

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 659**

51 Int. Cl.:

A61K 31/727 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2014 PCT/US2014/012360**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14158321**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2014 E 14774362 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2968400**

54 Título: **Potenciadores de la resorción como aditivos para mejorar la formulación oral de heparinas de bajo peso molecular**

30 Prioridad:

12.03.2013 US 201361778113 P

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

25.11.2019

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)

Zaehlerweg 4

6300 Zug, CH y

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

TURECEK, PETER y

VEJDA, SUSANNE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 732 659 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).

DESCRIPCION

Potenciadores de la resorción como aditivos para mejorar la formulación oral de heparinas de bajo peso molecular

5 INTRODUCCIÓN

10 La trombosis es la producción de una masa de constituyentes sanguíneos dentro del sistema circulatorio y puede ocluir vasos sanguíneos arteriales o venosos. La trombosis arterial tiene lugar cuando la sangre se coagula en el sitio de depósito de plaquetas en la pared arterial. Las enfermedades asociadas con la trombosis arterial incluyen enfermedad arterial coronaria, enfermedad vascular periférica y apoplejía. La trombosis es típicamente el resultado de una estasis venosa durante y después de la operación o inactividad prolongada. La trombosis venosa puede llevar a trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

15 Pueden usarse anticoagulantes para tratar o prevenir enfermedades tromboembólicas. La prevención y el tratamiento de la trombosis arterial y venosa pueden incluir el tratamiento con heparinas de bajo peso molecular que actúan como agentes antitrombina o antagonistas de factores de coagulación como el Factor Xa.

La US 2013/0035288 describe métodos para mejorar la coagulación sanguínea en un sujeto.

20 SUMARIO

25 La invención proporciona una composición de dosificación oral que comprende una heparina de bajo peso molecular que tiene un peso molecular medio ponderado que varía de 2 kDa a 12 kDa; una composición sinérgicamente eficaz de quitosano y bromelaina; y un vehículo de administración de dosificación oral.

La invención proporciona además una composición de dosificación oral como se ha definido anteriormente para su uso en terapia, preferiblemente terapia para el tratamiento de una enfermedad tromboembólica.

30 Aspectos de la invención incluyen una composición de administración oral como se ha definido anteriormente, para su uso en métodos para tratar o prevenir una enfermedad tromboembólica en un sujeto. También se describen kits de la invención.

35 De acuerdo con la presente descripción, la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal (por lo menos quitosano y bromelaina, de acuerdo con la invención) es una combinación sinérgicamente eficaz de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal. Como se describe con mayor detalle a continuación, la frase "sinérgicamente eficaz" se refiere a una combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en una cantidad (por ejemplo, proporción) que produce un efecto (es decir, mejora la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de la heparina de bajo peso molecular), que es mayor que el que se lograría por la suma de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal individuales. Por ejemplo, la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal produce un efecto que es 1,5 veces mayor o más que el que se lograría por la suma de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal individuales, como 2 veces o más, como 3 veces o más, como 4 veces o más, como 5 veces o más, como 10 veces o más e incluyendo 25 veces o más que lo que se lograría con la suma de los potenciadores de permeación de la barrera epitelial gastrointestinal individuales.

45 En ciertas realizaciones, una composición de dosificación oral como se ha definido anteriormente de acuerdo con la invención es para su uso en métodos que incluyen administrar por vía oral a un sujeto heparina de bajo peso molecular con una combinación sinérgicamente eficaz de bromelaina y quitosano. En estas realizaciones, la combinación de bromelaina y quitosano potencia la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de la heparina de bajo peso molecular en 1,5 veces o más, 2 veces o más que lo que se conseguiría con la suma de quitosano y bromelaina individualmente, como 3 veces o más, como 4 veces o más, como 5 o más, como 10 o más e incluyendo 25 o más de lo que se lograría con la suma de quitosano y bromelaina individualmente. En algunos casos, la magnitud del aumento es de 1000 veces o menos, como 750 veces o menos, incluyendo 500 veces o menos, por ejemplo, 250 veces o menos, incluyendo 100 veces o menos. En ciertos casos, el quitosano es un quitosano no modificado. Como se describe con mayor detalle a continuación, el término "quitosano no modificado" se usa en su sentido convencional para referirse al quitosano que no se derivado o modificado químicamente de ninguna manera para mejorar o cambiar de otra manera la estructura química. Como tal, el quitosano no modificado se refiere al polisacárido lineal compuesto de unidades de sacáridos de D-glucosamina y de N-acetil-D-glucosamina β -(1-4)-enlazadas distribuidas aleatoriamente que no se han modificado para incluir fracciones extrañas, como por sulfatación, acetilación, glicosilación, fosforilación, conjugación de polímeros (incluyendo con polietilenglicol). Por ejemplo, el quitosano no modificado excluye a los quitosanos que han sido tiolados (como, por ejemplo, quitosano-tio-butilamidina) para proporcionar grupos sulfhidrilo o metilados (como, por ejemplo, N-trimetil-quitosano) para proporcionar grupos metilo fijados a la superficie de la estructura de polisacárido.

65

En algunas realizaciones de la presente invención la heparina de bajo peso molecular es Bemiparina, Certoparina, Dalteparina, Enoxaparina, Nadroparina, Parnaparina, Reviparina y Tinzaparina y combinaciones de los mismos.

5 En ciertas realizaciones, la composición de dosificación oral como se ha definido anteriormente de acuerdo con la invención es para su uso en métodos que incluyen tratar o prevenir una enfermedad tromboembólica en un sujeto, donde la enfermedad tromboembólica está asociada con infarto de miocardio, trombosis venosa profunda posterior a la cirugía, ataque isquémico transitorio, injerto de bypass de arteria coronaria, enfermedad vascular periférica, apoplejía, angioplastia coronaria transluminal percutánea, leucemia promielocítica aguda, diabetes, mielomas múltiples, shock séptico, púrpura fulminanas, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, angina, inserción y presencia de válvula aórtica o prótesis vascular, cateterización cardíaca, endoplastia transluminal, reemplazo de válvula cardíaca.

15 En ciertas realizaciones, las composiciones de interés demuestran una permeación mejorada, por ejemplo, cuando se determina mediante estudios de reabsorción en modelos de células CaCo-2 en comparación con composiciones en ausencia de potenciadores de la permeación epitelial gastrointestinal, composiciones que tienen solo un único potenciador de la permeación epitelial gastrointestinal o composiciones que tienen dos potenciadores de la permeación epitelial gastrointestinal no sinérgicamente eficaces.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la configuración experimental para el análisis de biodisponibilidad de CaCo2 para determinar el% de resorción de heparinas de bajo peso molecular.

25 La Figura 2 muestra un ejemplo de la cantidad de heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal desoxicolina (0,06%) reabsorbida en el análisis de biodisponibilidad de CaCo2.

La Figura 3 muestra el estado de la capa celular en el análisis de biodisponibilidad de CaCo-2 para heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal desoxicolina (0,06%) medida por resistencia eléctrica transepitelial.

30 La Figura 4 muestra un ejemplo de la cantidad de heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal desoxicolina (0,08%) reabsorbida en el análisis de biodisponibilidad de CaCo2.

La Figura 5 muestra el estado de la capa celular en el análisis de biodisponibilidad de CaCo-2 para heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de permeación de la barrera epitelial gastrointestinal desoxicolina (0,08%) medida por resistencia eléctrica transepitelial.

35 La Figura 6 muestra un ejemplo de la cantidad de heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal quitosano (3% p/v) reabsorbida en el análisis de biodisponibilidad de CaCo2.

La Figura 7 muestra el estado de la capa celular en el análisis de biodisponibilidad de CaCo-2 para heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la barrera epitelial gastrointestinal quitosano (3% p/v) medido por resistencia eléctrica transepitelial.

40 La Figura 8 muestra un ejemplo de la cantidad de heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal bromelaina (0,5 mg/ml) reabsorbida en el análisis de biodisponibilidad de CaCo2.

45 La Figura 9 muestra el estado de la capa celular en el análisis de biodisponibilidad de CaCo-2 para heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal bromelaina (0,5 mg/ml) medida por resistencia eléctrica transepitelial.

La Figura 10 muestra un ejemplo de la cantidad de heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal caprato de sodio (12 mM) reabsorbida en el análisis de biodisponibilidad de CaCo2.

50 La Figura 11 muestra el estado de la capa celular en el análisis de biodisponibilidad de CaCo-2 para heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal caprato de sodio (12 mM) medido por resistencia eléctrica transepitelial.

55 La Figura 12 muestra un ejemplo de la cantidad de heparina de bajo peso molecular con una combinación sinérgicamente eficaz de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal quitosano (3% p/v) y bromelaina (0,5 mg/ml) reabsorbida en el análisis de biodisponibilidad de CaCo2.

La Figura 13 muestra el estado de la capa celular en el análisis de biodisponibilidad de CaCo-2 para heparina de bajo peso molecular con una combinación sinérgicamente eficaz de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal quitosano (3% p/v) y bromelaina (0,5 mg/ml) medido por resistencia eléctrica transepitelial.

60 La Figura 14 muestra un ejemplo de los datos de resorción adquiridos en el análisis de biodisponibilidad de CaCo-2 para heparina de bajo peso molecular en combinación con varios potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal.

65 DEFINICIONES RELEVANTES

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica a continuación.

5 Debe observarse que, como se usan en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a una "LMWH" puede incluir una mezcla de dos o más LMWH, como se desee.

10 Una "heparina de bajo peso molecular" (LMWH) como se usa en la presente se refiere a la clase de polisacáridos sulfatados (SP) de cadena corta que muestran actividad anticoagulante en cualquiera de los varios ensayos de coagulación descritos en la presente para tratar afecciones que presentan trombosis no deseada, así como para la profilaxis de alto riesgo de trombosis no deseada. Como se describe con mayor detalle a continuación, el término trombosis no deseada se refiere a la formación de un coágulo dentro de un vaso sanguíneo que puede interferir con el suministro de sangre a los tejidos y puede provocar complicaciones, como por ejemplo trombosis venosa profunda, embolias pulmonares, ataques cardíacos o apoplejías (es decir, provocar una enfermedad tromboembólica). La heparina de bajo peso molecular puede ser polisacáridos sulfatados naturales, como los fraccionados y despolimerizados de una fuente biológica de heparina no fraccionada o polisacáridos sulfatados sintéticos, donde el polisacárido sulfatado se produce parcial o totalmente mediante métodos sintéticos (por ejemplo, síntesis química). Una medida de la actividad es comparar el tiempo de coagulación demostrado por una heparina de bajo peso molecular con la actividad anticoagulante mostrada por heparina no fraccionada. Por ejemplo, las heparinas de bajo peso molecular de interés muestran actividad anticoagulante y anti-trombótica en el ensayo de coagulación de tiempo de protrombina diluido (dPT) o el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), que es por lo menos igual o mayor que la actividad anticoagulante y antitrombótico molar de heparina no fraccionada (intervalo de MW de 5.000 a 40.000; media de 18.000 daltons).

25 Las heparinas de bajo peso molecular de interés son polisacáridos sulfatados de cadena corta que pueden tener un intervalo de peso molecular de 2000 a 12.000 daltons, como por ejemplo, de 2500 daltons a 10.000 daltons, como de 3000 daltons a 9500 daltons, tales como 3500 daltons a 9000 daltons, incluyendo de 4000 daltons a 8500 daltons. Las heparinas de bajo peso molecular pueden tener un peso molecular medio de 2000 daltons a 10.000 daltons, como de 2500 daltons a 9000 daltons, como de 3000 daltons a 8500 daltons, incluyendo de 4000 daltons a 8000 daltons.

35 En algunos casos, las heparinas de bajo peso molecular de interés pueden incluir, entre otras, Ardeparina, Bemiparina, Bioparina, Certoparina, Dalteparina, Enoxaparina, Miniparina, Nadroparina, Parnaparina, Reviparina, Sandoparina y Tinzaparina y combinaciones de las mismas.

40 En los métodos de la invención pueden usarse heparinas de bajo peso molecular con una combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal para mejorar la hemostasis, en el tratamiento de enfermedades tromboembólicas, como las asociadas con trombosis arterial y venosa, que se manifiesta como una trombosis vascular o embolia pulmonar, en particular cuando es necesaria o deseable una resorción mejorada por el sistema gastrointestinal. La capacidad de las heparinas de bajo peso molecular para inhibir la trombosis y reducir la coagulación puede determinarse usando varios ensayos de coagulación *in vitro* (por ejemplo, ensayos de generación de trombina y tromboelastografía (TEG) o trombografía automática calibrada (CAT)) y modelos de sangrado *in vivo* (por ejemplo, corte de la cola, corte transversal, tiempo de coagulación de sangre completa o determinación del tiempo de sangrado de la cutícula en ratones o perros hemofílicos). Ver, por ejemplo, PDR Staff. Physicians' Desk Reference. 2004, Anderson et al. (1976) *Thromb. Res.* 9:575-580; Nordfang et al. (1991) *Thromb Haemost.* 66:464-467; Welsch et al. (1991) *Thrombosis Research* 64:213-222; Broze et al. (2001) *Thromb Haemost* 85:747-748; Scallan et al. (2003) *Blood.* 102:2031-2037; Pijnappels et al. (1986) *Thromb. Haemost.* 55:70-73; y Giles et al. (1982) *Blood* 60:727-730, y los ejemplos de la presente.

50 El término "polisacárido", como se usa en la presente, se refiere a un polímero que contiene dos o más residuos de sacáridos enlazados covalentemente. Los residuos de sacáridos pueden estar enlazados, por ejemplo, por fracciones de enlace glicosídicas, de éster, amida u oxima. El peso molecular medio de los polisacáridos puede variar ampliamente, como por ejemplo variar de 2000 daltons a 12.000 daltons, como por ejemplo, de 2500 daltons a 10.000 daltons, como de 3000 daltons a 9500 daltons, como de 3500 daltons a 9000 daltons, incluyendo de 4000 daltons a 8500 daltons. Los polisacáridos pueden ser de cadena lineal (es decir, lineales) o ramificados o pueden contener regiones discretas de partes lineales y ramificadas. Los polisacáridos también pueden ser fragmentos de polisacáridos generados por degradación (por ejemplo, hidrólisis) de polisacáridos más grandes. La degradación se puede lograr mediante cualquier protocolo conveniente incluyendo el tratamiento de polisacáridos con ácidos, bases, calor, oxidantes o enzimas para producir polisacáridos fragmentados. Los polisacáridos pueden alterarse químicamente y pueden modificarse, incluyendo pero no limitado a, sulfatación, polisulfatación, esterificación y metilación.

65 El peso molecular, como se analiza en la presente, puede expresarse o como un peso molecular medio en número o como un peso molecular medio ponderado. A menos que se indique lo contrario, todas las referencias al

peso molecular en la presente se refieren al peso molecular medio ponderado. Ambas determinaciones de peso molecular, media numérica y media ponderada, pueden medirse usando, por ejemplo, cromatografía de permeación en gel u otras técnicas de cromatografía líquida.

5 El término "derivado de" se usa en la presente para identificar la fuente original de una molécula, pero no se pretende que limite el método por el cual se elabora la molécula, que puede ser, por ejemplo, mediante síntesis química o metodologías recombinantes.

10 Los términos "variante", "análogo" y "muteína" se refieren a derivados biológicamente activos de una molécula de referencia, que retienen la actividad deseada, como la actividad anticoagulante en el tratamiento de una enfermedad tromboembólica. Los términos "variante" y "análogo" en referencia a un polipéptido (por ejemplo, factor de coagulación) se refieren a compuestos que tienen una secuencia y estructura de polipéptido nativa con una o más adiciones, sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora) y/o deleciones de aminoácidos, en relación con la molécula nativa, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica y que sean
15 "sustancialmente homólogas" a la molécula de referencia como se define a continuación. Las secuencias de aminoácidos de tales análogos tendrán un alto grado de homología de secuencia con la secuencia de referencia, por ejemplo, una homología de secuencia de aminoácidos del 50% o más, como del 60% o más, como del 70% o más, como del 80% o más, como del 90% o más, como del 95% o más, incluyendo el 99% o más (y en algunos casos siendo el 100% o menos) cuando las dos secuencias están alineadas. En algunos casos, los análogos incluirán la misma cantidad de aminoácidos, pero incluirán sustituciones. El término "muteína" incluye además polipéptidos que tienen una o más moléculas del tipo aminoácido incluyendo, pero no limitadas a, compuestos que contienen solo moléculas amino y/o imino, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos de origen no natural sintéticos, etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, moléculas tanto de origen natural como no de origen natural (por ejemplo, sintéticas), cicladas, ramificadas y similares. El término también incluye moléculas que comprenden uno o más residuos de glicina N-sustituida (un "peptide") y otros aminoácidos o péptidos sintéticos. (Ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.831.005; 5.877.278; y 5.977.301; Nguyen et al., Chem Biol. (2000) 7:463-473; y Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:9367-9371 para descripciones de peptoides). En realizaciones de la invención, los análogos y las muteínas tienen por lo menos la misma actividad de coagulación que la molécula nativa.
30

Como se ha tratado anteriormente, los análogos pueden incluir sustituciones que son conservadoras, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Específicamente, los aminoácidos se dividen en generalmente cuatro familias: (1) ácidos - aspartato y glutamato; (2) básicos - lisina, arginina, histidina; (3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga - glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican en algunos casos como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, un reemplazo aislado de leucina con isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo conservador similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente, no tendrá un efecto importante sobre la actividad. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, o incluso hasta aproximadamente 15-25 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, o cualquier número entero entre 5-25, siempre que la función deseada de la molécula permanezca intacta.
40

45 Por "derivado" se entiende cualquier modificación adecuada de la molécula de referencia de interés o de un análogo de la misma, como sulfatación, acetilación, glicosilación, fosforilación, conjugación de polímeros (como con polietilenglicol), u otra adición de fracciones extrañas, siempre que se retenga la actividad biológica deseada (por ejemplo, actividad trombótica reducida) de la molécula de referencia. Por ejemplo, los polisacáridos de heparina de bajo peso molecular pueden derivarse con uno o más grupos orgánicos o inorgánicos. Los ejemplos incluyen pero no están limitados a polisacáridos sustituidos en por lo menos un grupo hidroxilo con otra fracción (por ejemplo, un grupo sulfato, carboxilo, fosfato, amino, nitrilo, halo, sililo, amido, acilo, alifático, aromático o sacárido), o donde se ha reemplazado un anillo de oxígeno un grupo azufre, nitrógeno, un grupo metileno, etc. los polisacáridos pueden alterarse químicamente, por ejemplo, para mejorar la función antitrombótica. Tales modificaciones pueden incluir, pero no están limitadas a, sulfatación, polisulfatación, esterificación y metilación.
50

55 Por "fragmento" se entiende una molécula que contiene una parte de la secuencia y estructura de longitud completa intactas. En algunos casos, un fragmento de un polisacárido puede generarse por degradación (por ejemplo, hidrólisis, despolimerización) de un polisacárido más grande. Los fragmentos activos de un polisacárido de la invención pueden incluir aproximadamente 2-20 unidades de sacárido del polisacárido de longitud completa, como aproximadamente 5-10 unidades de sacárido de la molécula de longitud completa, e incluir cualquier número entero entre 2 unidades de sacárido y la molécula de longitud completa, siempre que el fragmento retenga la actividad biológica. Un fragmento de un polipéptido puede incluir una deleción C-terminal, una deleción N-terminal o una deleción interna del polipéptido nativo. Los fragmentos activos de una proteína particular pueden incluir, en algunas realizaciones, aproximadamente 5-10 residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa o más, como aproximadamente 15-25 residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa o más,
60
65

como aproximadamente 20-50 residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa o más, e incluyendo cualquier número entero entre 5 aminoácidos y la secuencia de longitud completa, siempre que el fragmento en cuestión retenga la actividad biológica, como por ejemplo, unión a la antitrombina III, actividad antitrombótica o la capacidad de inactivar el factor IIa y el factor Xa.

5 Por "sustancialmente purificado" se entiende el aislamiento de una sustancia (por ejemplo, polisacárido sulfatado no anticoagulante) de tal manera que la sustancia incluya la mayoría de la muestra en la que reside. Por ejemplo, una muestra que está sustancialmente purificada contiene el 50% o más de la sustancia de interés, como el 60% o más de la sustancia de interés, como el 75% o más de la sustancia de interés, como el 90% o más de la sustancia de interés, como el 95% o más de la sustancia de interés, incluyendo el 99% o más de la sustancia de interés. Puede emplearse cualquier protocolo conveniente para purificar polisacáridos, polinucleótidos y polipéptidos de interés e incluyen, pero no están limitados a, ultrafiltración, precipitación selectiva, cristalización, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y sedimentación de acuerdo con la densidad.

15 Por "aislado" se entiende, cuando se hace referencia a un polisacárido o polipéptido, que la molécula indicada está separada y es discreta del organismo completo con el que la molécula se encuentra en la naturaleza o está presente en ausencia sustancial de otras macro-moléculas biológicas del mismo tipo.

20 Por "homología" se entiende el porcentaje de identidad entre dos fracciones de polipéptidos. Como se hace referencia en la presente, dos secuencias de polipéptidos son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias muestran aproximadamente el 50% o más de identidad de secuencia, como el 60% o más de identidad de secuencia, como el 75% o más de identidad de secuencia, como el 85% o más de identidad de secuencia, como el 90% o más de identidad de secuencia, como el 95% o más de identidad de secuencia, incluyendo el 99% o más de identidad de secuencia. En algunas realizaciones, los polipéptidos sustancialmente homólogos incluyen secuencias que tienen identidad completa con una secuencia específica.

