



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 345 509**

(51) Int. Cl.:
A61K 9/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06826368 .0**

(96) Fecha de presentación : **20.10.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1951198**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2008**

(54) Título: **Administración intranasal de insulina de acción rápida.**

(30) Prioridad: **20.10.2005 US 728877 P**
03.03.2006 US 778724 P
10.07.2006 US 806904 P
04.08.2006 US 821525 P
15.09.2006 US 825876 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.09.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.09.2010

(73) Titular/es: **MDRNA, Inc.**
3830 Monte Villa Parkway
Bothell, Washington 98021-7266, US

(72) Inventor/es: **Quay, Steven, C.;**
Cohen, Annemarie, Stoudt;
Costantino, Henry, R.;
Quay, Shu-Chih Chen;
Sileno, Anthony, P. y
Kleppe, Mary, S.

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 345 509 T3

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

DESCRIPCIÓN

Administración intranasal de insulina de acción rápida.

5 Antecedentes

La insulina es una importante hormona polipeptídica reguladora de la glucosa. Es una hormona natural secretada por el páncreas. La insulina es necesaria para que las células del cuerpo recuperen y usen la glucosa de la sangre. La glucosa permite que las células produzcan la energía necesaria para llevar a cabo funciones celulares. Además de ser el efector principal de la homeostasis de los hidratos de carbono, la insulina tiene efectos en el metabolismo de grasas. Puede alterar la capacidad del hígado para liberar depósitos de grasa. La insulina tiene diferentes efectos farmacodinámicos por todo el cuerpo.

Los investigadores dieron por primera vez un extracto activo del páncreas que contenía insulina a un paciente diabético joven en 1922 y la FDA aprobó la insulina por primera vez en 1939. Actualmente, la insulina que se usa para el tratamiento se obtiene de páncreas de vaca o cerdo así como de tecnología recombinante (humana). La primera insulina humana recombinante fue aprobada por la FDA en 1982.

La insulina se usa en medicina en algunas formas de diabetes mellitus. Los paciente con diabetes mellitus son incapaces de absorber y usar la glucosa de la sangre, y como resultado, el nivel de glucosa en la sangre aumenta. En la diabetes de tipo 1, el páncreas no puede producir suficiente insulina. Por lo tanto, es necesaria la terapia con insulina. En la diabetes de tipo 2, los pacientes producen insulina, pero las células del cuerpo no responden con normalidad a la insulina. Sin embargo, la insulina también se puede usar en la diabetes de tipo 2 para superar la resistencia celular a la insulina. Aumentando la absorción de glucosa por las células y reduciendo la concentración de glucosa en la sangre, la insulina previene o reduce las complicaciones de la diabetes a largo plazo, incluyendo el daño a los vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios. La insulina normalmente se administra por inyección bajo la piel (vía subcutánea). Se prefiere el tejido subcutáneo del abdomen debido a que la absorción de insulina es más uniforme desde este sitio que desde tejidos subcutáneos de otros sitios.

Cuando se descubrió la insulina por primera vez y se puso a disposición de las personas con diabetes sólo había un tipo de insulina de acción corta. Esta requería varias inyecciones al día. Con el paso del tiempo, se desarrollaron nuevas insulinas que duraban más tiempo y requerían menos inyecciones, pero requerían una atención estricta de los horarios de las comidas. Ahora, hay diferentes tipos de insulina disponibles. Esto da más flexibilidad en el número y la planificación de la administración, haciendo que sea más fácil mantener los niveles objetivos de glucosa en la sangre, según el estilo de vida del paciente. La insulina está disponible en diferentes formas, por ejemplo, de acción rápida, media y larga. La insulina normalmente se administra en inyecciones subcutáneas. Están disponibles otras opciones, tales como el suministro con bomba, y más recientemente, el suministro pulmonar.

Están disponibles varios análogos de insulina que se preparan por tecnología de ADN recombinante, para uso clínico. Entre estos agentes están la insulina Aspart (NovoLog™; Novo Nordisk Pharmaceuticals), que es homóloga a la insulina humana común excepto por una única sustitución de prolina por ácido aspártico en la posición B28. Esta única sustitución reduce la tendencia de la molécula a formar hexámeros. Por lo tanto, la insulina Aspart es absorbida más rápidamente después de la inyección subcutánea y tiene tanto un inicio de la acción más rápido como una duración de la acción más corta que la insulina de acción corta.

También se usan mezclas de insulina, en especial para personas con diabetes de tipo 2. Las mezclas de insulina permiten el tratamiento con diferentes tipos de insulina en una administración combinada.

La insulina inyectable viene en tres formas diferentes, viales, jeringuillas precargadas y cartuchos. Los cartuchos se usan en un dispositivo de tipo bolígrafo que simplifica la acción. La insulina recombinante humana, insulina Lispro, insulina Aspart e insulina Glargina, son las insulinas usadas habitualmente. La insulina de vaca y cerdo se usan con poca frecuencia. La insulina humana común (Novolina R, Humulina R) está disponible en viales, cartuchos y jeringuillas precargadas.

La insulina humana NPH (Novolina N, Humulina P) está disponible en viales, cartuchos y jeringuillas precargadas. Está disponible una mezcla de insulina humana NPH al 70% e insulina humana regular al 30% (Novolina 70/30, Humulina 70/30) en viales, cartuchos y jeringuillas precargadas.

Está disponible una mezcla de insulina humana NPH al 50% e insulina humana regular al 50% (Humulina 50/50) en viales. La insulina humana Lente (Novolina L, Humulina L) está disponible en viales. La insulina humana Ultralenta (Humulina U) está disponible en viales. La insulina Lispro (Humalog) está disponible en viales y cartuchos. La insulina Aspart (NovoLog) está disponible en viales y en cartuchos. La insulina Glargina (Lantus) está disponible en viales y en cartuchos.

Las formas monoméricas de la insulina incluyen homólogos de insulina y se conocen por tener una acción rápida, p. ej., insulina Glulisina (LysB3, GluB29), HMR-1153 (LysB3, IleB28), HMR-1423 (GlyA21, HisB31, HisB32), insulina Aspart (AspB28) o (AspB10), Lispro (LysB28, ProB29). En todos los casos anteriores, la nomenclatura de los análogos se basa en una descripción de la sustitución de aminoácidos en posiciones específicas en la cadena A o

B de la insulina, numeradas desde el extremo N de la cadena, en la que el resto de la secuencia es la de la insulina humana natural.

