



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 284 168**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

C07C 53/126 (2006.01)

C07C 53/134 (2006.01)

C07C 57/26 (2006.01)

C07C 57/30 (2006.01)

C07C 59/76 (2006.01)

C07C 59/205 (2006.01)

C07C 229/10 (2006.01)

C07C 311/19 (2006.01)

C07D 207/34 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **96913778 .5**

(86) Fecha de presentación : **01.04.1996**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0817643**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.1998**

(54) Título: **Compuestos y composiciones para aportar agentes activos.**

(30) Prioridad: **31.03.1995 US 414654**
01.09.1995 US 3111 P
29.03.1996 US 17902 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

(73) Titular/es: **Emisphere Technologies, Inc.**
765 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, New York 10591-6715, US

(72) Inventor/es: **Leone-Bay, Andrea;**
Ho, Koc-Kan;
Sarubbi, Donald, J.;
Milstein, Sam, J. y
Press, Jeffery, Bruce

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos y composiciones para aportar agentes activos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos para aportar agentes activos y particularmente agentes biológicamente o químicamente activos, tales como, por ejemplo, péptidos bioactivos y similares. Estos compuestos se usan como portadores para facilitar el aporte de una carga a una diana. Los portadores son aminoácidos modificados y son muy adecuados para formar mezclas no covalentes con agentes biológicamente activos para la administración oral a animales. También se describen métodos para la preparación y para la administración de tales composiciones.

Antecedentes de la invención

Los medios convencionales para aportar agentes activos a menudo están intensamente limitados por barreras biológicas, químicas y físicas. Típicamente, estas barreras están impuestas por el ambiente a través del cual se produce el aporte, el ambiente de la diana para el aporte o la propia diana.

Los agentes biológicamente o químicamente activos son particularmente vulnerables a tales barreras. Por ejemplo, en el aporte a animales de agentes farmacológicos y terapéuticos, las barreras están impuestas por el cuerpo. Ejemplos de barreras físicas son la piel y diversas membranas de órganos que deben ser atravesadas antes de alcanzar una diana. Barreras químicas incluyen, pero no están limitadas a, variaciones de pH, bicapas lipídicas y enzimas degradantes.

Estas barreras son de particular significación en el diseño de sistemas de aporte oral. El aporte oral de muchos agentes biológicamente o químicamente activos sería la ruta de elección para la administración a animales si no fuera por barreras biológicas, químicas y físicas tales como pH variable en el tracto gastrointestinal (GI), enzimas digestivas potentes y membranas gastrointestinales impermeables a agentes activos. Entre los numerosos agentes que típicamente no son propensos a la administración oral están péptidos biológicamente o químicamente activos, tales como calcitonina e insulina; polisacáridos y en particular mucopolisacáridos, incluyendo, pero no limitados a, heparina; heparinoides; antibióticos; y otras sustancias orgánicas. Estos agentes se hacen rápidamente ineficaces o son destruidos en el tracto gastrointestinal por hidrólisis ácida, enzimas o similares.

Métodos previos para administrar oralmente agentes farmacológicos vulnerables se han basado en la coadministración de adyuvantes (por ejemplo, resorcinoles y tensioactivos no iónicos tales como éter olefílico de polioxietileno y n-hexadecilpolietilén-éter) para incrementar artificialmente la permeabilidad de las paredes intestinales, así como la coadministración de inhibidores enzimáticos (por ejemplo, inhibidores de tripsina pancreática, fluorofosfato de diisopropilo (DFF) y trasilol) para inhibir la degradación enzimática.

Los liposomas también se han descrito como sistemas de aporte de fármacos para insulina y heparina. Véanse, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.239.754; Patel y otros, (1976), *FEBS Letters*, Vol. 62, pg. 60 y Hashimoto y otros, (1979), *Endocrinology Japan*, Vol. 26, pg. 337.

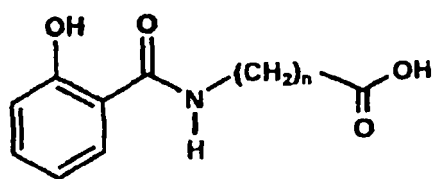
Sin embargo, el uso de amplio espectro de tales sistemas de aporte de fármacos está impedido debido a que: (1) los sistemas requieren cantidades tóxicas de adyuvantes o inhibidores; (2) no están disponibles cargas, es decir, agentes activos, de bajo peso molecular adecuadas; (3) los sistemas exhiben escasa estabilidad y vida útil inadecuada; (4) los sistemas son difíciles de fabricar; (5) los sistemas no protegen el agente activo (carga); (6) los sistemas alteran adversamente el agente activo; o (7) los sistemas no permiten o promueven la absorción del agente activo.

Más recientemente, se han usado microesferas de polímeros artificiales de aminoácidos mixtos (proteínoides) para aportar productos farmacéuticos. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.925.673 describe portadores de microesferas protéinoides que contienen fármaco así como métodos para su preparación y uso. Estas microesferas protéinoides son útiles para el aporte de un número de agentes activos.

Sigue existiendo una necesidad en la técnica de sistemas de aporte simples y económicos que se preparen fácilmente que puedan aportar una amplia gama de agentes activos.

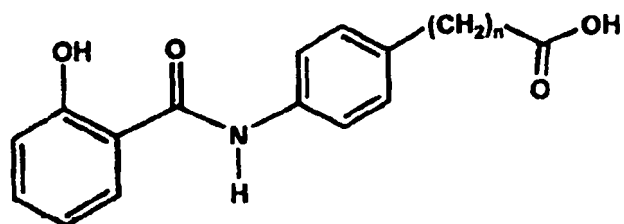
Sumario de la invención

Se proporcionan composiciones que son útiles en el aporte de agentes activos. Estas composiciones incluyen al menos un agente activo y preferiblemente un agente biológicamente o químicamente activo, y al menos uno de los siguientes compuestos



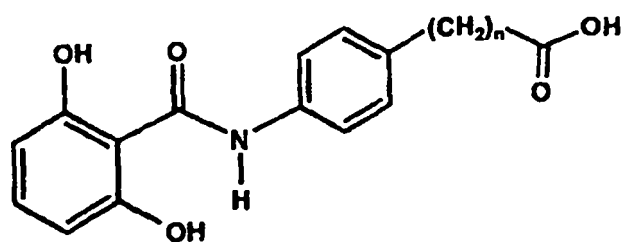
en donde

Compuesto	n
IV	3
XIX	7
XXVII	10
XXVIII	8
XXIX	6
XXX	11
XXXI	9



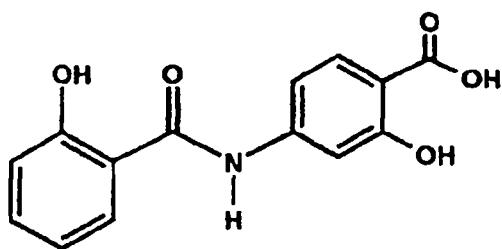
en donde

Compuesto	n
LII	1
LIV	2

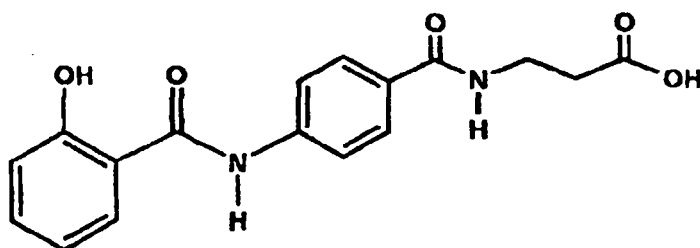


en donde

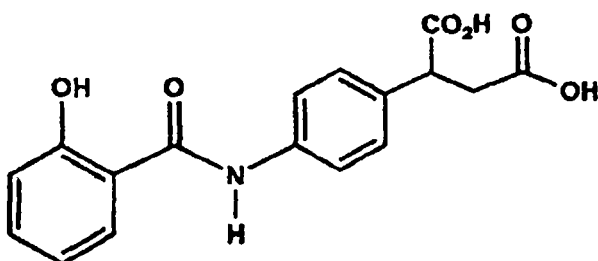
Compuesto	n
LIII	3
LVI	2



Compuesto XCIV



Compuesto CVI



Compuesto CIX

35 o sales de los mismos.

Se ha descubierto que los compuestos de ácido orgánico, y sus sales, que tienen un grupo amida aromática, que tienen un grupo hidroxilo substituido en la posición orto en el anillo aromático y una cadena lipófila con de aproximadamente 4 átomos a aproximadamente 20 átomos de carbono en la cadena son útiles como portadores para el aporte de agentes activos. En una forma preferida, la cadena lipófila puede tener de 5 a 20 átomos de carbono.

Composiciones que comprenden los compuestos portadores analizados anteriormente y agentes activos se han mostrado eficaces para aportar agentes activos a sistemas biológicos seleccionados. Estas composiciones incluyen al menos un agente activo que es preferiblemente un agente biológicamente o químicamente activo, y al menos un compuesto portador.

También se contemplan por la presente invención formas unitarias de dosificación que incluyen estas composiciones.

También se contempla un método para preparar estas composiciones, que comprende mezclar al menos un agente activo con al menos un compuesto como el descrito anteriormente y, opcionalmente, un vehículo de dosificación.

En una modalidad alternativa, estos compuestos atóxicos se administran oralmente a animales como parte de un sistema de aporte combinando o mezclando los compuestos con un agente activo antes de la administración.

55 Descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración gráfica de los resultados de la inyección subcutánea de una composición de rhGH en ratas.

La Figura 2 es una ilustración gráfica de los resultados de la dosificación sublingual (SL), intranasal (IN) e intracolónica (IC) de rhGH en ratas.

