

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 024**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/21** (2006.01)

**A61K 38/28** (2006.01)

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61K 47/42** (2007.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2009 PCT/JP2009/053648**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2009 WO09107766**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2009 E 09715976 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2253326**

54 Título: **Composición farmacéutica para administración transnasal**

30 Prioridad:

**28.02.2008 JP 2008048300**

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

**04.06.2018**

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)  
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**MORISHITA, MARIKO;  
TAKAYAMA, KOZO;  
NISHIO, REIJI y  
IDA, NOBUO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 671 024 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para administración transnasal

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para permitir la migración de una sustancia bioactiva hidrófila desde la cavidad nasal a la sangre mientras se mantiene su actividad.

10 **Antecedentes de la técnica**

Además de los fármacos hidrófobos de bajo peso molecular que se han empleado principalmente hasta el momento, recientemente han aparecido en centros clínicos sustancias bioactivas hidrófilas tales como péptidos y ácidos nucleicos. Se emplean como productos farmacéuticos y presentan notables efectos terapéuticos. Sin embargo, hasta el momento, en la mayoría de los casos, sus métodos de administración se limitan al uso como soluciones de inyección. Esto se debe a que las sustancias hidrófilas son incapaces de atravesar la capa de células epiteliales de la mucosa, a diferencia de los fármacos conocidos. Debido a que las células en la capa de células epiteliales están estrechamente unidas entre sí para evitar la invasión de sustancias extrañas en el organismo vivo, las sustancias que tienen hidrofilia difícilmente pueden pasar a través de la capa, por lo que la administración oral, que es un método de administración de fármacos utilizado generalmente, es incapaz de permitir que las sustancias actúen dentro del cuerpo.

Debido a que la administración de un fármaco por inyección es una carga pesada para un paciente y un médico, particularmente en los casos en que el tratamiento es frecuente y continúa durante un largo período de tiempo, se han estudiado diversos métodos para permitir la administración de tal sustancia bioactiva hidrófila por un método diferente a la inyección.

En la administración oral que se usa ampliamente como un método general para la administración de un fármaco, hay una serie de intentos de tecnologías para permitir la absorción de una sustancia bioactiva hidrófila. En particular, para mejorar la permeabilidad de la capa de células epiteliales intestinales que es una región principal de absorción cuando se lleva a cabo la administración oral, se han realizado intentos usando tensioactivos, sustancias adhesivas a células epiteliales, péptidos penetrantes celulares y similares.

"Péptido penetrante celular" es una expresión general para péptidos que tienen la propiedad de migrar desde el exterior de una célula al interior de la célula sin destruir la membrana celular. Los ejemplos bien conocidos de los péptidos incluyen diversos tipos de péptidos tales como oligoarginina que tiene un tramo de arginina; Tat, un péptido del virus VIH-1 (Bibliografía de Patente 1); y penetratina, que tiene la misma secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N.º:1 de la presente invención (Bibliografía de Patente 2 y 3). Se incluyen diversos péptidos en la misma y los ejemplos de los mismos incluyen los caracterizados por basicidad simple; los que tienen un dominio hidrófobo; los caracterizados por la anfifilia de la estructura primaria o de la estructura secundaria de los péptidos; y los que tienen un mecanismo incierto. Al utilizar estos péptidos, se han llevado a cabo, de manera exhaustiva, investigaciones sobre sus capacidades de migración al interior de la célula y sus usos como vehículos para el suministro de genes unidos a ellos al interior de la célula.

Además, se han llevado a cabo estudios con el objetivo de promover la penetración a través de la capa de células del epitelio y de promover la absorción tras la administración oral usando tal propiedad (Bibliografía de Patente 4 y 5). Sin embargo, debido a que los efectos de promoción de la absorción de los péptidos penetrantes celulares utilizados en estos estudios se basan en la evaluación con el tracto intestinal lavado y similares, los efectos reales tras la administración oral no están claros. Además, es difícil realizar una absorción estable por ingestión debido a la degradación digestiva en el estómago y a los cambios en el entorno en el tracto gastrointestinal, de modo que no se ha logrado la aplicación práctica de la administración oral de una sustancia bioactiva hidrófila.

Como un método diferente a la administración oral para realizar la absorción, se ha diseñado un método de administración que emplea la capa de la mucosa nasal. Entre la mucosa nasal y la mucosa del tracto gastrointestinal, existen diferencias en los tipos de células que constituyen la capa de mucosa y diferencias en las propiedades de las células individuales y las enzimas degradativas que existen en los lúmenes muestran diversas diferencias tales como diferencias en sus tipos y cantidades, por lo que se requieren tecnologías distintas a las de promoción de la absorción en el tracto gastrointestinal para promover la absorción transnasal.

La administración puede llevarse a cabo fácilmente a través de la mucosa nasal y la mucosa nasal tiene propiedades adecuadas para la absorción de fármacos debido a los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos desarrollados debajo de ella. Además, se considera que, ya que el fármaco absorbido por la cavidad nasal pasa directamente a la circulación general después de la absorción, se puede evitar el efecto de primer paso del hígado, por lo que se considera que la cavidad nasal es eficaz como sitio de administración de fármacos propensos a ser metabolizados en el tracto gastrointestinal y/o en el hígado. Sin embargo, debido a que, como en los otros sitios de absorción, la mucosa nasal tiene bajas permeabilidades para sustancias bioactivas hidrófilas y ya que el área del sitio de

absorción es pequeña, se requiere una tecnología que promueva la absorción para realizar la absorción de sustancias bioactivas hidrófilas de la cavidad nasal.

5 Hay ejemplos de ensayos clínicos con formulaciones transnasales que usan tensioactivos como agentes promotores de la absorción por una pluralidad de fabricantes de fármacos hasta el momento, pero todos los ensayos se abandonaron debido a la fuerte irritación de la mucosa nasal. Además, como un método que no emplea un tensioactivo, se ha intentado la promoción de la absorción utilizando un péptido en la fase de investigación y se divulga un intento de promover la absorción transnasal por unión directa de un péptido a un fármaco en la Bibliografía de Patente 6. Sin embargo, debido a que la tecnología requiere la modificación química de un fármaco, 10 necesariamente tiene muchos problemas por resolver tales como la disminución de la actividad farmacológica del fármaco, cambios en la farmacocinética, aumento en el coste de producción y antigenicidad del fármaco administrado.

15 En la Bibliografía de Patente 2 y 3 se mencionan las posibilidades de promoción de absorción transnasal mediante penetratina o un producto modificado de la misma se mencionan, pero debido a que requieren un enlace covalente entre el fármaco a infiltrar a través de la mucosa y el producto modificado de penetratina, son tecnologías diferentes de la presente invención en las que una sustancia bioactiva hidrófila y penetratina o un producto modificado de la misma no se unen covalentemente entre sí. Se sabe que se requiere la aparición eficaz de desorción de la célula, además de la migración desde el exterior de la célula al interior de la célula, para realizar la promoción de la absorción nasal utilizando un péptido penetrante celular y la absorbabilidad tras la absorción a través de la mucosa 20 nasal se ve afectada por diversos factores distintos de la permeabilidad celular, tales como la degradabilidad del péptido por diversas enzimas degradativas que existen en el tejido de la mucosa nasal. Por lo tanto, la necesidad de confirmación, mediante experimentos que utilizan un animal modelo o similar, de si el péptido penetrante celular tiene o no permeabilidad a través de la mucosa nasal es un conocimiento técnico general común de los expertos en la materia. Sin embargo, ya que la Bibliografía de Patente 2 y 3 no desvela verificación experimental sobre la permeabilidad en la mucosa nasal de la penetratina y del producto modificado de la misma, no es fácil para los expertos en la materia deducir de la Bibliografía de Patente 2 y 3 que la penetratina y el producto modificado de la misma tienen permeabilidad de la mucosa nasal.

