15 adrenocorticotropina, a diversas interleucinas, a la encefalina, péptido semejante al glucagón, del tipo 1, y a todos sus análogos. Se conocen muchas otras, en el arte especializado de la técnica. Se prevé y se espera que, cuando cualquier tipo de compuesto farmacéutico, el cual tenga enlaces peptídicos, los cuales estarían sujetos a segmentación o escisión, en el tracto gastrointestinal, beneficiarían de un suministro oral, en concordancia con la presente invención, debido al hecho de la mejora de la absorción de tales tipos de compuestos, por parte del

20

intestino, acoplado con la reducción en tal tipo de segmentación o escisión, la cual se produce mediante la aplicación de las enseñanzas de la presente invención.

Los péptidos activos los cuales forman parte de la presente invención, se seleccionan de entre el péptido semejante al glucagón del tipo 1, humano, la calcitonina del salmón, la insulina, y la hormona paratiroidea humana. Cuando se utiliza calcitonina del salmón, de una forma preferible, éste comprende un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde un 0,02 por ciento, a un 0,2 por ciento, en peso con respecto al peso total de la composición farmacéutica global (excluyendo el recubrimiento entérico). La calcitonina del salmón está disponible comercialmente en el mercado (por ejemplo, de procedencia de la firma BACHEM, Torrence, California, Estados Unidos de América). De una forma alternativa, ésta puede sintetizarse mediante métodos los cuales son conocidos en el arte especializado de la técnica, algunos de los cuales se discuten brevemente, más abajo, a continuación, en este documento de solicitud de patente. Otros agentes peptídicos activos, deberían estar presentes a concentraciones más altas o más bajas, dependiendo de las concentraciones sanguíneas diana deseadas para el compuesto activo y su biodisponibilidad en el sistema de administración oral de la presente invención.

Los precursores de la calcitonina del salmón pueden prepararse mediante procedimientos de síntesis químicas o recombinantes, las cuales son conocidas en el arte especializado de la técnica. Los precursores de otros agentes péptidos activos amidados pueden prepararse de la misma manera. Se cree que la producción recombinante es significativamente más efectiva y rentable, en cuanto a lo referente a su coste. Los precursores, se convierten en la calcitonina del salmón, activa, mediante reacciones de amidación, las cuales son así mismo, también, conocidas, en el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, la amidación enzimática, se describe en la Patente de EE.UU. U S 4. 708.9 34 y en las Publicaciones de Patente Europea EP 0 308 067 y EP 0 382 403. La producción recombinante, es la que se prefiere, para ambos, el precursor y la enzima que cataliza la conversión del precursor en la calcitonina del salmón. Dicha producción recombinante se discute en Biotechnology, Vol. 11 (1993) págs. 64 - 70, que describe adicionalmente una conversión de un precursor en un producto amidado. El producto amidado el cual se describe en dicho trabajo, es idéntico a la calcitonina natural, y la calcitonina del salmón, producida mediante la utilización de una síntesis química del péptido en solución, y en fase sólida.

La unión de un MT (translocador de membrana) a un ingrediente peptídico activo puede también llevarse a cabo, así mismo, mediante síntesis químicas o recombinantes, las cuales son conocidas en el arte especializado de la técnica. Mediante el término "unión" tal como éste se usa en la presente memoria se pretende dar a entender el hecho de que, el péptido biológicamente activo, se encuentra asociado con el MT de tal manera que, cuando el MT cruza la membrana celular, el péptido activo, también se importa a través de la membrana celular. Ejemplos de tales medios de unión incluyen (A) la unión del MT al péptido activo mediante un enlace peptídico, es decir que, los dos péptidos (la parte peptídica del MT y el péptido activo) se pueden sintetizar de manera contigua; (B) enlazar el MT con el péptido activo mediante un enlace covalente no peptídico (tal como la conjugación de un péptido señal con una proteína con un reactivo de reticulación); (C) pueden utilizarse métodos o procedimientos de ligadura química, para crear un enlace o unión covalente, entre el aminoácido carboxi-terminal, de un MT, tal como el consistente en un péptido señal, y el péptido activo.

Se muestran a continuación, ejemplos del método (A), en donde, se procede a sintetizar un péptido, por mediación medios estándar, los cuales son conocidos, en el arte especializado de la técnica (véase, a dicho efecto, los trabajos de Merrifield, en J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 - 2154, 1963, y de Lin et al., en Biochemistry 27 : 5640 -5 645, 1988) y que contiene, en orden lineal, desde el extremo amino-terminal, una secuencia peptídica de señal (MT), una secuencia de aminoácidos que puede ser segmentada o escindida mediante una proteasa plasmática, y una secuencia de aminoácidos biológicamente activa. Tal tipo de péptido podría producirse así, mismo, también, mediante técnicas de ADN recombinante, expresadas a partir de una construcción recombinante que codifica los aminoácidos descritos anteriormente para crear el péptido. (Véase, a dicho Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, - Clonación molecular: Un manual de Laboratorio -, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). (nota: en este documento de solicitud de patente, se utilizarán, indistintamente, ambas siglas, para el ácido desoxirribonucleico: ADN y DNA).

Para el método (B), se puede utilizar tanto un enlace peptídico, tal como el mencionado anteriormente, arriba, como también puede utilizarse un enlace covalente no peptídico para enlazar el MT con el péptido, polipéptido o proteína biológicamente activos. Este enlace covalente no peptídico, puede formarse mediante procedimientos o métodos estándar, pertenecientes al arte especializado de la técnica, tal como, por ejemplo conjugando el MT al péptido, polipéptido o proteína, vía un reactivo de reticulación, tal como, por ejemplo, el consistente en el glutaraldehído. Tales tipos de métodos son estándar, en el arte especializado de la técnica. (Véase, por ejemplo, el trabajo de Walter et al., en Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77: 5197, 1980).

Para el método (C), pueden utilizarse métodos o procedimiento de unión química, del tipo estándar, tales como el uso de reticulantes químicos que interaccionan con el aminoácido carboxi-terminal de un péptido señal. Tales tipos de procedimientos o métodos son estándar, en el arte especializado de la técnica (véase, a dicho efecto, el trabajo de Goodfriend et al., publicado en Science 143: 1344, 1964, en el cual se usa carbodiimida soluble en agua como un reactivo de ligadura) y el cual puede llevarse a cabo, fácilmente, para ligar el extremo carboxi terminal del péptido señal a cualquier molécula biológicamente activa seleccionada.

La producción de la calcitonina del salmón recombinante (rsCT) preferida, puede llevarse a cabo, por ejemplo, produciendo un precursor de la calcitonina del salmón extendido con glicina en *E. coli*, como una proteína de fusión, soluble, mediante glutatión-S-transferasa. El precursor extendido con glicina, tiene una estructura molecular que es idéntica a la de la calcitonina del salmón activa, excepto en el extremo C-terminal (en donde, la calcitonina del salmón termina mediante -Pro-NH₂, mientras que el precursor, termina mediante-pro-gly. Una enzima α -amidante, la cual se ha descrito en las publicaciones anteriores, mencionadas anteriormente, arriba, cataliza la conversión de precursores a la calcitonina del salmón. Esta enzima, se produce, de una forma preferible, de una forma recombinante, tal como, por ejemplo, en células del Ovario del Hámster Chino (CHO)), tal y como se describe en el artículo de Biotechnology, citado anteriormente, arriba. Otros precursores de otros péptidos amidados pueden producirse de manera similar. Los péptidos que no requieren amidación u otras funcionalidades adicionales también se pueden producir de la misma manera. Se encuentran comercialmente disponibles, en el mercado, otros agentes peptídicos activos, o bien, éstos pueden producirse mediante técnicas las cuales son conocidas en el arte especializado de la técnica.

El agente reductor del valor pH y el inhibidor de la proteasa

La cantidad total del compuesto que reduce el valor pH, a ser administrado con cada administración de la calcitonina del salmón, debe ser, de una forma preferible, una cantidad, la cual, cuando ésta se libera en el intestino, sea suficiente como para disminuir el valor pH intestinal local, de una forma sustancial, a un valor el cual se encuentre por debajo del valor pH óptimo para las proteasas, las cuales se encuentran allí. La cantidad requerida, variará, necesariamente, en dependencia de varios factores, factores éstos, los cuales incluyen al tipo de agente de reducción del valor pH, el cual se utilice (que se discutirá a continuación, más abajo), y los equivalentes de protones proporcionados por parte de un agente de reducción del valor pH dado. En la práctica, la cantidad requerida para proporcionar una buena biodisponibilidad es una cantidad, la cual, cuando ésta se añade a una solución de 10 mililitros de bicarbonato sódico 0,1 M, reduce el valor pH de la solución de bicarbonato sódico en cuestión, a un valor pH de no más de 5,5, reduciéndolo de una forma preferible, a un valor de no más 4,7, y de una forma mayormente preferible, a un valor no superior a 3,5. En algunas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, se puede utilizar una cantidad suficiente de ácido, como para reducir el valor pH, en el test de ensayo anterior, a un valor de aproximadamente 2.8. De una forma preferible, se procede a utilizar una cantidad de por lo menos 300 miligramos del agente reductor del pH, en la composición farmacéutica de la invención, utilizándose, de una forma más preferible, una cantidad de por lo menos 400 miligramos del agente reductor del pH, en la composición farmacéutica de la invención. Las cantidades preferidas del agente reductor del valor pH, en la composición farmacéutica de la presente invención, las cuales se han citado anteriormente, se refieren al peso total combinado de todos los agentes reductores del valor pH, en los que se utilizan dos o más de tales agentes en combinación. La formulación oral no debe incluir una cantidad de cualquier base, la cual, cuando se liberara conjuntamente con el compuesto que reduce el valor pH, evitaría el hecho de que el valor pH del test de ensayo del bicarbonato sódico, el cual se ha descrito anteriormente, arriba, se redujera a un valor de 5,5 ó inferior.

El agente reductor del valor pH, de la invención, puede tratarse de cualquier compuesto farmacéuticamente aceptable, el cual no sea tóxico en el tracto gastrointestinal y que sea capaz de suministrar iones de hidrógeno (un ácido tradicional) o de inducir un mayor contenido de iones de hidrógeno del entorno medioambiental local. Éste puede tratarse, así mismo, también, de cualquier combinación de entre tales compuestos farmacéuticamente aceptables. Se prefiere el hecho de que, por lo menos un agente reductor del pH usado, en concordancia con la presente la invención, tenga un valor de pKa, el cual no sea superior a 4,2, y de una forma preferible, el cual no sea superior a 3,0. También se prefiere, así mismo, el hecho de que, el agente reductor del valor pH tenga una solubilidad en agua, de por lo menos 30 gramos por 100 mililitros de agua, a temperatura ambiente.