Se ha descrito una formulación en polvo seco de una insulina de acción rápida para suministro pulmonar, que comprende una insulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la insulina humana natural (patente de EE.UU. n° 6.737.045). Es necesario desarrollar formulaciones farmacéuticas adicionales que comprendan insulinas de acción rápida, es decir, aquellas que son capaces de proporcionar niveles máximos en suero en 60 minutos y disminuciones de glucosa en 90 minutos.

Las personas que se inyectan insulina tienen disponibles varias elecciones. La insulina se puede inyectar de forma manual, o se puede infundir en el cuerpo con ayuda de un pequeño dispositivo de infusión electrónico denominado bomba de insulina. Las jeringuillas son probablemente la elección más común y barata, y son útiles para pacientes que toman dos tipos de insulina mezcladas juntas. Una alternativa a las jeringuillas es un bolígrafo de insulina, que viene precargado con insulina y puede ser desechable o reutilizable (con cartuchos de insulina desechables). El dispositivo se parece a un bolígrafo grueso, con una aguja fina bajo la tapa y un émbolo en el otro extremo. Un dial permite al usuario regular la dosis. Los bolígrafos de insulina están disponibles en las mezclas de tipos de insulina prescritas con más frecuencia, tales como 70/30 (insulina NPH y regular). Algunas personas prefieren los bolígrafos a las jeringuillas porque son más fáciles de llevar y de usar.

Otro dispositivo conocido como un inyector de chorro de insulina funciona usando una ráfaga de aire de alta presión para mandar una pulverización fina de insulina a través de la piel. Esta puede ser una opción buena para los pacientes que tienen miedo a las agujas. Sin embargo, los inyectores de chorro requieren una inversión financiera significativa y no siempre están cubiertos por el seguro médico.

Una bomba de insulina puede ser un modo más eficaz para controlar la diabetes de tipo 1 para algunas personas, porque imita mejor la producción de insulina del páncreas. Una bomba de insulina es un dispositivo electrónico compacto con un equipo (o tubo) de infusión unido que administra a un paciente un flujo constante y pequeño de insulina a lo largo del día, conocido como una "tasa basal". Antes de comer, el usuario de la bomba programa la bomba para suministrar un "bolo" de insulina de acción rápida para cubrir la correspondiente elevación de los niveles de glucosa en la sangre debido a la comida. El usuario también puede ajustar manualmente el flujo de la bomba a lo largo del día según necesidad.

Los péptidos reguladores de glucosa son una clase de péptidos que se ha demostrado que tienen potencial terapéutico en el tratamiento de la diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI), diabetes gestacional o diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNDI), el tratamiento de la obesidad y el tratamiento de la dislipidemia. Véase la patente de EE.UU. n° 6.506.724; publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 20030036504A1; patente europea n° EP1083924B1; publicación de solicitud de patente internacional n° WO 98/30231A1; y solicitud de patente internacional n° WO 00/73331A2. Además de la insulina y los análogos de insulina, los péptidos reguladores de glucosa incluyen el péptido análogo al glucagón, GLP, p. ej., GLP-1, las exendinas, en especial exendina-4, también conocida como exenatida, y péptidos de amilina y análogos de amilina tales como pramlintida. Hasta la fecha, estos péptidos se han administrado a seres humanos por inyección.

ZHANG Y y col. ZHONGUA YAOLI XUEBAO - ACTA PHARMACOLOGICA SINICA, SHANGHAI, CN, vol. 22, n° 11, noviembre 2001 (2001-11), páginas 1051-1056, los documentos EP 1031347, US 2003/211972, WO 94/22461, describen composiciones para la administración intranasal que comprenden insulina monomérica, un agente de solubilización (beta-ciclodextrina, en el documento WO 94/22461 una p-ciclodextrina metilpegilada) y un agente tensioactivo.

ZHANG Y y col. describen el uso de desoxicolato sódico como un potente detergente. En el documento EP1031347 se usa didecanoil-fosfatidilcolina.

El documento US 2003/211972 se refiere a sales biliares y fosfolípidos, mientras que el documento WO 94/22461 se centra en la didecanoil-L- α -fosfatidilcolina.

Por lo tanto, se necesita desarrollar formulaciones farmacéuticas para administrar péptidos reguladores de glucosa, en especial insulinas de acción rápida, distintas de la inyección.

Descripción de las figuras

Figura 1. Resultados PK para el estudio de conejo 1 que compara formulaciones de PDF solo con las de PDF con Tween.

Figura 2. Resultados PK para el estudio de conejo 2 que compara la administración IN de formulaciones de PDF con Tween con la administración de SQ de NovoLog.

Figura 3. Resultados PD para el estudio de conejo 1, % de glucosa (escala lineal logarítmica) comparando formulaciones de control IN, PDF IN, PDF con Tween IN, IV y SC.

Figura 4. Resultados PD comparando los datos del estudio 2 con el estudio 1, % de glucosa desde el inicio (gráfica lineal).

Figura 5. Datos PD para grupos dosificados en el estudio preclínico 3, % de glucosa desde el inicio (gráfica lineal).

Figura 6. Datos PD para grupos dosificados en el estudio preclínico 3, comparando formulaciones de PDF con Tween (con y sin DDPC) IN, de PDF SC y de control SC.

Figura 7. Datos PD para grupos dosificados en el estudio preclínico 4, comparando PDF con gelatina al 0,2% que contenía Tween o PG IN (con y sin DDPC).

Figura 8. Datos PK para grupos dosificados en el estudio preclínico 4, comparando PDF con gelatina al 0,2% que contenía Tween o PG IN (con y sin DDPC), TDM hipotónico, TDMI isotónico, PDF oral (con y sin PG y/o DDPC) y control SC.