La Figura 3 es una ilustración gráfica de los resultados de la dosificación intracolónica del aporte de heparina con el portador compuesto XXXI.

Descripción detallada de la invención

Las composiciones específicas de la presente invención incluyen un agente activo y un aminoácido modificado. Estas composiciones pueden usarse para aportar diversos agentes activos a través de diversas barreras biológicas, químicas y físicas y son particularmente adecuadas para aportar agentes activos que están sometidos a degradación medioambiental. Las composiciones de la presente invención son particularmente útiles para aportar o administrar agentes biológicamente o químicamente activos a cualesquiera animales tales como aves; mamíferos, tales como primates y particularmente seres humanos; e insectos.

Otras ventajas de la presente invención incluyen el uso de materias primas económicas fáciles de preparar. Las composiciones y los métodos de formulación de la presente invención son económicos, simples de realizar y propensos a aumento a escala industrial para la producción comercial.

La coadministración subcutánea, sublingual e intranasal de un agente activo, tal como hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH), y los agentes de aporte, y particularmente proteínas, descrita aquí da como resultado una biodisponibilidad incrementada del agente activo en comparación con la administración del agente activo solo. Se obtiene un resultado similar mediante la coadministración de calcitonina de salmón con los agentes de aporte, en ratas. Datos que apoyan estos hallazgos se presentan en los ejemplos.

Agentes Activos

Agentes activos adecuados para el uso en la presente invención incluyen agentes biológicamente o químicamente activos, incluyendo, pero no limitados a, fragancias, así como otros agentes activos tales como, por ejemplo, cosméticos.

Agentes biológicamente o químicamente activos incluyen, pero no se limitan a, plaguicidas, agentes farmacológicos y agentes terapéuticos. Por ejemplo, agentes biológicamente o químicamente activos adecuados para el uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, péptidos, y particularmente péptidos pequeños; hormonas, y particularmente hormonas que por sí mismas no pasan, o solo lo hace una fracción de la dosis administrada, a través de la mucosa gastrointestinal y/o son susceptibles de segmentación química por ácidos y enzimas en el tracto gastrointestinal; polisacáridos, y particularmente mezclas de mucopolisacáridos; carbohidratos; lípidos; o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos adicionales incluyen, pero no se limitan a, hormonas de crecimiento humanas; hormonas de crecimiento bovinas; hormonas liberadoras de hormonas de crecimiento; interferones; interleuquina-1; insulina; heparina, y particularmente heparina de bajo peso molecular; calcitonina; eritropoyetina; factor naturético auricular; antígenos; anticuerpos monoclonales; somatostatina; adrenocorticotropina, hormona liberadora de gonadotropina; oxitocina; vasopresina; cromolina sódica (cromoglicato sódico o disódico); vancomicina; desferrioxamina (DFO); hormona paratiroidea; antimicrobianos, incluyendo, pero no limitados a, agentes antifúngicos; o cualquier combinación de los mismos.

Aminoácidos Modificados

El término aminoácido modificado se usa para indicar los compuestos portadores mencionados anteriormente que son aminoácidos que se han modificado acilando un grupo amino libre con un agente acilante que reacciona con el grupo amino libre presente.

Los aminoácidos en forma modificada pueden usarse para aportar agentes activos, incluyendo, pero no limitados a, agentes biológicamente o químicamente activos tales como, por ejemplo, agentes farmacológicos o terapéuticos.

Los aminoácidos modificados se preparan típicamente modificando el aminoácido o un éster del mismo. Muchos de estos compuestos se preparan mediante acilación con agentes que tienen la fórmula



en la que:

R^4 es el radical apropiado para dar la modificación indicada en el producto final,

Y es



y X es un grupo de salida. Grupos de salida típicos incluyen, pero no se limitan a, halógenos, tales como, por ejemplo, cloro, bromo y yodo. Adicionalmente, los anhídridos correspondientes son agentes modificados.

Muchos de los compuestos de la presente invención pueden prepararse fácilmente a partir de aminoácidos mediante métodos dentro de la experiencia de los expertos en la técnica, basándose en la presente descripción. Por ejemplo, los Compuestos I-VII se derivan de ácido aminobutírico y los Compuestos XI-XXVI se derivan de ácido aminocaprílico. Por ejemplo, los compuestos de aminoácido modificados anteriores pueden prepararse haciendo reaccionar el aminoácido simple con el agente modificador apropiado que reacciona con el resto amino libre presente en los aminoácidos para formar amidas. Pueden usarse grupos protectores para evitar reacciones secundarias no deseadas como se sabe por los expertos en la técnica.

El aminoácido puede disolverse en solución acuosa alcalina de un hidróxido metálico, por ejemplo hidróxido sódico o potásico, y calentarse a una temperatura que varía entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 70°C, preferiblemente entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 40°C, durante un período que varía entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 4 horas, preferiblemente aproximadamente 2,5 horas. La cantidad de álcali empleada por equivalente de grupos NH₂ en el aminoácido varía generalmente entre aproximadamente 1,25 y aproximadamente 3 milimoles, preferiblemente entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,25 milimoles por equivalente de NH₂. El pH de la solución generalmente varía entre aproximadamente 8 y aproximadamente 13, variando preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 12.

Posteriormente, el agente modificador de amino apropiado se añade a la solución de aminoácido mientras se agita. La temperatura de la mezcla se mantiene a una temperatura que varía generalmente entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 70°C, preferiblemente entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 40°C, durante un período que varía entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4 horas. La cantidad de agente modificador de amino empleada con relación a la cantidad de aminoácido se basa en los moles de NH₂ libre total en el aminoácido. En general, el agente modificador de amino se emplea en una cantidad que varía entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2,5 equivalentes molares, preferiblemente entre aproximadamente 0,75 y aproximadamente 1,25 equivalentes, por equivalente molar de grupo NH₂ total en el aminoácido.

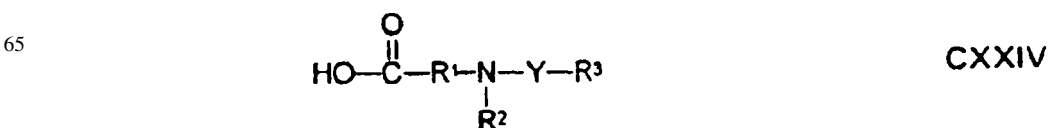
La reacción se extingue ajustando el pH de la mezcla con un ácido adecuado, por ejemplo ácido clorhídrico concentrado, hasta que el pH alcanza entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3. La mezcla se separa al reposar a temperatura ambiente para formar una capa superior transparente y un precipitado blanco o blanquecino. La capa superior se descarta y el aminoácido modificado se recoge de la capa inferior mediante filtración o decantación. El aminoácido modificado en bruto se disuelve a continuación en agua a un pH que varía entre aproximadamente 9 y aproximadamente 13, preferiblemente entre aproximadamente 11 y aproximadamente 13. Los materiales insolubles se retiran mediante filtración y el filtrado se seca a vacío. El rendimiento de aminoácido modificado varía generalmente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60%, y habitualmente aproximadamente 45%.

Si se desea, ésteres de aminoácido, tales como, por ejemplo, ésteres bencílicos, metílicos o etílicos de compuestos de aminoácido, pueden usarse para preparar los aminoácidos modificados de la invención. El éster de aminoácido, disuelto en un disolvente orgánico adecuado tal como dimetilformamida, piridina o tetrahydrofurano, se hace reaccionar con el agente modificador de amino apropiado a una temperatura que varía entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 70°C, preferiblemente aproximadamente 25°C, durante un período que varía entre aproximadamente 7 y aproximadamente 24 horas. La cantidad de agente modificador de amino usada con relación al éster de aminoácido es la misma que se describe anteriormente para aminoácido. Esta reacción puede llevarse a cabo con o sin una base tal como, por ejemplo, trietilamina o diisopropiletilamina.

Posteriormente, el disolvente de reacción se retira bajo presión negativa y la funcionalidad éster se retira hidrolizando el éster de aminoácido modificado con una solución alcalina adecuada, por ejemplo hidróxido sódico 1 N, a una temperatura que varía entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 80°C, preferiblemente aproximadamente 70°C, durante un período de tiempo suficiente para hidrolizar el grupo éster y formar el aminoácido modificado que tiene un grupo carboxilo libre. La mezcla de hidrólisis se enfría a continuación hasta temperatura ambiente y se acidifica, por ejemplo solución acuosa de ácido clorhídrico al 25%, hasta un pH que varía entre aproximadamente 2 y aproximadamente 2,5. El aminoácido modificado precipita en solución y se recupera por medios convencionales tales como filtración o decantación. Los ésteres bencílicos pueden retirarse mediante hidrogenación en un disolvente orgánico usando un catalizador de metal de transición.

El aminoácido modificado puede purificarse mediante recristalización o mediante fraccionación sobre soportes de columna sólidos. Sistemas de disolventes de recristalización adecuados incluyen acetonitrilo, metanol y tetrahydrofurano. La fraccionación puede realizarse sobre soportes de columna sólidos adecuados tales como alúmina, usando mezclas de metanol-propanol como la fase móvil; soportes de columna en fase inversa usando mezclas de ácido trifluoroacético/acetonitrilo como la fase móvil; y cromatografía de intercambio iónico usando agua como la fase móvil. Cuando se realiza cromatografía de intercambio aniónico, preferiblemente se emplea un gradiente de cloruro sódico 0-500 mM subsiguiente.