30 Por "identidad" se entiende una subunidad exacta a la correspondencia de subunidades de dos secuencias poliméricas. Por ejemplo, un polipéptido idéntico es uno que tiene una correspondencia de aminoácido a aminoácido exacta con otro polipéptido o un polinucleótido idéntico es uno que tiene una correspondencia de nucleótido a nucleótido exacta con otro polinucleótido. El porcentaje de identidad puede determinarse mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas (la secuencia de referencia y una secuencia con un % de identidad desconocido con la secuencia de referencia) alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia de referencia, y multiplicando el resultado por 100. Puede emplearse cualquier protocolo conveniente para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias poliméricas, como por ejemplo, ALIGN, Dayhoff, M.O. en *Atlas of Protein Sequence and Structure* M.O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Advances in Appl. Math.* 2:482-489, 1981 para análisis de péptidos.

40 Por "sujeto" se entiende cualquier miembro del subphylum chordata, incluyendo sin limitación, humanos y otros primates, incluyendo los primates no humanos como los chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores como ratones, ratas y cobayas; aves, incluyendo aves domésticas, salvajes y de caza como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares. El término no denota una edad particular. Por lo tanto, son de interés tanto los individuos adultos como los recién nacidos.

50 El término "paciente" se usa en su sentido convencional para referirse a un organismo vivo que padece o es propenso a una afección que puede prevenirse o tratarse mediante la administración de una heparina de bajo peso molecular de la invención, e incluye tanto humanos como animales no humanos.

55 Por "muestra biológica" se entiende una muestra de tejido o fluido aislado de un sujeto, incluyendo pero no limitado a, sangre, plasma, suero, materia fecal, orina, médula ósea, bilis, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, muestras de la piel, secreciones externas de la piel, vías respiratorias, intestinales y genitourinarias, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias y también muestras de constituyentes de cultivos celulares in vitro que incluyen, pero no están limitados a, medios acondicionados que resultan del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, por ejemplo, células recombinantes y componentes celulares.

60 Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que, cuando se administra como se describe en la presente, produce la respuesta terapéutica deseada, como por ejemplo, actividad antitrombótica o tiempos de coagulación aumentados.

65 Por "enfermedad tromboembólica" se entiende cualquier trastorno que resulta de la formación de un coágulo dentro de un vaso sanguíneo que interfiere con el suministro de sangre a los tejidos y puede provocar problemas del sistema circulatorio, como por ejemplo, trombosis venosa profunda, embolias pulmonares, ataques cardíacos o apoplejías. Como se trata a continuación, las enfermedades tromboembólicas pueden incluir, pero no

están limitadas a, aquellas enfermedades tromboembólicas asociadas con infarto de miocardio, trombosis venosa profunda después de la cirugía, ataque isquémico transitorio, injerto de bypass de arteria coronaria, enfermedad vascular periférica, angioplastia coronaria transluminal percutánea por apoplejía, leucemia promielopelocítica aguda, diabetes, mielomas múltiples, shock séptico, púrpura fulminante, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, angina, inserción y la presencia de prótesis de válvula aórtica o vascular, cateterización cardíaca, endoplastia transluminal, reemplazo valvular cardíaco.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los aspectos de la invención incluyen una composición de dosificación oral como se ha definido anteriormente de acuerdo con la invención para su uso en métodos para tratar una enfermedad tromboembólica en un sujeto. También se describen composiciones y kits de la invención.

Antes de describir la invención con mayor detalle, debe entenderse que la invención no se limita a las realizaciones particulares descritas en la presente ya que tales realizaciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no se pretende que la terminología sea limitativa. El alcance de la invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese intervalo expuesto, está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también están incluidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos también están incluidos en la invención. Ciertos intervalos se presentan en la presente con valores numéricos que van precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se usa en la presente para proporcionar soporte literal para el número exacto al que precede, así como un número que es cercano o aproximadamente al número que precede el término. Al determinar si un número está cerca de o aproximadamente un número enumerado específicamente, el número no enumerado cercano o aproximado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número recitado específicamente. Debe observarse que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, se pretende que esta declaración sirva como base antecedente para el uso de tal terminología exclusiva como "solamente", "solo" y similares en relación con la enumeración de elementos de las reivindicaciones, o el uso de una limitación "negativa". Como será evidente para los expertos en la técnica tras leer esta divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en la presente tiene componentes y características discretas que pueden separarse o combinarse fácilmente con las características de cualquiera de las otras varias realizaciones sin apartarse del alcance o espíritu de la invención. Cualquier método enumerado puede llevarse a cabo en el orden de los eventos enumerados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente también en la puesta en práctica o la prueba de la invención, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos representativos.

En una descripción más detallada de la presente invención, se describen primero con mayor detalle las composiciones para su uso en métodos para tratar una enfermedad tromboembólica administrando por vía oral una heparina de bajo peso molecular y una combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal. A continuación, también se describen composiciones y kits de la presente invención.

COMPOSICIONES PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO DE UNA ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA EN UN SUJETO

Como se ha resumido anteriormente, la invención proporciona una composición de dosificación oral como se ha definido anteriormente de acuerdo con la invención, para su uso en terapia, preferiblemente terapia para el tratamiento de una enfermedad tromboembólica. El término "tratar una enfermedad tromboembólica" se usa en su sentido convencional para referirse a reducir o eliminar la trombosis no deseada en el sujeto, como reduciendo el inicio (es decir, aumentar la cantidad de tiempo para que comience la trombosis) de la coagulación sanguínea así como la tasa global de coagulación sanguínea del sujeto (es decir, aumenta la cantidad de tiempo para que se complete la coagulación sanguínea). En algunas realizaciones, la composición reduce el inicio de la coagulación sanguínea. Por ejemplo, la composición de la invención puede aumentar la cantidad de tiempo requerido para que la sangre comience a coagular en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en 75% o más, como en un 90% o más, como en un 95% o más, en comparación con un control adecuado, donde en algunos casos el aumento es del 200% o menos, como del 100% o menos. En otras realizaciones, la composición de la invención reduce la velocidad de coagulación de la sangre. Por ejemplo, la composición de la invención puede reducir la tasa de coagulación sanguínea en un 2% o más, como en un 5% o

más, como en un 10% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más, como en un 100% o más, como en un 200% o más, incluyendo en un 500% o más, donde en algunos casos el aumento es del 1000% o menos, como el 750% o menos en comparación con un control adecuado.

5 En realizaciones de la presente invención, una cantidad de una heparina de bajo peso molecular se administra por vía oral a un sujeto con una combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal. Dependiendo de la fisiología del sujeto, la frase "epitelial gastrointestinal" como se usa en la presente, se refiere al tejido epitelial del tracto digestivo, como el estómago y el tracto intestinal (por ejemplo, duodeno, yeyuno, íleon), y puede incluir además otras estructuras que participan en las funciones gastrointestinales del cuerpo, incluida la parte inferior del esófago, el recto y el ano. Por potenciador de la permeación gastrointestinal se entiende un compuesto que, cuando se administra por vía oral, aumenta la cantidad de heparina de bajo peso molecular que es reabsorbida por el sistema gastrointestinal. Además, los potenciadores de la permeación gastrointestinal también pueden acelerar el inicio (es decir, reducir el tiempo en el que comienza de la resorción) de la resorción de heparina de bajo peso molecular a través del epitelio gastrointestinal así como acelerar la velocidad general de transporte de la heparina de bajo peso molecular a través del epitelio gastrointestinal el sujeto (es decir, reducir la cantidad de tiempo para que se complete la resorción de heparina de bajo peso molecular por parte del sistema gastrointestinal).

20 Se emplea una combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal para aumentar la cantidad de heparina de bajo peso molecular reabsorbida por el sistema gastrointestinal. Por ejemplo, la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal puede aumentar la cantidad de heparina de bajo peso molecular reabsorbida por el sistema gastrointestinal en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más, como en un 90% o más, como en un 95% o más, donde en algunos casos el aumento es del 100% o menos, en comparación con un control adecuado. En otras realizaciones, la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal acelera el inicio de la resorción de heparina de bajo peso molecular a través del epitelio gastrointestinal. Por ejemplo, los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal pueden reducir la cantidad de tiempo requerido para iniciar la resorción de la heparina de bajo peso molecular en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más, como en un 90% o más, como un 95% o más, donde en algunos casos el aumento es del 100% o menos, en comparación con un control adecuado. En otras realizaciones más, la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de la invención aumenta la tasa de resorción de la heparina de bajo peso molecular por el sistema gastrointestinal. Por ejemplo, los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal pueden aumentar la tasa de resorción de heparina de bajo peso molecular en un 2% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más, como en un 100% o más, como en un 200% o más, incluso en un 500% o más, donde en algunos casos el aumento es del 1000% o menos, en comparación con un control adecuado. En ciertos casos, la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación del epitelio gastrointestinal de la invención aumenta la resorción de heparina de bajo peso molecular como se determina por los modelos de células Caco-2, como se describe con mayor detalle a continuación. Por ejemplo, los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de la invención pueden aumentar la resorción de heparina de bajo peso molecular según se determina por los modelos de células Caco-2 en un 2% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más, como en un 100% o más, como en un 200% o más, incluso en un 500% o más, donde en algunos casos, el aumento es del 1000% o menos, en comparación con un control adecuado.

50 De acuerdo con la invención, el modulador de unión estrecha de polisacáridos es quitosano. El quitosano, como se usa en la presente, se refiere al copolímero lineal de 2-acetamida-2-deoxi-β-D-glucopiranososa y 2-amino-β-D-glucopiranososa producida por la N-desacetilación de quitina. Los moduladores de unión estrecha de polisacáridos también pueden incluir derivados de quitosano como N-alquil quitosano, quitosano acilado, carboximetil quitosano, quitosano fosforilado, N-(aminoalquil) quitosano, succinil quitosano y octanoil quitosano. En ciertas realizaciones, el modulador de unión estrecha de polisacárido es quitosano no modificado. Como se ha descrito anteriormente, el término "quitosano no modificado" se usa en su sentido convencional para referirse al quitosano que no ha sido derivado o modificado químicamente de ninguna manera para mejorar o cambiar de otro modo la estructura química. Como tal, el quitosano no modificado es quitosano que no se ha modificado para incluir otras fracciones extrañas como, por ejemplo, por sulfatación, acetilación, glicosilación, fosforilación, conjugación de polímeros (como con polietilenglicol). Por ejemplo, el quitosano no modificado excluye a los quitosanos que han sido tiolados (como, por ejemplo, quitosano-tio-butilamidina) para proporcionar grupos sulfhidrilo o metilados (como, por ejemplo, N-trimetil-quitosano) para proporcionar grupos metilo fijados a la superficie de la estructura de polisacáridos. De igual manera, los quitosanos no modificados excluyen los derivados del quitosano como el N-alquil quitosano, quitosano acilado, quitosano fosforilado, N-(aminoalquil) quitosano, succinil quitosano y octanoil quitosano, así como quitosano modificado con polipéptidos, otros polisacáridos, ciclodextrinas, éteres de corona y perlas de vidrio o nanopartículas, entre otros.

65

De acuerdo con la invención, la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal incluye bromelaina. La bromelaina, como se usa en la presente, se refiere al grupo de enzimas comúnmente derivadas de la fruta, el tallo y las hojas de *Ananas comosus* y también puede incluir elementos como cisteína proteasas, amilasa, fosfatasa ácida, peroxidasa y celulasas.

En realizaciones de la invención, la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal es una combinación sinérgicamente eficaz de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal. Por "sinérgicamente eficaz" se entiende que la combinación de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal produce un efecto (es decir, mejora la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal) que es mayor que el que se lograría por la suma aritmética de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal individuales. Por ejemplo, la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal producen un efecto que es 1,5 veces o más que el que se lograría por la suma aritmética de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal individuales, como 2 veces o más, como 3 veces o más, como 4 veces o más, como 5 veces o más, como 10 veces o más e incluyendo 25 veces o más (y en algunos casos es 100 veces o menos, como 50 veces o menos) de lo que se lograría con la suma de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal individuales. Como tal, cuando se combinan dos potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal, las combinaciones sinérgicamente eficaces proporcionadas por la presente invención producen un efecto que es 1,5 veces o más, como 2 veces o más, como 5 veces o más, como 10 veces o más e incluyendo 25 veces o más del que se lograría mediante la suma de los dos potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal individuales. De igual manera, cuando se combinan tres potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal, las combinaciones sinérgicamente eficaces de la presente invención producen un efecto que es 2 veces o más, como 5 veces o más, como 10 veces o más e incluyendo 25 veces o más del que se lograría por la suma de los tres potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal individuales. En algunos casos, la magnitud del aumento es 1000 veces o menos, como 750 veces o menos, incluyendo 500 veces o menos, por ejemplo, 250 veces o menos, incluyendo 100 veces o menos.

Por ejemplo, cuando se emplean bromelaina y un quitosano no modificado juntos en una composición para su uso de acuerdo con la invención, la combinación produce un efecto (es decir, mejora la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de la heparina de bajo peso molecular), que es mayor de la que se lograría por la suma aritmética de la bromelaina sola más el quitosano no modificado solo. En estas realizaciones, las combinaciones sinérgicamente eficaces producen un efecto que es 2 veces o más, como 5 veces o más, como 10 veces o más e incluyendo 25 veces o más que el que se lograría por la suma aritmética de la bromelaina sola más el modulador de quitosano no modificado solo.

La concentración de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la combinación sinérgicamente eficaz puede variar dependiendo de los efectos que se deseen, así como del tipo de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal combinados. La concentración de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la combinación sinérgicamente eficaz puede ser del 0,01% o más de la masa total de la composición, como el 0,1% o más, como el 1% o más, como el 2% o más, como el 5% o más, como el 10% o más, como el 15% o más, como el 20% o más, como el 25% o más e incluyendo el 50% o más de la masa total de la composición. En otras realizaciones, la concentración de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la combinación es de 0,01 mg/ml o más, como 0,05 mg/ml o más, como 0,1 mg/ml o más, como 1 mg/ml o más e incluyendo 5 mg/ml o más. En otras realizaciones más, la concentración de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la combinación es 0,1 mM o más, como 0,5 mM o más, como 1 mM o más, como 5 mM o más, como 10 mM o más, como 25 mM o más e incluyendo 50 mM o más.

El porcentaje de masa de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal puede variar, variando entre el 1% o más de la masa total de la composición, como el 2% o más, como el 5% o más, como el 10% o más, como el 25% o más e incluyendo el 50% o más de la masa total de la composición. Por ejemplo, cuando la combinación sinérgicamente eficaz de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal incluye dos potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal, la proporción de masa del primer potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal y el segundo potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal puede variar entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la proporción de masa del primer potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal con el segundo potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal puede variar entre 1:1 y 1:10; 1:5 y 1:25; 1:10 y 1:50; 1:25 y 1:100; 1:50 y 1:500; o 1:100 y 1:1000. En algunas realizaciones, la proporción de masa del segundo potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal con el primer potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal varía entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la proporción de masa del segundo potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal con el primer potenciador de la permeación de la

barrera epitelial gastrointestinal puede variar entre 1:1 y 1:10; 1:5 y 1:25; 1:10 y 1:50; 1:25 y 1:100; 1:50 y 1:500; o 1:100 y 1:1000.

5 Las combinaciones sinérgicamente eficaces de la presente invención incluyen una combinación de quitosano y bromelaina. En algunos casos, el quitosano es un quitosano no modificado. La concentración de quitosano puede variar, de aproximadamente el 0,1% p/v a aproximadamente el 5% p/v, como de aproximadamente el 0,15% p/v a aproximadamente 4,5% p/v, como del 0,2% p/v a aproximadamente el 4% p/v, como de aproximadamente el 0,25% p/v a aproximadamente el 3,5% p/v, como del 0,3% p/v a aproximadamente el 3% p/v, como del 0,5% p/v a aproximadamente el 2,5% p/v, como del 0,5% p/v al 1,5% p/v, incluyendo aproximadamente el 3% p/v. De igual manera, la concentración de bromelaina puede variar, variando de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, como de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,9 mg/ml, como de 0,25 mg/ml a aproximadamente 0,75 mg/ml, como de aproximadamente 0,3 mg/ml a aproximadamente 0,6 mg/ml, incluyendo de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml. Como tal, el porcentaje en peso de bromelaina en las composiciones de la invención puede variar de aproximadamente el 0,01% p/v a aproximadamente el 1% p/v, como de aproximadamente 0,2% p/v a aproximadamente el 0,9% p/v, como de aproximadamente el 0,25% p/v a aproximadamente 0,75% p/v, como de aproximadamente el 0,3% p/v a aproximadamente el 0,6% p/v e incluyendo de aproximadamente el 0,4% p/v a aproximadamente 0,5% p/v. En ciertos casos, las combinaciones sinérgicamente eficaces de bromelaina y quitosano incluyen una combinación de 20 0,5 mg/ml de bromelaina y 3% p/v de quitosano, 0,25 mg/ml de bromelaina y 1,5% p/v de quitosano o 0,12 mg/ml de bromelaina y 0,75% p/v de quitosano. Como tal, la proporción de masa del quitosano y la bromelaina puede variar, oscilando entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la proporción de masa del quitosano con la bromelaina puede variar entre 1:1 y 1:10; 1:5 y 1:25; 1:10 y 1:50; 1:25 y 1:100; 1:50 y 1:500; o 1:100 y 1:1000. En algunas realizaciones, la proporción de masa de la bromelaina con el quitosano varía 25 entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la proporción de masa de la bromelaina con el quitosano puede variar entre 1:1 y 1:10; 1:5 y 1:25; 1:10 y 1:50; 1:25 y 1:100; 1:50 y 1:500; o 1:100 y 1:1000. En estas realizaciones, la combinación sinérgicamente eficaz de quitosano y bromelaina tiene un efecto mayor sobre la mejora de la permeación a través de la barrera epitelial gastrointestinal que la que se logra por la suma aritmética de quitosano y bromelaina individualmente. Por ejemplo, en algunos casos, la combinación de quitosano y bromelaina mejora la permeación a través de la barrera epitelial gastrointestinal en 2 veces o más, como 5 veces o más, como 10 veces o más, e incluyendo 25 veces o más de la que se logra mediante la suma aritmética de quitosano y bromelaina individualmente. Como tales, en estas realizaciones, los métodos incluyen administrar una heparina de bajo peso molecular con una combinación sinérgicamente eficaz de quitosano y bromelaina. Por 35 ejemplo, los métodos pueden incluir administrar una heparina de bajo peso molecular como Ardeparina, Bemiparina, Bioparina, Certoparina, Dalteparina, Enoxaparina, Miniparina, Nadroparina, Parnaparina, Reviparina, Sandoparina y Tinzaparina y combinaciones de las mismas con una combinación sinérgicamente eficaz de quitosano y bromelaina.

40 En algunas realizaciones, las combinaciones sinérgicamente eficaces de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal son el resultado de cantidades específicas de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en combinación con la heparina de bajo peso molecular. En otras palabras, en estas realizaciones se proporciona un efecto de mejora de la permeación sinérgico mediante una cantidad específica de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la combinación. Por ejemplo, cuando los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal son bromelaina y 45 quitosano no modificado, se proporciona un efecto de mejora de la permeación sinérgico cuando la bromelaina se encuentra en una cantidad que varía de 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml, como de 0,15 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml, incluyendo 0,5 mg/ml y el quitosano no modificado está en una cantidad que varía del 1% p/v a aproximadamente el 5% p/v, como aproximadamente del 1,25% p/v a aproximadamente el 4,5% p/v, como del 1,5% p/v a aproximadamente el 4% p/v, como de aproximadamente el 1,75% p/v a aproximadamente el 3,5% p/v, como del 2% p/v a aproximadamente el 3,25% p/v, e incluyendo aproximadamente el 3% p/v. En ciertos casos, se proporciona un efecto de mejora de la permeación sinérgico cuando la bromelaina está en una cantidad de 0,5 mg/ml y el quitosano no modificado está en una cantidad del 3% p/v. En otros casos, se proporciona un efecto de mejora de la permeación sinérgica cuando la bromelaina está en una cantidad de 0,25 mg/ml y el quitosano no modificado está en una cantidad del 1,5% p/v. En otras realizaciones más, se proporciona un efecto de mejora de la permeación sinérgico cuando la bromelaina está en una cantidad de 0,12 mg/ml y el quitosano no modificado está 55 en una cantidad del 0,75% p/v.

60 En otras realizaciones, las combinaciones sinérgicamente eficaces de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal son el resultado de proporciones específicas de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal con la heparina de bajo peso molecular. En otras palabras, en estas realizaciones se proporciona un efecto de mejora de la permeación sinérgico mediante una proporción específica de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la combinación. Por ejemplo, cuando los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal son bromelaina y quitosano no modificado, una combinación sinérgicamente eficaz de bromelaina y quitosano no modificado puede incluir una proporción de 65 quitosano no modificado a bromelaina que varía entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50;

1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos.

5 Como se ha descrito anteriormente, una composición de dosificación oral como se ha definido anteriormente de acuerdo con la invención es para su uso en métodos incluyen tratar o prevenir una enfermedad tromboembólica administrando por vía oral la composición a un sujeto. Por "sujeto" se entiende la persona u organismo que recibe el tratamiento para la enfermedad tromboembólica. Como tales, los sujetos de la invención pueden incluir, pero no están limitados, a seres humanos y otros primates, como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores como ratones, ratas y cobayas; aves, incluyendo aves domésticas, salvajes y de caza como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares.

15 En ciertas realizaciones, el sujeto es un humano. Por ejemplo, la presente composición puede emplearse para tratar o prevenir una enfermedad tromboembólica en un humano, como cuando la enfermedad tromboembólica está asociada con infarto de miocardio, trombosis venosa profunda después de la cirugía, ataque isquémico transitorio, injerto de bypass de arteria coronaria, enfermedad vascular periférica, apoplejía, angioplastia coronaria transluminal percutánea, leucemia promielocítica aguda, diabetes, mielomas múltiples, shock séptico, púrpura fulminanas, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, angina, inserción y la presencia de prótesis de válvula aórtica o vascular, cateterización cardíaca, endoplastia transluminal, sustitución de la válvula del corazón.