Figura 9. Datos PD iniciales de % de glucosa para todos los grupos a los que se administraron formulaciones con potenciador de la viscosidad (gelatina, HPMC, MC, Carbomer y CMC); y

Figura 10. Datos PK para todos los grupos a los que se administraron formulaciones con potenciador de la viscosidad (gelatina, HPMC, MC, Carbomer y CMC).

Descripción de la invención

Con el fin de proporcionar una mejor comprensión de la presente invención, se proporcionan las siguientes definiciones:

Insulina y análogos de insulina

La presente invención se centra principalmente en la administración intranasal de insulinas de acción rápida que son capaces de proporcionar niveles máximos en suero en 60 minutos y disminuciones de glucosa en 90 minutos. De acuerdo con la presente invención, los péptidos reguladores de glucosa también incluyen las bases libres, sales de adición de ácido o sales de metales, tales como sales de potasio o de sodio de los péptidos, y péptidos que se han modificado mediante procedimientos tales como amidación, glicosilación, acilación, sulfatación, fosforilación, acetilación, ciclación y otros procedimientos de modificación covalente conocidos.

Tal según se usa en el presente documento, la expresión “insulina humana” incluye la insulina humana recombinante.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácidos inorgánicos, sales de aminas orgánicas, sales de ácidos orgánicos, sales de metales alcalinotérreos, y mezclas de las mismas. Los ejemplos adecuados de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitar, haluro, glucosamina, alquil-glucosamina, sulfato, hidrócloruro, carbonato, hidrobromuro, N,N'-dibenciletilen-diamina, trietanolamina, dietanolamina, trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, dicitlohexilamina, fosfato, sulfato, sulfonato, benzoato, acetato, salicilato, lactato, tartrato, citrato, mesilato, gluconato, tosilato, maleato, fumarato, estearato y sales de los mismos.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, los péptidos descritos antes y las mezclas de los mismos se incorporan en las formulaciones farmacéuticas adecuadas para el suministro transmucosa, en especial el suministro intranasal.

Análogos y miméticos de péptidos

Están incluidos dentro de la definición de péptidos biológicamente activos para usar en la invención los péptidos naturales o sintéticos, terapéutica o profilácticamente activos (compuestos de dos o más aminoácidos unidos de forma covalente), proteínas, fragmentos de péptidos o proteínas, análogos de péptidos o proteínas, y derivados químicamente modificados o sales de péptidos o proteínas activos. Se contempla una amplia variedad de análogos y miméticos de péptidos reguladores de la glucosa útiles para usar en la invención, y la actividad biológica se pueden producir y se puede ensayar de acuerdo con procedimientos conocidos. Con frecuencia, los péptidos o proteínas de péptidos reguladores de la glucosa u otros péptidos o proteínas biológicamente activos para usar en la invención son muteínas que se pueden obtener fácilmente mediante sustitución parcial, adición o delección de aminoácidos en una secuencia de péptido o proteína natural o nativa (p. ej., salvaje, mutante natural o variante alélica). Además, están incluidos los fragmentos biológicamente activos de péptidos o proteínas nativos. Dichos derivados y fragmentos mutantes retienen sustancialmente la actividad biológica deseada del péptido o proteína nativos. En el caso de péptidos o proteínas que tienen cadenas de hidratos de carbono, también están incluidas en la invención variantes biológicamente activas marcadas por alteraciones en estas especies de hidratos de carbono.

Tal según se usa en el presente documento, la expresión “sustitución de aminoácidos conservativa” se refiere a la posibilidad de intercambio general de los restos aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas alifáticas que normalmente se pueden intercambiar, es el de alanina, valina,

leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas con hidroxilo es el de serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es el de asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es el de fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es el de lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales ácidas que contienen azufre es el de cisteína y metionina. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un resto no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro. Igualmente, la presente invención contempla la sustitución de un resto polar (hidrófilo) tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, y entre treonina y serina. Además, se contempla la sustitución de un resto básico tal como lisina, arginina o histidina por otro, o la sustitución de un resto ácido tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro. Los grupos de sustituciones de aminoácidos conservativas de ejemplo son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. Mediante el alineamiento de un análogo de péptido o proteína de forma óptima con el correspondiente péptido o proteína nativo y usando los ensayos adecuados, p. ej., ensayos de unión de receptor o proteína de adhesión, para determinar una actividad biológica seleccionada, se pueden identificar fácilmente los análogos de péptidos y proteínas operables para usar en los procedimientos y las composiciones de la invención. Los análogos de péptidos y proteínas operables normalmente son específicamente inmunorreactivos con anticuerpos contra el correspondiente péptido o proteína nativo.

Agentes potenciadores de la administración en la mucosa

“Los agentes potenciadores de la administración en la mucosa” se definen como compuestos químicos y otros excipientes que, cuando se añaden a una formulación que comprende agua, sales y/o tampones comunes, y péptido regulador de glucosa (la formulación de control), producen una formulación que produce un aumento eficaz del transporte del péptido regulador de la glucosa a través de una mucosa, medido por la concentración máxima ($C_{\text{máx}}$) en la sangre, suero o líquido cefalorraquídeo o por el área bajo la curva, AUC, en una gráfica de concentración frente a tiempo. Una mucosa incluye las superficies mucosas nasal, oral, intestinal, bucal, broncopulmonar, vaginal y rectal, y de hecho incluye todas las revestimientos de membranas secretoras de moco, todas las cavidades corporales o pasajes que comunican con el exterior. Los agentes potenciadores de la administración en la mucosa se llaman a veces “portadores”.

La “formulación sin endotoxinas” significa una formulación que contiene un péptido regulador de glucosa y uno o más agentes potenciadores de la administración en la mucosa, que carece sustancialmente de endotoxinas y/o de sustancias pirógenas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están confinadas dentro de un microorganismo y son liberadas solamente cuando los microorganismos se rompen o mueren. Las sustancias pirógenas incluyen sustancias termolábiles que inducen fiebre (glicoproteínas) procedentes de la membrana exterior de las bacterias y otros microorganismos. Ambas sustancias pueden causar fiebre, hipotensión y choque si se administran a seres humanos. Las formulaciones que se producen careciendo de endotoxinas pueden requerir un equipamiento especial, técnicos expertos, y pueden ser significativamente más caras que la preparación de formulaciones que no carecen de endotoxinas. Puesto que se ha demostrado que la administración intravenosa de GLP o amilina simultáneamente con infusión de endotoxinas en roedores previene la hipotensión e incluso la muerte asociada con la administración de endotoxinas sola (patente de EE.UU. n° 4.839.343), se esperaría que no fuera necesaria la producción de formulaciones exentas de endotoxinas de estos y otros agentes terapéuticos peptídicos reguladores de la glucosa, para la administración no parenteral (no inyectada).