En un método alternativo, aminoácidos modificados que tienen la fórmula

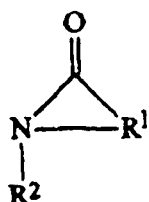


en la que Y es



y R^1 , R^2 y R^3 son los radicales apropiados; pueden prepararse

(a) haciendo reaccionar en agua y en presencia de una base un compuesto que tiene la fórmula



CXXV

con un compuesto que tiene la fórmula



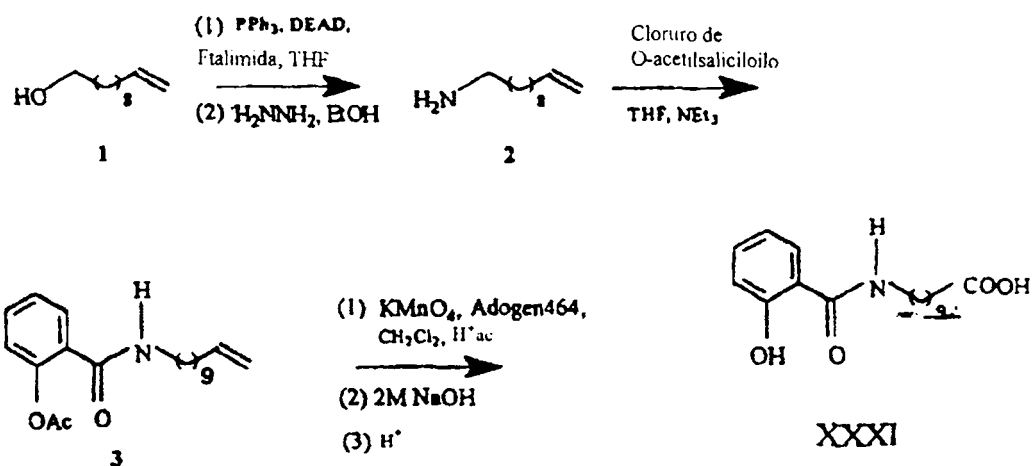
en la que

Y, R^1 , R^2 y R^3 son como se indica y X es un grupo de salida.

El compuesto CXXV puede prepararse, por ejemplo, mediante el método descrito en Olah y otros, *Synthesis*, 537-538 (1979).

El compuesto XXXI se preparó como se describe en el Esquema I a partir de 10-undecen-1-ol, 1, mediante un procedimiento de tres etapas con un rendimiento global de 31%. La alquilación de ftalimida con el alcohol, 1, bajo condiciones de Mitsunobu, seguida por reacción con hidrazina daba 1-aminoundec-10-eno, 2, con 66% de rendimiento. La amina se derivó con cloruro de O-acetilsaliciloilo y el alqueno resultante, 3, se oxidó hasta el ácido usando permanganato potásico. La retirada del acetato, seguida por precipitación con ácido, proporcionaba el compuesto XXXI con 47% de rendimiento basado en la amina 2.

Esquema I



Sistemas de Aporte

Los compuestos de la presente invención pueden incluir uno o más agentes activos.

En una modalidad, los compuestos portadores mencionados anteriormente pueden usarse directamente como un portador de aporte simplemente mezclando uno o más compuestos con el agente activo antes de la administración.

En una modalidad alternativa, los compuestos pueden usarse para formar microesferas que contienen el agente activo. Estos compuestos son particularmente útiles para la administración oral de ciertos agentes biológicamente activos, por ejemplo hormonas peptídicas pequeñas, que, por sí mismos, no pasan, o solo pasa una fracción de la dosis administrada, a través de la mucosa gastrointestinal y/o son susceptibles de segmentación química por ácidos y enzimas en el tracto gastrointestinal.

Si los aminoácidos modificados han de convertirse en microesferas, la mezcla se calienta opcionalmente hasta una temperatura que varía entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50°C, preferiblemente aproximadamente 40°C, hasta que el aminoácido o los aminoácidos modificados se disuelven. La solución final contiene entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 2000 mg de compuesto por ml de solución, preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 500 mg por ml. La concentración de agente activo en la solución final varía y depende de la dosificación requerida para el tratamiento. Cuando es necesario, la concentración exacta puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis de HPLC en fase inversa.

Cuando los compuestos se usan para preparar microesferas, otro procedimiento útil es como sigue: los compuestos se disuelven en agua desionizada a una concentración que varía entre aproximadamente 75 y aproximadamente 200 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 100 mg/ml, a una temperatura entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 60°C, preferiblemente aproximadamente 40°C. La materia en partículas que permanece en solución puede retirarse por medios convencionales tales como filtración.

Posteriormente, la solución de compuesto, mantenida a una temperatura de aproximadamente 40°C, se mezcla 1:1 (v/v) con una solución acuosa de ácido (también a aproximadamente 40°C) que tiene una concentración de ácido que varía entre aproximadamente 0,05 N y aproximadamente 2 N, preferiblemente aproximadamente 1,7 N. La mezcla resultante se incuba adicionalmente a 40°C durante un período de tiempo eficaz para la formación de microesferas, según se observa mediante microscopía óptica. Al poner en práctica esta invención, el orden de adición preferido es añadir la solución de compuesto a la solución acuosa de ácido.

Ácidos adecuados para la formación de microesferas incluyen cualquier ácido que no

- (a) afecte adversamente a los aminoácidos, poliaminoácidos o péptidos modificados, por ejemplo inicie o propague la descomposición química;
- (b) interfiera con la formación de microesferas;
- (c) interfiera con la incorporación en las microesferas de la carga de agente activo; ni
- (d) interactúe adversamente con la carga de agente activo.

Ácidos preferidos para el uso en este aspecto incluyen ácido acético, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido málico y ácido maleico.

Un aditivo estabilizante de microesferas puede incorporarse en la solución acuosa de ácido o en la solución de compuesto o carga antes del procedimiento de formación de microesferas. Con algunos agentes activos la presencia de tales aditivos promueve la estabilidad y/o la capacidad de dispersión de las microesferas en solución.

Los aditivos estabilizantes pueden emplearse en una concentración que varía entre aproximadamente 0,1 y 5% (p/v), preferiblemente aproximadamente 0,5% (p/v). Ejemplos adecuados, pero no limitativos, de aditivos estabilizantes de microesferas incluyen goma arábiga, gelatina, metilcelulosa, polietilenglicol, polipropilenglicol, ácidos carboxílicos y sus sales y polilisina. Los aditivos estabilizantes preferidos son goma arábiga, gelatina y metilcelulosa.

Bajo las condiciones anteriores, las moléculas de compuesto forman microesferas de tipo de matriz hueca o sólida en las que la carga está distribuida en una matriz portadora o microesferas de tipo cápsula que encapsulan carga líquida o sólida. Si las microesferas de compuesto se forman en presencia de un material soluble, por ejemplo un agente farmacéutico, en la solución acuosa de ácido mencionada anteriormente, este material se encapsulará dentro de las microesferas. De este modo, pueden encapsularse materiales farmacológicamente activos tales como péptidos, proteínas y polisacáridos así como moléculas orgánicas cargadas, por ejemplo agentes antimicrobianos, que normalmente tienen escasa biodisponibilidad mediante la ruta oral. La cantidad de agente farmacéutico que puede ser incorporado por la microesfera depende de un número de factores que incluyen la concentración de agente en la solución, así como la afinidad de la carga para el portador. Las microesferas de compuesto no alteran las propiedades fisiológicas y biológicas del agente activo. Por otra parte, el procedimiento de encapsulación no altera las propiedades farmacológicas del agente activo. Cualquier agente farmacológico puede incorporarse dentro de las microesferas. El sistema es particularmente ventajoso para aportar agentes químicos o biológicos que de otro modo se destruirían o se harían menos eficaces por las condiciones encontradas dentro del cuerpo del animal al que han de administrarse, antes de que la microesfera alcance su zona diana (es decir, el área en la que el contenido de la microesfera ha de liberarse) y para aportar agentes farmacológicos que son escasamente absorbidos en el tracto gastrointestinal. Las zonas diana pueden variar dependiendo del fármaco empleado.

El tamaño de partícula de la microesfera representa un papel importante para determinar la liberación del agente activo en el área diana del tracto gastrointestinal. Las microesferas preferidas tienen diámetros entre aproximadamente $\leq 0,1$ y aproximadamente 10 micras, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 micras y aproximadamente 5 micras. Las microesferas son suficientemente pequeñas para liberar eficazmente el agente activo en el área diana dentro del tracto gastrointestinal, tal como, por ejemplo, entre el estómago y el yeyuno. Las microesferas pequeñas también pueden administrarse parenteralmente suspendiéndose en un fluido portador apropiado (por ejemplo, solución salina isotónica) e inyectarse directamente en el sistema circulatorio, intramuscularmente o subcutáneamente. El modo de administración seleccionado variará, por supuesto, dependiendo del requerimiento del agente activo que se administra. Las microesferas de aminoácido grandes (> 50 micras) tienden a ser menos eficaces como sistemas de aporte oral.

El tamaño de las microesferas formadas poniendo en contacto compuestos con agua o una solución acuosa que contiene agentes activos puede controlarse manipulando una variedad de parámetros físicos o químicos, tales como el pH, la osmolaridad o la intensidad iónica de la solución encapsulante, el tamaño de los iones en solución y mediante la elección del ácido usado en el procedimiento de encapsulación.

Las mezclas de administración se preparan mezclando una solución acuosa del portador con una solución acuosa del ingrediente activo, justo antes de la administración. Alternativamente, el portador y el ingrediente biológicamente o químicamente activo pueden mezclarse durante el procedimiento de fabricación. Las soluciones pueden contener opcionalmente aditivos tales como sales tamponadoras de fosfato, ácido cítrico, ácido acético, gelatina y goma arábiga.