25 También hay un intento de administrar oligoarginina que no está unida covalentemente al fármaco, como una sustancia promotora de la absorción nasal junto con el fármaco (Bibliografía de Patente 7), pero esto requiere una alta concentración de oligoarginina y se ha demostrado su efecto con solo un fármaco de modelo único, dextrano marcado fluorescentemente, de modo que se desconoce la permeabilidad de una sustancia bioactiva hidrófila peptídica.

30 La bibliografía de patente 8 divulga componentes peptídicos que modulan la unión estrecha para potenciar la administración mucosa.

35 Por lo tanto, aún no se ha descubierto una tecnología altamente práctica para permitir la absorción nasal de alta eficacia de sustancias bioactivas hidrófilas.

[Bibliografía de patente 1 ] JP 10-33186 A

[Bibliografía de patente 2] Traducción de la solicitud de patente japonesa PCT abierta a inspección pública No. 2002-530059

45 [Bibliografía de patente 3] Traducción de la solicitud de patente japonesa PCT abierta a inspección pública No. 2002-519392

[Bibliografía de patente 4 ] JP 2006-257074 A

[Bibliografía de patente 5 ] JP 2008-7448 A

[Bibliografía de patente 6 ] WO 2004/037859

50 [Bibliografía de patente 7 ] JP 10-95738 A

[Bibliografía de patente 8 ] WO 2007/014391

### Divulgación de la invención

#### 55 PROBLEMAS A RESOLVER CON LA INVENCION

La presente invención tiene como objetivo proporcionar una composición farmacéutica para permitir la migración de una sustancia bioactiva hidrófila administrada por vía nasal a la sangre.

#### 60 MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

65 Para superar los problemas descritos anteriormente, los presentes inventores estudiaron un método para mejorar la eficacia de absorción de una sustancia bioactiva hidrófila que tiene una baja capacidad de migración a través de la mucosa a la sangre en condiciones normales y descubrieron que una composición farmacéutica que comprende una sustancia bioactiva hidrófila y: (a) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; (b) un péptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 con la excepción de que

uno o varios aminoácidos se eliminan, sustituyen y/o añaden, teniendo el péptido permeabilidad de la mucosa nasal; o (c) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia inversa de (a) o (b), teniendo el péptido permeabilidad de la mucosa nasal; es eficaz y puede realizar una migración altamente eficaz de la sustancia bioactiva hidrófila a la sangre tras la administración nasal.

5 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una sustancia bioactiva hidrófila y un péptido, estando dicha sustancia bioactiva hidrófila y dicho péptido mezclados independientemente y no unidos covalentemente entre sí; en la que dicho péptido tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, en donde los aminoácidos que constituyen el péptido son L-aminoácidos y/o D-aminoácidos de origen natural, en donde la composición farmacéutica se utiliza para mejorar la absorción de la sustancia bioactiva hidrófila en un método de tratamiento por administración nasal y en la que la sustancia bioactiva hidrófila es insulina o interferón  $\beta$ .

### 15 Efecto de la invención

Mediante la presente invención, es posible la migración de una sustancia bioactiva hidrófila administrada por vía nasal a la sangre y es posible una farmacoterapia más simple y más orientada al paciente en comparación con el método de administración convencional por inyección.

### 20 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra el efecto de promoción de la absorción en insulina administrada por vía nasal, obtenida usando el péptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7: nivel en sangre.

25 La Fig. 2 muestra el efecto de promoción de la absorción en insulina administrada por vía nasal, obtenida usando el péptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7: nivel de glucosa en sangre.

La Fig. 3 muestra el efecto de promoción de la absorción en insulina administrada por vía nasal, obtenida usando el péptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7: biodisponibilidad.

30 La Fig. 4 muestra el efecto de promoción de la absorción en insulina administrada por vía nasal, obtenida usando el péptido de la SEQ ID NO: 1: dependencia de la concentración.

La Fig. 5 muestra el efecto de promoción de la absorción de dextrano marcado fluorescentemente administrado por vía nasal, obtenido usando el péptido de la SEQ ID NO: 1.

La Fig. 6 muestra el efecto de promoción de la absorción de interferón  $\beta$  administrado por vía nasal, obtenido usando el péptido de la SEQ ID NO: 1.

35 La Fig. 7 muestra el efecto de promoción de la absorción en insulina administrada por vía nasal, obtenida usando el péptido de las SEQ ID NO: 1 a 6: nivel de glucosa en sangre.

La Fig. 8 muestra el efecto de promoción de la absorción en insulina administrada por vía nasal, obtenida usando el péptido de las SEQ ID NO: 1 a 6: nivel en sangre.

### 40 Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para administración nasal para permitir la migración de una sustancia bioactiva hidrófila desde la cavidad nasal a la sangre, conteniendo dicha composición farmacéutica una sustancia bioactiva hidrófila como se establece en la reivindicación 1 como un componente farmacológicamente activo y un péptido específico que tiene permeabilidad en la mucosa nasal que se mezclan de forma independiente y no se unen covalentemente entre sí. En el presente caso, "sustancia bioactiva hidrófila" en la presente invención significa una sustancia fisiológicamente activa que es característicamente hidrófila. "Hidrófila" en el presente documento significa tener una alta solubilidad en agua y se define como hidrófila una sustancia que se disuelve en agua en una cantidad de 1  $\mu\text{g}$  o más por 1 ml de agua. "Sustancia fisiológicamente activa" significa sustancias en general que actúan sobre un organismo vivo y provocan cambios en el organismo vivo y los ejemplos de las mismas incluyen proteínas que se unen a receptores en células específicas y enzimas que tienen afinidades por sustancias en el organismo vivo. Además, puede ser una sustancia que no causa una reacción directa con una sustancia en un organismo vivo e incluye sustancias que pueden administrarse a un organismo vivo para uso médico, tal como dextrano que se usa como una alternativa al plasma sanguíneo para aumentar la sangre.

55 "Péptido" en la presente invención significa una sustancia que tiene una estructura en la que los aminoácidos están unidos entre sí por enlaces peptídicos. Entre los péptidos, los que tienen un alto peso molecular generalmente se denominan proteínas, pero en la presente memoria descriptiva, estas proteínas también se denominan péptidos sin estar limitadas por sus pesos moleculares. Además, también se incluyen en los péptidos en la presente invención glucoproteínas que tienen una cadena de azúcar unida a una proteína y los derivados que tienen una modificación química tal como polietilenglicolación (PEGilación).

60 Se describirán ahora los detalles de la composición farmacéutica para la administración nasal de la presente invención.

65 En la presente invención, el péptido que está contenido junto con una sustancia bioactiva hidrófila y tiene la

secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 es el péptido generalmente denominado penetratina. La penetratina es un péptido que tiene permeabilidad celular que se encuentra en el sitio de unión al ADN del péptido de *Drosophila* llamado Antennapedia. Los presentes inventores descubrieron recientemente que la administración nasal de penetratina junto con una sustancia bioactiva hidrófila permite la migración de la sustancia bioactiva hidrófila a la sangre a una velocidad elevada en un organismo vivo debido a la excelente permeabilidad de la penetratina en la mucosa nasal, completando de esta forma la presente invención.