Administración no infundida

La “administración no infundida” significa cualquier procedimiento que no implique una inyección directa a una arteria o vena, un procedimiento que fuerza o dirige (normalmente un fluido) en algo y en especial a introducir en una parte del cuerpo mediante una aguja, jeringuilla u otro procedimiento invasivo. La administración no infundida incluye la inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal y los procedimientos de suministro a una mucosa que no son por inyección.

Procedimientos y composiciones para administración

Los procedimientos y composiciones mejoradas para administración en la mucosa del péptido regulador de glucosa a sujetos mamíferos optimiza las programaciones de administración del péptido regulador de glucosa. La presente invención proporciona el suministro en la mucosa del péptido regulador de glucosa formulado con uno o más agentes potenciadores de la administración en la mucosa, en el que la liberación de la dosificación de péptido regulador de glucosa sustancialmente normalizada y/o sostenida durante un periodo de suministro eficaz del péptido regulador de glucosa, está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 2,0 h; de 0,4 a 1,5 h; de 0,7 a 1,5 h; o de 0,8 a 1,0 h, después de la administración en la mucosa. La liberación sostenida del péptido regulador de glucosa lograda se puede facilitar mediante la administración repetida de péptido regulador de glucosa exógeno usando procedimientos y composiciones de la presente invención. Las composiciones y los procedimientos mejorados para la administración en la mucosa de un péptido regulador de glucosa a sujetos mamíferos optimiza las programaciones de las dosificaciones del péptido regulador de glucosa. La presente invención proporciona un suministro en la mucosa (p. ej. nasal) mejorado de una formulación que comprende el péptido regulador de glucosa en combinación con uno o más agentes potenciadores de la administración en la mucosa y un agente o agentes potenciadores de la liberación sostenida. Los agentes potenciadores de la administración en la mucosa de la presente invención dan un aumento eficaz en el suministro, p. ej., un aumento de la concentración máxima en el plasma ($C_{\text{máx}}$) para potenciar la actividad terapéutica del péptido regulador de glucosa

administrado vía mucosa. Un segundo factor que afecta a la actividad terapéutica del péptido regulador de glucosa en el plasma sanguíneo y el SNC, es el tiempo de permanencia (TP). Los agentes potenciadores de la liberación sostenida, en combinación con agentes potenciadores de la administración intranasal, aumentan la $C_{\max}$ y aumentan el tiempo de permanencia (TP) del péptido regulador de glucosa. También se describen en el presente documento vehículos polímeros de suministro y otros agentes y procedimientos de la presente invención que dan formulaciones potenciadoras de la liberación sostenida, por ejemplo, el polietilenglicol (PEG).

La presente invención proporciona un procedimiento mejorado de suministro del péptido regulador de glucosa y una forma de dosificación para el tratamiento de los síntomas relacionados con enfermedades y afecciones incluyendo la diabetes, hiperglucemia, dislipidemia, inducción de la saciedad en un individuo, promoción de la pérdida de peso en un individuo, obesidad, cáncer de colon, cáncer de próstata, u otros cánceres en un sujeto mamífero.

En las formulaciones de suministro en la mucosa y los procedimientos de esta invención, el péptido regulador de glucosa con frecuencia se combina o se administra de forma coordinada con un portador o vehículo adecuado para el suministro en la mucosa. Tal según se usa en el presente documento, el término "portador" significa carga sólida o líquida, diluyente o material de encapsulación farmacéuticamente aceptable. Un portador líquido que contiene agua puede contener aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de acidificación, agentes de alcalinización, conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes tamponantes, agentes quelantes, agentes de formación de complejos, agentes solubilizantes, humectantes, disolventes, agentes de suspensión y/o agentes de aumento de la viscosidad, agentes de tonicidad, agentes humectantes u otros materiales biocompatibles. Se puede encontrar una tabulación de los ingredientes listados en las categorías anteriores, en el Formulario Nacional y Farmacopea de EE.UU., 1857-1859, 1990. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilenglicol; polioles tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes tales como hidróxido magnésico e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua exenta de pirógenos; disolución salina isotónica; disolución de Ringer, alcohol etílico y disoluciones de tampón fosfato, así como otras sustancias compatibles no tóxicas usadas en las formulaciones farmacéuticas y mezclas de las mismas.

Así pues, algunos ejemplos de humectantes incluyen propilenglicol, glicerina, triacetato de glicerilo, un poliol, un poliol polímero, ácido láctico, urea y mezclas de los mismos.

Algunos ejemplos de tampones y sales tamponantes se basan en glutamato, acetato, glicina, histidina, arginina, lisina, metionina, lactato, formiato, glicolato y mezclas de los mismos.

También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes tales como lauril-sulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes agentes de sabor y perfume, conservantes y antioxidantes, de acuerdo con los deseos del formulador. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen antioxidantes solubles en agua tales como ácidos ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfito sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; antioxidantes solubles en aceite tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y agentes de formación de quelatos tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y mezclas de los mismos. La cantidad de principio activo que se puede combinar con los materiales vehículo para producir una sola forma de dosificación variará dependiendo del modo particular de administración.