20 Los aspectos de la invención incluyen administrar una composición de dosificación oral como se ha definido anteriormente de acuerdo con la invención para su uso en un método que comprende administrar por vía oral a un sujeto la composición para tratar o prevenir una enfermedad tromboembólica. Como se ha descrito anteriormente, el término "heparina de bajo peso molecular" se usa en su sentido convencional para referirse a la clase de compuestos anticoagulantes de glicosaminoglicanos sulfatados de cadena corta que tienen un peso molecular medio que varía de 2 kDa a 12 kDa que se obtienen por fraccionamiento o despolimerización de heparina polimérica de origen natural no fraccionada de una fuente biológica. Por "fuente biológica" se entiende un organismo o parte de un organismo de origen natural. Por ejemplo, la heparina de bajo peso molecular de interés puede ser fraccionada o despolimerizada a partir de heparina no fraccionada extraída de tejidos de la mucosa de animales de carne sacrificados, como el intestino porcino o el pulmón bovino. Puede emplearse cualquier protocolo conveniente para extraer la heparina de bajo peso molecular de la fuente biológica. Por ejemplo, la heparina de bajo peso molecular puede extraerse de la fuente biológica mediante extracción de ácido-base, degradación enzimática, precipitación selectiva, filtración, entre otros procedimientos. En algunos casos, la heparina de bajo peso molecular puede ser un fragmento de bajo peso molecular de heparina polimérica no fraccionada formada mediante despolimerización enzimática o por productos químicos.

35 En otras realizaciones, las heparinas de bajo peso molecular son heparinas de bajo peso molecular sintéticas. Por "sintético" se entiende que la heparina de bajo peso molecular se produce parcial o totalmente mediante métodos artificiales (por ejemplo, síntesis química). Por ejemplo, la heparina de bajo peso molecular sintética puede ser un oligómero sulfatado, como un oligosacárido sulfatado.

40 Por ejemplo, las heparinas de bajo peso molecular pueden incluir, entre otras, Ardeparina, Bemiparina, Bioparina, Certoparina, Dalteparina, Enoxaparina, Miniparina, Nadroparina, Parnaparina, Reviparina, Sandoparina y Tinzaparina y combinaciones de las mismas.

45 Dependiendo de los efectos y la potencia deseados de la heparina de bajo peso molecular, se pueden emplear juntas una o más heparinas de bajo peso molecular. Por ejemplo, se pueden emplear juntas dos o más heparinas de bajo peso molecular, como tres o más heparinas de bajo peso molecular e incluyendo cuatro o más heparinas de bajo peso molecular. Cuando se emplea más de una heparina de bajo peso molecular, todas las heparinas de bajo peso molecular pueden ser heparinas de bajo peso molecular naturales, todas heparinas de bajo peso molecular sintéticas o cualquier combinación de las mismas. Cuando se emplea más de una heparina de bajo peso molecular, el porcentaje de masa de cada heparina de bajo peso molecular en la composición puede variar, oscilando entre el 1% o más de la masa total de la composición, como el 2% o más, como el 5% o más, como el 10% o más, como el 25% o más e incluyendo como el 50% o más de la masa total de la composición.

50 La proporción de masa de la heparina de bajo peso molecular y la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal pueden variar, oscilando entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la proporción de masa de la heparina de bajo peso molecular con la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal puede variar entre 1:1 y 1:10; 1:5 y 1:25; 1:10 y 1:50; 1:25 y 1:100; 1:50 y 1:500; o 1:100 y 1:1000. En algunas realizaciones, la proporción de masa de la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal con la heparina de bajo peso molecular varía entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la proporción de masa de la

combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal con la heparina de bajo peso molecular puede variar entre 1:1 y 1:10; 1:5 y 1:25; 1:10 y 1:50; 1:25 y 1:100; 1:50 y 1:500; o 1:100 y 1:1000.

5 Los métodos en los que se usa una composición de dosificación oral como se ha definido anteriormente de acuerdo con la invención incluyen administrar una heparina de bajo peso molecular con una combinación sinérgicamente eficaz de bromelaina y quitosano. Por ejemplo, pueden administrarse, uno o más de Ardeparina, Bemiparina, Bioparina, Certoparina, Dalteparina, Enoxaparina, Miniparina, Nadroparina, Parnaparina, Reviparina, Sandoparina y Tinzaparina con una combinación sinérgicamente eficaz de bromelaina y quitosano.

10 Las heparinas de bajo peso molecular con una combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal como se divulga en la presente pueden administrarse solos (es decir, como agentes individuales), o en combinación con otros agentes terapéuticos, como otros agentes anticoagulantes o antitrombóticos. Como se desee, puede emplearse una cantidad de una heparina de bajo peso molecular con una combinación de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en el tratamiento de un sujeto que ha sido diagnosticado con una enfermedad tromboembólica, como por ejemplo un sujeto diagnosticado con una enfermedad tromboembólica asociada con infarto de miocardio, trombosis venosa profunda posterior a cirugía, ataque isquémico transitorio, injerto de bypass de arteria coronaria, enfermedad vascular periférica, apoplejía angioplastia coronaria transluminal percutánea, leucemia promielocítica aguda, diabetes, mielomas múltiples, shock séptico, púrpura fulminanas, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, angina, inserción y presencia de prótesis de válvula aórtica o vascular, cateterización cardíaca, endoplastia transluminal, reemplazo de válvula cardíaca.

25 En la puesta en práctica de los métodos en los que se usa una composición de dosificación oral como se ha definido anteriormente de acuerdo con la invención, los protocolos para tratar o prevenir una enfermedad tromboembólica en un sujeto pueden variar, como por ejemplo por la edad, el peso, la gravedad del trastorno de coagulación de la sangre, la salud general del sujeto, así como la composición particular y la concentración de la heparina de bajo peso molecular y los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal que se están administrando. La concentración de heparina de bajo peso molecular alcanzada en un sujeto después de la administración oral y la resorción por el sistema gastrointestinal puede variar, en algunos casos, variando de 0,01 nM a 500 nM. Las heparinas de bajo peso molecular de interés son antitrombóticas y anticoagulantes a su concentración óptima. Por "concentración óptima" se entiende la concentración en la que las heparinas de bajo peso molecular muestran la cantidad más alta de actividad anticoagulante. Como tal, dependiendo de la potencia de la heparina de bajo peso molecular así como del efecto deseado, la concentración óptima de heparinas de bajo peso molecular puede variar, de 0,01nM a 500 nM, como de 0,1 nM a 250 nM, como de 0,1 nM a 100 nM, como de 0,1 nM a 75 nM, como de 0,1 nM a 50 nM, como de 0,1 nM a 25 nM, como de 0,1 nM a 10 nM, e incluyendo de 0,1 nM a 1 nM. De igual manera, la concentración de los potenciadores de permeación de la barrera epitelial gastrointestinal alcanzada en un sujeto después de la administración oral y la resorción por el sistema gastrointestinal puede variar, en algunos casos, variando de 0,01 nM a 500 nM. Por ejemplo, dependiendo de la capacidad de absorción inherente de la heparina de bajo peso molecular, así como del efecto deseado, la concentración de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal puede variar, de 0,01 nM a 500 nM, como de 0,1 nM a 250 nM, como de 0,1 nM a 100 nM, como de 0,1 nM a 75 nM, como de 0,1 nM a 50 nM, como de 0,1 nM a 25 nM, como de 0,1 nM a 10 nM, e incluyendo de 0,1 nM a 1 nM.

45 Por lo tanto, la dosis oral de composiciones que contienen una heparina de bajo peso molecular con una combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de interés puede variar, oscilando de aproximadamente 0,01 mg/kg a 500 mg/kg al día, como de 0,01 mg/kg a 400 mg/kg al día, como de 0,01 mg/kg a 200 mg/kg al día, como de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg al día, como de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg al día, como de 0,01 mg/kg a 2 mg/kg al día, incluyendo de 0,02 mg/kg a 2 mg/kg al día. En otras realizaciones, la dosificación oral puede variar de 0,01 a 100 mg/kg cuatro veces al día (QID), como de 0,01 a 50 mg/kg QID, como de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg QID, como de 0,01 mg/kg a 2 mg/kg QID, como de 0,01 a 0.2 mg/kg QID. En otras realizaciones, la dosificación oral puede variar de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg tres veces al día (TID), como de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg TID, como de 0,01 mg/kg a 2 mg/kg TID, e incluyendo como de 0,01 mg/kg a 0.2 mg/kg TID. En otras realizaciones más, la dosificación oral puede variar de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg dos veces al día (BID), como de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg BID, como de 0,01 mg/kg a 2 mg/kg BID, incluyendo de 0,01 mg/kg a 0.2 mg/kg BID. La cantidad de compuesto administrado dependerá de la potencia y concentración de la heparina de bajo peso molecular específica, la magnitud o el efecto antitrombótico deseado, la capacidad de absorción inherente de la heparina de bajo peso molecular, así como de la mejora deseada de la resorción gastrointestinal.

60 Como se ha tratado anteriormente, las composiciones que contienen una cantidad de una heparina de bajo peso molecular y una combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal pueden administrarse por vía oral en combinación con otras heparinas de bajo peso molecular, potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal u otros agentes terapéuticos, como otros agentes antitrombóticos, factores sanguíneos, u otros medicamentos de acuerdo con un programa de dosificación que se basa en el criterio del practicante clínico y las necesidades del sujeto. Como tales, los programas

65

de dosificación pueden incluir, pero no están limitados a la administración, cinco veces al día, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquier combinación de los mismos.

5 En algunas realizaciones, la enfermedad tromboembólica puede ser una afección crónica que requiere las presentes composiciones en múltiples dosis durante un período prolongado. Alternativamente, las composiciones de la invención pueden administrarse para tratar una afección aguda (por ejemplo, trombosis causada por cirugía, ataque cardíaco, apoplejía, embolia pulmonar, etc.) en dosis individuales o múltiples durante un período relativamente corto, por ejemplo, de una a dos semanas. Al poner en práctica las de la invención, se administrarán uno o más ciclos terapéuticamente eficaces de tratamiento a un sujeto. Por "ciclo de tratamiento terapéuticamente eficaz" se entiende un ciclo de tratamiento que, cuando se administra, produce la respuesta terapéutica deseada con respecto al tratamiento. Por ejemplo, uno o más ciclos terapéuticamente eficaces de tratamiento pueden reducir el inicio o la tasa de trombosis como se determina por ensayos de coagulación de la sangre (por ejemplo, CAT, aPTT, que se describen detalladamente a continuación) en un 1% o más, como un 5% o más, como un 10% o más, como un 15% o más, como un 20% o más, como un 30% o más, como un 40% o más, como un 50% o más, como un 75% o más, como un 90% o más, como un 95% o más, incluyendo reducir el inicio o la tasa de trombosis en un 99% o más. En otros casos, uno o más ciclos de tratamiento terapéuticamente eficaces pueden reducir el inicio o la tasa de trombosis en 1,5 veces o más, como 2 veces o más, como 5 veces o más, como 10 veces o más, como 50 veces o más, incluyendo la reducción del inicio o la tasa de trombosis en 100 veces o más.

En algunas realizaciones, los sujetos tratados con las composiciones de la invención muestran una respuesta terapéutica positiva. Por "respuesta terapéutica positiva" se entiende que el sujeto muestra una mejora en uno o más síntomas de una enfermedad tromboembólica. Por ejemplo, un sujeto que muestra una respuesta terapéutica positiva a los métodos proporcionados por la invención puede incluir, pero no se limita a, respuestas como tiempos de formación de coágulos reducidos, tiempo de coagulación aumentado o una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, se administra más de un ciclo de tratamiento terapéuticamente eficaz.

Puede emplearse cualquier modo de administración conveniente siempre que la composición se reabsorba a través del epitelio gastrointestinal. Como tales, los modos de administración pueden incluir la administración oral (es decir, a través de la boca) o por sonda nasogástrica (por ejemplo, sonda de alimentación o sonda NG). Como se describe con mayor detalle a continuación, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en la forma de una solución o suspensión líquida, jarabe, comprimido, cápsula, polvo, gel o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, una composición de dosificación oral como se ha definido anteriormente de acuerdo con la invención es para su uso en métodos que proporcionan la administración por vía oral de una composición que tiene una cantidad de heparina de bajo peso molecular y una combinación sinérgicamente eficaz de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal como por ejemplo, antes de la cirugía planificada o cuando se desea reducir el riesgo potencial de trombosis involuntaria. La composición puede administrarse profilácticamente como se desee, como una hora o más antes de un procedimiento planificado, como 10 horas antes de un procedimiento planificado, como 24 horas antes de un procedimiento planificado, e incluyendo una semana antes de un procedimiento planificado. En algunos casos, la composición administrada antes o durante un procedimiento planificado puede ser una formulación de liberación sostenida (por ejemplo, comprimidos oblongos o comprimidos de liberación sostenida).

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse por vía oral antes de, concurrentemente con, o posteriormente a otros agentes para tratar afecciones relacionadas o no relacionadas. Si se proporcionan al mismo tiempo que otros agentes, las composiciones de la invención se pueden proporcionar en la misma composición o en una diferente. Por tanto, las heparinas de bajo peso molecular y las combinaciones sinérgicamente eficaces de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de interés y otros agentes pueden presentarse en una forma de dosificación oral al individuo por medio de una terapia concurrente. Por ejemplo, la terapia concurrente puede lograrse administrando composiciones de la invención y una composición farmacéutica que tiene por lo menos otro agente, como un agente antitrombótico, un fármaco antiinflamatorio, agentes moduladores del factor de crecimiento, moduladores hemodinámicos o agente quimioterapéutico, que en combinación comprenden una dosis terapéuticamente eficaz, de acuerdo con un régimen de dosificación oral particular. De manera similar, una o más heparinas de bajo peso molecular con una combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal y agentes terapéuticos pueden administrarse en por lo menos una dosis terapéutica. La administración de las composiciones farmacéuticas separadas puede realizarse simultáneamente o en momentos diferentes (es decir, secuencialmente, en cualquier orden, en el mismo día o en días diferentes), siempre que se provoque en el sujeto sometido a terapia el efecto terapéutico de la combinación de estas sustancias.

COMPOSICIONES

Los aspectos de la invención también incluyen composiciones de dosificación oral para tratar o prevenir una enfermedad tromboembólica en un sujeto. Como se ha descrito en detalle anteriormente, la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal es una

combinación que cuando se administra por vía oral, aumenta la cantidad de heparina de bajo peso molecular que es reabsorbida por el sistema gastrointestinal de una manera que es mayor que la que se lograría mediante la suma aritmética de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal individuales. Además, la combinación de dos o más potenciadores de la permeación gastrointestinal acelera el inicio (es decir, reduce la cantidad de tiempo para que comience la resorción) de la resorción de heparina de bajo peso molecular a través del epitelio gastrointestinal y también acelera la velocidad general de transporte de la heparina de bajo peso molecular a través del epitelio gastrointestinal del sujeto (es decir, reduce la cantidad de tiempo para que se complete la resorción de heparina de bajo peso molecular por parte del sistema gastrointestinal).

Como se ha indicado anteriormente, la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal puede aumentar la cantidad de heparinas de bajo peso molecular reabsorbidas por el sistema gastrointestinal. Por ejemplo, las presentes combinaciones de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal pueden aumentar la cantidad de heparinas de bajo peso molecular reabsorbidas por el sistema gastrointestinal en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más, como en un 90% o más, como en un 95% o más, en comparación con un control adecuado. En otras realizaciones, la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en composiciones orales de la invención acelera el inicio de la resorción de heparina de bajo peso molecular a través del epitelio gastrointestinal. Por ejemplo, las presentes combinaciones pueden reducir la cantidad de tiempo requerido para iniciar la resorción de la heparina de bajo peso molecular en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más, como en un 90% o más, como en un 95% o más, en comparación con un control adecuado. En otras realizaciones más, la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en composiciones orales de la invención aumenta la tasa de resorción de la heparina de bajo peso molecular. Por ejemplo, las presentes combinaciones pueden aumentar la tasa de resorción de heparina de bajo peso molecular en un 2% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más, como en un 100% o más, como en un 200% o más, incluyendo en un 500% o más, en comparación con un control adecuado.

En ciertos casos, la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación epitelial gastrointestinal en composiciones orales de interés pueden aumentar la resorción de heparinas de bajo peso molecular como se determina por los modelos de células Caco-2. Por ejemplo, las presentes combinaciones de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal pueden aumentar la resorción como se determina por los modelos de células Caco-2 en un 2% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más, como en un 100% o más, como en un 200% o más, incluyendo en un 500% o más, en comparación con un control adecuado.

De acuerdo con la invención, el modulador de unión estrecha de polisacárido es quitosano. El quitosano, como se ha tratado anteriormente, se refiere al copolímero lineal de 2-acetamida-2-deoxi-β-D-glucopiranososa y 2-amino-β-D-glucopiranososa producida por la N-desacetilación de quitina. Los moduladores de unión estrecha de polisacáridos también pueden incluir derivados de quitosano como el N-alquil quitosano, quitosano acilado, carboximetil quitosano, quitosano tiolado, quitosano fosforilado, quitosano ciclodextrina, N-(aminoalquil) quitosano, succinil quitosano y octanoil quitosano, entre otros. En ciertas realizaciones, el modulador de unión estrecha de polisacáridos es quitosano no modificado. Como se ha descrito anteriormente, el término "quitosano no modificado" se usa en su sentido convencional para referirse al quitosano que no ha sido derivado o modificado químicamente de ninguna manera para mejorar o cambiar la estructura o las propiedades químicas. Como tal, el quitosano no modificado es quitosano que no se ha modificado con ninguna otra fracción extraña, como, por ejemplo, mediante sulfatación, acetilación, glicosilación, fosforilación, conjugación de polímeros (como con polietilenglicol). Por ejemplo, el quitosano no modificado excluye a los quitosanos que han sido tiolados (como, por ejemplo, quitosano-tio-butilamidina) para proporcionar grupos sulfhidrilo o metilados (como, por ejemplo, N-trimetil-quitosano) para proporcionar grupos metilo fijados a la superficie de la estructura de polisacáridos. De igual manera, los quitosanos no modificados excluyen los derivados del quitosano como N-alquil quitosano, quitosano acilado, quitosano fosforilado, N-(aminoalquil)quitosano, succinil quitosano y octanoil quitosano, así como quitosano modificado con polipéptidos, otros polisacáridos, ciclodextrinas, éteres de corona y perlas de vidrio o nanopartículas, entre otros.

En composiciones de la invención, el modulador de unión estrecha de enzimas es bromelaina.

La concentración de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la combinación puede variar. Dependiendo del potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal, la concentración de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la combinación es de 0,01 mg/ml o más, como 0,05 mg/ml o más, como 0,1 mg/ml o más, como 1 mg/ml o más e incluyendo 5 mg/ml o más. En otras realizaciones más, la concentración de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la combinación es de 0,1 mM o más, como 0,5 mM o más, como 1 mM o más, como 5 mM o más, como 10 mM o más, como 25 mM o más e incluyendo 50 mM o más.

El porcentaje de masa de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la

combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal puede variar, oscilando entre el 1% o más de la masa total de la composición, como el 2% o más, como el 5% o más, como el 10% o más, como el 25% o más e incluyendo el 50% o más de la masa total de la composición. Por ejemplo, cuando la combinación de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal incluye dos potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal, la proporción de masa del primer potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal y el segundo potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal puede variar, oscilando entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la proporción de masa del primer potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal con el segundo potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal puede variar entre 1:1 y 1:10; 1:5 y 1:25; 1:10 y 1:50; 1:25 y 1:100; 1:50 y 1:500; o 1:100 y 1:1000. En algunas realizaciones, la proporción de masa del segundo potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal con el primer potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal varía entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la proporción de masa del segundo potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal con el primer potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal puede variar entre 1:1 y 1:10; 1:5 y 1:25; 1:10 y 1:50; 1:25 y 1:100; 1:50 y 1:500; o 1:100 y 1:1000.

La combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal incluye un quitosano y una bromelaina. En ciertos casos, el quitosano es un quitosano no modificado. La proporción de masa del quitosano y la bromelaina puede variar, oscilando entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la proporción de masa del quitosano con la bromelaina puede variar entre 1:1 y 1:10; 1:5 y 1:25; 1:10 y 1:50; 1:25 y 1:100; 1:50 y 1:500; o 1:100 y 1:1000. En algunas realizaciones, la proporción de masa de la bromelaina con el quitosano varía entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la proporción de masa de la bromelaina con el quitosano puede variar entre 1:1 y 1:10; 1:5 y 1:25; 1:10 y 1:50; 1:25 y 1:100; 1:50 y 1:500; o 1:100 y 1:1000.