Para el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 usada en la presente descripción, la eliminación, sustitución y/o adición de uno o varios aminoácido(s) es/son aceptable(s) siempre que la diferencia(s) esté/estén dentro del intervalo en el que la permeabilidad de la mucosa nasal requerida en la presente divulgación se conserve como en el péptido completo. Por ejemplo, los casos en los que un(os) aminoácido(s) básico(s) en el péptido se sustituye(n) con otro u otros aminoácido(s) básico(s), los casos en los que un(os) aminoácido(s) hidrófilo(s) se sustituye(n) con otro u otra pluralidad de aminoácido(s) hidrófilo(s) y los casos en los que un(os) aminoácido(s) hidrófobo(s) se sustituye(n) con otro u otra pluralidad de aminoácido(s) hidrófobo(s) en el péptido, no cambian las propiedades del péptido completo y, por lo tanto, estos se aceptan sin problemas. En particular, se aceptan preferentemente los casos en los que uno o más aminoácido(s) básico(s) se sustituye(n) o se añade(n) a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. El número de eliminación(es), sustitución(es) y/o adición (adiciones) de los aminoácidos descritos anteriormente es preferentemente pequeño y está(n) involucrado(s) en las mismas preferentemente de 1 a 5 aminoácido(s), más preferentemente de 1 a 3 aminoácido(s), aún más preferentemente 1 aminoácido. En el presente caso, en la presente divulgación, "aminoácido hidrófobo" significa un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina, isoleucina, triptófano, fenilalanina, valina y alanina y "aminoácido hidrófilo" significa un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en serina, treonina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina e histidina. "Aminoácido básico" significa un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, arginina e histidina. Los ejemplos preferidos del péptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 con la excepción de que uno o varios aminoácidos se eliminan, sustituyen y/o añaden, teniendo dicho péptido permeabilidad a la mucosa nasal incluyen el péptido que tiene las secuencias de aminoácidos mostradas en cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 6.

En la presente divulgación, incluso si el péptido contenido junto con una sustancia bioactiva hidrófila es un péptido representado por la secuencia inversa de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 que presenta una permeabilidad en la mucosa transnasal efectiva o un péptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 con la excepción de que una parte de los aminoácidos se eliminan, sustituyen y/o añaden, es aceptable siempre que la diferencia esté dentro del intervalo en el que la permeabilidad de la mucosa nasal requerida en la presente divulgación se conserve como en el péptido completo. En el presente caso, el péptido representado por la secuencia inversa significa que la secuencia de los aminoácidos que constituyen el péptido está invertida. Por ejemplo, cuando la secuencia de los aminoácidos en un péptido desde el extremo N hasta el extremo C es arginina, glutamina, isoleucina y lisina, el péptido invertido del mismo tiene la secuencia de aminoácidos de, desde el extremo N hasta el extremo C, lisina, isoleucina, glutamina y arginina. Los ejemplos preferidos de los mismos incluyen el péptido representado por la secuencia inversa de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 2).

En la presente invención, como aminoácidos que constituyen el péptido contenido junto con una sustancia bioactiva hidrófila, se pueden usar L-aminoácidos de origen natural. Además, debido a que los D-aminoácidos apenas son degradados por proteasas, se pueden usar de manera efectiva y, por lo tanto, la secuencia de aminoácidos del péptido puede estar parcial o totalmente constituida por D-aminoácidos y apropiadamente seleccionados dependiendo de la sustancia bioactiva hidrófila administrada conjuntamente con el péptido. En los casos en que la sustancia bioactiva hidrófila tiene cargas negativas en su totalidad, la secuencia de aminoácidos total está constituida preferentemente por L-aminoácidos. Por ejemplo, cuando la sustancia bioactiva hidrófila es insulina, la secuencia de aminoácidos total está constituida preferentemente por L-aminoácidos. En los casos en que la sustancia bioactiva hidrófila no tiene cargas, o en los casos en que tiene cargas positivas, la secuencia de aminoácidos total está constituida preferentemente por D-aminoácidos. Por ejemplo, en el caso del interferón  $\beta$  que tiene cargas positivas, la secuencia de aminoácidos total está constituida preferentemente por D-aminoácidos.

En la presente invención, el péptido contenido junto con una sustancia bioactiva hidrófila se puede preparar mediante un método convencional para sintetizar un péptido, y también se puede preparar, por ejemplo, mediante la introducción de un gen que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido en un microorganismo tal como *E. coli*, en células animales, en células de insectos o similares y permitiendo la expresión del gen. Además, el péptido también se puede obtener por degradación de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del péptido que se produce de manera natural. Por ejemplo, el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 tiene parcialmente la misma secuencia que la proteína Antennapedia en *Drosophila*, y también se puede preparar por tratamiento con proteasa de la proteína que se produce de forma natural.

En la presente invención, o bien un único tipo o una pluralidad de tipos del (de los) péptido(s) puede(n) estar contenido(s) junto con una sustancia bioactiva hidrófila y se prefiere un único tipo del péptido. La concentración de los mismos no está limitada y, como se muestra en los Ejemplos, es preferentemente de 0,2 mM a 2 mM. Es más preferida una concentración de 0,5 a 2 mM ya que se observa una notable permeación nasal de una sustancia

bioactiva hidrófila con la misma. La concentración de un péptido en la presente invención significa la concentración del péptido después de su administración a la cavidad nasal y, en los casos en que la composición farmacéutica de la presente invención es una solución, significa la concentración en la solución y, en el caso de un sólido, significa la concentración obtenida cuando la dosis de la composición por administración se restablece a 40 µl de una solución que es un volumen convencional para una única administración nasal.

De acuerdo con la invención, como se define en las reivindicaciones, la sustancia bioactiva hidrófila es insulina o interferón β. La absorción nasal de una sustancia bioactiva hidrófila en la presente invención significa la migración de la sustancia bioactiva hidrófila administrada a la cavidad nasal, desde la cavidad nasal a la sangre. Su resultado se puede confirmar mediante la observación del aumento en el nivel en sangre de la sustancia bioactiva hidrófila o la expresión de actividad farmacológica de la misma. El nivel en sangre de la sustancia bioactiva hidrófila se puede medir mediante un método usado convencionalmente por los expertos en la materia, tal como un inmunoensayo. La actividad farmacológica se puede medir utilizando como índice, en el caso de una enzima, su actividad enzimática; y, en el caso de una sustancia que actúa sobre un receptor en la célula, su capacidad para cambiar una función de la célula diana o la cantidad de producción de una sustancia marcadora. Por ejemplo, la actividad farmacológica de la insulina puede medirse utilizando como índice el nivel de glucosa en sangre del animal al que se administró la insulina.

Se puede confirmar si la absorción se promueve o no mediante la comparación entre: la relación de la cantidad de migración del fármaco en sangre con respecto a la cantidad del fármaco administrado observado cuando la sustancia bioactiva hidrófila, que es un componente farmacológicamente activo, se administró únicamente a la cavidad nasal; y la relación de la cantidad de migración del fármaco a la sangre con respecto a la cantidad del fármaco administrado observado cuando también se administró la composición farmacéutica de la presente invención. Si la última tasa es más alta, se puede confirmar que se ha promovido la absorción. Para permitir el ejercicio de una función suficiente como un agente farmacéutico real, el valor de biodisponibilidad, que indica el porcentaje del valor AUC (área bajo la curva de concentración en sangre frente al tiempo) con respecto al AUC tras la administración de la misma cantidad de la sustancia bioactiva hidrófila por inyección, de la composición farmacéutica preferentemente no es menor del 10 %, más preferentemente no menor del 20 %.

La composición farmacéutica para administración nasal de la presente invención también puede contener un vehículo y/o aditivo farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de dicho vehículo y aditivo incluyen agua, solventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, colágeno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polímeros de carboxivinilo, carboximetilcelulosa de sodio, poliácido de sodio, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, carboximetilalmidón sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantana, goma arábica, caseína, gelatina, agar, diglicerol, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina sérica humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa y tensioactivos aceptables como aditivos farmacéuticos.

La composición farmacéutica para administración nasal de la presente invención se puede usar en diversas formas tales como una solución, sólido o polvo, pero en vista de la estabilidad y facilidad de manipulación, se prefiere una forma de sólido o polvo producido por un método tal como liofilización.

El método para administrar la composición farmacéutica para la administración nasal de la presente invención a animales (incluido el ser humano) no está restringido en términos de su forma específica. Por ejemplo, la composición en estado seco o en forma de una solución se puede administrar tal como es; la composición se puede cargar en una cápsula junto con un vehículo y administrarse a continuación; o la composición en estado seco puede disolverse o dispersarse una vez en agua y administrarse a continuación.