Pueden incorporarse aditivos estabilizantes en la solución portadora. Con algunos fármacos, la presencia de tales aditivos promueve la estabilidad y la capacidad de dispersión del agente en solución.

Los aditivos estabilizantes pueden emplearse a una concentración que varía entre aproximadamente 0,1 y 5% (p/v), preferiblemente aproximadamente 0,5% (p/v). Ejemplos adecuados, pero no limitativos, de aditivos estabilizantes incluyen goma arábiga, gelatina, metilcelulosa, polietilenglicol, ácidos carboxílicos y sales de los mismos y polilisina. Los aditivos estabilizantes preferidos son goma arábiga, gelatina y metilcelulosa.

La cantidad de agente activo es una cantidad eficaz para lograr el propósito del agente activo particular. La cantidad en la composición típicamente es una cantidad farmacológicamente o biológicamente eficaz. Sin embargo, la cantidad puede ser menor que una cantidad farmacológicamente o biológicamente eficaz cuando la composición se usa en una forma unitaria de dosificación, tal como una cápsula, una tableta o un líquido, debido a que la forma unitaria de dosificación puede contener una multiplicidad de portador/composiciones de agente biológicamente o químicamente activo o puede contener una cantidad farmacológicamente o biológicamente eficaz dividida. Las cantidades eficaces totales pueden administrarse a continuación en unidades acumulativas que contienen, en total, cantidades farmacológicamente o biológicamente o químicamente activas de agente biológicamente o farmacológicamente activo.

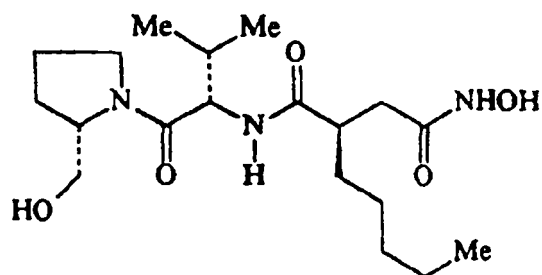
La cantidad total de agente activo, y particularmente agente biológicamente o químicamente activo, que ha de usarse puede ser determinada por los expertos en la técnica. Sin embargo, se ha encontrado sorprendentemente que con algunos agentes biológicamente o químicamente activos, el uso de los portadores actualmente descritos proporciona un aporte extremadamente eficaz, particularmente en sistemas orales, intranasales, sublinguales, intraduodenales o subcutáneos. Por lo tanto, pueden administrarse al sujeto cantidades de agente biológicamente o químicamente activo menores que las usadas en formas unitarias de dosificación por sistemas de aporte anteriores, mientras que se alcanzan los mismos niveles en sangre y efectos terapéuticos.

La cantidad de portador en la presente composición es una cantidad de aporte eficaz y puede determinarse para cualquier portador o agente biológicamente o químicamente activo particular mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Formas unitarias de dosificación también pueden incluir cualquiera de excipientes; diluyentes; desintegrantes; lubricantes; plastificantes; colorantes y vehículos de dosificación, incluyendo, pero no limitados a, agua, 1,2-propanodiol, etanol, aceite de oliva o cualquier combinación de los mismos.

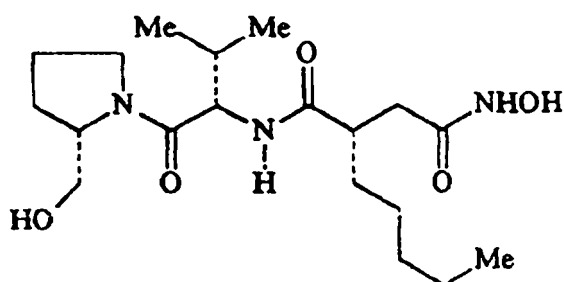
La administración de las presentes composiciones o formas unitarias de dosificación preferiblemente es oral o mediante inyección intraduodenal.

Las composiciones de aporte de la presente invención también pueden incluir uno o más inhibidores de enzimas. Tales inhibidores de enzimas incluyen, pero no se limitan a, compuestos tales como actinonina o epiactinonina y derivados de los mismos. Estos compuestos tienen las fórmulas siguientes:



Actinonina

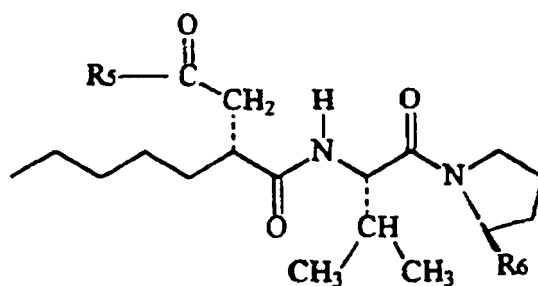
CXXVI



Epiactinonina

CXXVII

Derivados de estos compuestos se describen en la Patente de EE.UU. Nº 5.206.384. Los derivados de actinonina tienen la fórmula:



CXXVIII

en la que R^5 es sulfoximetilo o carboxilo o un grupo carboxi substituido seleccionado de grupos carboxamida, hidroxiaminocarbonilo y alcóxicarbonilo; y R^6 es un grupo hidroxilo, alcoxi, hidroxiamino o sulfoxiamino. Otros inhibidores de enzimas incluyen, pero no se limitan a, aprotinina (Trasylol) e inhibidor de Bowman-Birk.

Los compuestos y las composiciones de la presente invención son útiles para administrar agentes biológicamente o químicamente activos a cualesquiera animales, tales como aves; mamíferos, tales como primates y particularmente seres humanos; e insectos. El sistema es particularmente ventajoso para aportar agentes químicamente o biológicamente activos que de otro modo serían destruidos o se harían menos eficaces por las condiciones encontradas antes de que el agente activo alcance su zona diana (es decir, el área en la que el agente activo de la composición ha de liberarse) y dentro del cuerpo del animal al que han de administrarse. Particularmente, los compuestos y las composiciones de la presente invención son útiles en agentes activos que se administran oralmente, especialmente los que normalmente no son oralmente aportables.

Descripción de las modalidades preferidas

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitación. Todas las partes se dan en peso a no ser que se indique otra cosa.

Ejemplo 1

El compuesto XIX se preparó como sigue:

Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 3 l se dotó de un agitador mecánico elevado y un termómetro y el matraz se enfrió en un baño de hielo. Una solución de ácido 8-aminocaprílico (100,0 g, 0,65 moles) en hidróxido sódico acuoso 2 M (1,4 l) se cargó en el matraz de fondo redondo. La temperatura de la solución se mantuvo a aproximadamente 5°C y se añadió en porciones durante 7 horas cloruro de O-acetilsaliciloilo (198,6 g, 0,76 moles, 1,2 equivalentes). La mezcla se agitó a 5°C durante 12 horas para dar una solución homogénea amarilla. La solución se acidificó con ácido clorhídrico 1 M hasta pH 6,8 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 600 ml). El pH en la capa acuosa se reajustó hasta 6,3 y se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (2 x 600 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo se redisolvió en un volumen mínimo de hidróxido sódico acuoso 2 M y el pH de la solución estaba entre 9,5 y 10. La mezcla se acidificó con agitación con ácido clorhídrico 1 M hasta un pH de aproximadamente 6,2 y se formó un sólido. El sólido se filtró, se lavó con agua (3 x 300 ml) y se recristalizó en metanol al 55%/agua (v/v) para dar el Compuesto XVIII como un sólido blanquecino (99,7 g, 57%).

Las propiedades se listan posteriormente.

pf 116-117°C, ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,70 (1 H, s ancho), 11,95 (1 H, s ancho) 8,81 (1H, t), 7,82 (1H, m), 7,38 (1H, m), 6,84 (2H, m), 2,36 (2H, q), 2,18 (2H, t), 1,50 (4H, m ancho), 1,28 (6H, m). Análisis Calculado para C₁₅H₂₁NO₄: C, 64,50; H, 7,58; 1 N, 5,02. Encontrado: C, 64,26; H, 7,81; N, 4,93.

Procedimientos similares se usaron para preparar los Compuestos IV, XXVII y XXVIII.

Las propiedades se listan posteriormente.

Compuesto IV: Análisis Calculado para C₁₁H₁₃NO₄: C, 59,9, H, 5,87, N, 6,27. Encontrado: C, 58,89, H, 5,85, N, 6,07. ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 1,8 (2H, m) 2,3 (2H, t) 3,1 (2H,q) 6,9 (2H, t) 7,4 (1H, t) 7,8 (1 H, d) 8,85 (1H, t) 12,0 (1H, s) 12,15 (1H, s).

Compuesto XXVII: Análisis Calculado para C₁₈H₂₇NO₄: C, 67,25, H, 8,48, N, 4,36. Encontrado: C, 67,23, H, 8,57, N, 4,20. ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 1,22-1,26 (m, 12H) 1,45-1,51 (m, 4H) 2,16 (t, 2H) 3,25 (qt, 2H), 6,85 (t, 2H), 7,37 (t, 1 H), 7,81 (d, 1H), 8,79 (t, 1H), 11,95 (s, 1 H), 12,72 (s, 1 H).

Compuesto XXVIII: ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 1,26 (8H, m ancho), 1,49 (4H, m), 2,17 (2H, t), 3,26 (2H, m), 6,86 (2H, m), 7,37 (1H, m), 7,83 (1H, m), 8,80 (1H, t), 11,95 (1H, s), 12,73 (1H, s).