Las composiciones de la invención incluyen una combinación de quitosano y bromelaina, y la concentración de quitosano puede variar, variando de aproximadamente el 0,1% p/v a aproximadamente el 5% p/v, como de aproximadamente el 0,15% p/v a aproximadamente el 4,5% p/v, como del 0,2% p/v a aproximadamente el 4% p/v, como de aproximadamente el 0,25% p/v a aproximadamente el 3,5% p/v, como del 0,3% p/v a aproximadamente el 3% p/v, como del 0,5% p/v a aproximadamente el 2,5% p/v, incluyendo de aproximadamente el 0,5% p/v al 1,5% p/v. De igual manera, la concentración de bromelaina también puede variar, variando de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, como de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 0,9 mg/ml, como de 0,25 mg/ml a aproximadamente 0,75 mg/ml, como de aproximadamente 0,3 mg/ml a aproximadamente 0,6 mg/ml, incluyendo de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml. Como tal, el porcentaje en peso de bromelaina en las composiciones de la invención puede variar de aproximadamente al 0,01% p/v a aproximadamente el 1% p/v, como de aproximadamente el 0,2% p/v a aproximadamente el 0,9% p/v, como de aproximadamente el 0,25% p/v a aproximadamente el 0,75% p/v, como de aproximadamente el 0,3% p/v a aproximadamente el 0,6% p/v e incluyendo de aproximadamente el 0,4% p/v a aproximadamente el 0,5% p/v. En ciertos casos, la concentración de quitosano es aproximadamente del 3% y la concentración de bromelaina es de aproximadamente 0,5 mg/ml.

En algunas realizaciones, las composiciones de interés incluyen combinaciones sinérgicamente eficaces de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal que proporcionan un efecto de mejora de la permeación sinérgica como resultado de cantidades específicas de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la combinación. De acuerdo con la invención, cuando los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal son bromelaina y quitosano no modificado, una combinación sinérgicamente eficaz de bromelaina y quitosano no modificado puede incluir bromelaina en una cantidad que varía de 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml, como de 0,15 mg/ml a aproximadamente 0,4 mg/ml, incluyendo 0,5 mg/ml y quitosano no modificado en una cantidad que varía del 1% a aproximadamente el 5%, como de aproximadamente el 1,25% a aproximadamente el 4,5%, como del 1,5% a aproximadamente el 4%, como de aproximadamente el 1,75% a aproximadamente el 3,5%, como del 2% a aproximadamente el 3,25%, e incluyendo aproximadamente el 3%. En ciertos casos, las combinaciones sinérgicamente eficaces de bromelaina y quitosano no modificado incluyen una combinación de 0,5 mg/ml de bromelaina y el 3% p/v de quitosano no modificado. En otros casos, las combinaciones sinérgicamente eficaces de bromelaina y quitosano no modificado incluyen 0,25 mg/ml de bromelaina y el 1,5% p/v de quitosano no modificado. En otras realizaciones más, las combinaciones sinérgicamente eficaces de bromelaina y quitosano incluyen 0,12 mg/ml de bromelaina y el 0,75% p/v de quitosano no modificado.

En otras realizaciones, las composiciones de interés incluyen combinaciones sinérgicamente eficaces de potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal que proporcionan un efecto de mejora de la permeación sinérgica como resultado de proporciones específicas de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en la combinación. Por ejemplo, cuando los potenciadores de la permeación de la

barrera epitelial gastrointestinal son bromelaina y quitosano no modificado, una combinación sinérgicamente eficaz de bromelaina y quitosano no modificado puede incluir una proporción de quitosano no modificado a bromelaina que varía entre 1:1 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos.

5 Como se ha descrito anteriormente, las heparinas de bajo peso molecular en las composiciones de dosificación oral de la invención se refieren a la clase de compuestos antitrombóticos glicosaminoglicanos sulfatados de cadena corta que tienen un peso molecular medio que varía de 2 kDa a 12 kDa que se obtienen por fraccionamiento o despolimerización de heparina polimérica de origen natural no fraccionada. Las propiedades antitrombóticas de las heparinas de bajo peso molecular pueden determinarse usando ensayos de coagulación, incluyendo ensayos de coagulación de trombografía automatizada calibrada (CAT), tiempo de protrombina diluida (dPT) o del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). Una medida de la actividad antitrombótica es comparar la heparina de bajo peso molecular en cuestión con la heparina anticoagulante conocida.

15 Las heparinas de bajo peso molecular pueden derivarse de la heparina obtenida de una fuente biológica. Por ejemplo, las heparinas de bajo peso molecular de interés pueden fraccionarse o despolimerizarse a partir de heparina no fraccionada extraída de tejidos mucosos de animales de carne sacrificados, como el intestino porcino o el pulmón bovino. Puede emplearse cualquier protocolo conveniente para extraer la heparina de bajo peso molecular de la fuente biológica. Por ejemplo, la heparina de bajo peso molecular puede extraerse de la fuente biológica mediante extracción ácido-base, degradación enzimática, precipitación selectiva, filtración, entre otros procedimientos. En algunos casos, la heparina de bajo peso molecular puede ser un fragmento de bajo peso molecular de heparina polimérica de alto peso molecular no fraccionada formada por despolimerización enzimática o química.

25 En otras realizaciones, las composiciones incluyen heparinas de bajo peso molecular sintéticas. Por "sintético" se entiende que la heparina de bajo peso molecular se produce parcial o totalmente mediante métodos artificiales (por ejemplo, síntesis química). Por ejemplo, la heparina de bajo peso molecular sintética puede ser un oligómero sulfatado, como un oligosacárido sulfatado.

30 Por ejemplo, las heparinas de bajo peso molecular pueden incluir, pero no están limitadas a, Ardeparina, Bemiparina, Bioparina, Certoparina, Dalteparina, Enoxaparina, Miniparina, Nadroparina, Parnaparina, Reviparina, Sandoparina y Tinzaparina.

35 Las heparinas de bajo peso molecular de interés pueden variar en peso molecular medio de aproximadamente 2000 daltons a 12.000 daltons, como por ejemplo, de 2500 daltons a 10.000 daltons, como de 3000 daltons a 9500 daltons, como de 3500 daltons a 9000 daltons, incluyendo de 4000 daltons a 8500 daltons. Los pesos moleculares de las heparinas de bajo peso molecular pueden determinarse mediante cualquier protocolo conveniente, como por ejemplo, cromatografía de permeación en gel o cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC), electroforesis capilar, PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida), electroforesis en gel de agarosa, entre otros.

40 En algunas realizaciones, las heparinas de bajo peso molecular de interés pueden ser mezclas heterogéneas de moléculas de heparina de cadena corta que tienen pesos moleculares variables. Por ejemplo, en algunos casos, el 5% o más de la composición de heparina de bajo peso molecular tiene un peso molecular que varía de 10 a 4000 daltons, como el 10% o más, como el 25% o más, como el 50% o más, como el 75% o más, como el 90% o más, incluyendo el 95% o más de la composición de heparina de bajo peso molecular tiene un peso molecular que varía de 10 a 4000 daltons. En otras realizaciones, el 5% o más de la composición de heparina de bajo peso molecular tiene un peso molecular que varía de 4000 daltons a 8000 daltons, como el 10% o más, como el 25% o más, como el 50% o más, como el 75% o más, como el 90% o más, incluyendo el 95% o más de la composición de heparina de bajo peso molecular tiene un peso molecular que varía de 4000 a 8000 daltons. En otras realizaciones más, el 5% o más de la composición de heparina de bajo peso molecular tiene un peso molecular que es mayor que 8000 daltons, como el 10% o más, como el 25% o más, como el 50% o más, como el 75% o más, como el 90% o más, incluyendo el 95% o más de la composición de heparina de bajo peso molecular tiene un peso molecular que es mayor que 8000 daltons.

55 En algunas realizaciones, las composiciones de heparina de bajo peso molecular incluyen heparinas de bajo peso molecular extraídas de una fuente biológica y que se han fraccionado para aislar las moléculas de heparina de cadena corta deseadas (por ejemplo, fracciones que contienen heparinas de bajo peso molecular que tienen un peso molecular que varía de 4000-8000 daltons). Puede usarse cualquier protocolo conveniente para fraccionar heparinas de bajo peso molecular de interés incluyendo, pero no limitado a, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de permeación en gel, electroforesis capilar, entre otras.

60 En ciertos casos, la heparina de bajo peso molecular obtenida fraccionando una muestra de heparina polimérica no fraccionada puede emplearse para tratar una enfermedad tromboembólica como se proporciona mediante las composiciones de la invención. Por ejemplo, la heparina de bajo peso molecular se extrae de una

65

f fuente biológica para aislar moléculas de heparina de cadena corta que tienen pesos moleculares que varían de 2000 a 12.000 daltons, como de 2000 a 10.000 daltons, como de 3000 a 9000 daltons, como de 3500 a 8500 daltons, e incluyendo de 4000 a 8000 daltons. En ciertas realizaciones, una o más de estas fracciones pueden administrarse por vía oral en combinación con la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal para tratar una enfermedad tromboembólica en un sujeto, como por los métodos descritos anteriormente.

En ciertas realizaciones, la heparina de bajo peso molecular puede prepararse mediante hidrólisis enzimática, ácida o despolimerización por radicales de heparina polimérica no fraccionada. Los intervalos de peso molecular de los productos resultantes pueden ajustarse en base a la rigurosidad de las condiciones de hidrólisis o despolimerización empleadas. Las fracciones pueden luego purificarse adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico. Los tiempos de reacción de hidrólisis variarán típicamente de 15 minutos a varias horas. La mezcla de la reacción hidrolizada resultante se neutraliza luego mediante la adición de una base (por ejemplo, hidróxido de sodio). Las sales se eliminan posteriormente, por ejemplo, mediante electrodiálisis, y los productos de hidrólisis se analizan para determinar el peso molecular medio ponderado, el contenido de sacáridos y el contenido de azufre, usando técnicas analíticas convencionales para el análisis de carbohidratos. Alternativamente, pueden emplearse métodos enzimáticos para degradar la heparina polimérica no fraccionada usando, por ejemplo, glicosidasas. Las heparinas de bajo peso molecular para su uso en la invención pueden ser heterogéneas u homogéneas, dependiendo del grado de separación empleado.

Las composiciones de dosificación oral de la invención pueden incluir una o más heparinas de bajo peso molecular, como se desee. Por ejemplo, se pueden combinar dos o más heparinas de bajo peso molecular, como tres o más heparinas de bajo peso molecular e incluyendo cuatro o más heparinas de bajo peso molecular. Cuando se combinan entre sí más de una heparina de bajo peso molecular, todas las heparinas de bajo peso molecular pueden ser heparinas de bajo peso molecular naturales, todas heparinas de bajo peso molecular sintéticas o cualquier combinación de las mismas. Cuando las composiciones orales incluyen más de una heparina de bajo peso molecular, el porcentaje de masa de cada heparina de bajo peso molecular en la composición puede variar, oscilando entre el 1% o más de la masa total de la composición, como el 2% o más, como el 5% o más, como el 10% o más, como el 25% o más e incluyendo como el 50% o más de la masa total de la composición.

La cantidad (es decir, la masa) de cada una de las heparinas de bajo peso molecular y la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en las composiciones de dosificación oral de interés puede variar, variando de 0,001 mg a 1000 mg, como de 0,01 mg a 500 mg, como de 0,1 mg a 250 mg, como de 0,5 mg a 100 mg, como de 1 mg a 50 mg, incluyendo de 1 mg a 10 mg. Como tal, la proporción de masa de la una o más heparinas de bajo peso molecular y la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal en las presentes composiciones de dosificación oral puede variar, oscilando entre 1:1 y 1:2.5; 1:2.5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la proporción de masa de la heparina de bajo peso molecular con la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal puede variar entre 1:1 y 1:10; 1:5 y 1:25; 1:10 y 1:50; 1:25 y 1:100; 1:50 y 1:500; o 1:100 y 1:1000. En algunas realizaciones, la proporción de masa de la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal con la heparina de bajo peso molecular varía entre 1:1 y 1:2.5; 1:2.5 y 1:5; 1:5 y 1:10; 1:10 y 1:25; 1:25 y 1:50; 1:50 y 1:100; 1:100 y 1:150; 1:150 y 1:200; 1:200 y 1:250; 1:250 y 1:500; 1:500 y 1:1000, o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la proporción de masa de la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal con la heparina de bajo peso molecular puede variar entre 1:1 y 1:10; 1:5 y 1:25; 1:10 y 1:50; 1:25 y 1:100; 1:50 y 1:500; o 1:100 y 1:1000.

Las composiciones de dosificación oral pueden ser homogéneas, conteniendo solo un tipo único de heparina de bajo peso molecular y una única combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la barrera de permeación epitelial gastrointestinal. En otras realizaciones, las composiciones de interés son mezclas heterogéneas de dos o más heparinas de bajo peso molecular o dos o más combinaciones sinérgicamente eficaces de potenciadores de la barrera de permeación epitelial gastrointestinal. Por ejemplo, las mezclas heterogéneas pueden contener dos o más heparinas de bajo peso molecular diferentes y dos o más combinaciones diferentes de potenciadores de la barrera de permeación epitelial gastrointestinal. En otros casos, las mezclas heterogéneas pueden contener una heparina de bajo peso molecular y dos o más combinaciones de potenciadores de la barrera de permeación epitelial gastrointestinal. En otros casos más, las mezclas heterogéneas pueden contener dos o más heparinas de bajo peso molecular y una única combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la barrera de permeación epitelial gastrointestinal.

Las composiciones de dosificación oral de la invención pueden incluir además uno o más vehículos de administración de dosificación oral como parte de una composición farmacéutica. y pueden incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes pueden incluir, pero no están limitados a, carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, surfactantes, agua, alcoholes, polioles, glicerina, aceites

vegetales, fosfolípidos, tampones, ácidos, bases y cualquier combinación de los mismos. También se puede emplear un carbohidrato como un azúcar, un azúcar derivado como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado y/o un polímero de azúcar. Algunos excipientes de carbohidratos de interés incluyen, por ejemplo, monosacáridos como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosil sorbitol, mioinositol y similares. Las sales inorgánicas pueden incluir, pero no están limitadas a, ácido cítrico, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, nitrato de potasio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico y cualquier combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, las composiciones de dosificación oral de la invención también pueden incluir un agente antimicrobiano para prevenir o impedir el crecimiento microbiano, como por ejemplo cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato de fenilmercúrico, timersol, y cualquier combinación de los mismos.

También se pueden emplear uno o más antioxidantes. Los antioxidantes, que pueden reducir o prevenir la oxidación y, por lo tanto, el deterioro de la composición, pueden incluir, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito de sodio, sulfoxilato de formaldehído sódico, metabisulfito de sodio, y cualquier combinación de los mismos.

También se pueden incluir uno o más surfactantes en las composiciones de la invención. Por ejemplo, los surfactantes adecuados pueden incluir, pero no están limitados a polisorbatos, como "Tween 20" y "Tween 80", y plurónicos como F68 y F88 (BASF, Mount Olive, New Jersey); ésteres de sorbitán; lípidos, como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferiblemente no en forma liposómica), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, como el colesterol; agentes quelantes, como EDTA; y zinc y otros cationes.

Los ácidos o bases también pueden estar presentes en las composiciones de dosificación oral de la invención. Por ejemplo, los ácidos pueden incluir, pero no están limitados a, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido sulfúrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, y cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de bases incluyen, pero no están limitados a, hidróxido de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formiato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumarato de potasio, y cualquier combinación de los mismos.

La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición de dosificación oral variará dependiendo de la naturaleza y la función del excipiente, el vehículo de administración de dosificación oral y las necesidades particulares de la composición. En algunos casos, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina a través de experimentación rutinaria, es decir, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (variando de baja a alta), examinando la estabilidad y otros parámetros, y luego determinando el intervalo en el que se obtiene el rendimiento óptimo sin efectos adversos significativos. Generalmente, sin embargo, el excipiente(s) está presente en la composición de dosificación oral en una cantidad de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 99% en peso, como de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 98% en peso, como de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 95% en peso del excipiente, incluyendo menos del 30% en peso. Los excipientes farmacéuticos junto con otros excipientes que pueden emplearse en composiciones de interés se describen en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams, (1995), the "Physician's Desk Reference", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), y Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª Edición, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

Como se ha descrito anteriormente, las composiciones de la invención pueden administrarse por cualquier modo conveniente de administración siempre que la composición se reabsorba a través del epitelio gastrointestinal (por ejemplo, por vía oral o por sonda nasogástrica). Como tal, la formulación puede variar. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden ser polvos o liofilizados que pueden reconstituirse con un solvente antes del uso, composiciones insolubles secas para combinación con un vehículo antes del uso, y emulsiones y concentrados líquidos para dilución antes de la administración. Los diluyentes para reconstituir composiciones sólidas pueden incluir, pero no están limitados a, agua bacteriostática para inyección, dextrosa al 5% en agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de una solución o suspensión líquida, jarabe, comprimido, cápsula, polvo, gel, o cualquier combinación de los mismos para ingestión o aplicación por un tubo nasogástrico. Por ejemplo, las composiciones de dosificación oral de la invención pueden precargarse en un comprimido, una cápsula, dispositivo de comprimidos oblongos, o similares, dependiendo del uso previsto. En ciertas realizaciones, las composiciones están en forma de dosificación unitaria, de tal manera que una cantidad de la composición está lista en una dosis oral individual, en una forma premedida o pre-ensvasada.

65 UTILIDAD

Las presentes composiciones encuentran uso en cualquier situación en la que exista un deseo de tratar la trombosis o reducir la coagulación sanguínea en un sujeto, un deseo de mejorar la resorción de heparinas de bajo peso molecular a través del sistema gastrointestinal y el sujeto responde al tratamiento con una heparina de bajo peso molecular y un potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal. En ciertas realizaciones, las presentes composiciones pueden emplearse para tratar o prevenir una enfermedad tromboembólica en un sujeto, como cuando la enfermedad tromboembólica está asociada con infarto de miocardio, trombosis venosa profunda después de cirugía, ataque isquémico transitorio, injerto de bypass de arteria coronaria, enfermedad vascular periférica, apoplejía, angioplastia coronaria transluminal percutánea, leucemia promielocítica aguda, diabetes, mielomas múltiples, shock séptico, púrpura fulminante, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, angina, inserción y presencia de prótesis de válvula aórtica o vascular, cateterización cardíaca, endoplastia transluminal, reemplazo valvular cardíaco.

Las presentes composiciones también encuentran uso en la reducción o prevención de la trombosis o la reducción de la coagulación sanguínea como profilaxis en un sujeto que se ha sometido a un procedimiento quirúrgico o invasivo. En particular, la invención proporciona una composición de dosificación oral como se ha definido anteriormente de acuerdo con la invención, para su uso en un método para tratar a un sujeto que se ha sometido a un procedimiento quirúrgico o invasivo en el que sería deseable reducir o eliminar la trombosis, administrando por vía oral una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición como se detalla en la presente al sujeto.

En ciertas realizaciones, la heparina de bajo peso molecular y la presente combinación de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal se pueden coadministrar con una o más heparinas de bajo peso molecular y dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal diferentes, y/o en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos al sujeto que se ha sometido a un procedimiento quirúrgico o invasivo. Los agentes terapéuticos usados para tratar a un sujeto que se ha sometido a un procedimiento quirúrgico o invasivo pueden administrarse en la misma composición o en una diferente, y concurrentemente, antes o después de la administración de la heparina de bajo peso molecular y la combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal.

KITS

También se proporcionan kits para su uso en la puesta en práctica de los métodos divulgados en la presente, donde los kits pueden incluir una o más de las composiciones anteriores como se ha definido anteriormente de acuerdo con la invención. El kit puede incluir además otros componentes, por ejemplo, dispositivos de administración, fuentes de fluidos, etc., que pueden encontrar uso en la puesta en práctica de los métodos divulgados en la presente. Se pueden envasar varios componentes como se desee, por ejemplo, juntos o por separado. Los componentes de los presentes kits pueden estar presentes en recipientes separados, o múltiples componentes pueden estar presentes en un solo recipiente, donde los recipientes y/o el envase (o una parte de los mismos) del kit pueden ser estériles, como se desee.

Además de los componentes mencionados anteriormente, los presentes kits pueden incluir además instrucciones para usar los componentes del kit para poner en práctica los métodos divulgados en la presente. Las instrucciones para poner en práctica los métodos divulgados en la presente generalmente se registran en un medio de registro adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden imprimirse, como en papel o plástico, etc. Como tales, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un prospecto, en el etiquetado del recipiente del kit o componentes del mismo (es decir, asociados con el envase o subenvase), etc. En otras realizaciones, las instrucciones están presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento adecuado legible por ordenador, por ejemplo, una unidad flash portátil, CD-ROM, disquete, etc. En otras realizaciones más, las instrucciones reales no están presentes en el kit, pero se proporcionan medios para obtener las instrucciones de una fuente remota, por ejemplo, a través de Internet. Un ejemplo de esta realización es un kit que incluye una dirección web donde se pueden ver las instrucciones y/o desde donde se pueden descargar las instrucciones. Al igual que con las instrucciones, este medio para obtener las instrucciones se registra en un sustrato adecuado.

EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con propósitos ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se deben permitir algunos errores y desviaciones experimentales.

Estudios de biodisponibilidad y resorción de heparinas de bajo peso molecular en combinación con

potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal

Se estudió la biodisponibilidad de heparinas de bajo peso molecular en combinación con potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de interés usando el análisis del modelo de células CaCo-2. Este método utiliza una línea celular de carcinoma de colon humano que expresa una amplia variedad de proteínas transportadoras en sus membranas celulares. Las capas celulares se cultivan sobre una superficie de membrana que separa dos compartimentos (placa de 24 pocillos). Un ejemplo de la configuración experimental para estos experimentos se ilustra en la Figura 1. Se disolvieron muestras de heparinas de bajo peso molecular y potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal seleccionados en medio celular RPMI a una concentración de 1 mg/ml y se aplicaron sobre las células en el compartimiento apical. Las células se incubaron a 37° C en 5% de CO₂. Las muestras de medio se retiraron del compartimento basolateral y apical en diferentes puntos temporales. La condición de la capa celular se monitorizó mediante la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Las muestras se analizaron mediante el ensayo de generación de trombina (CAT). La concentración de heparina de bajo peso molecular se calculó en función de la actividad del ensayo CAT.