Los ejemplos de los compuestos que inducen un mayor contenido de iones de hidrógeno, incluyen al cloruro de aluminio y al cloruro de cinc. Los ácidos tradicionales farmacéuticamente aceptables incluyen, si bien no de una forma limitativo en cuanto a éstos, a los sales ácidos de aminoácidos (tales como, por ejemplo, los hidroclouros de aminoácidos) o a los derivados de los mismos. Los ejemplos de éstos, son sales ácidas del ácido acetilglutámico, de la alanina, de la arginina, de la asparagina, del ácido aspártico, de la betaína, de la carnitina, de la carnosina, de la citrulina, de la creatina, del ácido glutámico, de la glicina, de la histidina, de la hidroxilisina, de la hidroxiprolina, de la hipotaurina, de la isoleucina, de la leucina, de la lisina, de la metilhistidina, de la Norleucina, de la ornitina, de la fenilalanina, de la prolina, de la sarcosina, de la serina, de la taurina, de la treonina, de triptófano, de la tirosina y de la valina.

Otros ejemplos de compuestos útiles para reducir el valor pH, incluyen a los ácidos carboxílicos tales como el ácido acetilsalicílico, el ácido acético, el ácido ascórbico, el ácido cítrico, el ácido fumárico, el ácido glucurónico, el ácido glutárico, el ácido glicérico, el ácido glicocólico, el ácido glioxílico, el ácido isocítrico, el ácido isovalérico, el ácido láctico, el ácido maleico, el ácido oxaloacético, el ácido oxalosuccínico, el ácido propiónico, el ácido pirúvico, el ácido succínico, el ácido Tartárico, el ácido valérico.

Otros agentes de reducción del valor pH, los cuales son de utilidad, y que no suelen denominarse "ácidos" en el arte especializado de la técnica, pero que pueden ser útiles en concordancia con la presente invención son los ésteres de fosfato (tales como, por ejemplo, la fructosa 1, 6 difosfato, la glucosa 1, 6 difosfato, el ácido fosfoglicérico, y el

ácido difosfoglicérico). CARBOPOL[®] (marca registrada de la firma, BF Goodrich) y polímeros tales como el policarbófilo, pueden así mismo utilizar, también, para reducir el valor pH.

Se puede usar cualquier combinación de agente reductor del valor pH, mediante el cual pueda conseguirse el nivel de valor pH requerido, correspondiente a un nivel no superior a un valor de 5,5 en el test de ensayo de, bicarbonato sódico, el cual se ha discutido anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente. Una forma preferida de presentación, en concordancia con la presente invención, como al menos uno de los agentes reductores del valor pH de la composición farmacéutica, un ácido seleccionado de entre el grupo que consiste en el ácido cítrico, el ácido tartárico y una sal de ácido de un aminoácido.

Cuando la calcitonina del salmón es el agente peptídico activo, entonces, ciertos valores de relación o cociente del agente reductor del valor pH, con respecto a la calcitonina del salmón, han demostrado ser especialmente eficaces. Se prefiere el hecho de que, el factor de relación, en peso, del agente reductor del valor pH, con respecto a la calcitonina del salmón, exceda de un valor de 200: 1, de una forma preferible, que éste exceda de un valor de 800: 1 y de una forma mayormente preferible, que éste exceda de un valor de 2000: 1.

Una alternativa o un complemento al uso de agentes reductores del valor pH, es el uso de inhibidores de proteasa, de una forma particular, de inhibidores de proteasas intestinales. La siguiente Tabla 3 ilustra algunas de las proteasas intestinales conocidas.

Tabla 3 - Proteasas intestinales y sus dianas específicas

PROTEASA	SITIO OBJETIVIZADO COMO DIANA	VALOR PH ÓPTIMO	OBSERVACIONES
Tripsina	Lys-Xaa	8	
	Arg-Xaa		
Quimiotripsina	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	7,9 – 8,0	
	Phe-Arg-Xaa		Preferida
	Leu-Arg-Xaa		Preferida
Carboxipeptidasa	Phe-Arg-Xaa	7,0 - 9,0	Del extremo C-terminal

Ingredientes opcionales - El mejorador de la absorción

Cuando se usan, los mejoradores de la absorción se encuentran presentes, de una forma preferible presentes, en una cantidad la cual constituye un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde un 0,1 por ciento hasta un a 20,0 por ciento, en peso, con relación al peso total de la composición farmacéutica (excluyendo el revestimiento entérico). Los mejoradores de la absorción preferidos, son agentes tensioactivos que actúan tanto como potenciadores de la solubilidad como intensificadores de la captación. En términos genéricos, los "potenciadores de la solubilidad" mejoran la capacidad de los componentes de la invención de ser solubilizados, tanto en el entorno medioambiental acuoso en el que éstos se liberan originalmente, como en el entorno

medioambiental lipófilo de la capa de moco, mediante la cual se encuentran revestidas las paredes intestinales, o bien, ambas a la vez. Los “mejoradores del transporte (de captación)”, (los cuales de una forma frecuente, son los mismos agentes tensioactivos los cuales se utilizan como como potenciadores de la solubilidad) son aquéllos que facilitan la facilidad con la que los agentes peptídicos atraviesan la pared intestinal.

Uno o más intensificadores o potenciadores de la absorción, pueden realizar una sola función (tal como, por ejemplo, la de la solubilidad), o bien, uno o más intensificadores o potenciadores de la absorción, pueden realizar únicamente la otra función (tal como, por ejemplo, la de la captación), en el ámbito de la presente invención. Es así mismo posible, también, el tener una mezcla de varios compuestos, algunos de los cuales proporcionen una solubilidad mejorada, algunos de los cuales, proporcionen una captación mejorada y / o algunos de los cuales proporcionen ambas. Sin pretender ligarlo a ninguna teoría, se cree que, los potenciadores de la captación pueden actuar mediante (1), el aumento del desorden o trastorno de la región hidrofóbica de la membrana exterior de las células intestinales, lo cual permite un transporte transcelular incrementado; o bien (2), la lixiviación de proteínas membranas, lo cual tiene como resultado un transporte transcelular incrementado; o bien (3), la ampliación del radio de poro entre las células para incrementar el transporte paracelular.

Se cree que, los agentes tensioactivos, son útiles tanto como intensificadores de la solubilidad como, como potenciadores de la captación. Así, por ejemplo, los detergentes, son útiles en (1) solubilizar todos los componentes activos rápidamente en el entorno medioambiental acuoso, en el cual éstos se liberan originalmente, (2) potenciar la lipofilicidad de los componentes de la invención, especialmente el agente peptídico activo, ayudando a su paso en el interior y a través del moco intestinal, (3) aumentar la capacidad del agente péptido activo, normalmente polar, de cruzar la barrera epitelial de la membrana del borde en cepillo; y (4) aumentar el transporte transcelular o paracelular, tal como se ha descrito anteriormente, arriba.

Cuando se usan agentes tensioactivos como potenciadores o intensificadores de la absorción, se prefiere entonces el hecho de que, éstos sean material en polvo de libre flujo, con objeto de facilitar la mezcla y la carga de las cápsulas durante el proceso de fabricación. Debido a las características inherentes de la calcitonina del salmón y de otros péptidos (tales como, por ejemplo, las consistentes en su punto isoeléctrico, en su peso molecular, en la composición de aminoácidos, etc.), ciertos agentes activos de superficie o tensioactivos, interactúan de una forma mejor con ciertos péptidos. De hecho, algunos de éstos, pueden interactuar de una forma no deseable, con las porciones cargadas de la calcitonina del salmón y evitar su absorción, dando ello como resultado una biodisponibilidad disminuida. Cuando se intenta aumentar la biodisponibilidad de la calcitonina del salmón o de otros péptidos, se prefiere, entonces, el hecho de que cualquier agente activo de superficie (tensioactivo) el cual se pretenda utilizar como potenciador de la absorción, se seleccione de entre el grupo que consiste en, (i) agentes tensioactivos aniónicos, los cuales sean derivados del colesterol (tales como, por ejemplo, por ejemplo ácidos biliares), (ii) Agentes de superficie (tensioactivos) catiónicos (tales como, por ejemplo, los consistentes en las carnitinas de acilo, en los fosfolípidos y similares), (iii) agentes tensioactivos no iónicos, y (iv) mezclas de agentes tensioactivos aniónicos (especialmente aquéllos los cuales tienen regiones de hidrocarburos, lineales) conjuntamente con neutralizantes de carga negativa. Los neutralizantes de carga negativa, incluyen, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a la acilcarnitinas, al cloruro de cetilpiridinio, y similares. También se prefiere, así mismo, el hecho de que, el potenciador de la absorción sea soluble a un valor pH ácido, particularmente, a un valor pH correspondiente a un intervalo comprendido dentro de unos márgenes los cuales vayan de 3,0 a 5,0.

Una combinación especialmente preferida que ha funcionado bien con la calcitonina del salmón, mezcla agentes tensioactivos catiónicos con agentes tensioactivos aniónicos, los cuales son derivados de colesterol, siendo ambos solubles a pH ácido.

Una combinación particularmente preferida es un ácido biliar soluble en ácido conjuntamente con un agente tensioactivo catiónico. Una acilcarnitina y un éster de sacarosa, resulta ser una buena combinación. Cuando se utiliza un potenciador de la absorción particular, solo, se prefiere el hecho de que, éste, sea un agente tensioactivo catiónico. Las acilcarnitinas (tales como, por ejemplo, la lauroilcarnitina), los fosfolípidos y los ácidos biliares, son particularmente buenos potenciadores de la absorción, especialmente la acilcarnitina. Los tensioactivos aniónicos que son derivados del colesterol, se también se usan en algunas formas de realización. Se pretende, mediante estas preferencias, el hecho de evitar las interacciones con el agente peptídico que interfieren con la absorción del agente peptídico al interior de la sangre.

Para reducir la probabilidad de que acontezcan efectos secundarios, los detergentes preferidos, cuando éstos se usan como los potenciadores de la absorción de la invención, éstos son biodegradables o reabsorbibles (tal como, por ejemplo, los compuestos biológicamente reciclables tales como los ácidos biliares, los fosfolípidos y / o las acilcarnitinas), de una forma preferible, del tipo biodegradables. Se cree que, las acilcarnitinas, son particularmente útiles para mejorar el transporte paracelular. Cuando se procede a utilizar un ácido biliar (u otro detergente aniónico el cual carezca de hidrocarburos lineales), en combinación con un detergente catiónico, entonces, la calcitonina del salmón, se transporta mejor, tanto hacia la pared intestinal, como también a través de ella.