Ejemplo 1A

Una síntesis alternativa del Compuesto XIX era como sigue:

Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 5 l se dotó de una manta calentadora, un agitador mecánico elevado, un embudo de adición y un termómetro. La reacción se realizó bajo una atmósfera de argón. Se cargaron al matraz de fondo redondo ácido hidroxilamino-O-sulfónico (196,7 g, 1,74 moles, 1,10 equivalentes) y ácido fórmico (1 l) y se agitaron para formar una suspensión blanca. Una solución de ciclooctanona (200,0 g, 1,58 moles, 1,0 equivalentes) en ácido fórmico (600 ml) se añadió gota a gota a la suspensión blanca a través del embudo de adición. Después de la adición, el embudo de adición se reemplazó por un condensador de reflujo y la reacción se calentó hasta reflujo (temperatura interna aproximadamente 105°C) durante 1 hora para dar una solución parda. Después de que la solución se enfriara hasta temperatura ambiente, se vertió en una mezcla de cloruro amónico acuoso saturado (1,5 l) y agua (1,5 l). La mezcla acuosa se extrajo con cloroformo (3 x 1200 ml). Las capas de cloroformo combinadas se transfirieron a un vaso de precipitados y se añadió lentamente bicarbonato sódico saturado (2 l). La capa de cloroformo se separó a continuación, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar un aceite pardo. El aceite se puso en un matraz de fondo redondo de 500 ml con un agitador magnético. El matraz de fondo redondo se puso en un baño de aceite silicónico y se dotó de una columna de destilación a vacío de corto recorrido equipada con un termómetro. Un receptor de tipo Cow se conectó a tres matraces de 250 ml. Se obtuvo 2-azaciclonononona (145 g, 65%, pf 64-69°C) mediante destilación a vacío (fracción con el intervalo de temperatura de la columna de 80 a 120°C a presiones entre 3,0 y 3,4 mm de Hg).

Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 5 l se dotó de una manta calentadora, un agitador mecánico elevado, un condensador de reflujo y un termómetro. Una suspensión de 2-azaciclonononona (83 g, 0,59 moles, 1,0 equivalen-

ES 2 284 168 T3

tes) en hidróxido sódico acuoso 5 M (650 ml, 8,23 moles, 5,5 equivalentes) se cargó a un matraz de fondo redondo. La mezcla se calentó hasta reflujo (temperatura interna aproximadamente 110°C) durante 4 horas para dar una solución amarilla transparente. La manta calentadora y el condensador de reflujo se retiraron. Después de que la solución se enfriara hasta temperatura ambiente, se diluyó con agua (650 ml) y se enfrió adicionalmente en un baño de hielo. Cloruro de O-acetilsaliciloilo finamente dividido (114,7 g, 0,59 moles, 1,0 equivalentes) se añadió en porciones a la solución con agitación y se continuó el enfriamiento durante 1 hora. Después de 30 minutos adicionales, el baño de hielo se retiró y la agitación se continuó a temperatura ambiente durante 21 horas para dar una solución amarillo pardusco. La mezcla agitada se acidificó con ácido sulfúrico 2 M (aproximadamente 850 ml) hasta un pH de aproximadamente 1 y se formó un sólido amarillo. El sólido se recogió mediante filtración y se disolvió en metanol caliente (1,7 l). Se añadió carbón vegetal activado (aproximadamente 5 g) al metanol y la solución se agitó durante 10 minutos. El carbón vegetal activado se retiró mediante filtración y el residuo de carbón vegetal se lavó con 300 ml adicionales de metanol. Se añadió agua (2 l) a los filtrados combinados (es decir, los 2 l de metanol) y precipitó un sólido blanquecino al reposar a 4°C durante la noche. El producto en bruto se filtró y se recrystalizó en metanol al 65%/agua (v/v) para dar el Compuesto XIX (69,1 g, 42%) como un sólido blanquecino.

Las propiedades se listan posteriormente:

pf 116-117°C; HPLC, ¹H NMR y Análisis Calculado para C₁₅H₂₁NO₂: C, 64,50; H, 7,58; N, 5,02. Encontrado: C, 64,26; H, 7,81; N, 4,93.

Ejemplo 2

El Compuesto XXXI se preparó como sigue:

1-Aminoundec-1-eno. Una mezcla de 10-undecen-1-ol (5,00 g, 29,36 milimoles, 1 equivalente), trifenilfosfina (7,70 g, 29,36 milimoles, 1 equivalente) y ftalimida (4,32 g, 29,36 milimoles, 1 equivalente) en tetrahidrofurano seco (THF, 30 ml) se agitó vigorosamente bajo argón. Azodicarboxilato de dietilo (DEAD, 5,11 g, 29,36 milimoles, 1 equivalente) se diluyó con THF (12 ml) y se añadió gota a gota mediante una jeringa. Después de la adición, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se evaporó bajo vacío y se añadió éter (30 ml) para precipitar el óxido de trifenilfosfina y dicarboxilato de hidrazina que se retiraron mediante filtración. El precipitado se enjuagó con éter (2 x 30 ml) y los filtrados combinados se evaporaron para proporcionar un sólido amarillo. El sólido amarillo se trituró con hexanos calientes (3 x 50 ml) y se filtró. Los hexanos combinados se evaporaron para dar 1-ftalimidilundec-10-eno como una cera amarilla.

La cera amarilla se disolvió en una solución etanólica (38 ml) de hidrato de hidrazina (1,47 g, 1 equivalente, 29,36 milimoles). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas. Después de que la mezcla se enfriara hasta temperatura ambiente se añadió ácido clorhídrico concentrado (30 ml) y el sólido se filtró a través de un filtro de vidrio sinterizado. El residuo se lavó con agua (50 ml) y los filtrados combinados se evaporaron para proporcionar un sólido amarillo. El sólido amarillo se redisolvió en NaOH 1 M (100 ml) y se extrajo con éter (2 x 50 ml). El éter se secó y se evaporó para proporcionar un aceite amarillo. El aceite se purificó mediante destilación de Kugelrohr (alrededor de 0,1 mm de Hg, 100°C) para proporcionar 1-aminoundec-10-eno (2) como un aceite amarillo claro (3,29 g, 66%).

Las propiedades se listan posteriormente.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1,23 (14H, m ancho), 1,99 (2H, m), 2,48 (2H, m), 4,94 (2H, m), 5,77 (1H, m).

1-(O-Acetilsaliciloilamino)undec-10-eno. Cloruro de O-acetilsaliciloilo (3,82 g, 19,25 milimoles, 1 equivalente) en THF (30 ml) se enfrió en un baño de hielo. Se añadieron a través de una jeringa trietilamina (1,95 g, 19,25 milimoles, 1 equivalente), seguido por 1-aminoundec-10-eno (3,26 g, 19,25 milimoles, 1 equivalente) en THF (10 ml). El baño de hielo se retiró y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas. Después de la retirada del disolvente, el residuo se disolvió en EtOAc (50 ml) y se lavó con agua (2 x 30 ml). La capa orgánica se secó y se evaporó para proporcionar 1-(O-acetilsaliciloilamino)undec-10-eno como un aceite incoloro, con un rendimiento cuantitativo, 6,59 g.

Las propiedades se listan posteriormente:

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1,26 (12H, s ancho), 1,47 (2H, m), 1,99 (2H, m), 2,19 (3H, s), 3,15 (2H, q), 4,95 (2H, m), 5,78 (1H, m), 7,15 (1H, m), 7,30 (1H, m), 7,50 (2H, m), 8,24 (1H, t).

Compuesto XXXI

1-(O-Acetilsaliciloilamino)undec-10-eno (6,59 g, 19,25 milimoles, 1 equivalente) en diclorometano (108 ml) se añadió a una mezcla de agua (108 ml), ácido sulfúrico (9 M, 13 ml), ácido acético glacial (2,16 ml) y cloruro de metiltrialquil(C₈-C₁₀)amonio (0,32 g) (Adogen® 464, disponible de Aldrich Chemical Co.). La mezcla se agitó vigorosamente en un baño de hielo y se añadió permanganato potásico (9,13 g, 57,75 milimoles, 3 equivalentes) en porciones durante 1,5 horas. Después de la adición, el baño de hielo se retiró y la solución púrpura resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La solución se enfrió en un baño de hielo y se añadió bisulfito sódico (6,8 g) para disipar el permanganato en exceso. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron y se evaporaron. Se añadió

al residuo hidróxido sódico (2 M, 50 ml) y se agitó durante 30 minutos. La solución se diluyó con agua (50 ml), se lavó con éter (50 ml) y se acidificó hasta pH 1 con ácido clorhídrico 2 M. Se formaba un sólido y se recogía mediante filtración. La recrystalización del sólido en MeOH al 65%/H₂O daba XXXI como un sólido de color canela (2,78 g, 47% basado en la amina).

Las propiedades se listan posteriormente:

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1,24 (10H, m ancho), 1,51 (4H, m), 2,17 (2H, t), 3,27 (2H, m), 6,86 (2H, m), 7,37 (1H m), 7,82 (1H, m), 8,80 (1H, t), 11,95 (1H, s), 12,72 (1H, s).

Los otros compuestos de la invención pueden prepararse fácilmente siguiendo los procedimientos descritos en los Ejemplos 1-2.

Ejemplos 5-15

Evaluación In vivo de Hormona del Crecimiento Recombinante en Ratas

Se prepararon composiciones de dosificación mezclando los aminoácidos modificados y hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) según se lista en la Tabla 1 posterior en una solución tamponadora de fosfato a un pH de aproximadamente 7-8.