Todas las muestras de heparina de bajo peso molecular y potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal se diluyeron de tal manera que la concentración de la muestra estaba en el intervalo de la actividad anticoagulante creciente. En base a los valores de concentración de carga iniciales, las concentraciones apical y basolateral se determinaron en incrementos de 2 horas (por ejemplo, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, incluidas 24 horas). En base a las concentraciones basolaterales determinadas, se determinó el porcentaje de resorción para cada combinación de compuestos (es decir, heparina de bajo peso molecular y potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal).

Ejemplo 1:

Un ejemplo de los estudios de resorción descritos en la presente se ilustra en las Tablas 1-3 que resumen las concentraciones apical y basolateral de heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal, desoxicolina (0,06%) en el modelo de células Caco-2. La Tabla 1 ilustra dos ensayos que incluyen concentraciones apicales de partida de la heparina de bajo peso molecular en combinación con desoxicolina, aproximadamente 970 µg/ml (Ensayo 1) y 1210 µg/ml (ensayo 2), respectivamente. Después de 8 horas, la concentración apical de la heparina de bajo peso molecular se reduce en aproximadamente un 25% a una media de aproximadamente 733 µg/ml (Ensayo 1) y 900 µg/ml (Ensayo 2).

Tabla 1:

Ensayo 1 - LMWH y Desoxicolina 0.06%		
Muestra	Partida (mg/ml)	8 horas (mg/ml)
LMWH - Conjunto A	970	740
LMWH - Conjunto B		770
LMWH - Conjunto C		690
Ensayo 2 - LMWH y Desoxicolina 0.06%		
Muestra	Partida (mg/ml)	8 horas (mg/ml)
LMWH - Conjunto A	1210	880
LMWH - Conjunto B		970
LMWH - Conjunto C		850

La Tabla 2 ilustra las concentraciones basolaterales de heparina de bajo peso molecular en combinación con desoxicolina (0,08%) de los ensayos 1 y 2 anteriores, en varios puntos temporales. La Figura 2 muestra las concentraciones basolaterales de heparina de bajo peso molecular en presencia de desoxicolina (0,06%) en el sistema Caco-2. La Figura 3 muestra la condición de la capa celular medida por las correspondientes curvas de resistencia eléctrica transepitelial.

Tabla 2:

Ensayo 1 - LMWH y Desoxicolina 0.06%				
Concentración de la muestra (µg/ml)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	1.6	5.9	8.3	9.7
LMWH - Conjunto B	0.6	1.3	4.7	1.9
LMWH - Conjunto C	2.9	6.6	16.1	29.1
Máximo teórico	190	171	156	141
Ensayo 2 - LMWH y Desoxicolina 0.06%				
Concentración de la muestra (µg/ml)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	4.0	11.6	15.1	16.1
LMWH - Conjunto B	1.7	8.8	11.2	11.4
LMWH - Conjunto C	2.4	8.7	12.9	15.1
Máximo teórico	190	171	156	141

La Tabla 3 ilustra el porcentaje (%) de resorción de heparina de bajo peso molecular en presencia de desoxicolina (0,08%) en varios puntos temporales.

Tabla 3:

Ensayo 1 - LMWH and Desoxicolina 0.06%				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	0.8	3.5	5.3	6.9
LMWH - Conjunto B	0.3	0.8	3.0	1.3
LMWH - Conjunto C	1.5	3.9	10.3	20.6
Ensayo 2 - LMWH and Desoxicolina 0.06%				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	2.1	6.8	9.7	11.4
LMWH - Conjunto B	0.9	5.1	7.2	8.1
LMWH - Conjunto C	1.3	5.1	8.3	10.7

Ejemplo 2:

Otro ejemplo de los estudios de resorción descritos en la presente se ilustra en las Tablas 4-6 que resumen las concentraciones apicales y basolaterales de heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal, desoxicolina (0,08%) en el modelo de células Caco-2. La Tabla 4 ilustra dos ensayos que incluyen concentraciones apicales de partida de heparina de bajo peso molecular en combinación con desoxicolina, aproximadamente 930 µg/ml (Ensayo 1) y 1360 µg/ml (Ensayo 2), respectivamente. Después de 8 horas, la concentración apical de la heparina de bajo peso molecular se reduce en aproximadamente un 45% a una media de aproximadamente 560 µg/ml (Ensayo 1) y 683 µg/ml (Ensayo 2).

Tabla 4:

Ensayo 1 - LMWH and Desoxicolina 0.08%		
Muestra	Partida (mg/ml)	8 horas (mg/ml)
LMWH - Conjunto A	930	610
LMWH - Conjunto B		520
LMWH - Conjunto C		550
Ensayo 2 - LMWH and Desoxicolina 0.06%		
Muestra	Partida (mg/ml)	8 horas (mg/ml)
LMWH - Conjunto A	1360	630
LMWH - Conjunto B		710
LMWH - Conjunto C		710

La Tabla 5 ilustra las concentraciones basolaterales de heparina de bajo peso molecular en combinación con desoxicolina (0,08%) de los ensayos 1 y 2 anteriores, en varios puntos temporales. La Figura 4 muestra las concentraciones basolaterales de heparina de bajo peso molecular en presencia de desoxicolina (0,08%) en el sistema Caco-2. La Figura 5 muestra la condición de la capa celular medida por las curvas de resistencia eléctrica transepitelial correspondientes.

Tabla 5:

Ensayo 1 - LMWH y Desoxicolina 0.08%				
Sample Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	13.3	41.8	51.8	61.8
LMWH - Conjunto B	4.0	9.9	17.2	30.7
LMWH - Conjunto C	7.8	25.7	46.5	57.2
Máximo teórico	190	171	156	141
Ensayo 2 - LMWH y Desoxicolina 0.08%				
Sample Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	18.0	54.0	79.3	97.1
LMWH - Conjunto B	10.6	49.5	69.5	93.3
LMWH - Conjunto C	10.8	42.9	61.0	77.1
Máximo teórico	190	171	156	141

La Tabla 6 ilustra el porcentaje (%) de resorción de heparina de bajo peso molecular en presencia de desoxicolina (0,08%) en varios puntos temporales.

Tabla 6:

Ensayo 1 - LMWH y Desoxicolina 0.08%				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	7.0	24.4	33.2	43.8
LMWH - Conjunto B	2.1	5.8	11.0	21.8

(continuación)

Ensayo 1 - LMWH y Desoxicolina 0.08%				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
LMWH - Conjunto C	4.1	15.0	29.8	40.6
Ensayo 2 - LMWH y Desoxicolina 0.08%				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	9.4	31.6	50.8	68.9
LMWH - Conjunto B	5.6	29.1	44.6	66.2
LMWH - Conjunto C	5.7	25.1	39.1	54.7

Ejemplo 3:

Otro ejemplo de los estudios de resorción descritos en la presente se ilustra en las Tablas 7-9 que resumen las concentraciones apicales y basolaterales de heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal, quitosano (3% p/v) en el modelo de células Caco-2. La Tabla 7 ilustra dos ensayos que incluyen las concentraciones apicales de partida de heparina de bajo peso molecular en combinación con quitosano, aproximadamente 910 µg/ml (Ensayo 1) y 1390 µg/ml (Ensayo 2), respectivamente. Después de 8 horas, la concentración apical de la heparina de bajo peso molecular se reduce en aproximadamente un 35% a una media de aproximadamente 663 ua/ml (ensayo 1) v 886 ua/ml (ensayo 2).

Tabla 7:

Ensayo 1 - LMWH y Quitosano (3% p/v)		
Muestra	Partida (mg/ml)	8 horas (mg/ml)
LMWH - Conjunto A	910	720
LMWH - Conjunto B		600
LMWH - Conjunto C		670
Ensayo 2 - LMWH y Quitosano (3% p/v)		
Muestra	Partida (mg/ml)	8 horas (mg/ml)
LMWH - Conjunto A	1390	860
LMWH - Conjunto B		870
LMWH - Conjunto C		930

La Tabla 8 ilustra las concentraciones basolaterales de heparina de bajo peso molecular en combinación con quitosano de los ensayos 1 y 2 anteriores, en varios puntos temporales. La Figura 6 muestra las concentraciones basolaterales de heparina de bajo peso molecular en presencia de quitosano (3% p/v) en el sistema Caco-2. La Figura 7 muestra la condición de la capa celular medida por las curvas de resistencia eléctrica transepitelial correspondientes.

Tabla 8:

Ensayo 1 - LMWH y Quitosano 3% p/v				
Concentración de la muestra (µg/ml)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	2.2	3.4	2.0	7.1
LMWH - Conjunto B	1.5	1.9	7.5	6.0
LMWH - Conjunto C	1.0	1.8	1.6	4.8
Máximo teórico	190	171	156	141

(continuación)

Ensayo 2 - LMWH y Quitosano 3% p/v				
Concentración de la muestra ($\mu\text{g/ml}$)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	0.2	3.4	3.8	4.2
LMWH - Conjunto B	2.9	5.4	4.6	7.5
LMWH - Conjunto C	1.1	6.2	6.7	7.7
Máximo teórico	190	171	156	141

La Tabla 9 ilustra el porcentaje (%) de resorción de heparina de bajo peso molecular en presencia de quitosano (3% p/v) en varios puntos temporales.

Tabla 9:

Ensayo 1 - LMWH y Quitosano 3% p/v				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	1.2	2.0	1.3	5.0
LMWH - Conjunto B	0.8	1.1	4.8	4.3
LMWH - Conjunto C	0.5	1.1	1.0	3.4
Ensayo 2 - LMWH y Quitosano 3% p/v				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	0.1	2.0	2.4	3.0
LMWH - Conjunto B	1.5	3.2	3.0	5.3
LMWH - Conjunto C	0.6	3.6	4.3	5.5

Ejemplo 4:

Otro ejemplo de los estudios de resorción descritos en la presente se ilustra en las Tablas 10-12 que resumen las concentraciones apicales y basolaterales de heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal, bromelaina (0,5 mg/ml) en el modelo de células Caco-2. La Tabla 10 ilustra dos ensayos que incluyen las concentraciones apicales de partida de heparina de bajo peso molecular en combinación con bromelaina de aproximadamente 1060 $\mu\text{g/ml}$ (Ensayo 1) y 1230 $\mu\text{g/ml}$ (Ensayo 2), respectivamente. Después de 8 horas, la concentración apical de la heparina de bajo peso molecular se reduce en aproximadamente un 25% a una media de aproximadamente 870 $\mu\text{g/ml}$ (Ensayo 1) y 890 $\mu\text{g/ml}$ (Ensayo 2).

Tabla 10:

Tabla 10:

Ensayo 1 - LMWH y Bromelaina (0.5 mg/ml)		
Muestra	Partida (mg/ml)	8 horas (mg/ml)
LMWH - Conjunto A	1060	830
LMWH - Conjunto B		990
LMWH - Conjunto C		790

(continuación)

Ensayo 2 - LMWH y Bromelaina (0.5 mg/ml)		
Muestra	Partida (mg/ml)	8 horas (mg/ml)
LMWH - Conjunto A	1230	950
LMWH - Conjunto B		990
LMWH - Conjunto C		730

La Tabla 11 ilustra las concentraciones basolaterales de heparina de bajo peso molecular en combinación con la bromelaina de los ensayos 1 y 2 anteriores, en varios puntos temporales. La Figura 8 muestra las concentraciones basolaterales de heparina de bajo peso molecular en presencia de bromelaina en el sistema Caco-2. La Figura 9 muestra la condición de la capa celular medida por las curvas de resistencia eléctrica transepitelial correspondientes.

Tabla 11:

Ensayo 1 - LMWH y Bromelaina (0.5 mg/ml)				
Concentración de la muestra ($\mu\text{g/ml}$)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	1.4	3.6	4.5	18.5
LMWH - Conjunto B	0.5	1.7	7.1	14.2
LMWH - Conjunto C	1.2	2.9	8.9	11.0
Máximo teórico	190	171	156	141
Ensayo 2 - LMWH y Bromelaina (0.5 mg/ml)				
Concentración de la muestra ($\mu\text{g/ml}$)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	0.4	1.9	16.6	20.8
LMWH - Conjunto B	1.5	5.5	14.0	21.0
LMWH - Conjunto C	0.3	12.2	17.9	21.4
Máximo teórico	190	171	156	141

La Tabla 12 ilustra el porcentaje (%) de resorción de heparina de bajo peso molecular en presencia de bromelaina (0,5 mg/ml) en varios puntos temporales.

Tabla 12:

Ensayo 1 - LMWH y Bromelaina (0.5 mg/ml)				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	0.7	2.1	2.9	13.1
LMWH - Conjunto B	0.3	1.0	4.6	10.0
LMWH - Conjunto C	0.6	1.7	5.7	7.8
Ensayo 2 - LMWH y Bromelaina (0.5 mg/ml)				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	0.2	1.1	10.6	14.8
LMWH - Conjunto B	0.8	3.2	9.0	14.9

(continuación)

Ensayo 2 - LMWH y Bromelaina (0.5 mg/ml)				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
LMWH - Conjunto C	0.2	7.1	11.5	15.2

Ejemplo 5:

Otro ejemplo de los estudios de resorción descritos en la presente se ilustra en las Tablas 13-15 que resumen las concentraciones apicales y basolaterales de heparina de bajo peso molecular en combinación con el potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal, caprato de sodio (12 mM) en el modelo de células Caco-2. La Tabla 13 ilustra dos ensayos que incluyen concentraciones apicales de partida de heparina de bajo peso molecular en combinación con caprato de sodio de aproximadamente 920 µg/ml (Ensayo 1) y 1150 µg/ml (Ensayo 2), respectivamente. Después de 8 horas, la concentración apical de la heparina de bajo peso molecular se reduce en aproximadamente un 20% a una media de aproximadamente 803 µg/ml (Ensayo 1) y 840 µg/ml (Ensayo 2).

Tabla 13:

Ensayo 1 - LMWH y Caprato de sodio (12 mM)		
Muestra	Partida (mg/ml)	8 horas (mg/ml)
LMWH - Conjunto A	920	810
LMWH - Conjunto B		830
LMWH - Conjunto C		770
Ensayo 2 - LMWH y Caprato de sodio (12 mM)		
Muestra	Partida (mg/ml)	8 horas (mg/ml)
LMWH - Conjunto A	1150	730
LMWH - Conjunto B		880
LMWH - Conjunto C		910

La Tabla 14 ilustra las concentraciones basolaterales de heparina de bajo peso molecular en combinación con caprato de sodio de los ensayos 1 y 2 anteriores, en varios puntos temporales. La Figura 10 muestra las concentraciones basolaterales de heparina de bajo peso molecular en presencia de caprato de sodio en el sistema Caco-2. La Figura 11 muestra la condición de la capa celular medida por las curvas de resistencia eléctrica transepitelial correspondientes.

Tabla 14:

Ensayo 1 - LMWH y Caprato de sodio (12 mM)				
Concentración de la muestra (mg/ml)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	0.7	1.1	1.4	2.5
LMWH - Conjunto B	0	1.3	1.6	3.3
LMWH - Conjunto C	0.4	1.8	2.5	3.7
Máximo teórico	190	171	156	141
Ensayo 2 - LMWH y Caprato de sodio (12 mM)				
Concentración de la muestra (mg/ml)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	0.2	1.7	3.2	4.7
LMWH - Conjunto B	0.3	2.4	2.8	3.1
LMWH - Conjunto C	0	4.5	4.8	7.5

(continuación)

Ensayo 2 - LMWH y Caprato de sodio (12 mM)				
Concentración de la muestra (mg/ml)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Máximo teórico	190	171	156	141

La Tabla 15 ilustra el porcentaje (%) de resorción de heparina de bajo peso molecular en presencia de caprato de sodio (12 mM) en varios puntos temporales.

Tabla 15:

Ensayo 1 - LMWH and Caprato de sodio (12 mM)				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	0.4	0.6	0.9	1.8
LMWH - Conjunto B	0	0.8	1.0	2.3
LMWH - Conjunto C	0.2	1.1	1.6	2.6
Ensayo 2 - LMWH and Caprato de sodio (12 mM)				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	0.1	1.0	2.1	3.3
LMWH - Conjunto B	0.2	1.4	1.8	2.2
LMWH - Conjunto C	0	2.6	3.1	5.3

Ejemplo 6:

Otro ejemplo de los estudios de resorción descritos en la presente se ilustra en las Tablas 16-18 que resumen las concentraciones apicales y basolaterales de heparina de bajo peso molecular con la combinación sinérgicamente eficaz de los potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal, quitosano (3% p/v) y bromelaina (0,5 mg/ml) en el modelo de células Caco-2. La Tabla 16 ilustra dos ensayos que incluyen las concentraciones apicales de partida de heparina de bajo peso molecular en combinación con la combinación sinérgicamente eficaz de quitosano (3% p/v) y bromelaina (0,5 mg/ml) de aproximadamente 920 µg/ml (Ensayo 1) y 1250 µg/ml (Ensayo 2), respectivamente. Después de 8 horas, la concentración apical de la heparina de bajo peso molecular se reduce en aproximadamente un 55% a una media de aproximadamente 493 µg/ml (Ensayo 1) y 560 µg/ml (Ensayo 2).

Tabla 16:

Ensayo 1 - LMWH y Quitosano (3% p/v) y Bromelaina (0.5 mg/ml)		
Muestra	Partida (mg/ml)	8 horas (mg/ml)
LMWH - Conjunto A	920	550
LMWH - Conjunto B		450
LMWH - Conjunto C		480
Ensayo 2 - LMWH y Quitosano (3% p/v) y Bromelaina (0.5 mg/ml)		
Muestra	Partida (mg/ml)	8 horas (mg/ml)
LMWH - Conjunto A	1250	600
LMWH - Conjunto B		470
LMWH - Conjunto C		610

La Tabla 17 ilustra las concentraciones basolaterales de heparina de bajo peso molecular y una combinación sinérgicamente eficaz de quitosano y bromelaina no modificada de los ensayos 1 y 2 anteriores, en

varios puntos temporales. La Figura 12 muestra las concentraciones basolaterales de heparina de bajo peso molecular en presencia de una combinación sinérgicamente eficaz de quitosano y bromelaina en el sistema Caco-2. La Figura 13 muestra la condición de la capa celular medida por las curvas de resistencia eléctrica transepitelial correspondientes.

5

Tabla 17:

Ensayo 1 - LMWH y Quitosano (3% p/v) y Bromelaina (0.5 mg/ml)				
Concentración de la muestra ($\mu\text{g/ml}$)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	17.2	43.8	72.2	64.9
LMWH - Conjunto B	20.8	43.3	67.6	51.1
LMWH - Conjunto C	23.5	48.8	82.3	54.2
Máximo teórico	190	171	156	141
Ensayo 2 - LMWH y Quitosano (3% p/v) y Bromelaina (0.5 mg/ml)				
Concentración de la muestra ($\mu\text{g/ml}$)	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	18.4	71.2	90.8	68.6
LMWH - Conjunto B	26.9	83.5	96.9	84.8
LMWH - Conjunto C	32.2	77.1	104.8	90.0
Máximo teórico	190	171	156	141

10

15

20

25

30

La Tabla 18 ilustra el porcentaje (%) de resorción de heparina de bajo peso molecular en presencia de una combinación sinérgicamente eficaz de quitosano y bromelaina no modificada en varios puntos temporales.

35

Tabla 18:

Ensayo 1 - LMWH y Quitosano (3% p/v) y Bromelaina (0.5 mg/ml)				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	9.1	25.6	46.3	46.0
LMWH - Conjunto B	10.9	25.3	43.3	36.2
LMWH - Conjunto C	12.4	28.5	52.8	38.4
Ensayo 2 - LMWH y Quitosano (3% p/v) y Bromelaina (0.5 mg/ml)				
Porcentaje de resorción	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas
Factor de dilución	1	0.9	0.82	0.74
LMWH - Conjunto A	9.6	41.6	58.2	48.7
LMWH - Conjunto B	5.6	48.8	62.1	60.1
LMWH - Conjunto C	16.9	45.1	67.2	63.8

40

45

50

55

La Tabla 19 es un resumen del porcentaje de resorción de heparinas de bajo peso molecular en el modelo de células Caco-2 en presencia de varios potenciadores de la permeación epitelial gastrointestinal a varias concentraciones. Como se muestra en la Tabla 19, la combinación sinérgicamente eficaz de quitosano (3% p/v) y bromelaina (0,5 mg/ml) demostró una mayor resorción de heparina de bajo peso molecular que la suma aditiva de quitosano (3% p/v) solo más bromelaina (0,5 mg/ml) sola.

60

65

Tabla 19:

Porcentaje de resorción medio a las 8 horas	Heparina de bajo peso molecular
Peso molecular	3 kD
Sin potenciador	1.0
Caprato de sodio - 12 mM	2.9
Desoxicolato - 0.06%	9.8
Desoxicolato - 0.08%	49.3
Bromelaina - 0.5 mg/ml	12.8
Quitosano - 3%	4.4
Bromelaina/Quitosano - 0.5 mg/ml:3%	48.9

La Figura 14 ilustra la resorción de heparina de bajo peso molecular en modelos de células Caco-2: 1) en ausencia de cualquier potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal; 2) en presencia de diferentes potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal (por ejemplo, caprato de sodio, desoxicolato, bromelaina, quitosano); y 3) en presencia de una combinación sinérgicamente eficaz de bromelaina y quitosano en diferentes momentos (es decir, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 8 horas). Como se ilustra en la Figura 14, la combinación sinérgicamente eficaz de quitosano (3% p/v) y bromelaina (0,5 mg/ml) demostró una mayor resorción de heparina de bajo peso molecular que la suma aditiva de quitosano (3% p/v) solo más bromelaina (0,5 mg/ml) sola.

No obstante las cláusulas adjuntas, la descripción también se define mediante las siguientes cláusulas. Cláusulas que no están cubiertas por las reivindicaciones adjuntas y no forman parte de la invención.