En las composiciones y procedimientos de suministro en mucosa de la invención, se usan diferentes agentes potenciadores de la administración que potenciar el suministro del péptido regulador de glucosa en o a través de la superficie de mucosa. En relación con esto, el suministro del péptido regulador de glucosa a través del epitelio de mucosa puede ocurrir de forma "transcelular" o "paracelular". La medida en la que contribuyen estas rutas al flujo global y biodisponibilidad del péptido regulador de glucosa depende del entorno de la mucosa, de las propiedades fisicoquímicas del agente activo y de las propiedades del epitelio de la mucosa. El transporte paracelular implica solo difusión pasiva, mientras que el transporte transcelular puede ocurrir por procesos pasivos, facilitados o activos. En general, los solutos polares e hidrófilos transportados pasivamente se difunden a través de la ruta paracelular, mientras que los solutos más lipófilos usan la ruta transcelular. La absorción y biodisponibilidad (p. ej., como se refleja por un coeficiente de permeabilidad o ensayo fisiológico) se pueden evaluar fácilmente para diferentes solutos absorbidos de forma pasiva y activa, en términos de los componentes de suministro tanto paracelular como transcelular, para cualquier péptido regulador de glucosa seleccionado en la invención. Para los fármacos absorbidos de forma pasiva, la contribución relativa de las rutas paracelular y transcelular al transporte del fármaco depende del pKa, coeficiente de reparto, radio molecular y carga del fármaco, el pH del entorno luminal en el que se libera el fármaco, y el área de la superficie de absorción. La ruta paracelular representa una fracción relativamente pequeña del área superficial accesible del epitelio de la mucosa nasal. En términos generales, se ha descrito que las membranas celulares ocupan un área superficial de la mucosa que es mil veces mayor que el área ocupada por los espacios paracelulares. Por lo tanto, el área accesible más pequeña, y la discriminación basada en tamaño y carga frente a la permeación macromolecular sugerirían que la ruta de suministro paracelular es una ruta menos favorable en general que la transcelular para el transporte del fármaco.

Sorprendentemente, los procedimientos y composiciones de la invención proporcionan un transporte significativamente potenciado de productos bioterapéuticos en y a través del epitelio de la mucosa a través de la ruta paracelular. Por lo tanto, los procedimientos y composiciones de la invención se dirigen satisfactoriamente a las rutas tanto paracelular como transcelular, alternativamente o en un solo procedimiento o composición.

Tal según se usa en el presente documento, los “agentes potenciadores de la administración en la mucosa” incluyen agentes que potencian la liberación o solubilidad (p. ej., de un vehículo de suministro de formulación), tasa de difusión, capacidad y tiempo de penetración, absorción, tiempo de permanencia, estabilidad, semivida eficaz, niveles de concentración máximos o sostenidos, depuración y otras características de suministro en la mucosa deseados (p. ej., medidos en el sitio de suministro, o en un sitio de actividad objetivo seleccionado, tal como el torrente sanguíneo o el sistema nervioso central) del péptido regulador de glucosa u otro(s) compuesto(s) biológicamente activo(s). La potenciación del suministro en la mucosa puede, por lo tanto, ocurrir por cualquiera de una serie de mecanismos, por ejemplo, aumento de la difusión, transporte, persistencia o estabilidad del péptido regulador de glucosa, aumento de la fluidez de la membrana, modulación de la disponibilidad o acción del calcio y otros iones que regulan la permeación intracelular o paracelular, solubilización de componentes de la membrana mucosa (p. ej., lípidos), cambio de niveles de sulfhidrilo de no proteínas y proteínas en los tejidos de mucosa, aumento del flujo de agua a través de la superficie de la mucosa, modulación de la fisiología de unión epitelial, reducción de la viscosidad del moco que reviste el epitelio de la mucosa, reducción de las tasas de depuración mucociliar, y otros mecanismos.

Según se usa en el presente documento, una “cantidad eficaz en la mucosa de péptido regulador de glucosa” contempla el suministro eficaz en la mucosa del péptido regulador de glucosa en un sitio objetivo para la actividad del fármaco en el sujeto, que puede implicar una variedad de rutas de suministro o transferencia. Por ejemplo, un agente activo dado puede encontrar su camino a través de depuraciones entre células de la mucosa y alcanzar una pared vascular adyacente, mientras que por otra ruta el agente puede, de forma pasiva o activa, ser absorbido en las células de la mucosa para actuar dentro de las células o ser descargado o transportado fuera de las células para llegar a un sitio objetivo secundario, tal como la circulación sistémica. Los procedimientos y las composiciones de la invención pueden promover el desplazamiento de los agentes activos a lo largo de una o más de dichas rutas alternativas, o pueden actuar directamente en el tejido de la mucosa o tejido vascular próximo para promover la absorción o penetración del agente o agentes activos. La promoción de la absorción o penetración en este contexto no está limitada a estos mecanismos.

Según se usa en el presente documento, la “concentración máxima ($C_{\text{máx}}$) del péptido regulador de glucosa en un plasma sanguíneo”, el “área bajo la curva de concentración frente a tiempo (AUC) del péptido regulador de glucosa en el plasma sanguíneo”, el “tiempo para la concentración plasmática máxima ($t_{\text{máx}}$) del péptido regulador de glucosa en un plasma sanguíneo” son parámetros farmacocinéticos conocidos para el experto en la materia. Laursen y col., *Eur. J. Endocrinology* 135:309-315, 1996. La “curva de concentración frente al tiempo” mide la concentración del péptido regulador de glucosa en un suero sanguíneo de un sujeto frente al tiempo después de la administración de una dosificación del péptido regulador de glucosa al sujeto, sea por vía intranasal, intramuscular, subcutánea u otra ruta parenteral de administración. La “ $C_{\text{máx}}$ ” es la concentración máxima de péptido regulador de glucosa en suero sanguíneo de un sujeto después de una sola dosificación del péptido regulador de glucosa al sujeto. La “ $t_{\text{máx}}$ ” es el tiempo para alcanzar la concentración máxima de péptido regulador de glucosa en un suero sanguíneo de un sujeto después de administración de una sola dosificación de péptido regulador de glucosa al sujeto.

Según se usa en el presente documento, el “área bajo la curva de concentración frente a tiempo (AUC) del péptido regulador de glucosa en el plasma sanguíneo” se calcula de acuerdo con una regla trapezoidal lineal y con suma de las áreas residuales. Una disminución de 23% o un aumento de 30% entre dos dosificaciones se detectaría con una probabilidad de 90% (error β de tipo II = 10%). La “velocidad de suministro” o la “velocidad de absorción” se calculan por comparación del tiempo ($t_{\text{máx}}$) para alcanzar la concentración máxima ($C_{\text{máx}}$). Tanto $C_{\text{máx}}$ como $t_{\text{máx}}$ se analizan usando procedimientos no paramétricos. Las comparaciones entre las farmacocinéticas de las administraciones del péptido regulador de glucosa intramuscular, subcutánea, intravenosa e intranasal se llevaron a cabo por análisis de varianza (ANOVA). Para las comparaciones de parejas se usa un procedimiento secuencial de Benferroni-Holmes para evaluar la significancia. La relación de dosis-respuesta entre las 3 dosis nasales se calcula por análisis de regresión. $P < 0,05$ se considera significativo. Los resultados se dan como valores medios $\pm$ ETM.