La dosis y el número de dosis tras la administración de la composición farmacéutica para administración nasal de la presente invención a un organismo vivo se seleccionan apropiadamente dependiendo de la forma de dosificación, edad y peso corporal del paciente y de la gravedad de los síntomas, y se puede administrar la composición normalmente a una dosis dentro del intervalo de 0,0001 a 50 mg, preferentemente dentro del intervalo de 0,001 a 20 mg por adulto por día basado en el peso de la sustancia bioactiva hidrófila contenida.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Administración nasal de insulina

<Método>

Se hizo una escala de una cantidad prescrita de polvo de insulina (Wako Pure Chemicals) y se colocó en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf), seguido de su disolución en HCl 0,1 N y a continuación la adición de la misma cantidad de NaOH 0,1 N para preparar una solución de insulina.

Se disolvió en PBS penetratina (SEQ ID NO:1; cuya síntesis se encargó a Sigma Genosys) u oligoarginina (SEQ ID NO: 7; cuya síntesis se encargó a Sigma Genosys) que tenía una secuencia de aminoácidos constituida completamente por L-aminoácidos o por D-aminoácidos y se combinó con la solución de insulina mencionada

anteriormente para preparar, para cada experimento de administración, 40 µl de una solución mixta que contenía insulina (10 UI/kg) y 0,5 mM de cada péptido.

5 Se sometieron a ayuno durante 24 horas ratas SD macho que tenían un peso corporal de aproximadamente 200 g y se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de 50 mg/kg de pentobarbital, seguido de una incisión de la parte cervical para exponer la tráquea. Se insertó un tubo de polietileno (INTRAMEDIC PE205, Clay Adams) en la tráquea, se realizó una incisión parcial en el esófago y se insertó cuidadosamente un tubo que tenía el mismo diámetro desde la parte incisa del esófago hasta la coana sin dañar los tejidos. La punta del tubo para insertar en la coana se selló preliminarmente de forma hermética con algodón absorbente y un adhesivo. Para prevenir el reflujo de la solución del fármaco, el conducto nasopalatino en la apertura del maxilar en la cavidad oral se cerró con un adhesivo sintético (Aron Alpha A; fabricado por Daiichi Sankyo Company, Limited). De la vena yugular, se recogieron 0,25 ml de sangre antes y 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos después de la administración de la solución mixta preparada de insulina y el péptido, o solo insulina, seguido de centrifugación para separar el plasma sanguíneo y medir la concentración de insulina en plasma mediante el kit EIA (Levis). La biodisponibilidad se calculó por comparación con los datos obtenidos por administración subcutánea de insulina.

<Resultados>

20 Los cambios en el nivel de insulina en sangre con el tiempo se muestran en la Fig. 1 y los cambios en el nivel de glucosa en sangre se muestran en la Fig. 2. Las ratas a las que solo se administró insulina por vía nasal apenas presentaron un aumento en el nivel de insulina en sangre, mientras que en ratas a las que se administró penetratina u oligoarginina junto con insulina, se observó migración de insulina a la sangre inmediatamente después de la administración. El máximo nivel sanguíneo se logró con L-penetratina y este fue seguido en orden por D-penetratina, D-oligoarginina y L-oligoarginina (Fig. 1). Se observó un descenso en el nivel de glucosa en sangre, que es una actividad farmacológica causada por la migración de insulina a la sangre y se confirmó la disminución en el nivel de glucosa en sangre que refleja el nivel de insulina en sangre (Fig. 2).

30 La biodisponibilidad fue del 0,8 % en ratas a las que solo se administró insulina, mientras que en los casos de administración simultánea de insulina y L- o D-oligoarginina, la biodisponibilidad (BA) fue del 1,1 % para L-oligoarginina y 2,0 % para D-oligoarginina y, en los casos de administración simultánea de insulina y penetratina, la BA fue del 3,4 % para D-penetratina y del 7,1 % para L-penetratina (Fig. 3), mostrando que la penetratina tiene un mayor efecto de promoción de la absorción de insulina en comparación con la oligoarginina.

### 35 **Ejemplo 2: Administración nasal de insulina y su dependencia de la concentración de péptidos**

<Método>

40 La L-penetratina (SEQ ID NO: 1), que mostró la mayor eficacia del efecto de promoción de la absorción en el Ejemplo 1, se evaluó de manera similar del mismo modo que en el Ejemplo 1, con la excepción de que se cambió su concentración en la solución a administrar a 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM o 2 mM.

<Resultados>

45 Mientras que la biodisponibilidad en el caso de la administración de insulina solamente fue del 1,7 %, las biodisponibilidades en los casos de administración de 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM y 2 mM de L-penetratina fueron del 15,1 %, 17,9 %, 28,4 % y 50,7 %, respectivamente. Por lo tanto, la eficacia de absorción de insulina se mejoró dependiendo de la concentración de penetratina (Fig. 4).

### 50 **Ejemplo 3: Administración nasal de dextrano marcado de manera fluorescente (Ejemplo de referencia)**

<Método>

55 Se diluyó un dextrano FD-4 marcado fluorescentemente (Molecular probes, Inc.) con PBS para proporcionar una solución de 4 mg/ml. Utilizando 40 µl de esta solución, se llevo a cabo la evaluación de la misma manera que en el Ejemplo 1. Se cuantificó la concentración de FD en sangre mediante fluorometría. La biodisponibilidad se calculó por comparación con el caso en el que se administró la misma cantidad de FD-4 por vía intravenosa.

<Resultados>

60 La biodisponibilidad fue del 4,9 % en ratas a las que solamente se administró FD-4, del 17 % en el caso del uso de L-penetratina y del 36 % en el caso del uso de D-penetratina. Las biodisponibilidades en las ratas a las que se les administró L-oligoarginina y D-oligoarginina fueron del 12,4 % y 12,4 %, respectivamente. Por lo tanto, la penetratina presentó un mayor efecto de promoción de la absorción en comparación con la oligoarginina (Fig. 5).

**Ejemplo 4: Administración nasal de interferón  $\beta$** 

&lt;Método&gt;

5 Con enfriamiento con hielo, se añadió 1 ml de PBS suplementado con Tween 20 al interferón  $\beta$  de tipo salvaje humano ("Feron" fabricado por Toray Industries, Inc), para obtener una solución de 6.000.000 UI/ml y una alícuota de 100  $\mu$ l de la solución resultante. A esta alícuota, se le añadieron 566  $\mu$ l de PBS suplementado con Tween 20 para obtener una solución de 900.000 UI/ml. Se hizo una escala de cada una de D-penetratina y L-penetratina (SEQ ID NO: 1) y se añadieron 40  $\mu$ l de la solución de interferón P a las mismas de manera que se alcanzó la concentración final de 0,5 mM o 2 mM, para obtener una solución mixta de interferón P y penetratina, que se evaluó, a continuación, de la misma manera que en el Ejemplo 1. La concentración de interferón P se midió con "Kit ELISA de interferón P Humano" fabricado por Kamakura Techno-Science Inc. y la biodisponibilidad se calculó mediante la comparación de su concentración plasmática con la del caso donde se administró la misma cantidad de interferón  $\beta$  por vía intravenosa.

&lt;Resultados&gt;

Mediante la adición de penetratina junto con interferón  $\beta$ , se observó migración de interferón  $\beta$  a la sangre. La biodisponibilidad fue del 6,1 % para L-penetratina 0,5 mM, del 11,0 % para D-penetratina 0,5 mM y del 22,0 % para D-penetratina 2 mM (Fig. 6).

**Ejemplo 5: Administración nasal de insulina**

&lt;Método&gt;

25 Se hizo una escala de una cantidad prescrita de polvo de insulina (Wako Pure Chemicals) y se colocó en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf), seguido de su disolución en HCl 0,1 N y a continuación la adición de la misma cantidad de NaOH 0,1 N para preparar una solución de insulina.