Los mejoradores de la absorción preferidos incluyen: (a) a los salicilatos tales como los consistentes en el salicilato de sodio, el 3 - metoxisalicilato, el 5 - metoxisalicilato y el homovanilato; (b) los ácidos biliares, tales como los

consistentes en el ácido taurocólico, en el ácido taurodesoxicólico, en el ácido desoxicólico, en el ácido cólico, en el ácido glicólico, en el litocolato, en el ácido quenodesoxicólico, en el ácido ursodesoxicólico, en el ácido ursochólico, en el ácido deshdrocólico, en el ácido fusídico, etc. ; (C) en los tensioactivos no iónicos tales como los consistentes en los éteres de polioxietileno (tales como, por ejemplo. Los consistentes en los Brij 36T, Brij 52, Brij 56, Brij 76, Brij 96, Texaphor A6, Texaphor A14, Texaphor A60, etc.), los p-t-octilfenolpolioxietilenos (Triton X-45, Triton X-100, Triton X-114, Triton X-305, etc.), los nonilfenoxipolioxietilenos, (tales como, por ejemplo, el Igepal de la serie CO), los ésteres de polioxietilensorbitán (tales como, por ejemplo, el Tween-20, el Tween-80, etc.); d) los tensioactivos aniónicos tales como el sulfosuccinato sódico de dioctilo; (e) los lisofosfolípidos tales como los consistentes en la lisolecitina y en la lisofosfatidiletanolamina; (f) las acilcarnitinas, la acilcolinas y los acilaminoácidos tales como lauroilcarnitina, la miristoilcarnitina, la palmitoilcarnitina, la lauroilcolina, la miristoilcolina, la palmitoilcolina, la hexadecilisina, la N-acilfenilalanina, la N-acilglicina, etc. ; g) los fosfolípidos solubles en agua; (h) los glicéridos de cadena media los cuales sean mezclas de mono-, di- y triglicéridos que contengan ácidos grasos de cadena media (ácidos caprílico, cáprico y láurico); (i) el ácido etilendiaminotetraacético; (j) los tensioactivos catiónicos tales como el cloruro de cetilpiridinio; (k) los derivados de ácidos grasos de polietilenglicol tales como los consistentes en el Labrasol, el Labrafac, etc. ; y (1) los alquilsacáridos tales como la laurilmaltosida, la lauroilsacarosa, la miristoil sacarosa, la palmitoil sacarosa, etc.

En algunas formas preferidas de presentación, y sin pretender ligarlo a ninguna teoría, se incluyen agentes de intercambio iónico, catiónicos (tales como, por ejemplo, los consistentes en los detergentes), para proporcionar una mejora o potenciación de la solubilidad mediante otro mecanismo posible. En particular, éstos pueden prevenir o evitar la unión de la calcitonina del salmón u otros agentes peptídicos activos, al moco. Los agentes de intercambio iónico catiónicos preferidos incluyen al cloruro de protamina o a cualquier otro polication.

Otros ingredientes opcionales

Se prefiere que una barrera soluble en agua separe los inhibidores de la proteasa y / o el agente reductor del pH del vehículo protector resistente a los ácidos. Se puede usar una cápsula farmacéutica convencional con el fin de proporcionar esta barrera. Muchas barreras solubles en agua son conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, la hidroxipropilmetilcelulosa y las gelatinas farmacéuticas convencionales.

En algunas formas preferidas de presentación, en concordancia con la presente invención, se procede a la inclusión de otro péptido (tal como por ejemplo, el consistente en la albúmina, en la caseína, en la proteína de soja, en otras proteínas animales o vegetales, y similares) para reducir la adsorción no específica (tal como, por ejemplo, la unión del péptido a la barrera del moco intestinal) disminuyendo así, de este modo, la concentración necesaria del costoso agente péptido activo. Cuando se procede a añadir el péptido, entonces, la cantidad de péptido a añadir, será, de una forma preferible, la correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde un 1,0 por ciento, en peso, hasta un 10,0 por ciento, en peso, con relación al peso de la composición farmacéutica global (con exclusión del vehículo protector). De una forma preferible, este segundo péptido, no es fisiológicamente activo y, de una forma mayormente preferible, éste se trata de un péptido alimenticio, tal como el consistente en un péptido de semilla de soja, o similar. Sin pretender ligarlo a ninguna teoría, este segundo péptido, también puede aumentar, así mismo, la biodisponibilidad, actuando como un secuestrante de proteasa el cual, de una forma deseable, compite con el agente peptídico activo, para la interacción de la proteasa. El segundo péptido también puede ayudar, así mismo, al paso del compuesto activo, a través del hígado.

Todas las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir, de una forma opcional, así mismo, también diluyentes farmacéuticos comunes, agentes deslizantes, lubricantes, cápsulas de gelatina, conservantes, colorantes y similares, en sus tamaños usuales conocidos y en las cantidades usuales conocidas.

El vehículo protector

Cualquier portador o soporte, o vehículo, el cual protege a la calcitonina del salmón, de las proteasas del estómago y que luego se disuelve, para que los otros ingredientes de la invención puedan liberarse en el intestino, puede ser apropiado. Muchos de tales tipos de recubrimientos entéricos, son conocidos, en el arte especializado de la técnica y éstos son de utilidad, en concordancia con la presente invención. Los ejemplos de éstos, incluyen al acetato-ftalato de celulosa, al succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, al ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, a la carboxilmetilcelulos y al copolímero de ácido metacrílico - metacrilato de metilo. En algunas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, el péptido activo, los potenciadores de la absorción tales como potenciadores de la solubilidad y / o de la absorción y el compuesto o compuestos que reducen el valor pH, se incluyen en un jarabe protector el cual sea lo suficientemente viscoso como para permitir el paso protegido de los componentes de la invención a través el estómago.

Los revestimientos entéricos los cuales son adecuados para proteger al agente peptídico, de las proteasas estomacales, se pueden aplicar, por ejemplo, a las cápsulas, después de que los componentes restantes de la invención, se hayan cargado dentro de la cápsula en cuestión. En otras formas de presentación, en concordancia con la presente invención, el recubrimiento entérico, se recubre sobre la parte exterior de una tableta, o éste se recubre sobre la superficie exterior de las partículas de los componentes activos, los que se comprimen a

continuación, en forma de tabletas, o se cargan en una cápsula la cual, de una forma preferible, está recubierta, en sí misma, mediante un revestimiento entérico.

Es altamente deseable el hecho de que, todos los componentes de la invención, se liberen del portador o soporte, o vehículo y que éstos se solubilizan en el entorno medioambiental intestinal, de una forma tan simultánea como sea posible. Se prefiere el hecho de que, el portador o soporte, o vehículo, libere los componentes activos en el intestino delgado, en donde, los potenciadores de la captación los cuales aumentan el transporte transcelular o paracelular son menos propensos a causar efectos secundarios no deseables, en comparación con el hecho de que si los mismos potenciadores de la captación, se liberaran más tarde en el colon. Sin embargo, no obstante, se hace hincapié en que, la presente invención, se cree eficaz, tanto en el colon, como en el intestino delgado. Numerosos portadores o soportes, o vehículos, además de los que se han discutido anteriormente, arriba, son conocidos, en arte especializado de la técnica. Es deseable (especialmente en la optimización de cómo se liberan, de una forma simultánea, los componentes de la invención) el proceder a mantener baja, la cantidad de revestimiento entérico. De una forma preferible, el recubrimiento entérico, añade una cantidad correspondiente a un porcentaje de no más del 30 %, al peso del resto de la composición farmacéutica (siendo el "resto" la composición farmacéutica, exclusiva del recubrimiento entérico). De una forma mayormente preferible, el recubrimiento entérico, añade una cantidad correspondiente a un porcentaje de menos del 20 %, añadiendo, especialmente una cantidad correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes los cuales van desde un 12 % hasta un 20%, al peso de la composición sin recubrir. El revestimiento entérico, de una forma preferible, debería ser suficiente como para prevenir o evitar la descomposición de la composición farmacéutica de la invención en HCl 0,1 N, durante un transcurso de tiempo de por lo menos dos horas, y después, capaz de permitir la liberación completa de todos los contenidos de la composición farmacéutica dentro de un transcurso de tiempo de treinta minutos, después de que el valor pH se haya eleva a un valor de 6,3, en un baño de disolución en el que, dicha composición, se haga girar a una velocidad angular de 100 r. p. m. (revoluciones por minuto)

Otras Preferencias

Se prefiere el hecho de que, el factor de relación, en peso del agente o agentes reductores del valor pH y / o de los inhibidores de proteasa, con respecto al potenciador o potenciadores de la absorción, cuando éstos se encuentren presente, sea el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 3 : 1 y 20 : 1, siendo éste, de una forma preferible, el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 4 : 1 – 12 : 1 y de una forma mayormente preferible, el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 5 : 1 - 10 : 1. El peso total de todos los agentes reductores del valor pH y / o de los inhibidores de la proteasa, y el peso total de todos los potenciadores de la absorción, en una composición farmacéutica dada, se incluye en las proporciones preferidas anteriores. Así, por ejemplo, si una composición farmacéutica incluye dos agentes reductores del valor pH y tres potenciadores de la absorción, entonces, los factores o cocientes de relación anteriores, se calcularán en base al peso combinado total de ambos agentes reductores del valor pH, y al peso combinado total de la totalidad de los tres potenciadores de la absorción.

Se prefiere el hecho de que, el agente reductor del valor pH y / o el inhibidor de la proteasa, el agente peptídico activo, y el potenciador de la absorción, cuando éstos se encuentren presentes (bien ya sea compuestos individuales o bien ya sea una pluralidad de compuestos en cada categoría), éstos se dispersen de una forma en uniforme, en la composición farmacéutica. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la composición farmacéutica, comprende gránulos que incluyen un aglutinante farmacéutico que tiene el agente peptídico activo, el agente reductor del valor pH, y el potenciador de la absorción, uniformemente dispersados, en dicho aglutinante. Los gránulos preferidos, pueden consistir así mismo, también, en un núcleo ácido, rodeado por una capa uniforme de ácido orgánico, una capa de potenciador y una capa de péptido que está rodeada por una capa externa de ácido orgánico. Los gránulos en cuestión, se pueden preparar a partir de una mezcla acuosa, la cual consista en aglutinantes farmacéuticos tales como los consistentes en la polivinilpirrolidona o la hidroxipropilmetilcelulosa, conjuntamente con los agentes reductores del valor pH, los potenciadores o mejoradores de la absorción, y los agentes peptídicos activos.