Aunque el mecanismo de promoción de la absorción puede variar con diferentes agentes potenciadores de la administración en la mucosa de la invención, los reactivos útiles en este contexto no afectarán sustancialmente de forma adversa al tejido de la mucosa y se seleccionarán de acuerdo con las características fisicoquímicas del péptido regulador de glucosa particular y otro agente activo o potenciador del suministro. En este contexto, los agentes potenciadores de la administración que aumentan la penetración o la permeabilidad de tejidos de mucosa a menudo darán como resultado alguna alteración de la barrera de permeabilidad protectora de la mucosa. Para que dichos agentes potenciadores de la administración tengan valor en la invención, en general se desea que cualquier cambio significativo en la permeabilidad de la mucosa sea reversible en un marco de tiempo adecuado para la duración deseada de suministro del fármaco. Además, no debe haber una toxicidad sustancial, acumulativa, ni ningún cambio perjudicial permanente inducido en las propiedades de barrera de la mucosa con el uso a largo plazo.

En ciertos aspectos de la invención, los agentes de promoción de la absorción para la administración coordinada o formulación combinatoria con el péptido regulador de glucosa de la invención, se seleccionan de moléculas hidrófilas pequeñas, incluyendo, pero sin limitar, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida, etanol, propilenglicol y 2-pirrolidonas. Alternativamente, se pueden usar moléculas anfipáticas de cadena larga, por ejemplo decilmetilsulfóxido,

azona, laurilsulfato sódico, ácido oleico y sales biliares, para potenciar la penetración en la mucosa del péptido regulador de glucosa. En aspectos adicionales, se usan tensioactivos (p. ej., polisorbatos) como compuestos adyuvantes, agentes de procesamiento o aditivos de la formulación para potenciar el suministro intranasal del péptido regulador de glucosa. Los agentes tales como DMSO, polietilenglicol y etanol, si están presentes en concentraciones suficientemente altas en el entorno de suministro (p. ej., por administración previa o incorporación en una formulación terapéutica), pueden entrar en la fase acuosa de la mucosa y alterar sus propiedades de solubilización, potenciando así el reparto del péptido regulador de glucosa del vehículo a la mucosa.

Así pues, algunos ejemplos de agentes de solubilización incluyen ciclodextrinas, hidroxipropil- β -ciclodextrina, sulfobutileter- β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina y mezclas de los mismos.

Los agentes potenciadores de la administración en la mucosa adicionales que son útiles en la administración coordinada y procedimientos de procesamiento y formulaciones combinadas de la invención incluyen, pero sin limitar, micelas mixtas; enaminas; donadores de óxido nítrico (p. ej., S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina, NOR1, NOR4, que se coadministran preferiblemente con un depurador de NO tal como carboxi-PITO o doclofenaco sódico); salicilato sódico; ésteres de glicerol del ácido acetoacético (p. ej., 1,3-diacetoacetato de glicerilo o 3-acetoacetato de 1,2-isopropilidenglicerina); y otros agentes promotores de la penetración intra o transepitelial o de liberación-difusión que son fisiológicamente compatibles para el suministro en mucosas. Otros agentes promotores de la absorción se seleccionan de una variedad de portadores, bases y excipientes que potencian el suministro en mucosas, la estabilidad, la actividad o la penetración transepitelial del péptido regulador de glucosa. Estos incluyen, entre otros, ciclodextrinas y derivados de β -ciclodextrina (p. ej., 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina y heptakis(2,6-di-O-metil- β -ciclodextrina). Estos compuestos, opcionalmente conjugados con uno o más de los principios activos y además opcionalmente formulados en una base oleaginosa, potencian la biodisponibilidad en las formulaciones para mucosas de la invención. Otros agentes potenciadores de la absorción adicionales adaptados para el suministro en mucosas incluyen ácidos grasos de cadena media, incluyendo mono y diglicéridos (p. ej., extractos de caprato sódico de aceite de coco, Capmul) y triglicéridos (p. ej. amilodextrina, Estaram 299, Miglyol 810).

Las composiciones terapéuticas y profilácticas para la mucosa de la presente invención se pueden complementar con cualquier agente promotor de la penetración adecuado que facilite la absorción, difusión o penetración del péptido regulador de glucosa a través de las barreras de mucosas. El promotor de la penetración puede ser cualquier promotor que sea farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, en aspectos más detallados de la invención, se proporcionan composiciones que incorporan uno o más agentes promotores de la penetración seleccionados de salicilato sódico y derivados del ácido salicílico (salicilato de acetilo, salicilato de colina, salicilamida, etc.); aminoácidos y sales de los mismos (p. ej., ácidos monoaminocarboxílicos tales como glicina, alanina, fenilalanina, prolina, hidroxiprolina etc.; hidroxiaminoácidos tales como serina; aminoácidos tales como ácido aspártico, ácido glutámico, etc.; y aminoácidos básicos tales como lisina etc., incluidas sus sales de metal alcalino o metal alcalinotérreo); y N-acilaminoácidos (N-acetilalanina, N-acetilfenilalanina, N-acetilserina, N-acetilglicina, N-acetil-lisina, ácido N-acetilglutámico, N-acetilprolina, N-acetilhidroxiprolina, etc.) y sus sales (sales de metal alcalino y sales de metal alcalinotérreo). También se proporcionan como agentes promotores de la penetración en los procedimientos y composiciones de la invención, las sustancias que se usan en general como emulsionantes (p. ej., aceite fosfato sódico, lauril-fosfato sódico, lauril-sulfato sódico, miristil-sulfato sódico, éteres de alquilo polioxietilénicos, ésteres de alquilo polioxietilénicos, etc.), ácido caproico, ácido láctico, ácido málico y ácido cítrico y sus sales de metal alcalino, ácidos pirrolidinacarboxílicos, ésteres de ácidos alquilpirrolidinacarboxílicos, N-alquilpirrolidonas, ésteres de prolina-acilo, y similares.