30 Cada uno de los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos constituida completamente por L-aminoácidos (SEQ ID NO: 1 a 6; cuya síntesis se encargó a Sigma Genosys) se disolvió en PBS y se combinó con la solución de insulina mencionada anteriormente para preparar, para cada experimento de administración, 40  $\mu$ l de una solución mixta que contiene insulina (1 UI/kg) y 0,5 mM de cada péptido. Las soluciones preparadas se sometieron a la evaluación de la misma manera que en el Ejemplo 1.

&lt;Resultados&gt;

Los cambios en el nivel de glucosa en sangre con el tiempo se muestran en la Fig. 7; los cambios en el nivel de insulina en sangre con el tiempo se muestran en la Fig. 8; y varios parámetros obtenidos por los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 1. El aumento en el nivel de insulina en sangre apenas se pudo observar en ratas a las que solamente se administró insulina por vía nasal, mientras que la administración simultánea de cada uno de los péptidos de SEQ ID NO: 1 a 6 con insulina provocó la migración de insulina a la sangre inmediatamente después de la administración, lo que lleva a la disminución en el nivel de glucosa en sangre. La biodisponibilidad (BA) calculada basándose en los cambios en el nivel de insulina en sangre fue del 2,3 % en ratas a las que solamente se administró insulina, mientras que fue del 4,4 al 20,1 % en los casos con los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 6. La disponibilidad farmacéutica (BA) calculada basándose en los cambios en el nivel de glucosa en sangre fue del 4,7 % en el caso de administración de solamente insulina, pero fue del 15,7 % al 37,5 % en los casos con los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 6.

[Tabla 1]

	Cm <sub>máx</sub> ( $\mu$ U/ml)	Tm <sub>máx</sub> (min)	AAC (% glu.reduc.h)	AUC ( $\mu$ U.h./ml)	PA (%)	BA (%)
SEQ ID NO:1 (penetratina)	92,9	13,3	34,5	54,5	37,5	19,8
SEQ ID NO:2	58,3	11,7	13,5	52,8	14,7	19,2
SEQ ID NO:3	49,3	18,3	17,1	43,6	18,6	15,9
SEQ ID NO:4	21,2	11,3	10,3	12,2	11,2	4,4
SEQ ID NO:5	100,8	16,0	21,5	52,3	23,4	19,0
SEQ ID NO:6	187,3	10,0	14,4	55,2	15,7	20,1
Sin adición de penetratina	6,5	10,8	4,3	6,4	4,7	2,3



**Aplicabilidad industrial**

Mediante la presente invención, sustancias bioactivas hidrófilas que se han administrado hasta el momento como soluciones de inyección pueden administrarse por vía nasal y, por lo tanto, pueden proporcionarse fármacos que mejoran en gran medida el dolor y la incomodidad de los pacientes. La mejoría del dolor y de la incomodidad de las visitas hospitalarias de los pacientes causadas por estas soluciones inyectables pueden no solo lograr atención médica orientada al paciente en los centros clínicos, sino también cambiar drásticamente el concepto convencional de formulación, lo que lleva a la creación de formulaciones que hacen época.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, Inc.

<120> Fármacos para administración nasal

<130> 08122

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila

<400> 1

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
1 5 10 15

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Penetratina Inversa

<400> 2

Lys Lys Trp Lys Met Arg Arg Asn Gln Phe Trp Ile Lys Ile Gln Arg  
1 5 10 15

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> K a R

<400> 3

Arg Gln Ile Arg Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Arg Trp Arg Arg  
1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> R a K

ES 2 671 024 T3

<400> 4

Lys Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Lys Lys Met Lys Trp Lys Lys  
1 5 10 15

5 <210> 5  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> K a R, R a K

<400> 5

Lys Gln Ile Arg Ile Trp Phe Gln Asn Lys Lys Met Arg Trp Arg Arg  
1 5 10 15

15 <210> 6  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> C-R4

25 <400> 6

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg  
20

30 <210> 7  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> oligo-arginina

<400> 7

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

40

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica que comprende una sustancia bioactiva hidrófila y un péptido, estando dicha sustancia bioactiva hidrófila y dicho péptido mezclados independientemente y no unidos covalentemente entre sí;
- 5 en la que dicho péptido tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, en donde los aminoácidos que constituyen el péptido son L-aminoácidos y/o D-aminoácidos de origen natural, en donde la composición farmacéutica se utiliza para mejorar la absorción de la sustancia bioactiva hidrófila en un método de tratamiento por administración nasal y
- 10 en la que la sustancia bioactiva hidrófila es insulina o interferón  $\beta$ .