Se les administró a las ratas la composición de dosificación mediante sonda oral sublingual, administración intraduodenal o administración colónica. El aporte se evaluó usando un ensayo de ELISA para rhGH de Medix Biotech, Inc. Para la administración intracolónica, una muestra se preparó y se dosificó a ratas en ayunas a 25 mg/kg de portador en una solución tamponadora que contenía propilenglicol (0-50%) y 1 mg/kg de rhGH.

Los resultados se ilustran en la Tabla 1 posterior.

Ejemplo Comparativo 5A

Se administró rhGH (6 mg/ml) mediante sonda oral a una rata, y el aporte se evaluó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 5.

Los resultados se ilustran en la Tabla 1 posterior.

Tabla 1					
Aporte In Vivo de rhGH					
Ejemplo	Portador	Dosis de Portador (mg/kg)	Dosis de Fármaco (mg/kg)	Método de Administración	Niveles Séricos Máximos Medios de rhGH (mg/ml)
5A	ninguno	0	6	Oral	<10+/-10
11	XIX	200	3	Oral	60,92+/-26,3
12	XIX	25	1	Colónico	111,52+/-16,4
13	XIX	100	3	Sublingual	119,14+/-65,6
14	XIX	25	1	Intranasal	92,7+/-73,2
15	XXVII	25	1	Colónico	73,72+/-4,9

Ejemplos 16-26

Evaluación In Vivo de Hormona de Crecimiento Recombinante en Ratas

Preparación de Soluciones de Dosificación

Los agentes de aporte se reconstituyeron con agua destilada y se ajustaron hasta pH 7,2-8,0 bien con ácido clorhídrico acuoso o bien con hidróxido sódico acuoso. Se preparó una solución de reserva de rhGH mezclando rhGH, D-

manitol y glicina y disolviendo esta mezcla en glicerol al 2%/agua. La solución de reserva se añadió a continuación a la solución de agente de aporte. Se estudiaron varias relaciones de agente de aporte a agente activo.

Experimentos In Vivo

Ratas Sprague-Dawley macho que pesaban 200-250 g se mantuvieron en ayunas durante 24 horas y se les administró ketamina (44 mg/kg) y clorpromazina (1,5 mg/kg) 15 minutos antes de la dosificación. Se les administró a las ratas una de las soluciones de dosificación descritas anteriormente mediante inyección subcutánea, instilación intranasal o instilación sublingual. Se recogieron muestras de sangre en serie desde la arteria de la cola para la determinación de la concentración de calcio en suero o concentraciones de rhGH en suero. La dosis de rhGH administrada en estos experimentos era 0,1 mg/kg.

Las concentraciones de rhGH en suero se cuantificaron mediante un estuche de prueba de inmunoensayo enzimático para rgGH. Los resultados se dan en la Tabla 2 y las Figuras 1 y 2.

En la Figura 2, los círculos representan la respuesta después de la dosificación SL de una solución acuosa de compuesto XIX y rhGH. Los cuadrados representan la respuesta después de la dosificación IN de una solución acuosa de compuesto XIX y rhGH. Los triángulos representan la respuesta después de la dosificación IC de una solución acuosa de compuesto XIX y rhGH. La dosis de compuesto XIX era 25 mg/kg y la dosis de rhGH era 1 mg/kg.

Ejemplo Comparativo 16A

Se administró rhGH (1 mg/kg) mediante sonda oral a una rata y el aporte se evaluó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 16.

Los resultados se ilustran en la Tabla 2 posteriormente.

Tabla 2			
Potenciación por el Agente de Aporte de la Biodisponibilidad de Hormona de Crecimiento Humana Recombinante (rhGH) Administrada Mediante Administración Subcutánea			
Ejemplo	Agente de Aporte	Dosis de Agente de Aporte (mg/kg)	[rhGH] en Suero Máximo (ng/ml)
16	XIX	1,0	22 ± 3
16A	Ninguno	0,0	4 ± 2
17	XIX	2,5	25 ± 5
18	XIX	25	30 ± 6
27	CIX	1,0	16 ± 3

Ejemplos 28-33

Evaluación In Vivo de Interferón en Ratas

Se prepararon composiciones de dosificación mezclando los compuestos de aminoácido modificados e interferón $\alpha 2b$ según se lista en la Tabla 3 posteriormente en una solución tamponadora de hidrócloruro Trizma® (Tris-HCl) a un pH de aproximadamente 7-8. Se añadió propilenglicol (0-25%) como un agente solubilizante, si era necesario.

Se les administró a las ratas la composición de dosificación mediante sonda oral, administración intraduodenal o administración intracolónica. El aporte se evaluó mediante el uso de un ensayo ELISA para interferón humano α de Biosource, Inc.

Los resultados de la administración intracolónica se ilustran en la Tabla 3 posteriormente.

Ejemplo Comparativo 28A

Interferón $\alpha 2b$ (250 $\mu\text{g/kg}$) se administró intracolónicamente a ratas y el aporte se evaluó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 14.

Los resultados se ilustran en la Tabla 3 posteriormente.

Tabla 3				
Aporte In Vivo de Interferón Mediante Administración Intracolónica				
Ejemplo	Portador	Dosis de Portador (mg/kg)	Dosis de Interferón ($\mu\text{g/kg}$)	Niveles en Suero Máximos Medios de Interferón (pg/ml)
28A	ninguno	0	250	0
31	XIX	100	250	11193 +/- 8559

Ejemplos 34-37

Evaluación In Vivo de Calcitonina de Salmón en Ratas

Se prepararon composiciones de dosificación mezclando los aminoácidos modificados y calcitonina de salmón según se lista en la Tabla 4 posteriormente. Se añadieron 400 mg de portador a 2,9 ml de propilenglicol acuoso al 25%. La solución resultante se agitó y el pH se ajustó hasta 7,2 con hidróxido sódico (1,0 N). Se añadió agua para llevar el volumen total hasta 2,0 ml. La muestra tenía una concentración de portador final de 200 mg/ml. Se añadió calcitonina (10 μg) a la solución. La concentración de calcitonina total era 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

Para cada muestra se anestesió un grupo de ratas en ayunas. Se les administró a las ratas la composición de dosificación mediante sonda oral, instilación intracolónica o administración intraduodenal. Se recogieron muestras de sangre en serie de la arteria de la cola. La calcitonina en suero se determinó probando con un Calcium Kit (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, EE.UU. de A.).

Los resultados se ilustran en la Tabla 4 posteriormente.

Tabla 4					
Aporte In Vivo de Calcitonina					
Ejemplo	Portador	Dosis de Portador (mg/kg)	Dosis de Fármaco ($\mu\text{g/kg}$)	Método de Administración	Dilución Máxima en el Calcio en Suero (% por debajo de la línea de base)
36	XIX	10	3	intracolónico	26,49 +/- 12,3
37	XIX	200	7,5	oral	25,48 +/- 4,7

Ejemplos 38-43

*Evaluación In Vivo de Calcitonina de Salmón en Ratas**Preparación de la Solución de Dosificación*

Los agentes de aporte se reconstituyeron con agua destilada y se ajustaron hasta pH 7,2-8,0 bien con ácido clorhídrico acuoso o bien con hidróxido sódico acuoso. Se preparó una solución de reserva de sCT disolviendo sCT en ácido cítrico (0,085 N). La solución de reserva se añadió a continuación a la solución de agente de aporte. Se estudiaron varias relaciones diferentes de agente de aporte a agente activo.

Experimentos In Vivo

5 Ratas Sprague-Dawley macho que pesaban 200-250 g se mantuvieron en ayunas durante 24 horas y se les administró ketamina (44 mg/kg) y clorpromazina (1,5 mg/kg) 15 minutos antes de la dosificación. A las ratas se les administró una de las soluciones de dosificación descritas anteriormente mediante inyección subcutánea. Se recogieron muestras de sangre en serie de la arteria de la cola para la concentración de calcio en suero.

10 Las concentraciones de calcio en suero se cuantificaron mediante el método de O-cresoltaleína-complexona (Sigma) usando un espectrofotómetro UV/VIS (Perkin Elmer). Los resultados se dan en la Tabla 5.

Ejemplo 38A

15 Se administró calcitonina de salmón mediante sonda oral a ratas y el aporte se evaluó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 38. Los resultados se dan en la Tabla 5 posteriormente.

Tabla 5			
Mejora por el Agente de Aporte de la Biodisponibilidad de Calcitonina de Salmón (sCT, dosificada en 0,2 µg/kg) Administrada Mediante Administración Subcutánea			
Ejemplo	Agente de Aporte	Dosis de Agente de Aporte (µg/kg)	Porcentaje de Disminución en Calcio en Suero
38	XIX	2	17 ± 3
38A	Ninguno	0	17 ± 2
39	XIX	20	25 ± 4
40	XIX	200	25 ± 5
41	XIX	2000	26 ± 5

Ejemplos 44-50

Evaluación In Vivo de Heparina en Ratas

45 Se prepararon composiciones de dosificación mezclando los aminoácidos modificados y heparina según se lista en la Tabla 4. En un tubo de ensayo, 900 mg de portador se disolvieron en 3 ml de propilenglicol y 0,299 g de heparina sódica se disolvieron en 3 ml de agua. Las soluciones se mezclaron mediante turbulencia. Se añadió hidróxido sódico (10 M) a la mezcla resultante hasta que se obtenía una solución. El pH se ajustó a continuación hasta 7,4 +/- 0,5 con ácido clorhídrico concentrado y la solución final se sometió a sonicación a 40°C durante 30 minutos.

50 A un grupo de ratas conscientes en ayunas se les administraban las composiciones de dosificación mediante sonda oral. Se recogieron muestras de sangre mediante punción cardíaca después de la administración de ketamina (44 mg/kg). La actividad de heparina se determinó utilizando el tiempo del tromboplastina parcial activado (APTT) de acuerdo con el método de Henry, J.B., *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*; Philadelphia, PA; WB Saunders (1979).