En diferentes aspectos de la invención, se proporcionan formulaciones y procedimientos mejorados de suministro en la mucosa nasal que permiten el suministro del péptido regulador de glucosa y otros agentes terapéuticos de la invención a través de las barreras de mucosas entre los sitios de administración y objetivos seleccionados. Algunas formulaciones están específicamente adaptadas para una célula, tejido u órgano objetivo seleccionados, o incluso un estado patológico particular. En otros aspectos, las formulaciones y los procedimientos proporcionan una endo o transcitosis selectiva y eficaz del péptido regulador de glucosa específicamente a través de una ruta intracelular o intercelular definida. Normalmente, el péptido regulador de glucosa se carga eficazmente a unos niveles de concentración eficaces en un portador u otro vehículo de suministro, y se administra y mantiene en una forma estabilizada, p. ej., en la mucosa nasal y/o durante el paso a través de los compartimentos intracelulares y membranas a un sitio objetivo remoto para la acción del fármaco (p. ej., el torrente sanguíneo o un tejido, órgano o compartimento extracelular definidos). El péptido regulador de glucosa se puede proporcionar en un vehículo de suministro o modificado de otra forma (p. ej., en forma de un profármaco), en el que la liberación o activación del péptido regulador de glucosa es desencadenada por un estímulo fisiológico (p. ej., cambio de pH, enzimas lisosomales, etc.). Con frecuencia, el péptido regulador de glucosa es farmacológicamente inactivo hasta que alcanza su sitio objetivo para la actividad. En la mayoría de los casos, el péptido regulador de glucosa y otros componentes de la formulación no son tóxicos ni inmunógenos. En este contexto, los excipientes y otros componentes de la formulación se seleccionan en general por su capacidad para ser degradados y excretados rápidamente en condiciones fisiológicas. Al mismo tiempo, las formulaciones son química y físicamente estables en la forma de dosificación para la conservación eficaz. Se proporciona una variedad de aditivos, diluyentes, bases y vehículos de suministro en la invención que controlan eficazmente el contenido de agua para potenciar la estabilidad de la proteína. Estos reactivos y materiales vehículo eficaces como agentes de antiagregación en este sentido incluyen, por ejemplo, polímeros de diferentes funcionalidades, tales como polietilenglicol, dextrano, dietilaminodextrano y carboximetilcelulosa, que aumentan significativamente la estabilidad y reducen la agregación de la fase sólida de péptidos y proteínas mezclados con los mismos o unidos a los mismos. En algunos casos, la actividad o estabilidad física de las proteínas también se puede potenciar mediante diferentes aditivos a las disoluciones

acuosas de los fármacos peptídicos o proteínicos. Por ejemplo, se pueden usar aditivos tales como polioles (incluyendo azúcares), aminoácidos, proteínas tales como colágeno y gelatina y diferentes sales.

Algunos aditivos, en particular azúcares y otros polioles, también imparten una estabilidad significativa a las proteínas secas, p. ej. liofilizadas. Estos aditivos también se pueden usar en la invención, para proteger las proteínas frente a la agregación no solo durante la liofilización, sino también durante el almacenamiento en estado seco. Por ejemplo, la sacarosa y Ficoll 70 (un polímero con unidades de sacarosa) presentan una protección importante frente a la agregación de péptidos y proteínas durante la incubación en fase sólida en diferentes condiciones. Estos aditivos pueden potenciar también la estabilidad de las proteínas sólidas insertadas en matrices polímeras.

Otros aditivos adicionales, por ejemplo la sacarosa, estabilizan las proteínas frente a la agregación en estado sólido en atmósferas húmedas a temperaturas elevadas, como puede ocurrir en determinadas formulaciones de liberación sostenida de la invención. Las proteínas tales como la gelatina y el colágeno, también pueden servir como agentes de estabilización o de volumen para reducir la desnaturalización y agregación de las proteínas inestables en este contexto. Estos aditivos se pueden incorporar en procedimientos de fusión de polímero y composiciones en la invención. Por ejemplo, se pueden preparar micropartículas de polipéptidos simplemente mediante liofilización o secado por atomización de una disolución que contiene diferentes aditivos de estabilización descritos antes. Por lo tanto, se puede obtener la liberación sostenida de péptidos y proteínas no agregados a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

En el presente documento se proporcionan diferentes componentes y procedimientos de preparación adicionales, así como aditivos de formulación específicos, que dan formulaciones para el suministro en mucosas de péptidos y proteínas propensos a la agregación, en las que el péptido o proteína se estabilizan en una forma sustancialmente pura y no agregada usando un agente de solubilización. Se contemplan una variedad de componentes y aditivos para usar en estos procedimientos y formulaciones. Son ejemplos de estos agentes de solubilización las ciclodextrinas (CD), que se unen selectivamente a las cadenas laterales hidrófobas de los polipéptidos. Se ha encontrado que estas CD se unen a parches hidrófobos de proteínas de una forma que inhibe significativamente la agregación. Esta inhibición es selectiva con respecto tanto a las CD como a la proteína implicada. Dicha inhibición selectiva de la agregación de proteínas proporciona ventajas adicionales en los procedimientos y composiciones de suministro intranasal de la invención. Los agentes adicionales para usar en este contexto incluyen dímeros, trímeros y tetrámeros de CD con diferentes geometrías controladas por los conectores que bloquean específicamente la agregación de péptidos y proteínas. Además los agentes y procedimientos de solubilización para incorporar en la invención implican el uso de péptidos y miméticos de péptidos para bloquear selectivamente las interacciones proteína-proteína. En un aspecto, la unión específica de cadenas laterales hidrófobas descrita para multímeros de CD se extiende a proteínas mediante el uso de péptidos y miméticos de péptidos que bloquean de forma similar la agregación de proteínas. Está disponible una amplia variedad de procedimientos adecuados y agentes de antiagregación para incorporar en las composiciones y procedimientos de la invención.