Fig. 1

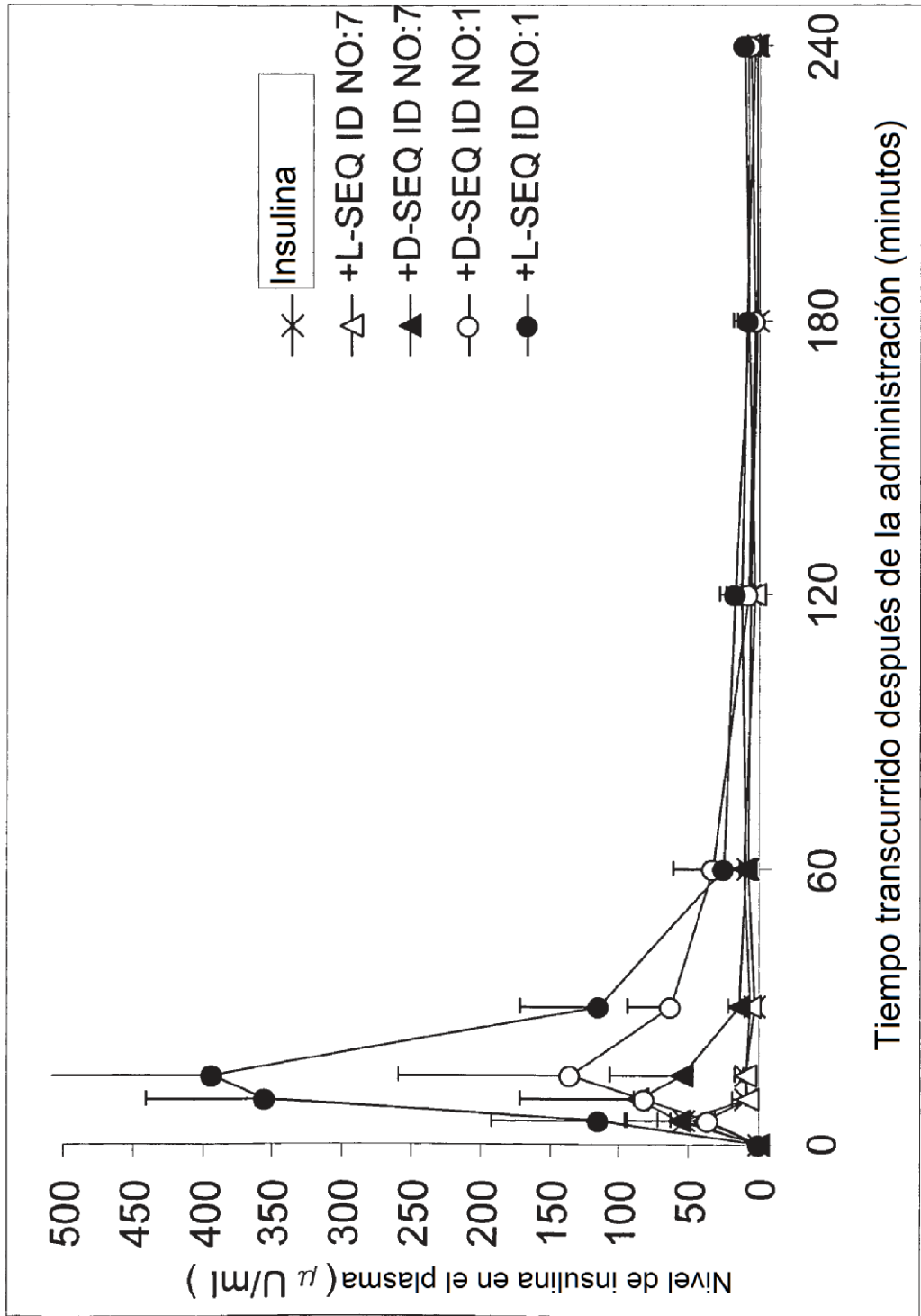
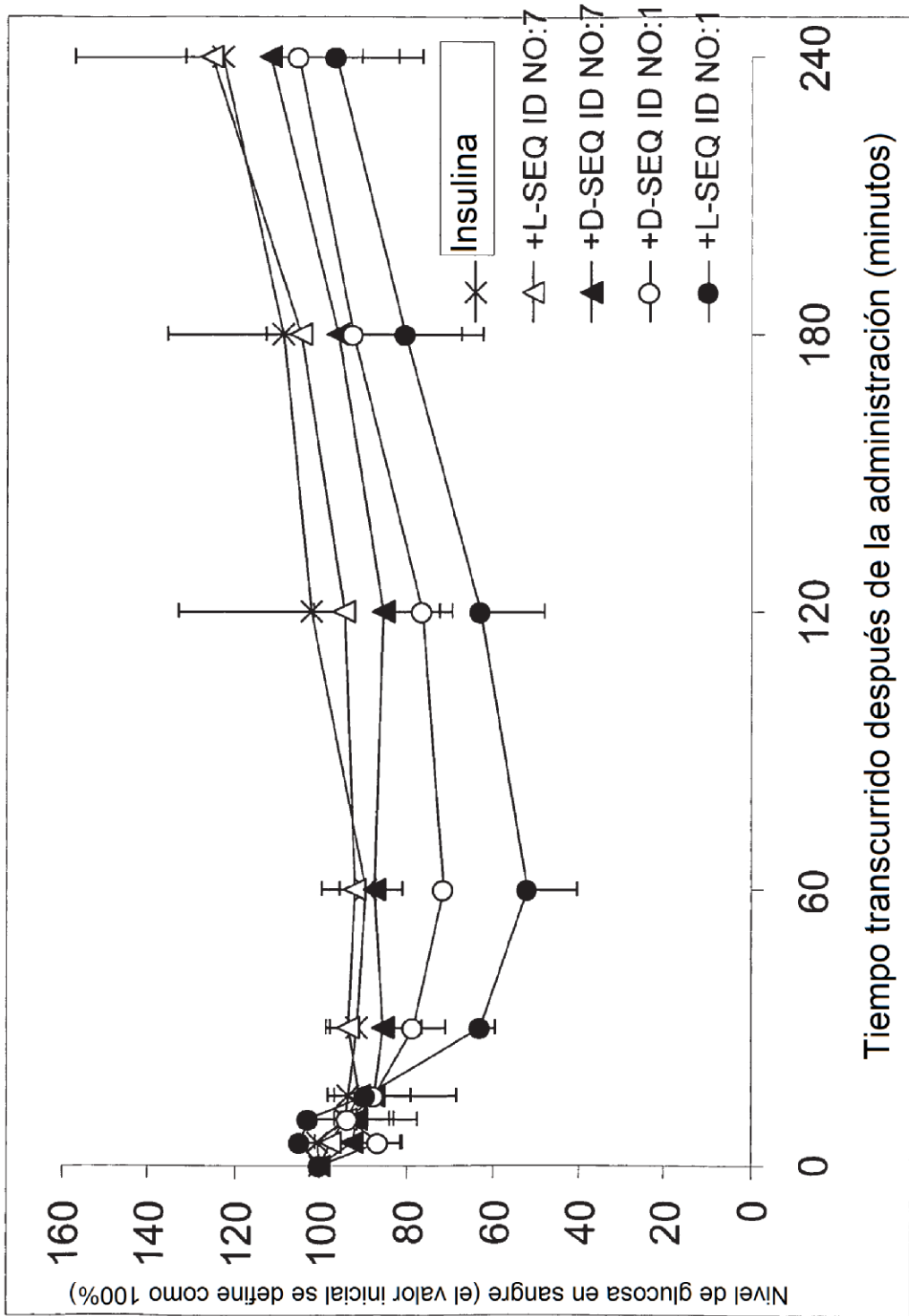