Proceso de fabricación

Una composición farmacéutica preferida de la invención incluye una cápsula de gelatina de tamaño 00 rellena con 0,25 mg de calcitonina del salmón unida a un MT (translocador de membrana), 400 mg de ácido cítrico granular (el cual se encuentra comercialmente disponible en el mercado, de procedencia de, por ejemplo, la firma Archer Daniels Midland Corp.), 50 mg de ácido taurodesoxicólico (el cual se encuentra comercialmente disponible en el mercado, de procedencia de, por ejemplo, la firma SIGMA), 50 mg de lauroilcarnitina (cual se encuentra comercialmente disponible en el mercado, de procedencia de, por ejemplo, la firma SIGMA).

La totalidad de los ingredientes son, de una forma preferible, para su eventual inserción, en la cápsula de gelatina, y éstos son, de una forma preferible, materias en polvo, las cuales pueden añadirse a una mezcladora en cualquier orden que se desee. A continuación, se hace funcionar la mezcladora, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente tres minutos, hasta que, las materias en polvo, se hayan mezclado completamente, a fondo. Subsiguientemente, a continuación, las materias en polvo mezcladas, se cargan en el extremo grande de las

cápsulas de gelatina. Después se procede a añadir el otro extremo de la cápsula y ésta se cierra herméticamente, de golpe. Puede procederse a añadir 500 unidades de tales tipos de cápsulas, o una cantidad mayor de éstas, a un dispositivo de aplicación del revestimiento (tal como, por ejemplo, el consistente en dispositivo del tipo Vector LDCS 20 / 30 Laboratory Development Coating System – Sistema de desarrollo de recubrimiento, de laboratorio - (comercialmente disponible, en el mercado, de procedencia de la firma Vector Corp., Marion, Iowa)).

Se prepara una solución de revestimiento entérico, como sigue. Se procede a pesar 500 gramos de EUDRAGIT L30 D-55 (compuesto éste, el cual se trata de un copolímero de ácido metacrílico con éster metílico del ácido metacrílico, un recubrimiento entérico éste, el cual se encuentra comercialmente disponible en el mercado, de procedencia de la firma ROHM Tech Inc., Maidan, Mass.). A continuación, se procede a añadir 411 gramos de agua destilada, 15 gramos de citrato de trietilo y 38 gramos de talco. Esta cantidad de revestimiento será suficiente para recubrir aproximadamente 500 cápsulas de tamaño 00.

Las cápsulas, se pesan y se colocan en el tambor de la máquina de revestimiento. La máquina, se pone en marcha, para hacer girar el tambor (el cual, ahora, contiene cápsulas) a una velocidad angular de 24 - 28 r. p. m. (revoluciones por minutos). La temperatura del pulverizador de entrada es, de una forma preferible, de aproximadamente 45 °C. Las temperaturas de escape son, de una forma preferible, de aproximadamente 30 °C. La temperatura de la cápsula no recubierta es, de una forma preferible, de aproximadamente 25 °C. El flujo de aire es de unos 38 pies cúbicos por minuto.

Se procede, a continuación, a insertar un tubo, procedente de la máquina, al interior de la solución de revestimiento, preparada de la forma la cual se ha discutido anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente. A continuación, se procede a activar la bomba, para introducir la solución en el dispositivo de revestimiento. Subsiguientemente, el revestimiento, acontece de una forma automática. La máquina se puede parar en cualquier momento, con objeto de proceder a pesar las cápsulas, para determinar si la cantidad de recubrimiento, es suficiente. Por lo general, se deja que el recubrimiento continúe durante un transcurso de tiempo de 60 minutos. La bomba se apaga después, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente cinco minutos, mientras la máquina sigue funcionando, para ayudar a secar las cápsulas recubiertas. La máquina puede entonces apagarse. El recubrimiento de la cápsula, es entonces completo, si bien, no obstante, se recomienda que las cápsulas se sequen al aire durante, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente dos días.

Debido a la mayor biodisponibilidad proporcionada por la presente invención, la concentración de calcitonina del salmón, de alto coste, en la preparación farmacéutica de la invención, puede mantenerse relativamente baja. Los ejemplos específicos de formulación se exponen en los ejemplos los cuales se facilitan más abajo, a continuación, en este documento de solicitud de patente.

Tratamiento de pacientes

Cuando se elige la calcitonina del salmón, como ingrediente activo, para el tratamiento de la osteoporosis, se recomienda la administración periódica. La calcitonina del salmón, se metaboliza rápidamente con una vida media de sólo 20 - 40 minutos, después de la administración subcutánea en el hombre. Sin embargo, no obstante, su efecto beneficioso sobre los osteoclastos, es mucho más duradero, y éste puede durar más de 24 horas, a pesar de la rápida disminución de los niveles sanguíneos. Normalmente, no hay niveles de sangre detectables más de dos horas después de la inyección de calcitonina del salmón, a dosis convencionales. Así, por consiguiente, se prefiere la administración periódica de una dosis, a razón de aproximadamente 5 días por semana. La administración subcutánea de la calcitonina del salmón (100 unidades internacionales) ha dado como resultado, con frecuencia, una concentración sérica máxima de aproximadamente 250 picogramos por mililitro. La calcitonina del salmón administrada por vía nasal (200 unidades internacionales) ha demostrado ser eficaz contra la osteoporosis, a niveles máximos tan bajos como los consistentes en 10 picogramos por mililitro. Algunos pacientes, informan sobre algún trastorno gastrointestinal, a unos altos niveles pico (tal como, por ejemplo, a 200 picogramos o por encima de 200 ml). Así, por consiguiente, se prefiere el hecho de que, la calcitonina del salmón, en suero, tenga un valor pico correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 10 picogramos por mililitro y los 150 picogramos por mililitro, prefiriéndose, de una forma mayormente preferible, el hecho de que, la calcitonina del salmón, en suero, tenga un valor pico correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 10 picogramos por mililitro y los 50 picogramos por mililitro. Los niveles séricos se pueden medir mediante técnicas de radioinmunoensayo, las cuales son bien conocidas en el arte especializado de la técnica. El médico tratante puede supervisar y controlar la respuesta del paciente, los niveles sanguíneos de la calcitonina del salmón o los marcadores sustitutivos de la enfermedad ósea (tal como la piridinolina urinaria o la desoxipiridinolina), especialmente, durante la fase inicial del tratamiento (1 - 6 meses). A continuación, éste puede proceder a modificar la dosis, ligeramente, con objeto de poder tener en cuenta el metabolismo y la respuesta individual del paciente.

La biodisponibilidad susceptible de poderse alcanzar, en concordancia con la presente invención, permite la liberación oral de la calcitonina del salmón, en la sangre, en los niveles de concentración preferidos, los cuales se han identificado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, mientras que se usan solamente 10 - 1000 microgramos de calcitonina del salmón por cápsula, de una forma preferible 10 - 400 microgramos, de una forma especial, una cantidad comprendida dentro de unos márgenes situados entre los 10 y los 200 microgramos.

Se prefiere el hecho de utilizar una sola cápsula en cada administración, debido al hecho de que, una sola cápsula, proporciona, de la mejor forma, la liberación simultánea del polipéptido, del agente reductor del valor pH y de los potenciadores de la absorción. Este hecho, es altamente deseable, debido al hecho de que, el ácido, es más capaz de reducir el ataque proteolítico no deseable, en el polipéptido, cuando el ácido se libera en proximidad inmediata, en el tiempo, a la liberación del polipéptido. Se consigue una liberación casi simultánea, de la mejor forma, procediendo a administrar todos los componentes de la invención como una sola píldora o cápsula individual. Sin embargo, no obstante, la invención, también incluye, así mismo, por ejemplo, dividir la cantidad requerida de ácido y de potenciadores, cuando éstos se usan, entre dos o más cápsulas, las cuales se pueden administrar conjuntamente de manera que, conjuntamente, éstos proporcionen la cantidad necesaria de todos los ingredientes. "Composición farmacéutica", tal y como este término se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, incluye una dosificación completa, apropiada, para una administración particular, a un paciente humano, independiente de cómo se subdivide ésta, siempre y cuando ésta sea para una administración substancialmente simultánea.

Ejemplo 1 - Preparación de un péptido de fusión purificado de la calcitonina del salmón (sCT) y translocador de membrana, segmentable mediante enzima (MT)

1. Construcción del péptido de fusión de la calcitonina del salmón (SCT) y del Translocador de Membrana segmentable mediante enzima (MT)

Se utilizó una secuencia de translocador de membrana correspondiente al Dominio de Transducción de Proteínas de la proteína HIV TAT. La secuencia de aminoácidos de este MT es la siguiente:

TYR-GLY-ARG-LYS-LYS-ARG-ARG-GLN-ARG-ARG-ARG (SEQ ID No. 18).

Aguas abajo de esta secuencia MT, se encuentra la secuencia escindible (segmentable) mediante enzima, TRP-VAL-ALA. Ésta viene seguida por la secuencia de 33 aminoácidos para sCT-Gly:

CYS-SER-ASN-LEU-SER-THR-CYS-VAL-LEU-GLY-LYS-LEU-SER-GLN-
GLU-LEU-HIS-LYS-LEU-GLN-THR-TYR-PRO-ARG-THR-ASN-THR-GLY-
SER-GLY-THR-PRO-GLY (SEQ ID No. 19)

La secuencia de fusión resultante, se muestra abajo, a continuación, de una forma esquemática.



La secuencia TRP-VAL-ALA, es susceptible de poderse segmentar o escindir mediante enzimas, en primer lugar mediante la enzima de conversión de la endotelina, entre TRP y VAL, y la secuencia VAL-ALA-sCT-Gly, es susceptible de poderse segmentar o escindir, mediante la dipeptidil-peptidasa IV, para liberar la sCT-Gly auténtica.

La secuencia de DNA para esta fusión, se ensambló de la forma la cual se muestra abajo, a continuación:

Se producen dos oligonucleótidos sintéticos:

Oligo 1 (+) 57:

5' -CCTACGGTCGTAAAAACGTCGTCAGCGTCGTCGTTGGGTTGCGTGTTCTAACT
TGT-3' (SEQ ID No. 20)

Oligo 2 (-) 59:

5' -AGACAAGTTAGAACACGCAACCCAACGACGACGCTGACGACGTTTTTTACGAC
CGTAGG-3' (SEQ ID No. 21)

Los oligonucleótidos 1 y 2 codifican la secuencia MT más un aminoácido en el extremo 5', para la ligadura en el vector apropiado, la secuencia escindible por enzima y los primeros 4 aminoácidos de la secuencia sCT-Gly (CYS-SER-ASN-LEU) (SEC ID N° 22). El oligonucleótido de cadena negativa se fosforiló en el extremo 5'. La secuencia

de ADN de doble hebra, se ensambló mediante recocido y ligadura de las secuencias Oligo1 y Oligo 2. El saliente formado en el extremo 3', proporcionó un Ace I compatible con el final adherente.