55 Los resultados se ilustran en la Tabla 6 posteriormente.

Ejemplo Comparativo 44A

60 Se administró heparina (100 mg/kg) mediante sonda oral a ratas y la actividad de heparina se determinó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 44.

Los resultados se ilustran en la Tabla 6 posteriormente.

65

Tabla 6				
Aporte In Vivo de Heparina Mediante Administración Oral				
Ejemplo	Portador	Dosis de Portador (mg/kg)	Dosis de Fármaco (mg/kg)	APTT Máximo Medio (s)
44A	ninguno	ninguno	100	20,7 +/- 0,17
48	XIX	300	100	119,99 +/- 56,3
49	XXXI	50	25	127,56 +/- 22,97
50	XXXI	50	10	50,85 +/- 9,1

Ejemplo 51

Se siguió el método del Ejemplo 44, substituyendo la heparina por heparina de bajo peso molecular y variando las cantidades de propilenglicol y agua para la solubilización, según fuera necesario.

Ejemplos 50-58

*Evaluación In Vivo de Hormona Paratiroidea en Ratas**Preparación de soluciones de dosificación*

Los agentes de aporte se reconstituyeron con agua destilada y/o propilenglicol y se ajustaron hasta un pH aparente de 7,2-8,0 bien con ácido clorhídrico acuoso o bien con hidróxido sódico acuoso. Se preparó una solución de reserva de hormona paratiroidea disolviendo hormona paratiroidea en agua. La solución de hormona paratiroidea se añadió a continuación a la solución de agente de aporte. Se estudiaron varias relaciones diferentes de agente de aporte a agente activo.

Experimentos in vivo

Ratas Sprague-Dawley macho que pesaban 200-250 g se mantuvieron en ayunas durante 24 horas y se les administró ketamina (44 mg/kg) y clorpromazina (1,5 mg/kg) 15 minutos antes de la dosificación. A las ratas se les administró una de las soluciones de dosificación descritas anteriormente mediante sonda oral o instilación intracolónica. Se recogieron muestras de sangre en serie de la arteria de la cola para la determinación en suero de la concentración de hormona paratiroidea. Las concentraciones de hormona paratiroidea en suero se cuantificaron mediante un estuche de prueba de radioinmunoensayo para hormona paratiroidea.

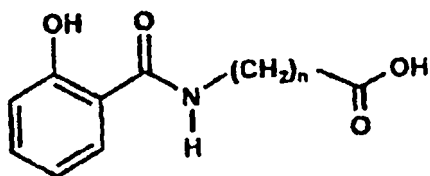
Administración oral in vivo

La administración oral de soluciones que contenían hormona paratiroidea (PTH) y los agentes de aporte que no son α -aminoácidos se probaron in vivo en ratas. Los resultados muestran una disminución significativa en la biodisponibilidad oral de hormona paratiroidea en comparación con la administración similar del agente activo solo. Los datos se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7					
Potenciación por el Agente de Aporte de la Biodisponibilidad Oral de Hormona Paratiroidea (PTH)					
Ejemplo	Portador	Dosis de Portador mg/kg	Método de Administración	Dosis de Agente Activo ($\mu\text{g/kg}$)	[PTH] en Suero Máximo (pg/ml)
51	XIX	100	intracolónico	25	130 ± 20
52	XIX	250	oral	100	75 ± 25
53	XIX	250	oral	25	20 ± 6

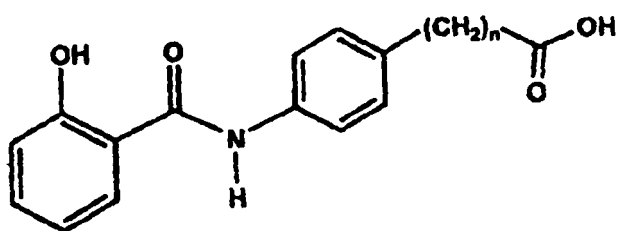
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en



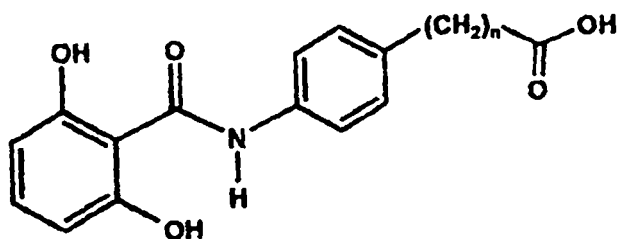
en donde

Compuesto	n
XIX	7
XXVII	10
XXVIII	8
XXIX	6
XXX	11
XXXI	9



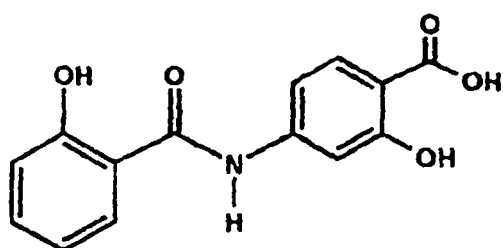
en donde

Compuesto	n
LIV	2

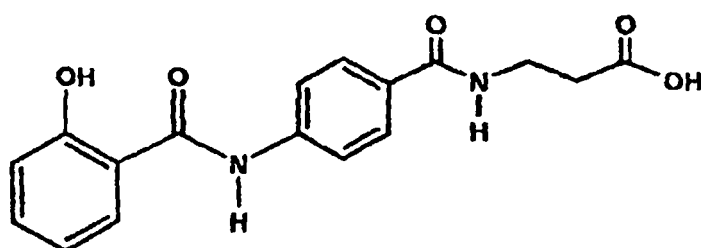


en donde

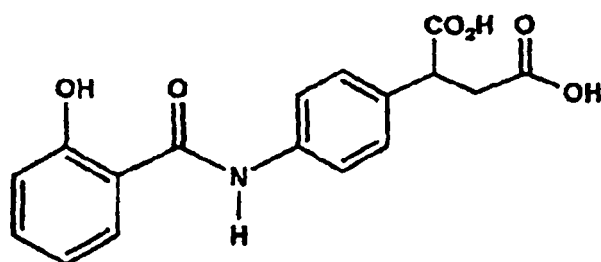
Compuesto	n
LIII	3
LVI	2



Compuesto XCIV



Compuesto CVI



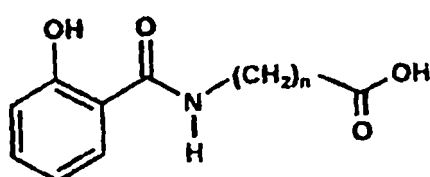
Compuesto CIX

o sales del mismo.

2. Una composición que comprende

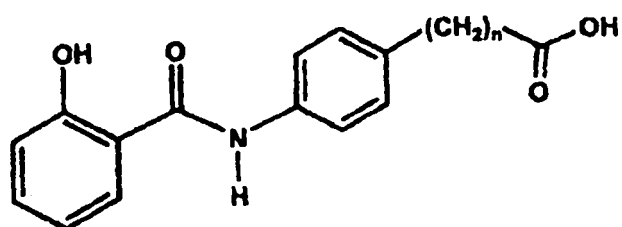
a) un agente activo;

b) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en



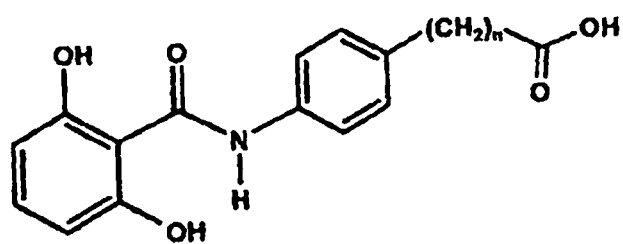
en donde

Compuesto	n
IV	3
XIX	7
XXVII	10
XXVIII	8
XXIX	6
XXX	11
XXXI	9



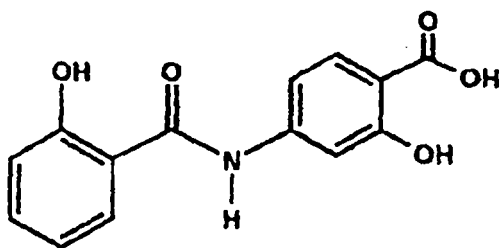
en donde

Compuesto	n
LII	1
LIV	2

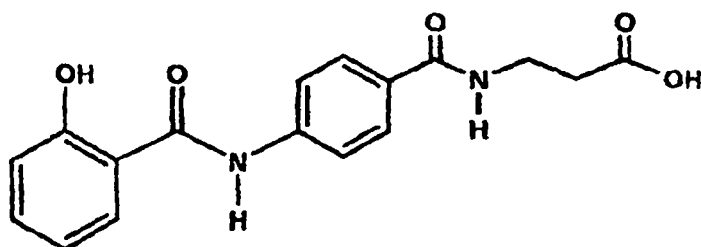


en donde

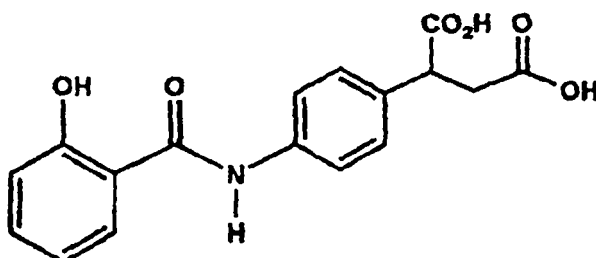
Compuesto	n
LIII	3
LVI	2



Compuesto XCIV



Compuesto CVI



Compuesto CIX

o sales del mismo.