1. Una composición de dosificación oral que comprende:

una heparina de bajo peso molecular;
 una combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal; y
 un vehículo de administración de dosificación oral.

2. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 1, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal mejora la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de la heparina de bajo peso molecular en 3 veces o más de la que se logra mediante la suma aditiva de cada potenciador de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal.

3. La composición de dosificación oral de acuerdo con las Cláusulas 1 o 2, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende dos o más moduladores de unión estrecha.

4. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 3, en donde los moduladores de unión estrecha se seleccionan del grupo que consiste de proteasas, ácidos biliares, polisacáridos, ácidos grasos y sales de los mismos y combinaciones de los mismos.

5. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 4, en donde el modulador de unión estrecha comprende una proteasa.

6. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 5, en donde el modulador de unión estrecha es bromelaina o un componente enzimático de la misma.

7. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 4, en donde el modulador de unión estrecha es un polisacárido.

8. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 7, en donde el polisacárido es un quitosano.

9. La composición de dosificación oral de acuerdo con la cláusula 8, en donde el polisacárido es carboximetil quitosano.

10. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 9, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende carboximetil quitosano y bromelaina.

11. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 10, en donde el carboximetil quitosano y la bromelaina están presentes en una proporción suficiente para proporcionar un aumento de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de 3 veces o más que el que se logra mediante la suma aditiva de carboximetil quitosano y bromelaina.

12. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 10, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende aproximadamente del

0,75% p/v a aproximadamente el 3% p/v de carboximetil quitosano y de aproximadamente 0,125 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

5 13. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 10, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende aproximadamente el 1,5% p/v de carboximetil quitosano y aproximadamente 0,25 mg/ml de bromelaina.

14. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 8, en donde el polisacárido es quitosano no modificado.

10 15. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 14, en donde el polisacárido es quitosano no tiolado.

16. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 14, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende quitosano no modificado y bromelaina.

15 17. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 16, en donde el quitosano no modificado y la bromelaina están presentes en una proporción suficiente para proporcionar un aumento de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de 3 veces o más que el que se logra mediante la suma aditiva de quitosano no modificado y bromelaina .

20 18. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 16, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende de aproximadamente el 0,75% p/v a aproximadamente el 3% p/v de quitosano no modificado y de aproximadamente 0,125 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

19. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 16, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende aproximadamente el 1,5% p/v de quitosano no modificado y aproximadamente 0,25 mg/ml de bromelaina.

25 20. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 16, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende aproximadamente el 3% p/v de quitosano no modificado y aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

21. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde la heparina de bajo peso molecular tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 10 kDa.

30 22. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde la heparina de bajo peso molecular se produce por la despolimerización de heparina no fraccionada.

23. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde la heparina de bajo peso molecular se selecciona del grupo que consiste de Bemiparina, Certoparina, Dalteparina, Enoxaparina, Nadroparina, Parnaparina, Reviparina y Tinzaparina.

35 24. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde la composición está en forma de dosificación unitaria.

25. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 24, en donde la composición proporciona una dosis en el intervalo de 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

40 26. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde la composición es un líquido.

27. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las cláusulas precedentes, en donde la composición es un sólido.

45 28. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 27, en donde el sólido comprende una capa resistente a la degradación gastrointestinal.

29. Una composición de dosificación oral que comprende:

una heparina de bajo peso molecular;

una combinación sinérgicamente eficaz de quitosano no modificado y bromelaina en una cantidad suficiente para proporcionar una mejora de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal que es mayor que la que se logra mediante la suma aditiva de quitosano no modificado y bromelaina individualmente; y

un vehículo de administración de dosificación oral.

55 30. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 29, en donde el quitosano no modificado es quitosano no tiolado.

31. La composición de dosificación oral de acuerdo con las cláusulas 29 o 30, en donde la combinación de quitosano no modificado y bromelaina está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una mejora de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal que es 3 veces mayor que la que se alcanza por la suma aditiva de quitosano no modificado y bromelaina.

60 32. La composición de dosificación oral de acuerdo con las Cláusulas 29, 30 o 31, en donde la composición de dosificación oral comprende de aproximadamente el 0,75% p/v a aproximadamente el 3% p/v de quitosano no modificado y de aproximadamente 0,125 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

33. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 29, 30 o 31, en donde la composición de dosificación oral comprende aproximadamente el 1,5% p/v de quitosano no modificado y aproximadamente 0,25 mg/ml de bromelaina.

65 34. La composición de dosificación oral de acuerdo con las Cláusulas 29, 30 o 31, en donde la composición

de dosificación oral comprende aproximadamente el 3% p/v de quitosano no modificado y aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

5 35. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 29 a 34, en donde el quitosano no modificado y la bromelaina están presentes en una proporción suficiente para proporcionar un aumento de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de 4 veces o más que el que se logra mediante la suma aditiva de quitosano no modificado y bromelaina.

36. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 29 a 35, en donde la heparina de bajo peso molecular tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 10 kDa.

10 37. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 29 a 36, en donde la heparina de bajo peso molecular se produce por la despolimerización de heparina no fraccionada.

38. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 29 a 37, en donde la heparina de bajo peso molecular se selecciona del grupo que consiste de Bemiparina, Certoparina, Dalteparina, Enoxaparina, Nadroparina, Parnaparina, Reviparina y Tinzaparina.

15 39. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 29 a 38, en donde la composición está en forma de dosificación unitaria.

40. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 39, en donde la composición proporciona una dosis en el intervalo de 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

41. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 29 a 40, en donde la composición es un líquido.

20 42. La composición de dosificación oral de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 29 a 40, en donde la composición es un sólido.

43. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 42, en donde el sólido comprende una capa resistente a la degradación gastrointestinal.

44. Un método que comprende:

25 administrar por vía oral a un sujeto una composición de dosificación oral que comprende:

una heparina de bajo peso molecular;

una combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal; y

30 un vehículo de administración de dosificación oral.

45. El método de acuerdo con la Cláusula 44, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal mejora la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de la heparina de bajo peso molecular en 3 veces o más que la que se obtiene mediante la suma aditiva de cada potenciador de la barrera de permeación epitelial gastrointestinal.

35 46. El método de acuerdo con la Cláusula 45, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende dos o más moduladores de unión estrecha.

47. El método de acuerdo con la Cláusula 46, en donde los moduladores de unión estrecha se seleccionan del grupo que consiste de proteasas, ácidos biliares, polisacáridos, ácidos grasos y sales de los mismos y combinaciones de los mismos.

40 48. El método de acuerdo con la Cláusula 47, en donde el modulador de unión estrecha comprende una proteasa.

49. El método de acuerdo con la Cláusula 48, en donde el modulador de unión estrecha es bromelaina o un componente enzimático de la misma.

45 50. El método de acuerdo con la Cláusula 48, en donde el modulador de unión estrecha es un polisacárido.

51. El método de acuerdo con la Cláusula 50, en donde el polisacárido es un quitosano.

52. El método de acuerdo con la Cláusula 51, en donde el quitosano es carboximetil quitosano.

53. El método de acuerdo con la Cláusula 52, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende carboximetil quitosano y bromelaina.

50 54. El método de acuerdo con la Cláusula 53, en donde el carboximetil quitosano y la bromelaina están presentes en una proporción suficiente para proporcionar una mejora de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de 3 veces o más que la que se logra mediante la suma aditiva de quitosano no modificado y bromelaina.

55 55. El método de acuerdo con la Cláusula 54, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende de aproximadamente el 0,75% p/v a aproximadamente el 3% p/v de carboximetil-quitosano y de aproximadamente 0,125 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

60 56. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 54, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende aproximadamente el 1,5% p/v de carboximetil quitosano y aproximadamente 0,25 mg/ml de bromelaina.

57. El método de acuerdo con la Cláusula 54, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende aproximadamente el 3% p/v de carboximetil quitosano y aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

58. El método de acuerdo con la Cláusula 51, en donde el quitosano es quitosano no modificado.

65 59. El método de acuerdo con la Cláusula 58, en donde el quitosano es quitosano no tiolado.

60. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 58 a 59, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende quitosano no modificado y bromelaina.
- 5 61. El método de acuerdo con la Cláusula 60, en donde el quitosano no modificado y la bromelaina están presentes en una proporción suficiente para proporcionar una mejora de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de 3 veces o más que la que se logra mediante la suma aditiva de quitosano no modificado y bromelaina .
- 10 62. El método de acuerdo con la Cláusula 60, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende de aproximadamente el 0,75% p/v a aproximadamente el 3% p/v de quitosano no modificado y de aproximadamente 0,125 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.
- 15 63. La composición de dosificación oral de acuerdo con la Cláusula 62, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende aproximadamente el 1,5% p/v de quitosano no modificado y aproximadamente 0,25 mg/ml de bromelaina.
64. El método de acuerdo con la Cláusula 62, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende aproximadamente el 3% p/v de quitosano no modificado y aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.
- 20 65. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 44 a 64, en donde la heparina de bajo peso molecular tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 10 kDa.
66. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 44 a 65, en donde la heparina de bajo peso molecular se produce por la despolimerización de heparina no fraccionada.
- 25 67. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 44 a 66, en donde la heparina de bajo peso molecular se selecciona del grupo que consiste de Bemiparina, Certoparina, Dalteparina, Enoxaparina, Nadroparina, Parnaparina, Reviparina y Tinzaparina.
68. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 44 a 67, en donde la composición de dosificación oral está en forma de dosificación unitaria.
- 30 69. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 44 a 68, en donde la composición proporciona una dosis en el intervalo de 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.
70. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 44 a 69, en donde la composición de dosificación oral se administra como un líquido.
71. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 44 a 69, en donde la composición de dosificación oral se administra como un sólido.
- 35 72. El método de acuerdo con la cláusula 71, en donde el sólido comprende una capa resistente a la degradación gastrointestinal.
73. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 44 a 72, en donde el sujeto es un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad tromboembólica.
- 40 74. El método de acuerdo con la Cláusula 73, en donde la enfermedad tromboembólica está asociada con infarto de miocardio, trombosis venosa profunda posterior a la cirugía, ataque isquémico transitorio, injerto de bypass de arteria coronaria, angioplastia coronaria transluminal percutánea, leucemia promielocítica aguda, diabetes, mieloma múltiple, shock séptico, púrpura fulminanas, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, angina o prótesis de válvula aórtica o vascular.
75. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 44 a 74, en donde el método comprende además diagnosticar al sujeto con una enfermedad tromboembólica.
- 45 76. Un método que comprende:
 administrar por vía oral a un sujeto una composición de dosificación oral que comprende:
- 50 una heparina de bajo peso molecular;
 una combinación sinérgicamente eficaz de quitosano no modificado y bromelaina en una cantidad suficiente para proporcionar una mejora de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal que es mayor que la que se logra mediante la suma aditiva de quitosano no modificado y bromelaina individualmente; y
 un vehículo de administración de dosificación oral.
- 55 77. El método de acuerdo con la cláusula 76, en donde la combinación de quitosano no modificado y bromelaina mejora la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de la heparina de bajo peso molecular en 3 veces o más de lo que se logra mediante la suma aditiva de quitosano y bromelaina sin modificar individualmente.
- 60 78. El método de acuerdo con las Cláusulas 76 o 77, en donde el quitosano no modificado es quitosano no tiolado.
79. El método de acuerdo con la Cláusula 78, en donde el quitosano no modificado y la bromelaina están presentes en una proporción suficiente para proporcionar una mejora de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de 4 veces o más que la que se logra mediante la suma aditiva de quitosano no modificado y bromelaina individualmente.
- 65 80. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 76 a 79, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende de aproximadamente el

0,75% p/v a aproximadamente el 3% p/v de quitosano y de aproximadamente 0,125 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

5 81. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 76 a 79, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende aproximadamente el 1,5% p/v de quitosano no modificado y aproximadamente 0,25 mg/ml de bromelaina.

82. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 76 a 79, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende aproximadamente el 3% p/v de quitosano no modificado y aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

10 83. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 76 a 82, en donde la heparina de bajo peso molecular tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 10 kDa.

84. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 76 a 83, en donde la heparina de bajo peso molecular se produce por la despolimerización de heparina no fraccionada.

15 85. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 76 a 84, en donde la heparina de bajo peso molecular se selecciona del grupo que consiste en Bemiparina, Certoparina, Dalteparina, Enoxaparina, Nadroparina, Parnaparina, Reviparina y Tinzaparina.

86. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 76 a 79, en donde la composición de dosificación oral está en forma de dosificación unitaria.

20 87. El método de acuerdo con la Cláusula 86, en donde la composición proporciona una dosis en el intervalo de 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

88. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 76 a 87, en donde la composición de dosificación oral se administra como un líquido.

25 89. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 76 a 87, en donde la composición de dosificación oral se administra como un sólido.

90. El método de acuerdo con la Cláusula 89, en donde el sólido comprende una capa resistente a la degradación gastrointestinal.

30 91. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 76 a 90, en donde el sujeto es un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad tromboembólica.

92. El método de acuerdo con la Cláusula 91, en donde la enfermedad tromboembólica está asociada con infarto de miocardio, trombosis venosa profunda después de la cirugía, ataque isquémico transitorio, injerto de bypass de arteria coronaria, angioplastia coronaria transluminal percutánea, leucemia promielocítica aguda, diabetes, mieloma múltiple, shock séptico, púrpura fulminanas, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, angina o prótesis de válvula aórtica o vascular.

35 93. El método de acuerdo con cualquiera de las Cláusulas 76 a 92, en donde el método comprende además diagnosticar que el sujeto tiene una enfermedad tromboembólica.

94. Un kit que comprende:

- una o más heparinas de bajo peso molecular;
- una combinación sinérgicamente eficaz de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal; y
- 40 un vehículo de administración de dosificación oral.

95. El kit de acuerdo con la Cláusula 94, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende quitosano no modificado y bromelaina .

45 96. El kit de acuerdo con la Cláusula 95, en donde el quitosano no modificado y la bromelaina están presentes en una proporción suficiente para proporcionar una mejora de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de 3 veces o más que la que se logra mediante la suma aditiva de quitosano no modificado y bromelaina .

50 97. El kit de acuerdo con la Cláusula 95, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende de aproximadamente el 0,75% p/v a aproximadamente el 3% p/v de quitosano no modificado y de aproximadamente 0,125 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

55 98. El kit de acuerdo con la Cláusula 95, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende aproximadamente el 3% p/v de quitosano no modificado y aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

99. El kit de acuerdo con la Cláusula 94, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende carboximetil quitosano y bromelaina.

60 100. El kit de acuerdo con la Cláusula 99, en donde el carboximetil quitosano y la bromelaina están presentes en una proporción suficiente para proporcionar una mejora de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal de 3 veces o más de la que se lograría mediante la suma aditiva de carboximetil quitosano y bromelaina.

65 101. El kit de acuerdo con la Cláusula 99, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende de aproximadamente el 0,75% p/v a aproximadamente el 3% p/v de carboximetil quitosano y de aproximadamente 0,125 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

102. El kit de acuerdo con la Cláusula 99, en donde la combinación de dos o más potenciadores de la

permeación de la barrera epitelial gastrointestinal comprende aproximadamente el 3% p/v de carboximetil quitosano y aproximadamente 0,5 mg/ml de bromelaina.

103. El kit de acuerdo con la Cláusula 99, en donde la heparina de bajo peso molecular tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 10 kDa.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición de dosificación oral que comprende:
- 5 - una heparina de bajo peso molecular que tiene un peso molecular medio ponderado que varía de 2 kDa a 12kDa;
 - una combinación sinérgicamente eficaz de quitosano y bromelaina; y
 - un vehículo de administración de dosificación oral.
- 10 **2.** La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende del 0,25% p/v al 3,5% p/v de quitosano, preferiblemente del 0,3% p/v al 3% p/v de quitosano.
- 3.** La composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende de 0,01 mg/ml a 1,0 mg/ml de bromelaina, preferiblemente de 0,25 mg/ml a 0,75 mg/ml de bromelaina.
- 15 **4.** La composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende del 0,75% p/v al 3% p/v de quitosano y de 0,125 mg/ml a 0,5 mg/ml de bromelaina.
- 5.** La composición de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1-4, que comprende:
- 20 - el 0,75% p/v de quitosano y 0,12 mg/ml de bromelaina;
 - el 1,5% p/v de quitosano y 0,25 mg/ml de bromelaina; o
 - el 3% p/v de quitosano y 0,5 mg/ml de bromelaina.
- 25 **6.** La composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el quitosano es carboximetil quitosano, quitosano no modificado o quitosano no tiolado.
- 7.** La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende del 1% p/v al 5% p/v de quitosano no modificado y de 0,1 mg/ml a 0,5 mg/ml de bromelaina.
- 30 **8.** La composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la heparina de bajo peso molecular tiene un peso molecular que varía de 2 kDa a 10 kDa.
- 9.** La composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la composición está en forma de dosificación unitaria.
- 35 **10.** La composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la composición es un líquido.
- 11.** La composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde en donde la composición es un sólido.
- 40 **12.** La composición de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el sólido comprende una capa resistente a la degradación gastrointestinal.
- 45 **13.** La composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, para su uso en terapia, preferiblemente terapia para el tratamiento de una enfermedad tromboembólica.

50

55

60

65

Analisis de Biodisponibilidad del Modelo de Células CaCo2

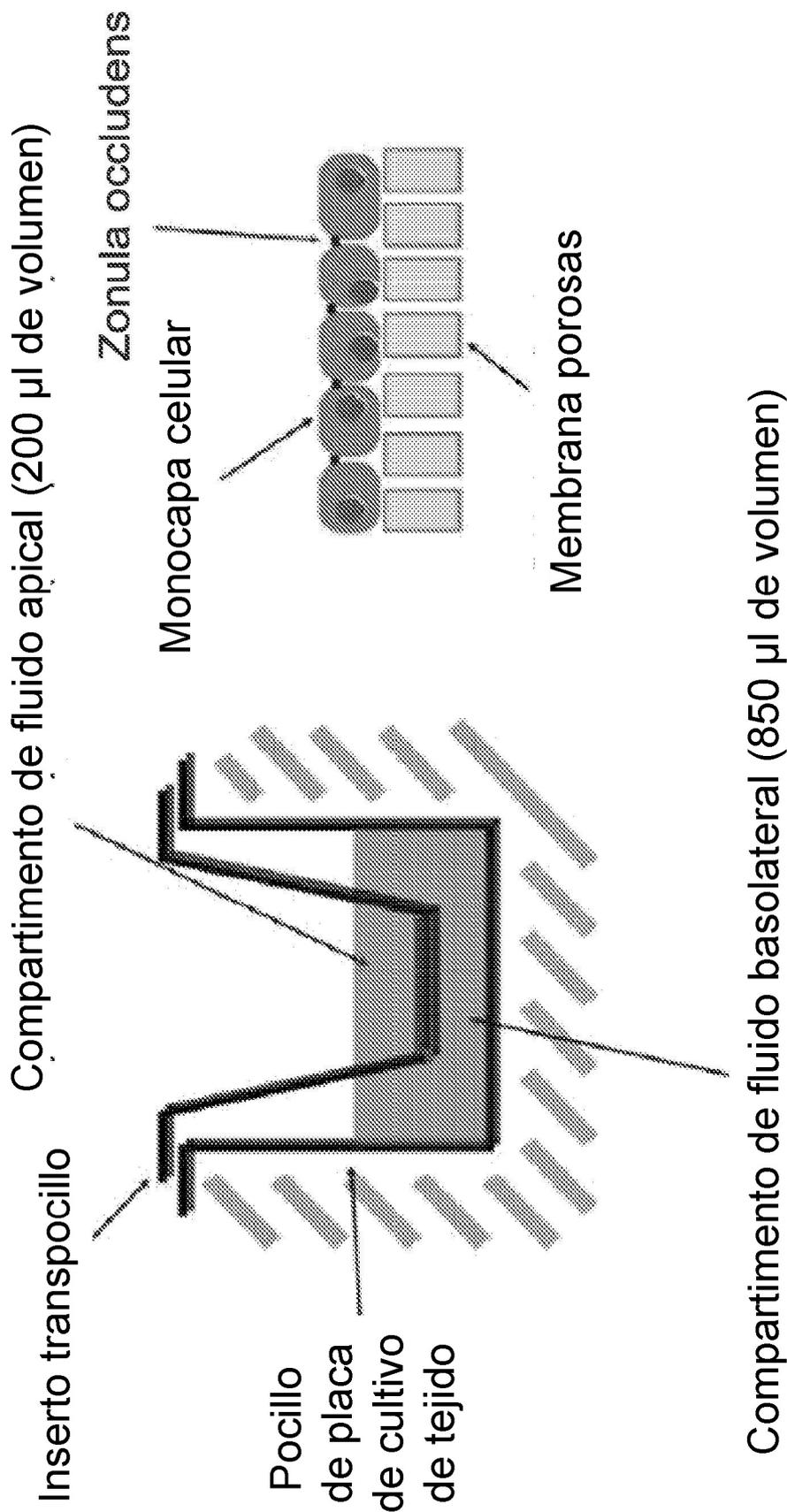


Fig. 1

Análisis de Biodisponibilidad de Modelo de Células CaCo2

Concentraciones basolaterales de Heparina de Bajo Peso Molecular en el sistema CaCo2 con Desoxicolina (0,06%)