El gen para sCT-Gly se obtuvo mediante la amplificación por PCR de la región apropiada del plásmido psCT025, el cual se trata de un plásmido de expresión previamente construido, el cual contiene el gen sCT (véase, a dicho efecto, la Figura 3), o de cualquier otra fuente adecuada del gen sCT. Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR, generaron un fragmento amplificado de 125 pb, el cual contenía el gen sCT completo. La amplificación por PCR, se realizó utilizando un equipo comercialmente disponible en el mercado, de procedencia de la Boehringer Mannheim. El ciclado de la PCR, se realizó de la siguiente manera:

94 ° C - 2 minutos - 1 ciclo
94 ° C - 30 seg. - 45 ° C - 1 min. - 68 ° C - 1 min. - 5 ciclos
94 ° C - 30 seg. - 65 ° C - 1 min. - 68 ° C - 1 min. - 25 ciclos
68 ° C - 5 min. - 1 ciclo
4 ° C – empapado.

El cebador 5'-PCR contiene un sitio Ace I, y el cebador 3' contiene un sitio Nco I. El fragmento de PCR de 125 pb se digirió con Ace I y, el fragmento resultante de 100 pb se aisló a partir de un gel de agarosa y éste se cuantificó. El fragmento de ADN de doble hebra formado por la ligadura de los oligos 1 y 2 entonces, éste se ligó al fragmento de PCR de 100 pb en el sitio común Ace I. El producto de esta ligadura, se digirió con Nco I. La secuencia resultante de ADN de 150 pb tenía un extremo 5' embotado o romo, y un extremo 3' compatible con Nco I. Este fragmento de ADN, denominado MT3sCT01, se purificó en gel y se procedió a su cuantificación.

2. Clonación del MT3sCT01 en el vector de secreción universal pUSEC-05.

El vector de clonación universal pUSEC-05 (Figura 1), contiene promotores duales de Tac y Lac, seguidos por una secuencia de Shine-Delgarno y la secuencia para el péptido señal omp A. A continuación de la señal omp A se encuentran sitios de clonación para las Stu I, Nco I y Sty I. El pUSEC-05 se linealizó mediante la digestión con Stu I y Nco I y la secuencia de MT3sCT01, se ligó en el vector de extremos embotados o romos en el extremo 5' y El sitio Nco I en el extremo 3' para crear el plásmido pMT3sCT01 (Figura 2). El plásmido MT3sCT01 se caracterizó por mapeo de digestión por restricción y secuenciación, para confirmar la presencia de todos los genes relevantes y de la secuencia del fragmento de ADN clonado.

Este plásmido se usó para transformar la cepa huésped de E. coli BLR, para crear la cepa de expresión recombinante UGL286.

3. Clonación de MT3sCT01 en el vector de secreción universal pUSEC-06.

El vector de clonación universal pUSEC-06 (Figura 4), contiene promotores de Tac y Lac, seguido de una secuencia de Shine-Delgarno y la secuencia para el péptido señal ompA. El Sitio de Clonación Múltiple [MCS] del vector del plásmido pUSEC06 contiene los sitios de enzima de restricción para BspEI y AscI. El pUSEC-06 se linealizó por digestión con estas enzimas, creando extremos adhesivos para la ligación direccional. El plásmido, pMT3sCT01, se cortó también con BspEI y AscI, y el fragmento de ADN de 713 pb que contenía la secuencia de ADN de MT3sCT01 se aisló, se purificó en gel y se cuantificó. La secuencia MT3sCT01 se unió direccionalmente al vector con el BspEI en el extremo 5' y el sitio AscI en el extremo 3', para crear el plásmido, pMT3-sCT-02 (Figura 5).

4. Clonación del MT3sCT como Cartucho de Doble Gen.

El plásmido pMT-sCT-02 se linealizó con 2 otras enzimas de restricción, AflII y Mfe I, con sitios dentro del MCS inmediatamente adyacentes entre sí. El plásmido pMTsCT01 también se cortó con las mismas dos enzimas para liberar el fragmento de ADN MT3sCT01. El fragmento de ADN purificado en gel, aislado, se clonó direccionalmente en el vector en los extremos compatibles con Afl II / Mfe para crear el plásmido pMT3-sCT-03 (Figura 6), que codifica las secuencias MT3sCT01 en tándem, así como el gen de resistencia a la canamicina, y los genes del factor de secreción, secE y pr1A4.

El plásmido pMT3-sCT-03 se usó para transformar células BLR de E. coli, para crear la cepa de expresión recombinante, UGL 716.

5. Fermentación y Análisis

La cepa de expresión, UGL 716, se cultivó en fermentación a escala de banco (valor de referencia), en concordancia con el Protocolo de Fermentación de la Serie 700, ref. CPM: 022: 035, bajo unas condiciones del tipo estándar de valor pH, dO₂, temperatura y régimen de alimentación / inducción. La fermentación se recogió por centrifugación a las 26 horas y, las células se almacenaron a una temperatura de - 20 °C, hasta la lisis. Las muestras de fermentación, se evaluaron mediante análisis de ADN y análisis de expresión de proteínas.

Análisis de ADN: El análisis del mapeo de enzimas de restricción del plásmido preparado a partir de las muestras de fermentación, verificó la presencia del plásmido pMT3sCT03 y de todos los genes relevantes.

El análisis de expresión de proteínas de las muestras de fermentación mediante SDS-PAGE [sistema mini-Protean con un gradiente de geles del 10 - 20% gradiente] y un inmunoensayo de transferencia Western (Western blot inmunoassay), confirmaron la producción de una proteína insoluble, la cual reaccionó positivamente con un anticuerpo policlonal específico de sCT.

6. Lisis celular y aislamiento de la fracción insoluble

Se procedió a lisar una cantidad de aprox. 124 g [wcw] de las células cosechadas a partir de la fermentación de UGL 716, mediante la utilización del homogeneizador Rannie OH 8,3 a ~ 12 K psi, en un tampón de lisis Tris / NaCl, pH 8,5, más $MgCl_2$ y ~ 32 K unidades de Benzonasa™. El lisado total resultante se centrifugó a una velocidad angular de 9 K r. p. m. (revoluciones por minuto), durante un transcurso de tiempo de 1 hora. A continuación, se procedió a retirar el sup (sobrenadante), y el sedimento, se lavó una vez con tampón de lisis Tris / NaCl y éste se volvió a centrifugar. El sedimento insoluble restante, se usó para la solubilización y purificación de la proteína recombinante.

7. Solubilización y purificación

Se procedió a solubilizar una cantidad de aproximadamente 54 gramos (referido al peso en estado húmedo) de cuerpos de inclusión de E. coli, parcialmente, con 800 l de HCl 0,1 M, HCl de guanidina 5 M. A continuación, la suspensión, se centrifugó a una velocidad angular de 20.000 r. p. m. (50.000 x g) durante un transcurso de tiempo de 60 minutos. El sobrenadante resultante, se recogió y se cargó directamente sobre una columna de Vydac C18 (22 x 250 mm), 10 m, 300 equilibrada con ácido trifluoroacético al 0,1%. La columna, se sometió a un gradiente lineal correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales iban desde un 100 % de A (0,1% TFA) hasta un 100 % de B (0,1% de ácido trifluoroacético, 80% de acetonitrilo), durante un transcurso de tiempo de 90 minutos. La columna, se hizo funcionar a razón de 25 ml / minuto, y se procedió a controlar la absorbancia de UV a 280 nm. A continuación, las fracciones recogidas se seleccionaron y se agruparon después del análisis de RP-HPLC, en una columna de Vydac C18 (4,6 x 250 mm), 5 m, 300. Subsiguientemente, las fracciones reunidas, se concentraron hasta secado, por liofilización para proporcionar 133 mg de una materia en polvo, de una tonalidad de color blanca. El péptido purificado se sometió, a continuación a un análisis de la composición de aminoácidos, mediante la utilización de una columna de derivatización previa, con isocianato de fenilo (PITC) y un análisis de RP - HPLC. La identidad del péptido se confirmó mediante espectroscopia de masas por electronebulización (ESI-MS). Se determinó que la masa molecular media experimental era de 7.416,92 Da, lo cual era consistente con la masa molecular esperada del MT3sCTgly con la señal de OmpA todavía unida a la molécula.

8. Análisis de OmpA-MT3-sCTgly Recombinante Purificado mediante SDS-PAGE

Se procedió a utilizar un gel de SDS-PAGE con un gradiente del 10 – 20 %, para analizar las muestras listadas en la Leyenda de la Figura 7. El análisis de gel, indicó el hecho de que, el material insoluble utilizado como entrada para la solubilización y purificación, contenía la proteína MTS3sCTgly [pista 3], migrando con la proteína marcadora de 15 kDa [pista 2]. Se observa el hecho consistente en que, se ve la misma banda, en las diferentes muestras de purificación [pistas 4 - 6]. Se observa así mismo, también, un control positivo para el inmunoblot (inmunotransferencia) GSTsCTgly, en la pista 7, mientras que, el control negativo, una muestra de lisado total para una línea celular de E. coli, se observa en la pista 1.

Mediante la utilización de los protocolos estándar de transferencia western y de inmunoensayo, se transfirió un gel idéntico, a la membrana de PVDF, y se procedió a utilizar el anticuerpo específico de sCT, a una dilución correspondiente a un valor de relación de 1: 10.000 y se incubó el desarrollo de color, durante un transcurso de tiempo de 1 minuto (Figura 8). La transferencia Western anterior, muestra un nivel bajo de la reactividad de los anticuerpos no específicos en el control negativo [pista 1]. Pista 2, los patrones estándar de precisión, consistente en los "Precision Standards™", no reaccionan con el anticuerpo, aunque las proteínas marcadoras están diseñadas para transferirse a la membrana, para facilitar su referencia. La pista 3, es la entrada, mientras que las pistas 4 – 6, son las muestras analíticas y preparativas de purificación.

9. Conclusiones de los análisis

La supuesta proteína recombinante MTS3sCTgly estaba en la fracción insoluble. La migración, no era consistente con un tamaño predicho de ~ 5 kDa, para el péptido MTS3sCTgly, sin bien, sin embargo, no obstante, en cambio, la proteína r, en el gel, estaba migrando, casi coincidiendo con la proteína marcador de ~ 15 kDa. El fraccionamiento y los datos de análisis del gel, también sugirieron, así mismo, el hecho consistente en que, el péptido señal, podría no ser procesado en esta construcción, y esto viene corroborado por los datos del análisis de aminoácidos y espectroscopia de masas. El tamaño total de una proteína compuesta por OmpA / MTS3 / sCTgly sin procesar sería de ~ 7KDa. Sin embargo, no obstante, y debido a la naturaleza altamente cargada del MTS3, se cree que la proteína recombinante insoluble entera está funcionando de una forma aberrante, y dando lugar al tamaño de 15K Da, que se ve en el SDS-PAGE. Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, el resultado de este proceso, era el

aislamiento de una proteína OmpA / MTS3 / sCTgly de fusión, es decir, de la calcitonina del salmón, fusionada a dos Mts, el péptido señal OmpA y el MTS3.