3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho agente activo se selecciona del grupo que consiste en un agente biológicamente activo y un agente químicamente activo.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho agente biológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un mucopolisacárido, un carbohidrato, un lípido, un plaguicida o cualquier combinación de los mismos.

5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho agente biológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento bovina, hormona liberadora de hormona de crecimiento, un interferón, interleuquina-II, insulina, heparina, calcitonina, eritropoyetina, factor natu-rético auricular, un antígeno, un anticuerpo monoclonal, somatostatina, adrenocorticotropina, hormona liberadora de gonadotropina, oxitocina, vasopresina, cromolina sódica, vancomicina, hormona paratiroidea, desferrioxamina (DFO) o cualquier combinación de los mismos.

6. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicha composición es adecuada para adminis-trarse oralmente, intranasalmente, sublingualmente, intraduodenalmente, intramuscularmente o subcutáneamente a un animal que necesite un agente activo.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el agente activo es un agente biológicamente activo y la composición es adecuada para administrarse oralmente a un animal.

8. Una forma unitaria de dosificación que comprende

(A) una composición de acuerdo con la reivindicación 2; y

(B)

(a) un excipiente,

(b) un diluyente,

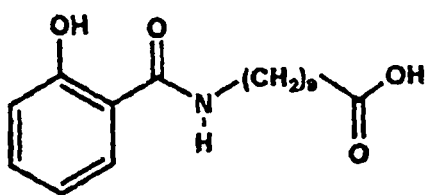
- (c) un desintegrante,
- (d) un lubricante,
- (e) un plastificante,
- (f) un colorante,
- (g) un vehículo de dosificación, o
- (h) cualquier combinación de los mismos.

9. Una forma unitaria de dosificación de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende una tableta, una cápsula o un líquido.

10. Un método para preparar una composición, comprendiendo dicho método mezclar

- (A) al menos un agente biológicamente activo;
- (B) al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1; y
- (C) opcionalmente un vehículo de dosificación.

11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, de la siguiente fórmula

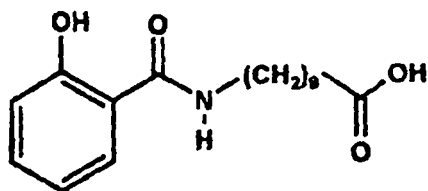


Compuesto XXXI

o una sal del mismo.

12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende

- (a) un compuesto de la siguiente fórmula



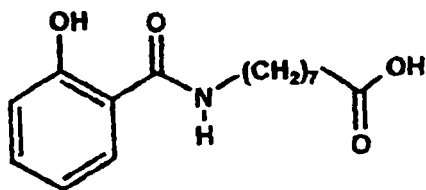
Compuesto XXXI

o una sal del mismo; y

- (b) un agente biológicamente activo.

13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el agente biológicamente activo es heparina.

14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, de la siguiente fórmula

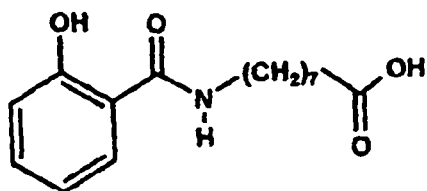


Compuesto XIX

o una sal del mismo.

15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende

(a) un compuesto de la siguiente fórmula



Compuesto XIX

o una sal del mismo; y

(b) un agente biológicamente activo.

16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el agente biológicamente activo es hormona de crecimiento humana.

17. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el agente biológicamente activo es interferón.

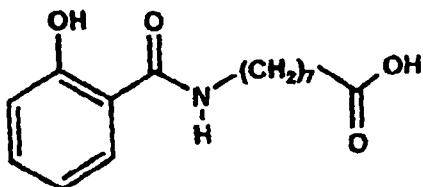
18. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el agente biológicamente activo es calcitonina.

19. La composición de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el agente biológicamente activo es calcitonina de salmón.

20. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el agente biológicamente activo es heparina.

21. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12, 13, 15 a 20, en donde dicha composición es adecuada para administrarse oralmente.

22. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende un compuesto de la siguiente fórmula



Compuesto XIX

o una sal del mismo; y

hormona paratiroidea.

FIG. 1

DOSIS DE FÁRMACO = 0,1 mg/kg
DOSIS DE AGENTE DE APOORTE = 10 mg/kg

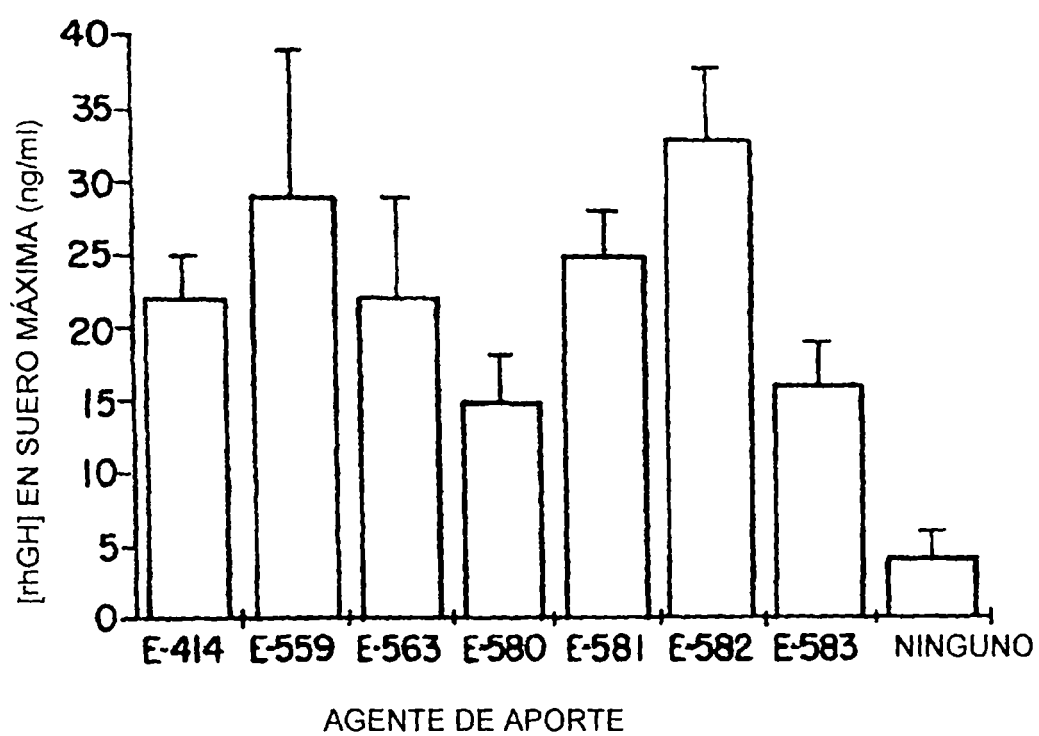


FIG. 2

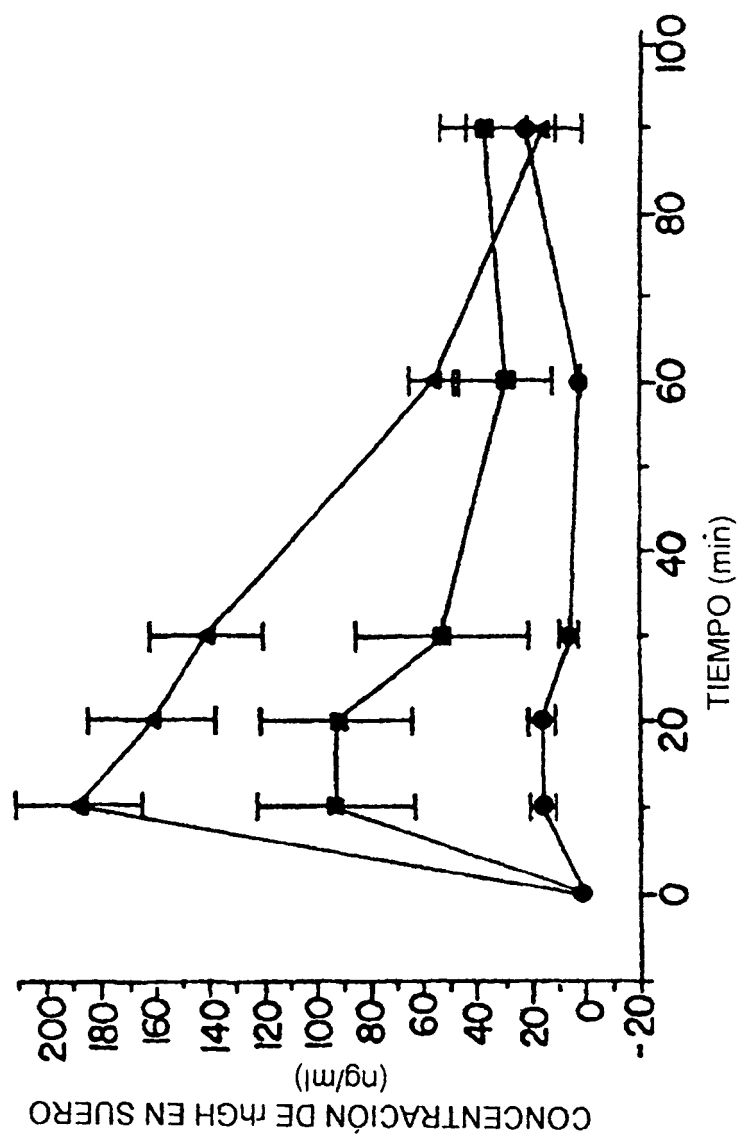


FIG. 3