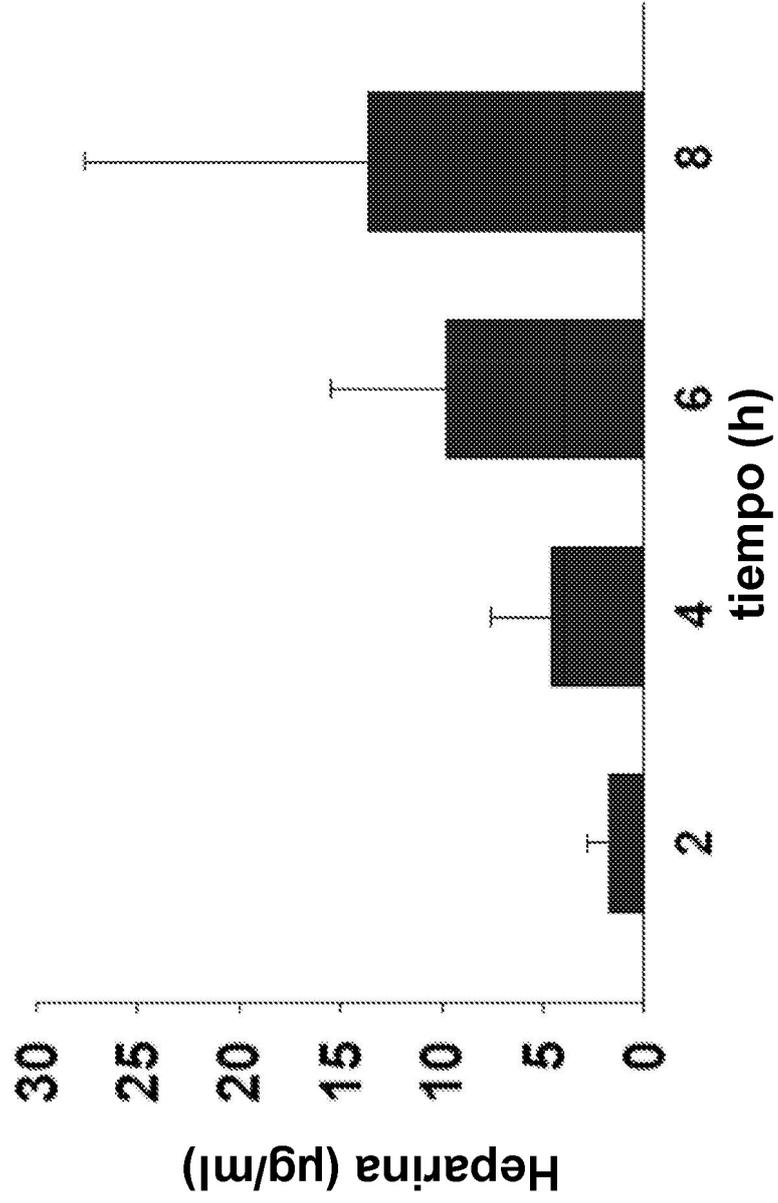


Fig. 2

Condición de la Capa Celular Medida por TEER

Heparina de Bajo Peso Molecular en el sistema CaCo2 con Desoxicolina (0,06%)

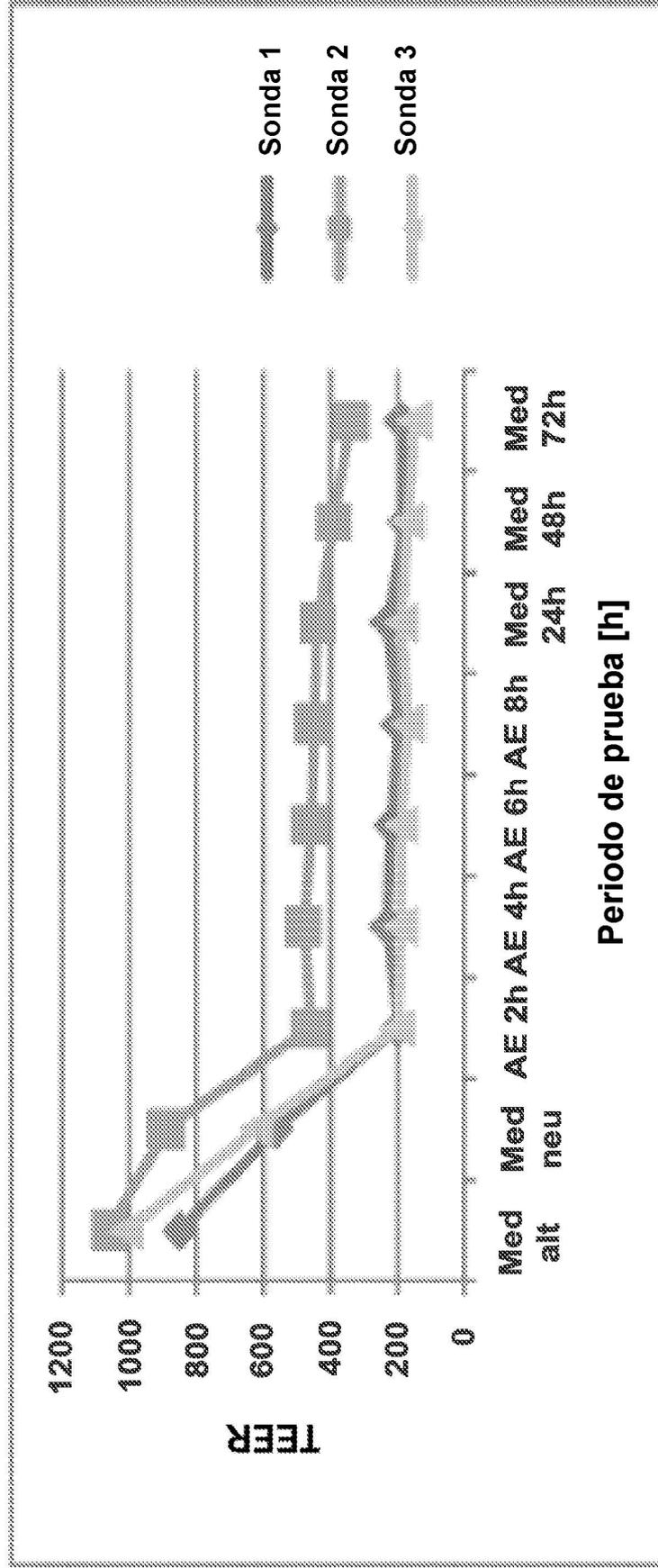


Fig. 3

Análisis de Biodisponibilidad del Modelo de Células CaCo2

Concentraciones basolaterales de Heparina de Bajo Peso Molecular en el sistema CaCo2 con Desoxicolina (0,08%)

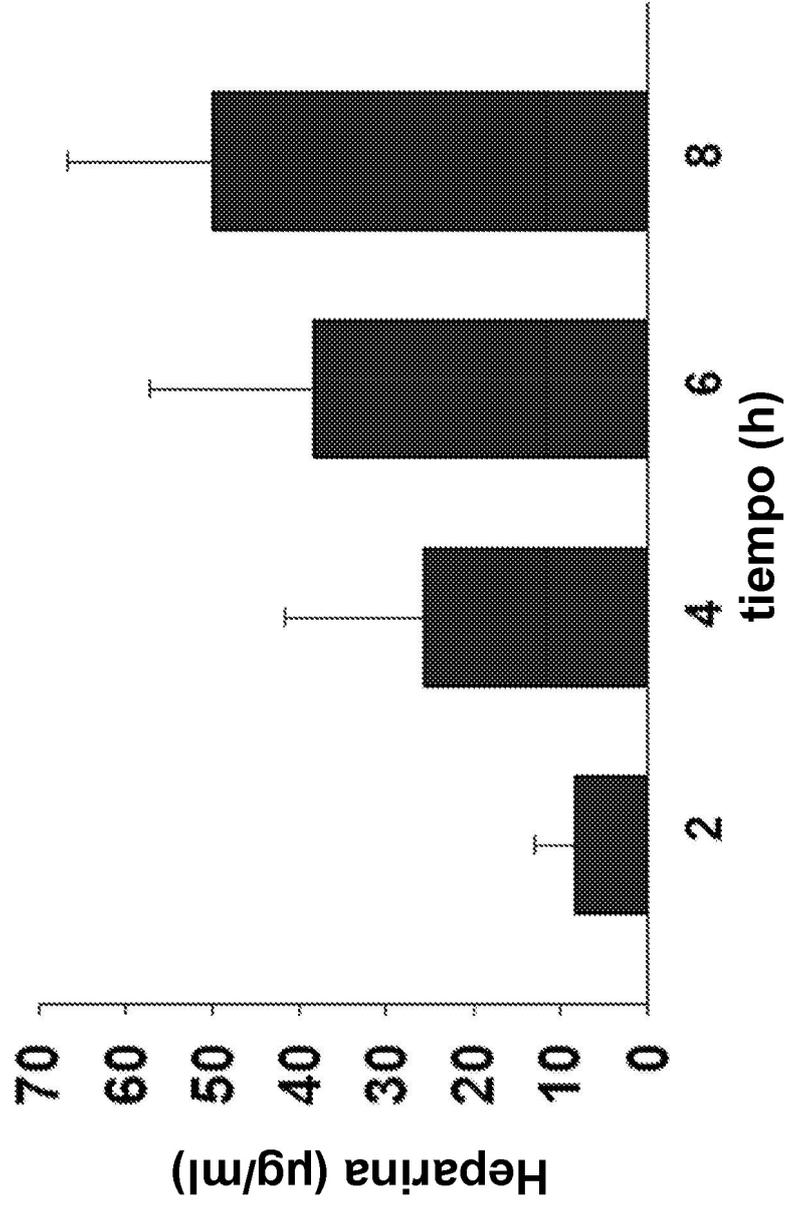


Fig. 4

Condición de la Capa Celular Medida por TEER

Heparina de Bajo Peso Molecular en el sistema CaCo2 con Desoxicolina (0,08%)

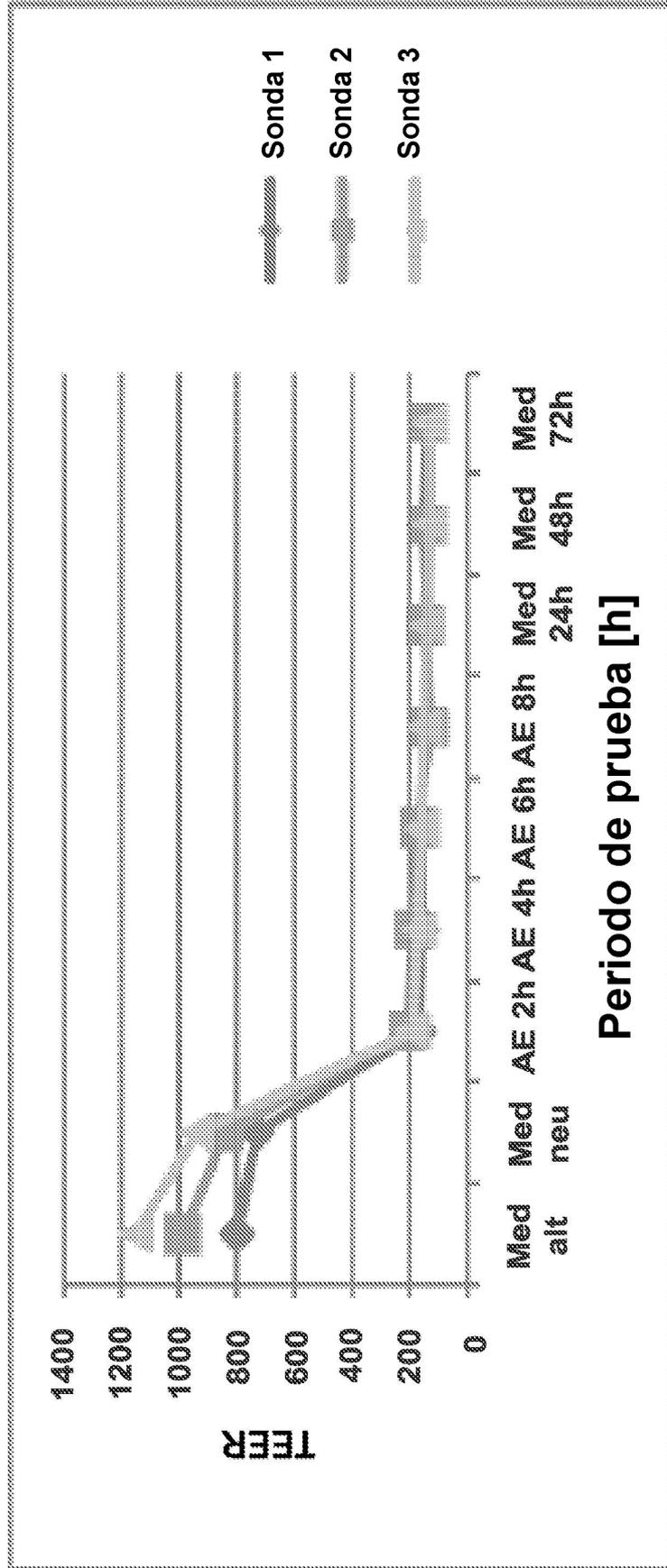


Fig. 5

Análisis de Biodisponibilidad del Modelo de Células CaCo2

Concentraciones basolaterales de Heparina de Bajo Peso Molecular en el sistema CaCo2 con Quitosano (3%)

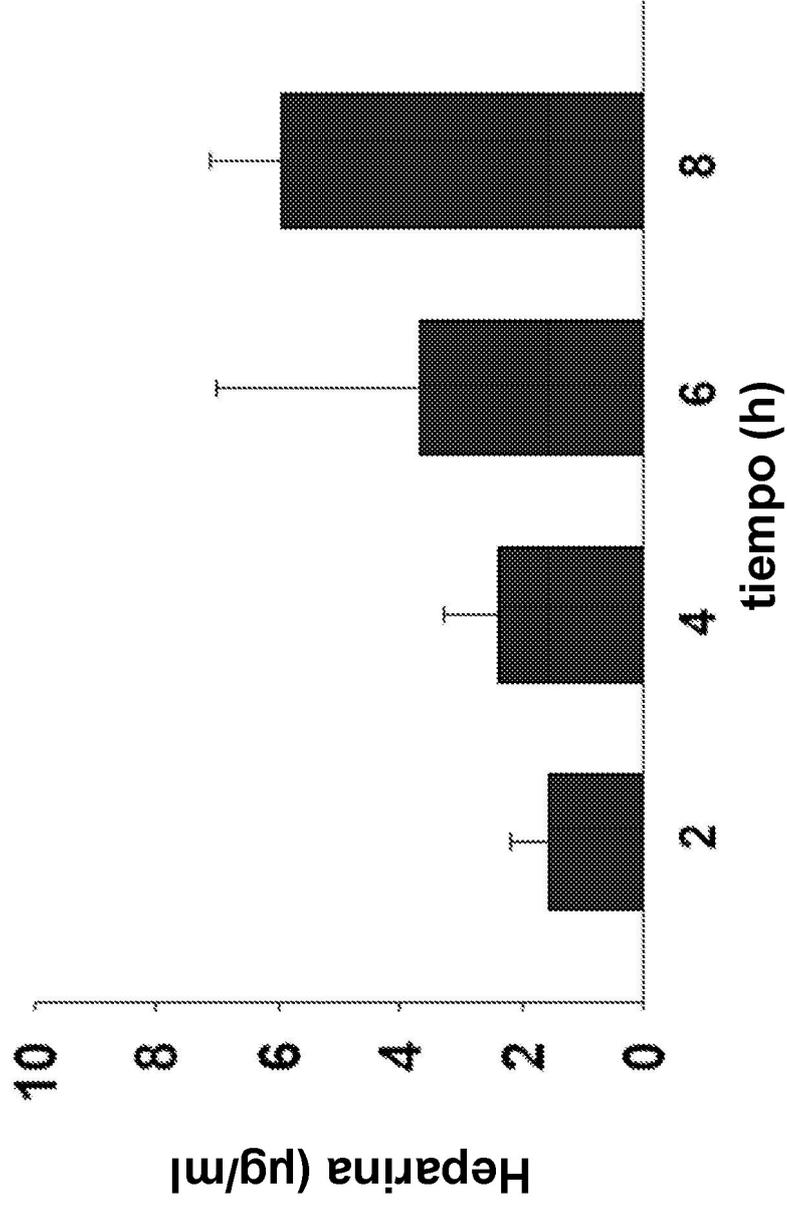


Fig. 6

Condición de la Capa Celular Medida por TEER

Heparina de Bajo Peso Molecular en el sistema CaCo2 con Quitosano (3%)

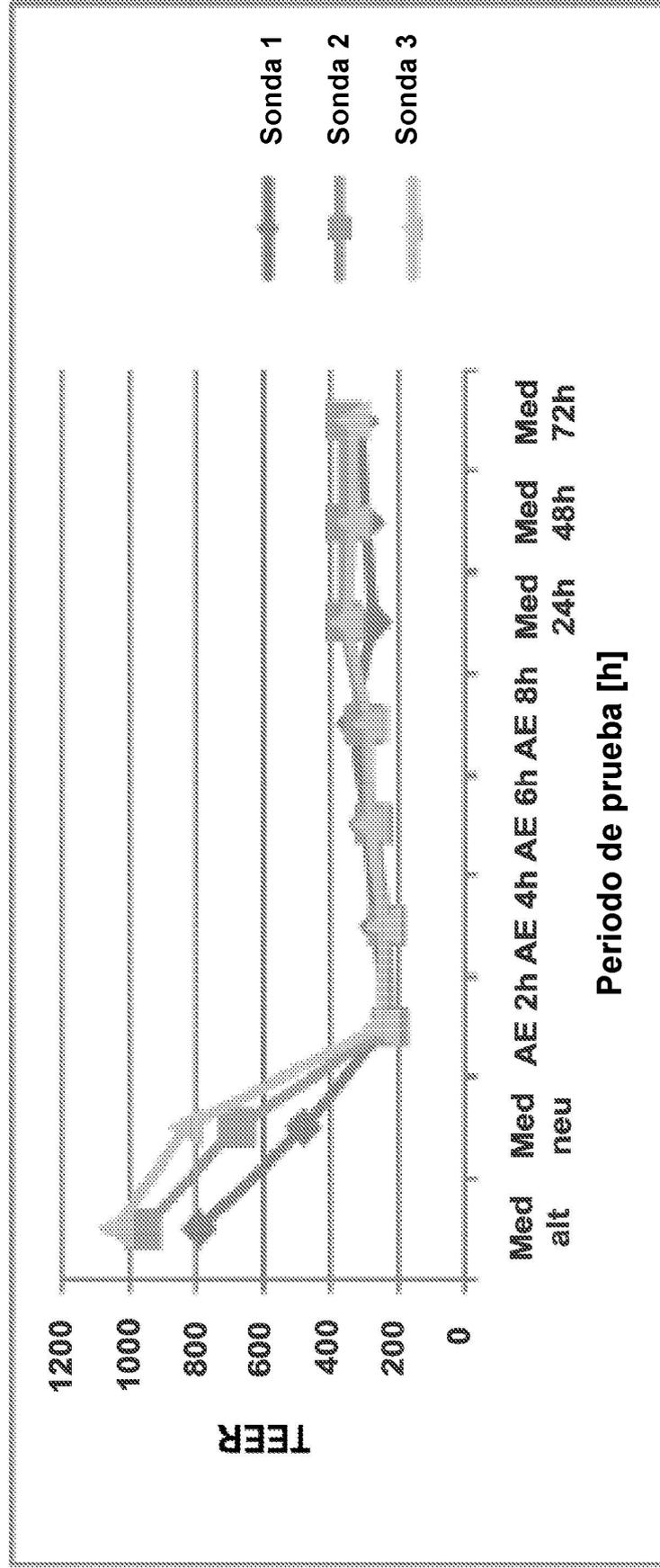


Fig. 7

Análisis de Biodisponibilidad del Modelo de Células CaCo2

Concentraciones Basolaterales de Heparina de Bajo Peso Molecular en el sistema CaCo2 con Bromelaina (0,5 mg/ml)

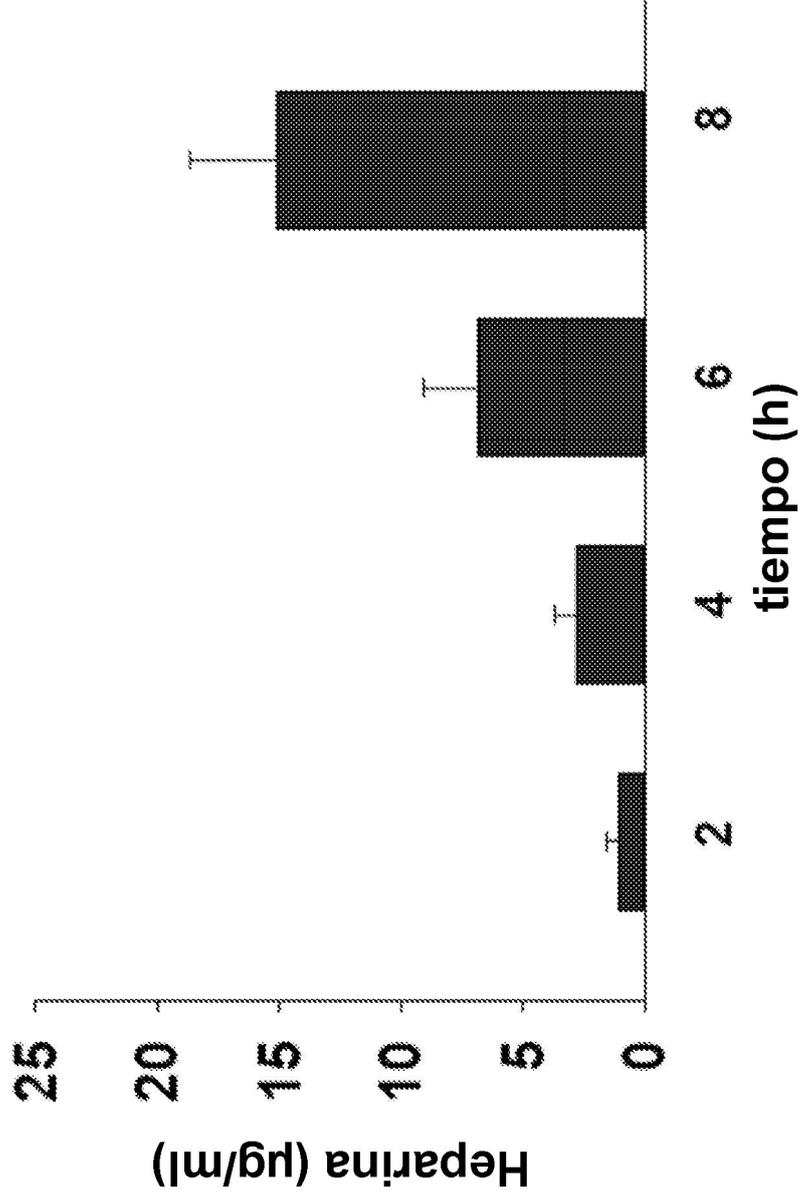


Fig. 8

Condición de la Capa Celular Medida por TEER

Heparina de Bajo Peso Molecular en el sistema CaCo2 con Bromelaina (0,5 mg/ml)