Fig. 2



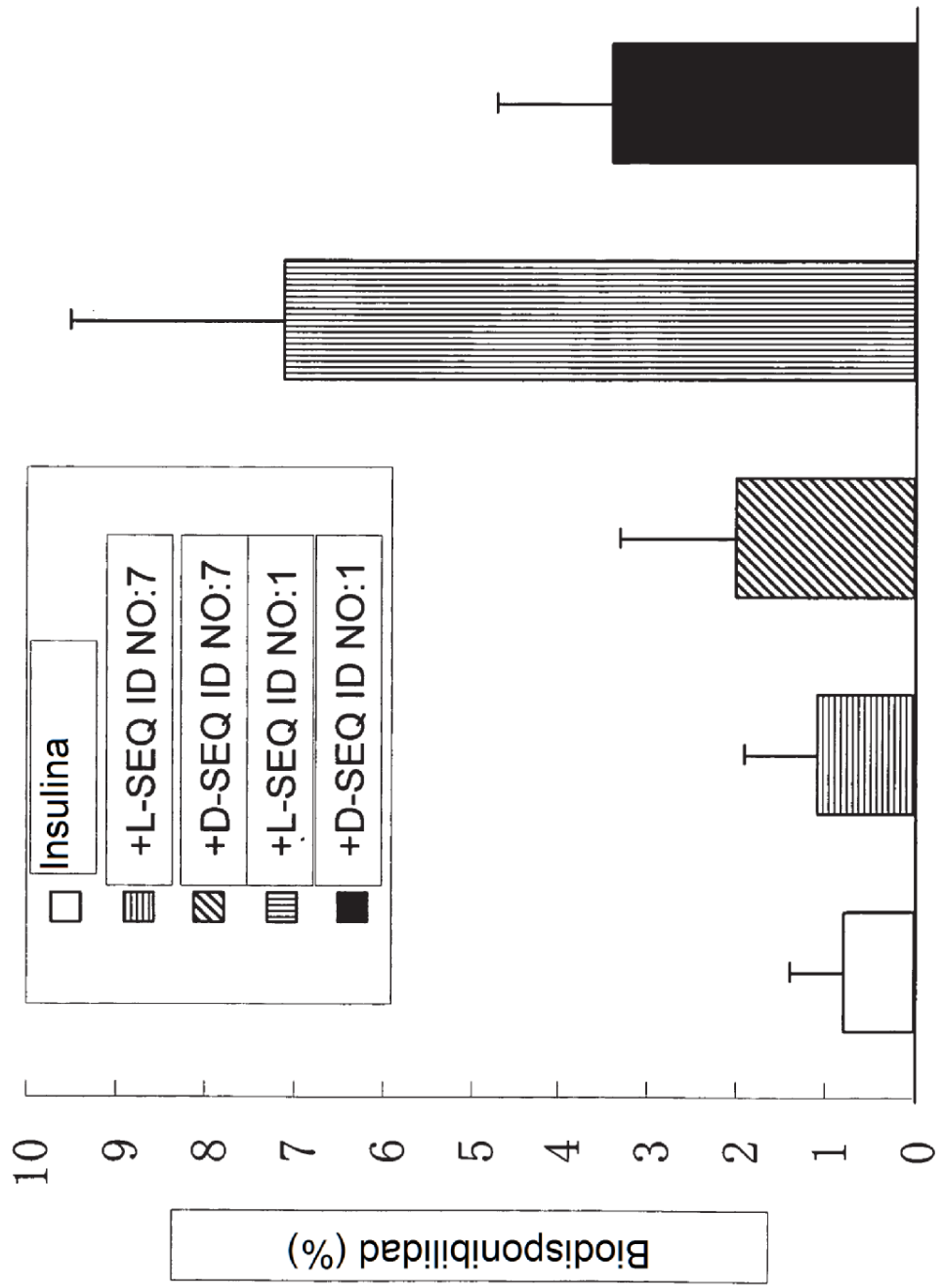


Fig. 3

Fig. 4

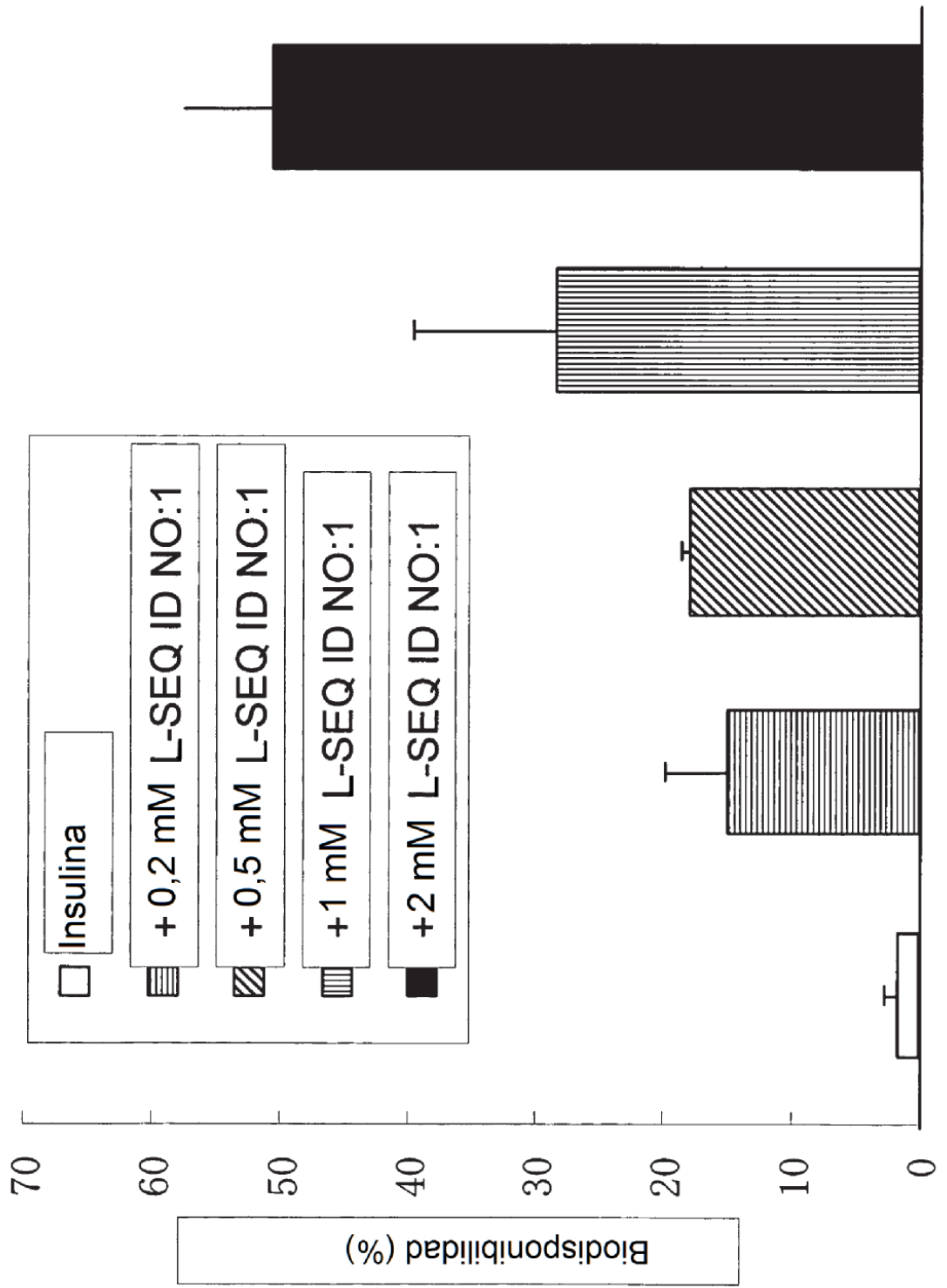
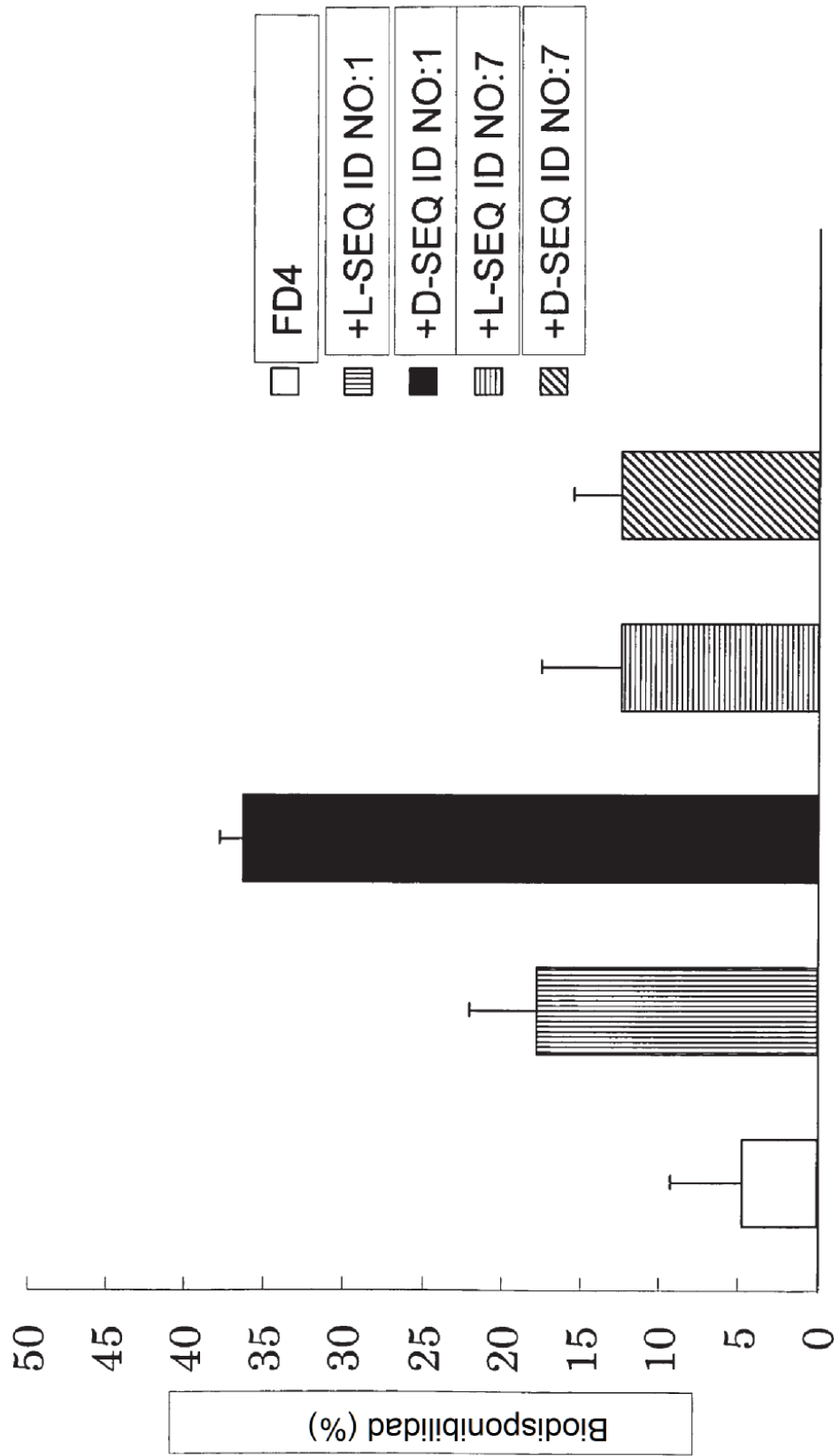