Ejemplo 2 Efecto de la OmpA-MT3 sobre la Absorción de Calcitonina del salmón a partir de Duodeno de Rata

Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley hembra (250 - 275 g) (n = 4 para cada péptido) con cetamina y xilazina antes de la inserción de una cánula en la arteria carótida. La cánula, se conectó a una válvula de tres vías, a través de la cual se extrajo una muestra de sangre y, se reemplazó mediante una solución salina fisiológica que contenía heparina. A continuación, se procedió a realizar una incisión en la línea media en la cavidad abdominal y se inyectaron directamente, en el duodeno, 0,45 ml de sCT-gly (10 mg / ml) o bien OmpA-MT3-sCT-gly (10 mg / ml) en ácido cítrico 0,5 M. Se recogió sangre (0,5 ml) antes y 5, 15, 30, 45 y 60 minutos después de la administración de los péptidos. La sangre se centrifugó, y la concentración ($\pm$ SEM [error estándar de la media]) de sCT-gly o bien OmpA-MT3-sCT-gly en el sobrenadante de plasma, se determinó mediante un inmunoensayo enzimático competitivo (EIA). La concentración plasmática pico o máxima (Cmax) se determinó mediante inspección. La biodisponibilidad absoluta de cada péptido (con relación con una dosis intravenosa de sCT [calcitonina del salmón]) se calculó a partir de gráficos de la concentración en plasma de cada péptido en función del tiempo.

Los resultados resumidos en la Tabla 1, la cual se facilita abajo, a continuación, muestran el hecho consistente en que, la concentración máxima de cada péptido en la sangre, acontecía entre los 30 y 60 minutos después de su administración. La Cmax de OmpA-MT3-sCT-gly era de un valor más de 25 veces mayor que la del sCT-gly, y la biodisponibilidad de OmpA-MT3-sCT-gly, era de un valor 20 veces mayor que la del sCT-gly. Estos resultados, indican claramente que la unión de OmpA-MT3 al sCTgly aumenta significativamente la absorción de péptidos a través de la pared intestinal.

TABLA 1 - Efecto de OmpA-MT3 sobre la Absorción del sCT-gly en el duodeno de la Rata

Tiempo minutos	sCT-gly ng / ml $\pm$ SEM	OmpA-MT3-sCT-gly ng / ml $\pm$ SEM
0	0,00	0,00
5	200,62 $\pm$ 6 73,67	563,07 $\pm$ 150,44
15	115,53 $\pm$ 39,10	1861,86 $\pm$ 713,20
30	222,66 $\pm$ 44,76	5603,76 $\pm$ 1749,75
45	151,36 $\pm$ 10,43	3879,76 $\pm$ 713,62
60	178,60 $\pm$ 76,15	6060,0 $\pm$ 2462,69
Cmax (mg / ml)	222,66 $\pm$ 44,76	6060,70 $\pm$ 2462,69
Biodisponibilidad absoluta (por ciento)	0,92 $\pm$ 0,23	21,26 $\pm$ 6,23

Ejemplo de referencia 3 - Efecto del dominio de transducción de proteínas HIV TAT, como un MT, sobre la absorción de la calcitonina del salmón en el duodeno del perro.

1. Encapsulación y administración oral del péptido de fusión MT3sCT01 en perros

Se procede a utilizar dos formulaciones, con objeto de someter a test de ensayo la eficacia del péptido de fusión MT3-SCT-01.

La primera formulación (F1) se prepara procediendo a mezclar 13 g de ácido cítrico, 1,3 g de lauroilcarnitina, 0,65 g de talco y 0,03 g sCT, mediante un mortero y una maza o maja. La otra formulación (F2) se prepara procediendo al mezclado de la misma mezcla, excepto en cuanto a lo referente al hecho de que, el sCT se reemplaza con una cantidad equivalente de MT3sCT01. Ambas mezclas se utilizan para rellenar cápsulas de gelatina de tamaño 00 y las cápsulas se recubren con Eudragit L30D-55. Las cápsulas revestidas entéricas resultantes contienen aproximadamente de 1 a 2 mg de sCT (F1) ó de MT3sCT01 (F2), por cápsula. A los perros (n = 8), los cuales se hallaban en ayuna, se les administra la primera formulación, F1, por vía oral y, las muestras de sangre, se recogen en tubos heparinizados a t = -10 minutos, 0 minutos y después, cada 15 minutos, durante un transcurso de tiempo de 240 minutos. Las muestras de sangre se centrifugan y el, plasma resultante, se almacena, a una temperatura de - 20 °C para su análisis posterior. Después de un período de lavado de 1 semana, se procede a administrar, a los mismos perros, la formulación F2, por vía bucal, y se procede a seguir el mismo protocolo.

2. Determinación de la biodisponibilidad de la calcitonina del salmón en plasma canino

Se procede a medir la cantidad de sCT en muestras de plasma de perros, los cuales los cuales se les había administrado cualquiera de las dos formulaciones, medición ésta, la cual se lleva a cabo mediante radioinmunoensayo (RIA) mediante la utilización de un equipo, a modo de "kit", comercialmente disponible en el

mercado. Se espera que ambas formulaciones produzcan cantidades mesurables de sCT en la sangre, y se espera que la concentración máxima de sCT en la sangre de los perros que haya recibido la formulación F1, se encuentre en el intervalo de 0,5 a 6,0 ng / ml, mientras que la concentración máxima de sCT en los perros a los cuales se les ha administrado la F2 sea de un valor correspondiente a una cantidad de menos de 12 ng / ml.

5 Se espera que la biodisponibilidad de sCT en perros a los cuales se les haya administrado la formulación F1, sea de aproximadamente la correspondiente a un porcentaje del 1 %, mientras que se espera que la biodisponibilidad de sCT en perros que hayan recibido la formulación F2 sea la correspondiente a un valor de por lo menos un 1,2 %. La

10 escisión o segmentación in vivo del MT del sCT en perros que reciben F2, se demuestra aplicando muestras de plasma de perros que reciben F1 y F2 a una columna de HPLC y recogiendo el efluente en tubos de plástico. El disolvente en los tubos, se elimina a vacío y se analiza la presencia de sCT mediante RIA. La escisión o segmentación in vivo del MT3sCT01 se establece mostrando que el tiempo de retención de sCT en el plasma, de los perros a los cuales se les administra la formulación perros dados F2 es el mismo que el tiempo de retención del sCT en el plasma de los perros a los cuales se les haya administrado la formulación F1.

15

REIVINDICACIONES

1.- Una composición farmacéutica para la administración oral de un agente peptídico fisiológicamente activo, el cual comprende:

- (A) una cantidad terapéuticamente efectiva del citado péptido activo, unida a un translocador de membrana, en donde, el citado péptido activo, se selecciona de entre un péptido semejante al glucagón del tipo 1, humano, la calcitonina del salmón, la insulina, y una hormona paratiroidea humana; y en donde, el citado translocador de membrana, es un péptido señal, el cual es capaz de sementarse, por lo menos parcialmente, del péptido activo, in vivo, mediante una enzima;
- (B) por lo menos un agente reductor del valor pH, y / o inhibidor de proteasa, farmacéuticamente aceptable, y
- (C) un vehículo protector resistente a los ácidos, para transportar la citada composición farmacéutica, a través del estómago de un paciente, al mismo tiempo que prevenir el contacto entre el citado péptido activo y las proteasas del estómago.

2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado translocador de membrana comprende una secuencia de aminoácidos, seleccionada de entre por lo menos una, de entre el grupo en la totalidad o en una parte del péptido señal del factor de crecimiento de los fibroplastos de Kaposi, la secuencia señal de la integrina β_2 , humana, y el péptido señal OmpA.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado agente reductor del valor pH, se encuentra presente, en dicha composición farmacéutica, en una cantidad, la cual, si dicha composición se agrega a diez mililitros de una solución acuosa de bicarbonato sódico 0,1 M, sería suficiente como para reducir el valor pH la citada solución, a un valor no mayor de 5,5.

4.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado agente reductor del valor pH, se encuentra presente en una cantidad, la cual, si dicha composición se agregara a diez mililitros de solución acuosa de bicarbonato sódico 1 M, e sodio IM, sería suficiente como para reducir el valor pH de dicha solución a, un valor no superior a 3,5.

5.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado inhibidor de proteasa es un inhibidor de proteasa del estómago y / o del intestino.

6.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado inhibidor de proteasa inhibe una enzima seleccionada de entre el grupo que consiste en la pepsina, la tripsina, la quimiotripsina, la elastasa, la calicreína y la carboxipeptidasa.

7.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, la citada enzima, in vivo, se selecciona de entre el grupo que consiste en la caspasa-1, la caspasa-3, la proproteína convertasa 1, la proproteína convertasa 2, la proproteína convertasa 4, la proproteína convertasa 4 PACE 4, la prolil-oligopeptidasa, la endotelina, la dipeptidil-peptidasa IV, la peptidasa de señal, la neprilisina, la renina y la esterasa.

8.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado vehículo protector, se encuentra presente en un peso, el cual corresponde a un porcentaje no superior a un 30 %, con respecto al peso del resto de dicha composición farmacéutica.

9.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado vehículo protector, se encuentra presente en un peso, el cual corresponde a un porcentaje no superior a un 20 %, con respecto al peso del resto de dicha composición farmacéutica.

10.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado vehículo protector, se encuentra presente en un peso, el cual corresponde a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde un 10 %, hasta un 20 %, con respecto al peso del resto de dicha composición farmacéutica.

11.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado vehículo protector es suficiente como para evitar la descomposición de dicha composición farmacéutica en HCl 0,3 N, durante un transcurso de tiempo de por lo menos dos horas, pero que, sin embargo, no obstante, permite la liberación completa de todos los contenidos de dicha composición farmacéutica, en un transcurso de tiempo de 45 minutos, después de que, el valor pH, se haya aumentado a un valor de 6,3 en un baño de disolución en el cual se procede a hacer girar la citada composición, a una velocidad angular de 100 revoluciones por minuto.

12.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, la cual contiene, de una forma adicional, por lo menos un potenciador de la absorción, el cual sea eficaz para fomentar la biodisponibilidad del citado agente activo.

13.- La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en donde, el citado potenciador de la absorción, es un agente tensioactivo.