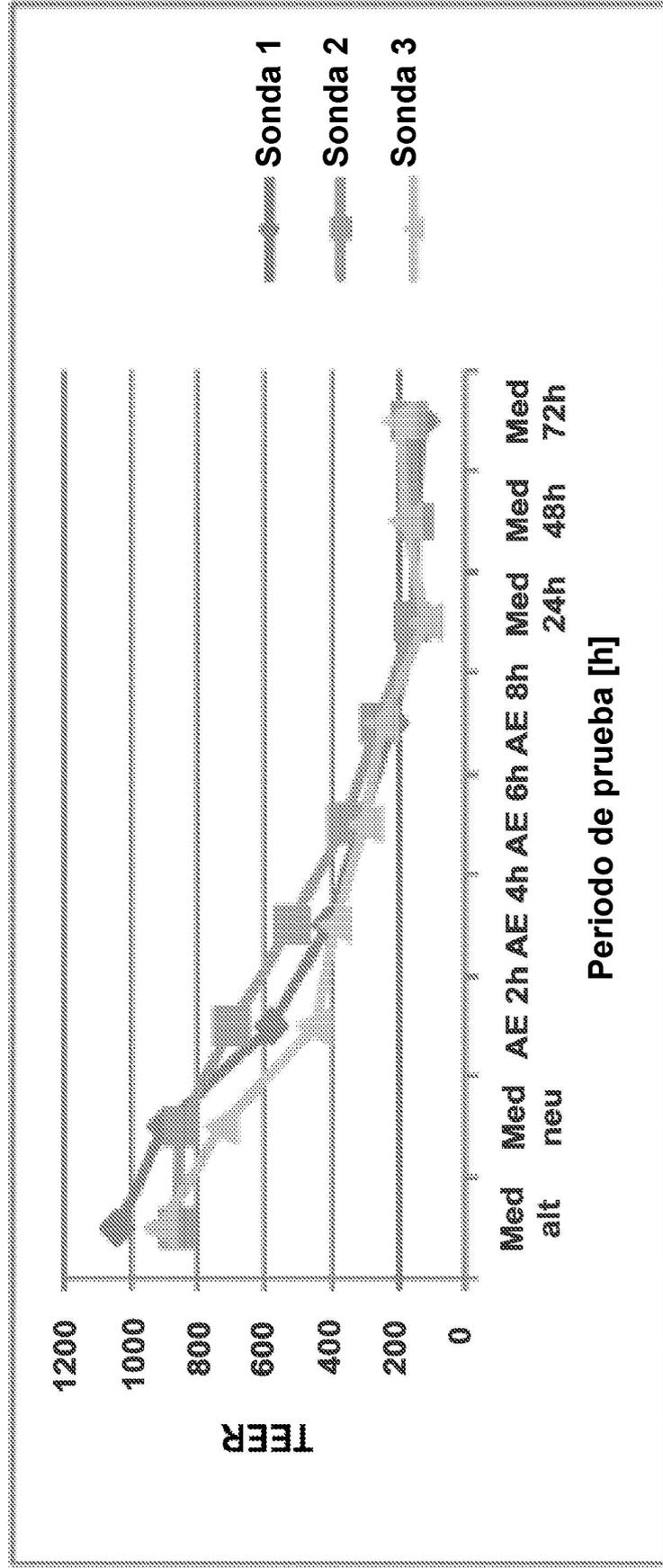


Fig. 9

Análisis de Biodisponibilidad del Modelo de Células CaCo2

Concentraciones Basolaterales de Heparina de Bajo Peso Molecular en el sistema CaCo2 con Caprato de Sodio (12 mM)

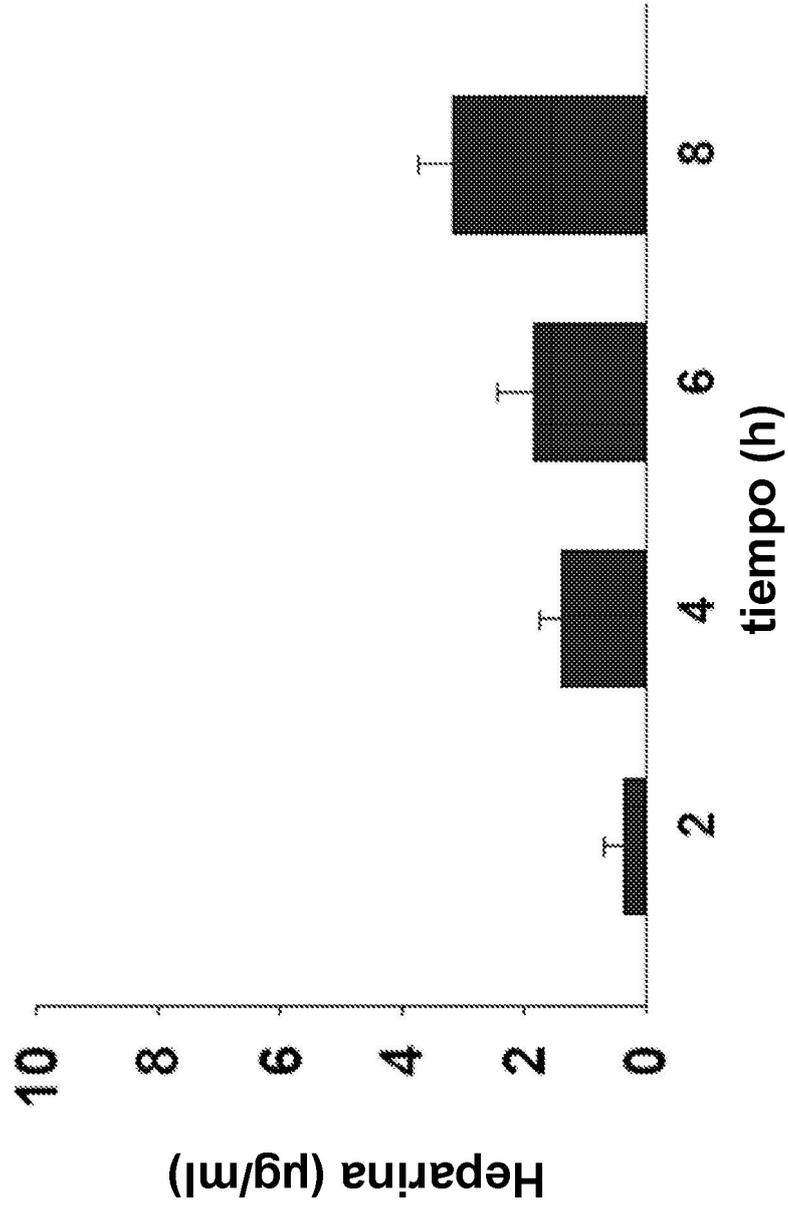


Fig. 10

Condición de la Capa Celular Medida por TEER

Heparina de Bajo Peso Molecular en el sistema CaCo2 con Caprato de Sodio (12 mM)

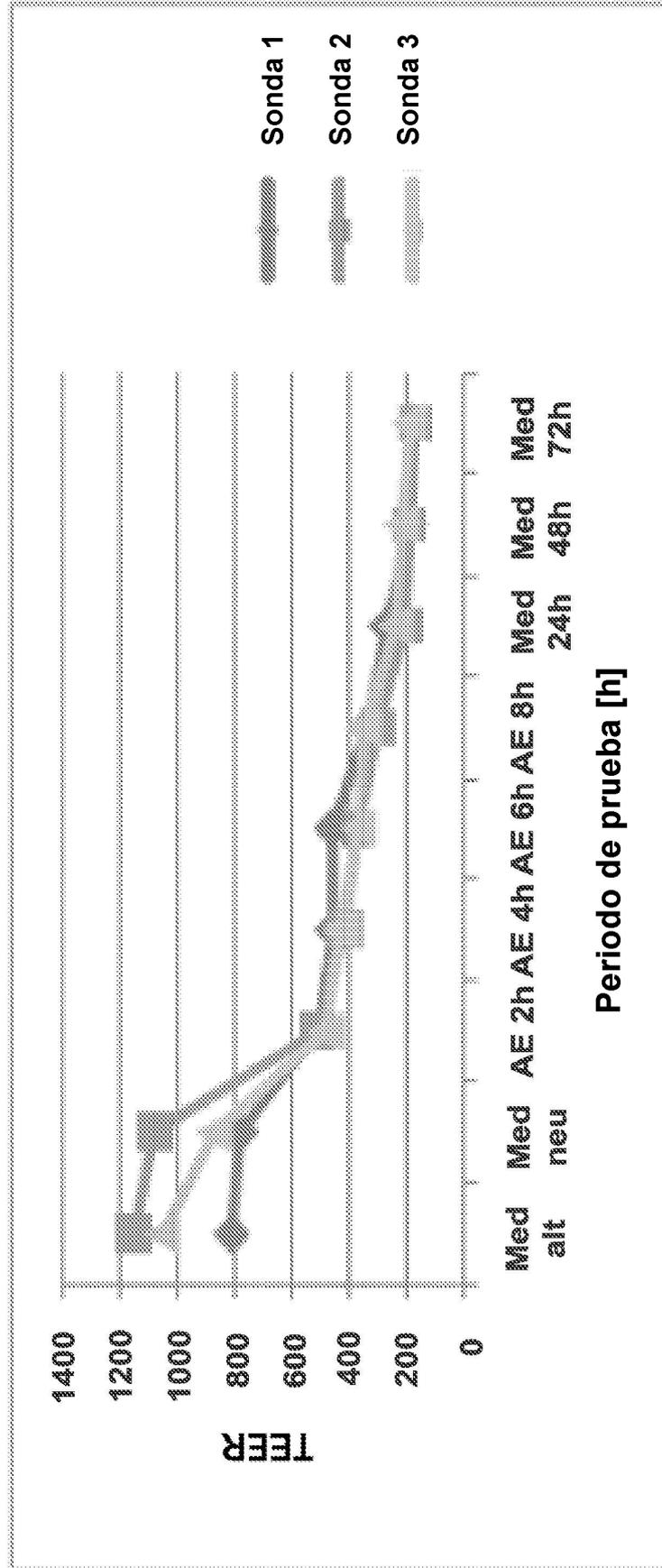


Fig. 11

Análisis de Biodisponibilidad del Modelo de Células CaCo2

Concentraciones Basolaterales de Heparina de Bajo Peso Molecular en el sistema CaCo2 con Quitosano (3%) y Bromelaina (0,5 mg/ml)

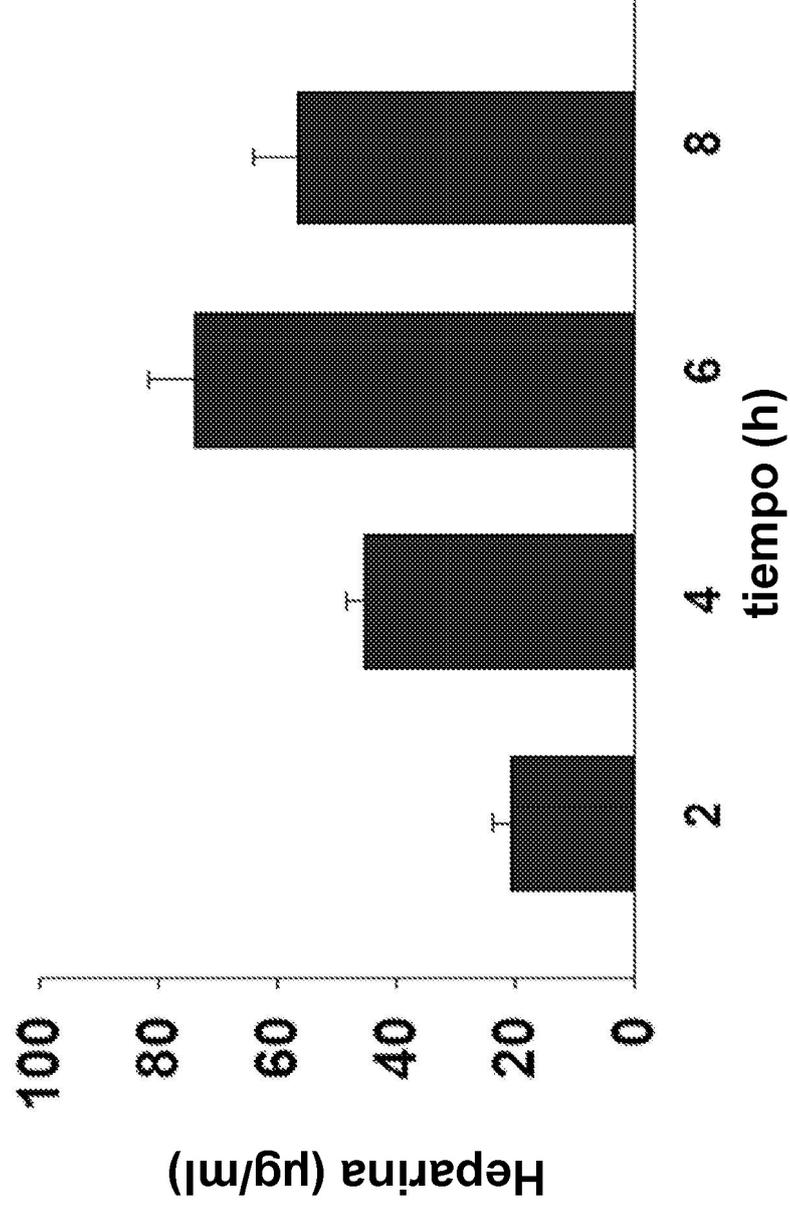


Fig. 12

Condición de la Capa Celular Medida por TEER

Heparina de Bajo Peso Molecular en el sistema CaCo2 con Quitosano (3%) y Bromelaina (0,5 mg/ml)

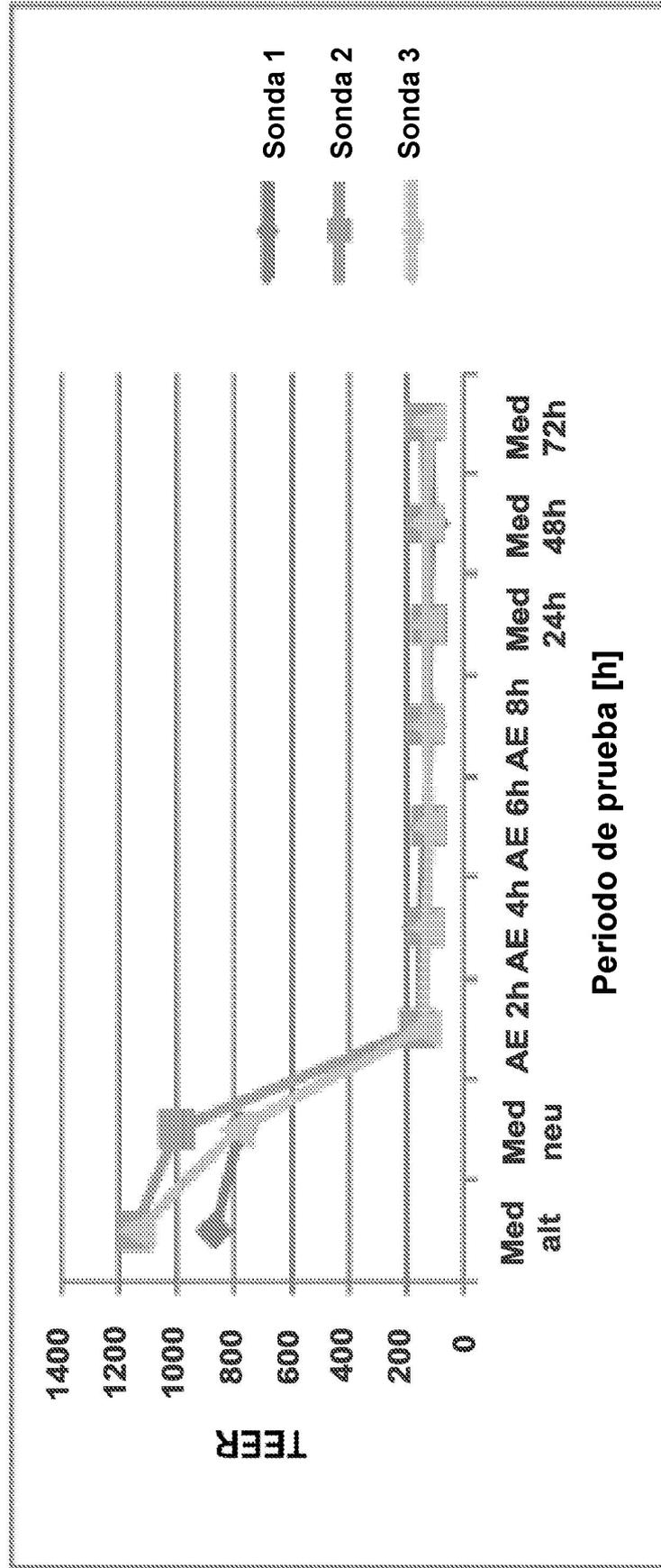


Fig. 13

**Heparina de Bajo Peso Molecular
y
Potenciadores de la Permeación de la Barrera Epitelial Gastrointestinal**

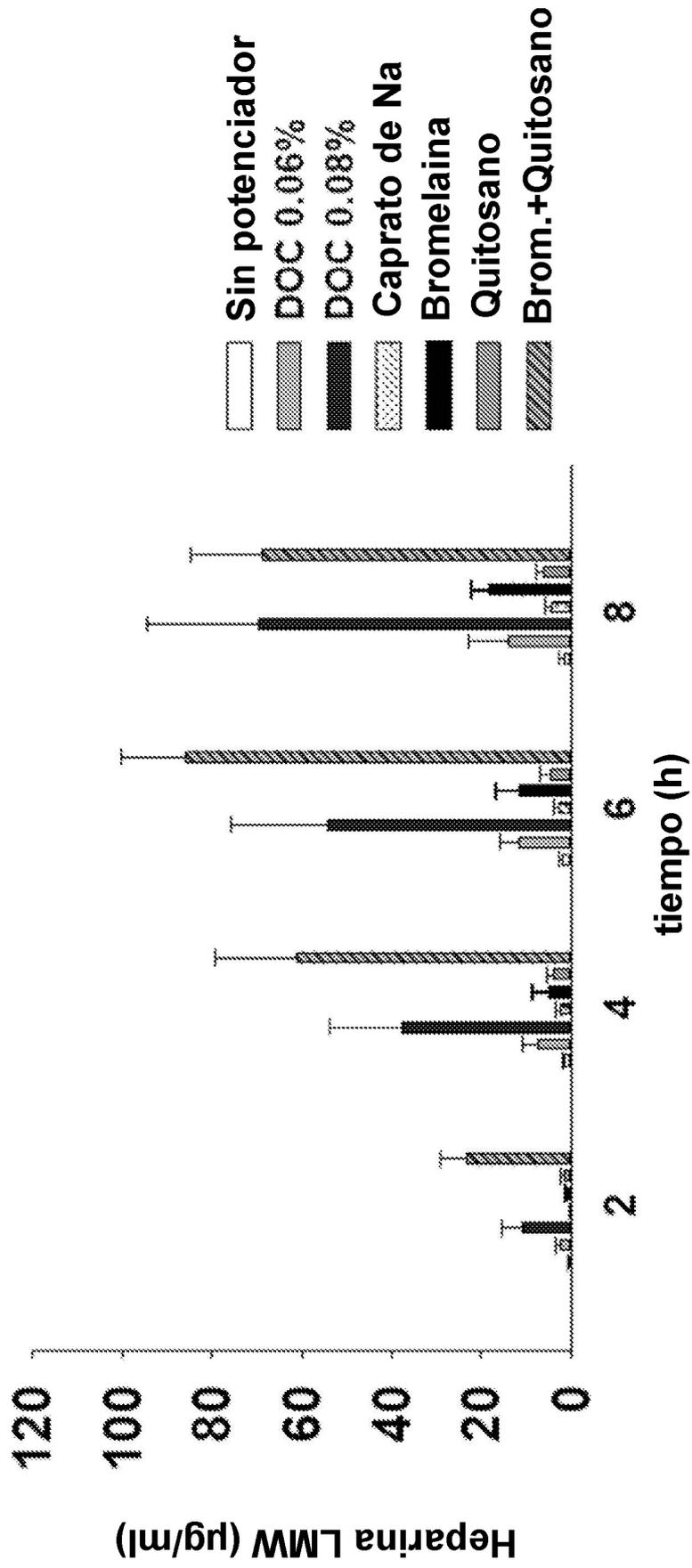


Fig. 14