Fig. 5





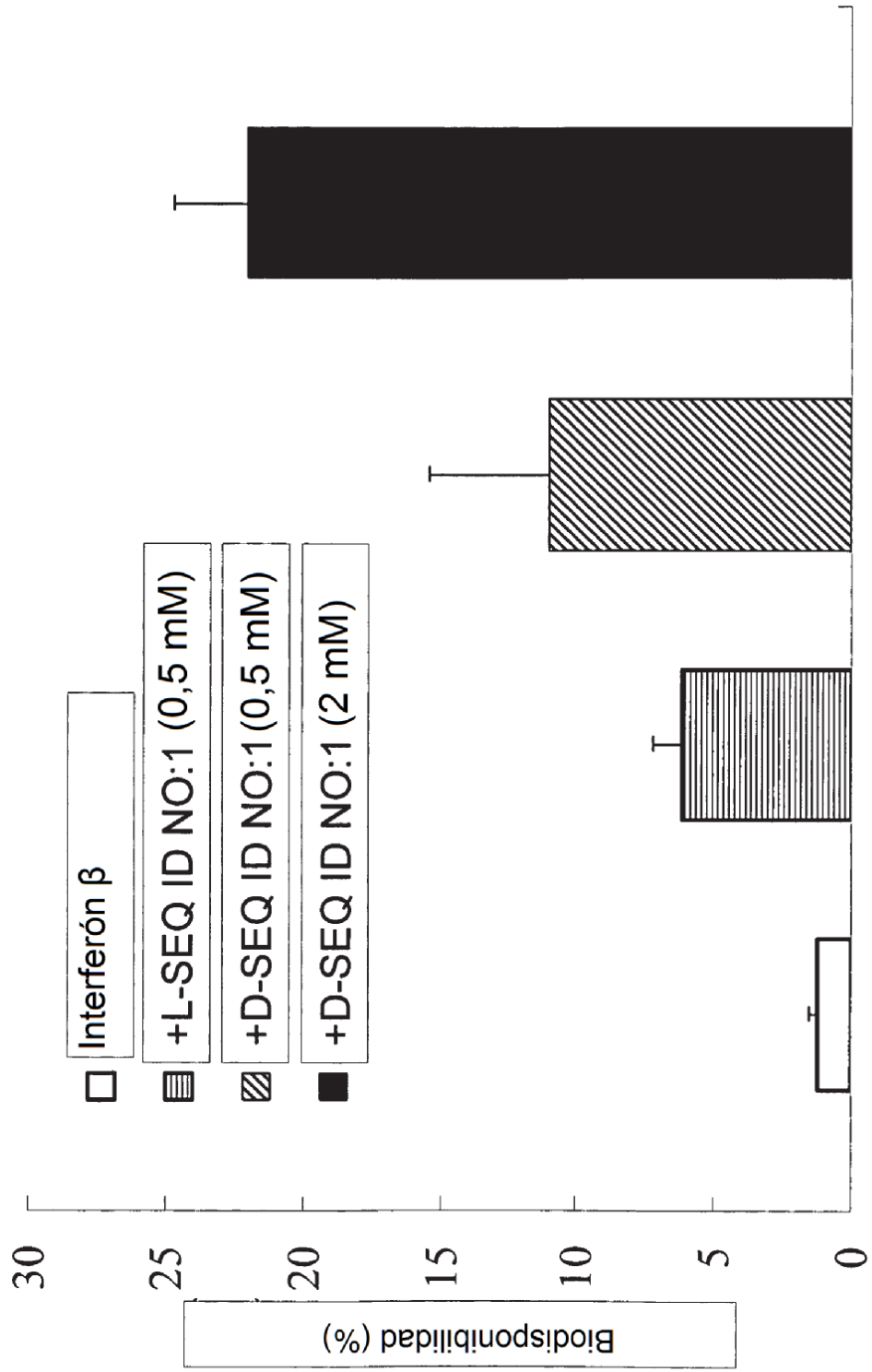


Fig. 6

Fig. 7

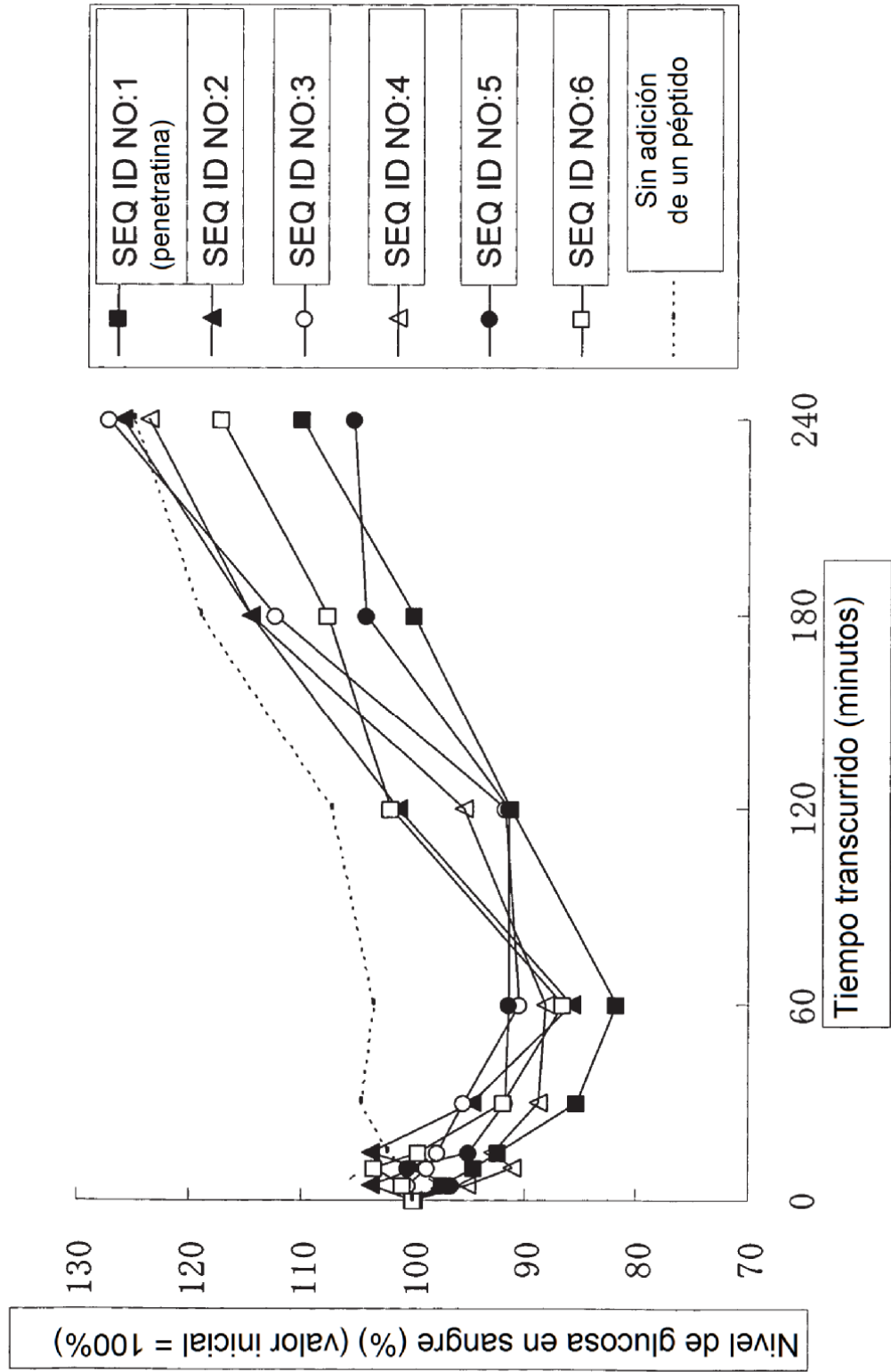


Fig. 8