- 14.- La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en donde, el citado agente tensioactivo, es absorbible o biodegradable.
- 5 15.- La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde, el citado agente tensioactivo se selecciona de entre el grupo que consiste en las acilcarnitinas, las fosfolípidos y los ácidos biliares.
- 16.- La composición farmacéutica de la reivindicación 15, en donde, el citado potenciador, se trata de una acilcarnitina.
- 10 17.- La composición farmacéutica de la reivindicación 16, la cual comprende, de una forma adicional, un éster de sacarosa.
- 18.- La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en donde, el citado potenciador de la absorción, es un agente activo de superficie seleccionado de entre el grupo que consiste en (i) un agente aniónico, el cual es un derivado de colesterol, (ii) una mezcla de un neutralizador de carga negativa y un agente tensioactivo, aniónico, (iii) agentes tensioactivos no iónicos, y (iv) agentes tensioactivos catiónicos.
- 15 19.- La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en donde, el potenciador de la absorción, se selecciona de entre el grupo que consiste en un agente tensioactivo catiónico y un tensioactivo aniónico, el cual se trata de un derivado del colesterol.
- 20 20.- La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en donde, la citada composición farmacéutica, incluye por lo menos dos potenciadores de la absorción, uno de los cuales es un agente tensioactivo catiónico, y otro de los cuales es un agente tensioactivo aniónico, el cual se trata de un derivado de colesterol.
- 25 21.- La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en donde, el citado agente tensioactivo aniónico es un ácido biliar soluble en ácido.
- 22.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, la cual comprende, de una forma adicional, una cantidad de un segundo péptido, el cual no es un péptido fisiológicamente activo eficaz para aumentar la biodisponibilidad de dicho agente peptídico activo.
- 30 23.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, la cual comprende, de una forma adicional, además, una barrera soluble en agua, la cual separa al citado agente reductor del valor pH, de dicho vehículo protector.
- 35 24.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, la citada composición, incluye por lo menos un agente de reducción del valor pH, el cual contiene un que tiene un pKa no superior a 4,2.
- 25.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, por lo menos un agente reductor del valor pH, tiene una solubilidad en agua de por lo menos 30 gramos por 100 mililitros de agua, a la temperatura ambiente.
- 40 26.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, todos los ingredientes distintos de dicho vehículo protector se encuentran uniformemente dispersados.
- 45 27.- La composición farmacéutica de la reivindicación 26, en donde, la citada composición farmacéutica, comprende gránulos los cuales contienen un aglutinante farmacéutico, y los cuales se encuentran dispersados de una forma uniforme, en el aglutinante, en el citado agente reductor del valor pH, en el citado potenciador de la absorción y en el citado agente peptídico activo.
- 50 28.- La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en donde, la citada composición, se trata de una forma de dosificación sólida, en la cual, un factor de relación, en peso, del citado agente reductor del valor pH, con respecto al citado potenciador de la absorción, se encuentra comprendido dentro de unos valores situados entre 3 : 1 y 20 : 1.
- 55 29.- La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en donde, la citada composición, se trata de una forma de dosificación sólida en la cual, un factor de relación, en peso, del citado agente reductor del valor pH, con respecto al citado potenciador de la absorción, se encuentra comprendido dentro de unos valores situados entre 5 : 1 y 10 : 1.
- 30.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado agente reductor del valor pH, se selecciona de entre el grupo que consiste en el ácido cítrico, el ácido tartárico y una sal de ácido de un aminoácido.
- 60 31.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado agente reductor del valor pH se encuentra presente en una cantidad la cual no sea inferior a los 300 miligramos.
- 32.- La composición farmacéutica de la reivindicación 31, en donde, el citado agente reductor del valor pH, se encuentra presente en una cantidad la cual no sea inferior a los 400 miligramos.
- 65

33. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado vehículo protector, es un jarabe protector viscoso.
- 5 34.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el factor de relación en peso del citado agente reductor del valor pH, con respecto a la citada calcitonina del salmón es el correspondiente a un valor de por lo menos 200 : 1.
- 10 35.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el factor de relación en peso del citado agente reductor del valor pH, con respecto a la citada calcitonina del salmón es el correspondiente a un valor de por lo menos 800 : 1.
- 15 36.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el factor de relación en peso del citado agente reductor del valor pH, con respecto a la citada calcitonina del salmón es el correspondiente a un valor de por lo menos 2000 : 1.
- 20 37.- La composición farmacéutica de la reivindicación 30, en donde, una barrera soluble en agua, separa al agente de reducción del valor pH, del citado vehículo protector.
- 38.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde, el citado revestimiento entérico, se encuentra presente en una cantidad correspondiente a un porcentaje en peso, el cual no supera al 30 % del peso del resto de dicha composición farmacéutica, excluyendo dicho vehículo protector.
- 25 39.- Una composición, según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 38, para su uso como un medicamento.
- 40.- Una composición, según la reivindicación 39, para el tratamiento de pacientes los cuales sufran de trastornos los cuales respondan, de una forma favorable, a unos niveles incrementados de un compuesto que contenga un péptido.
- 30 41.- Una composición, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, en donde, el citado péptido, es la calcitonina del salmón, para su uso en el tratamiento de un trastorno del calcio, o de una enfermedad ósea, de una forma particular, seleccionada de entre el grupo consistente en la osteoporosis, la enfermedad de Paget, o la hipercalcemia por malignidad.
- 35 42.- Una composición, según una cualquiera de las reivindicaciones 39 a 41, la cual se encuentra específicamente diseñada para el suministro oral.

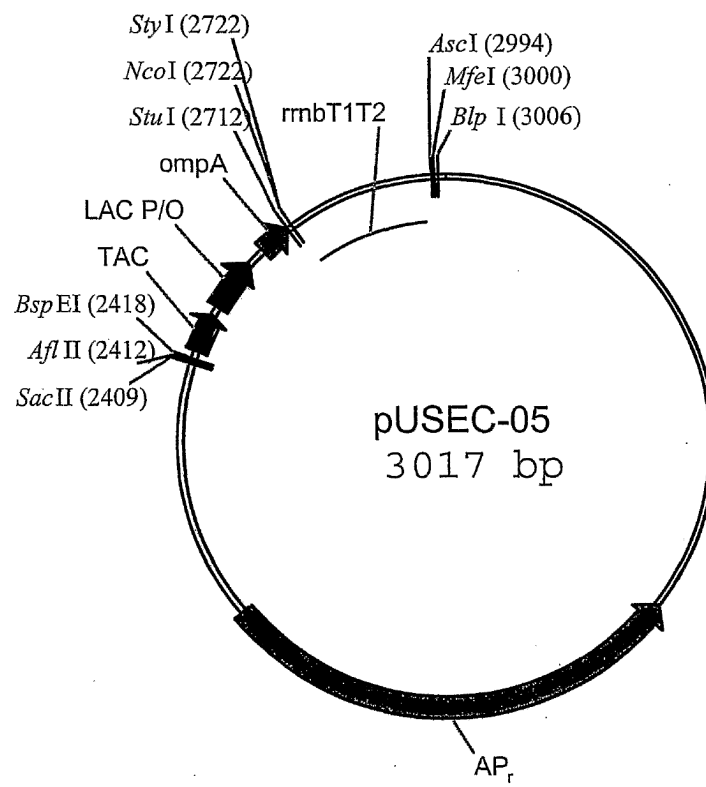


FIG 1

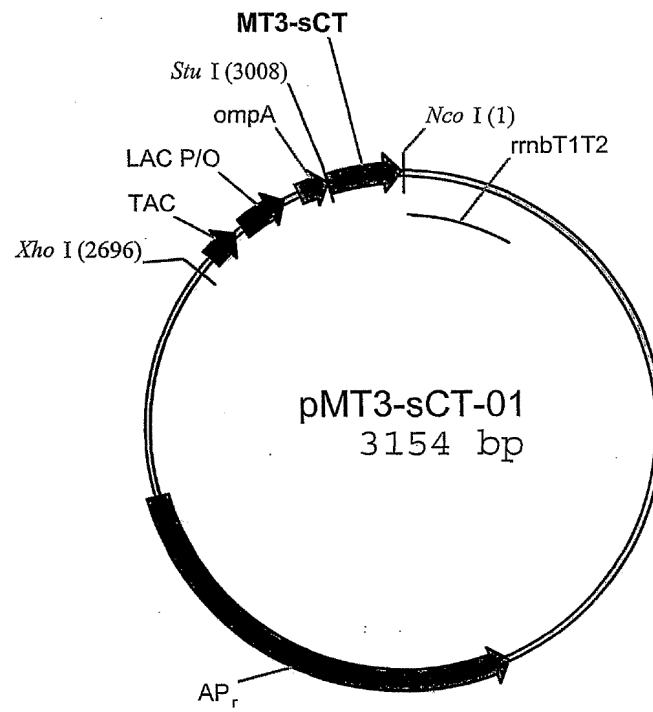


FIG 2

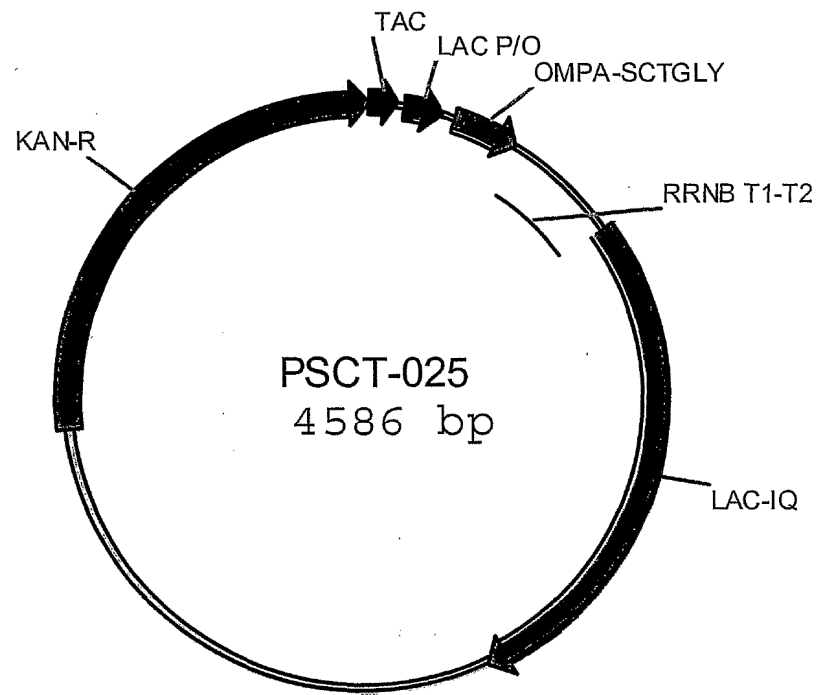


FIG 3

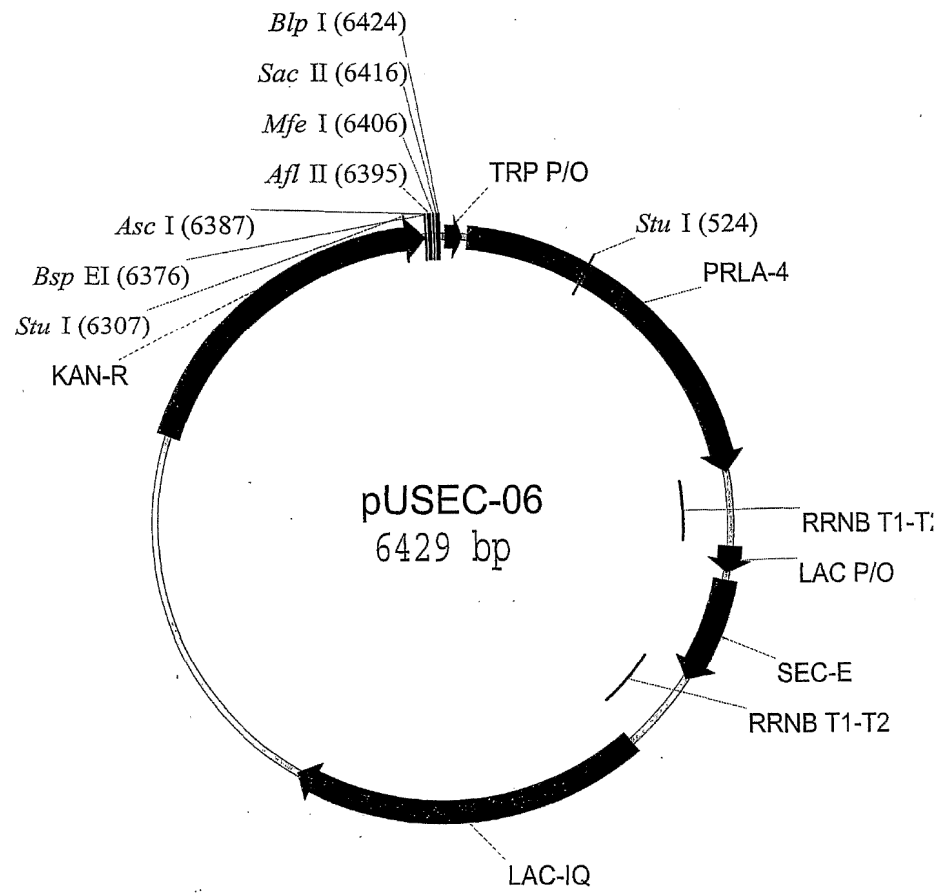


FIG 4

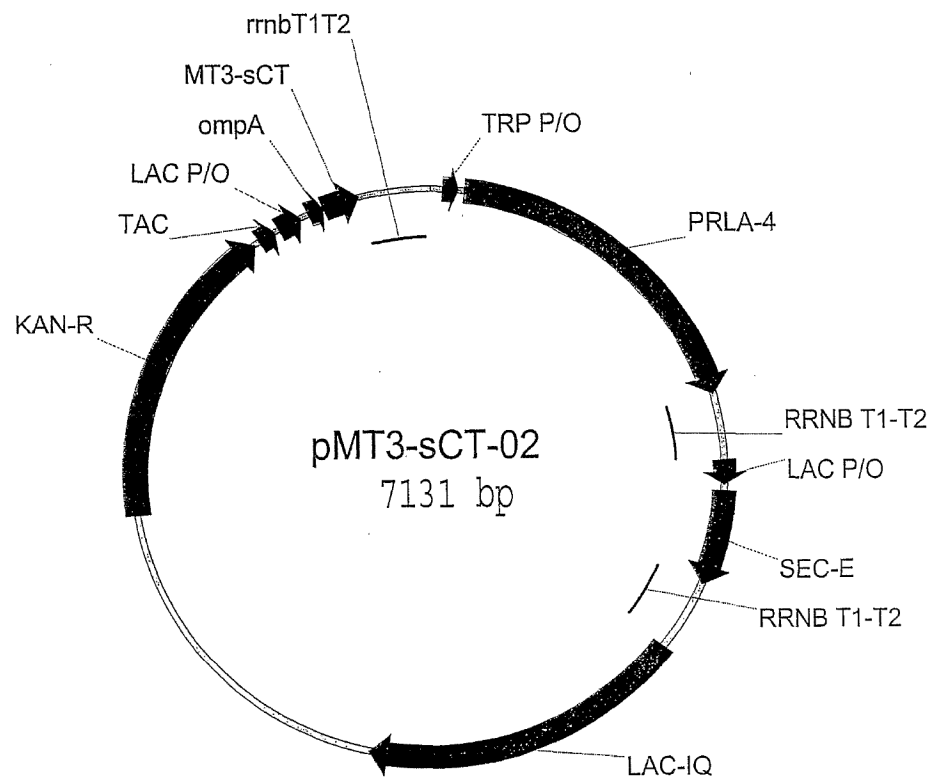


FIG. 5

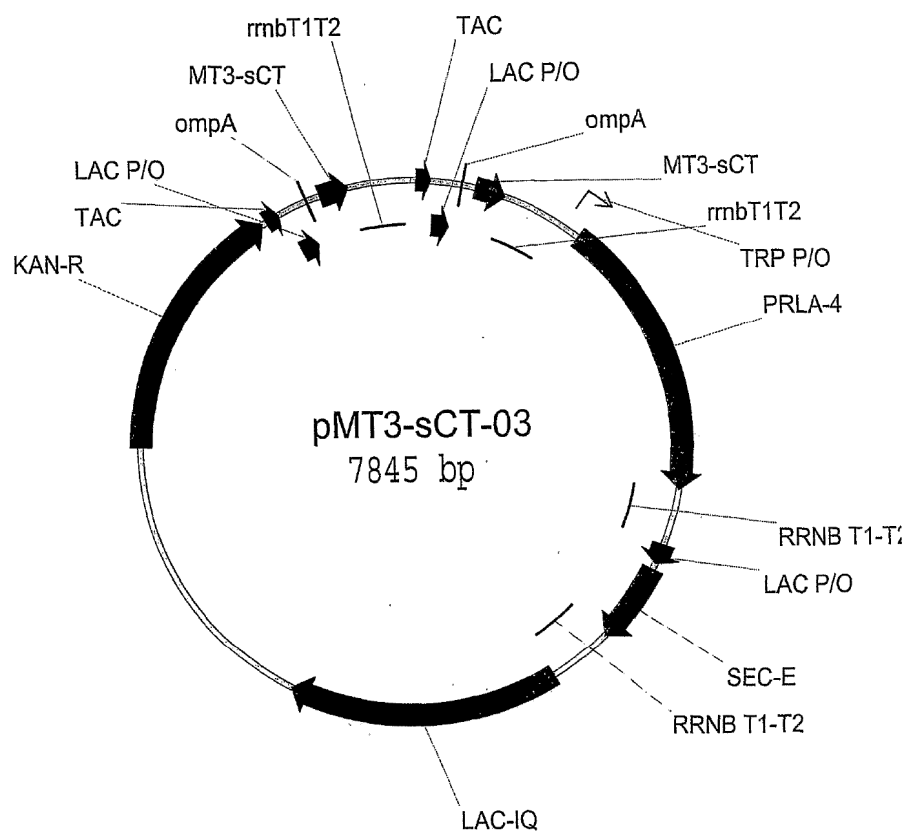


FIG 6

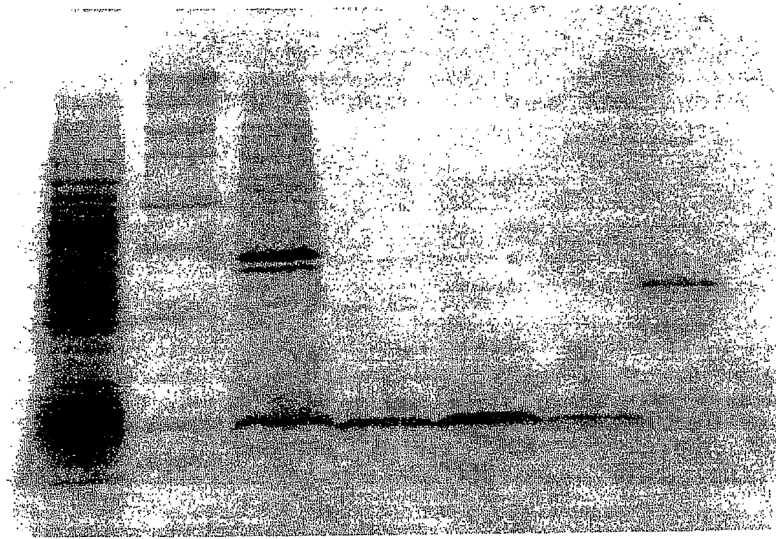


FIG 7

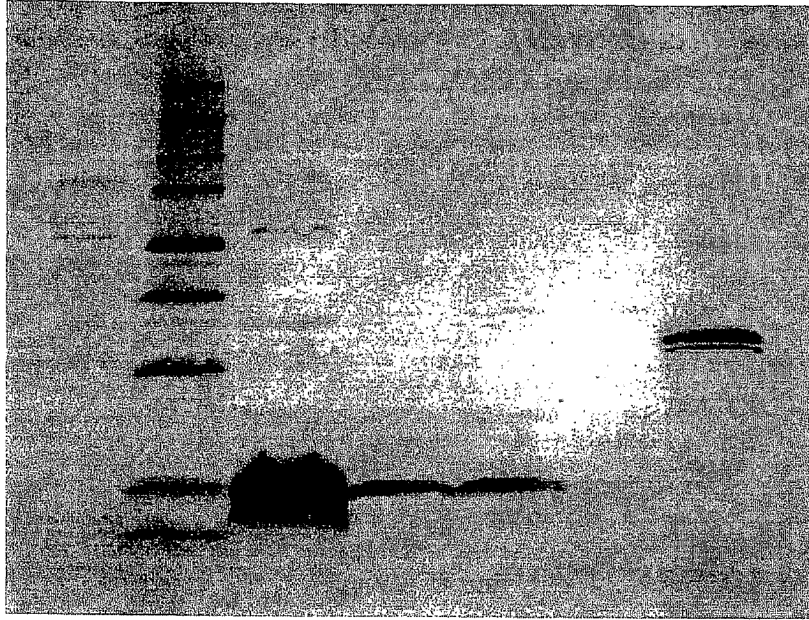


FIG 8