Agentes y procedimientos de modificación de la carga y control de pH

Para mejorar las características de transporte de agentes biológicamente activos (incluyendo el péptido regulador de glucosa, otros péptidos y proteínas activos y fármacos macromoleculares y moléculas pequeñas) para el suministro potenciado a través de las barreras de membrana de mucosa hidrófoba, la invención también proporciona técnicas y reactivos para la modificación de carga de agentes biológicamente activos seleccionados o agentes potenciadores de la administración descritos en el presente documento. En relación con esto, las permeabilidades relativas de macromoléculas en general están relacionadas con sus coeficientes de reparto. El grado de ionización de las moléculas, que depende del pK_a de la molécula y del pH en la superficie de la membrana de la mucosa, también afecta a la permeabilidad de las moléculas. La permeación y reparto de agentes biológicamente activo, incluyendo el péptido regulador de glucosa y análogos de la invención, para el suministro en mucosas, se puede facilitar por alteración de la carga o extensión de la carga del agente activo o agente de permeabilización, que se logra, por ejemplo, por alteración de los grupos funcionales cargados, modificando el pH del vehículo o disolución de suministro en el que se administra el agente activo, o por administración coordinada de un reactivo de alteración de la carga o pH con el agente activo.

De acuerdo con estas enseñanzas generales, la administración en mucosas de especies macromoleculares cargadas, incluyendo el péptido regulador de glucosa y otros péptidos y proteínas biológicamente activos, en los procedimientos y las composiciones de la invención, se mejora sustancialmente cuando el agente activo se administra en la superficie de la mucosa en un estado no ionizado o de carga eléctrica sustancialmente neutra.

Algunos péptidos reguladores de la glucosa y otros componentes péptidos y proteínas biológicamente activos de las formulaciones para mucosa para usar en la invención, tendrán la carga modificada para producir un aumento de la densidad de carga positiva del péptido o proteína. Estas modificaciones se extienden también al cationizado de conjugados de péptidos y proteínas, excipientes y otras formas de suministro descritas en el presente documento. El cationizado ofrece un medio conveniente para alterar la biodistribución y propiedades de transporte de proteínas y macromoléculas en la invención. El cationizado se lleva a cabo de una forma que conserva sustancialmente la actividad biológica del agente activo y limita potencialmente efectos secundarios adversos, incluyendo daño y toxicidad de tejidos.

Un “tampón” se usa en general para mantener el pH de una disolución a un valor prácticamente constante. Un tampón mantiene el pH de una disolución, incluso cuando se añaden a la disolución pequeñas cantidades de ácido fuerte o base fuerte, evitando o neutralizando cambios grandes de concentraciones de iones hidrógeno e hidróxido. Un

tampón en general consiste en un ácido débil y su sal adecuada (o una base débil y su sal adecuada). La sal adecuada de un ácido débil contiene el mismo ion negativo presente en el ácido débil (véase, Lagowski, Macmillan Encyclopedia of Chemistry, Vol. 1, Simon & Schuster, New York, 1997, en pág. 273-4). Para describir un tampón se usa la ecuación de Henderson-Hasselbach, $\text{pH} = \text{pK}_a + \log_{10} [\text{A}^-]/[\text{HA}]$, y se basa en la ecuación estándar para la disociación de ácidos débiles, $\text{HA} = \text{H}^+ + \text{A}^-$. Los ejemplos de fuentes de tampón usados normalmente incluyen los siguientes: acetato, tartrato, citrato, fosfato, lactato, glicina, lisina, arginina, histidina, glutamato, metionina, formiato y glicolato.

La “capacidad de tamponamiento” significa la cantidad de ácido o base que se puede añadir a una disolución tampón antes de que se produzca un cambio significativo del pH. Si el pH está en el intervalo de $\text{pK}-1$ y $\text{pK}+1$ del ácido débil, la capacidad de tamponamiento es apreciable, pero fuera de este intervalo disminuye en una medida tal que tiene poco valor. Por lo tanto, un sistema dado solo tiene acción tamponante útil en un intervalo de una unidad de pH por cada lado del pK del ácido débil (o base débil) (véase, Dawson, Data for Biochemical Research, 3ª Edición, Oxford Science Publications, 1986, pág. 419). En general, se eligen concentraciones adecuadas de modo que el pH de la disolución está cerca del pKa del ácido débil (o base débil) (véase Lide, CRC Handbook of Chemistry and Physics, 86ª edición, Taylor & Francis Group, 2005-2006, pág. 2-41). Además, las disoluciones de ácidos y bases fuertes normalmente no están clasificados como disoluciones tampón, y no presentan capacidad de tamponamiento entre valores de pH de 2,4 a 11,6.

Agentes inhibidores de enzimas degradativas y procedimientos

Otro excipiente que se puede incluir en una preparación transmucosa es un inhibidor de enzimas degradativas. Los ejemplos de complejos de inhibidores de enzima-polímero mucoadhesivo que son útiles en las formulaciones y procedimientos de suministro en mucosas en la invención incluyen, pero sin limitar: carboximetilcelulosa-pepstatina (con actividad anti-pepsina); inhibidor poli(ácido acrílico)-Bowman-Birk (anti-quimotripsina); poli(ácido acrílico)-quimostatina (anti-quimotripsina); poli(ácido acrílico)-elastatinal (anti-elastasa); carboximetilcelulosa-elastatinal (anti-elastasa); policarbofil-elastatinal (anti-elastasa); quitosán-antipaina (anti-tripsina); poli(ácido acrílico)-bacitracina (anti-aminopeptidasa N); quitosán-ED-TA (anti-aminopeptidasa N, anti-carboxipeptidasa A); quitosán-EDTA-antipaina (anti-tripsina, anti-quimotripsina, anti-elastasa). Como se describe a continuación con más detalle, algunas realizaciones de la invención incorporarán opcionalmente un nuevo derivado de quitosán o forma químicamente modificada de quitosán. Uno de dichos derivados nuevos para usar en la invención se indica como un polímero de β -[1 $\rightarrow$ 4]-2-guanidino-2-desoxi-D-glucosa (poli-GuD).

Cualquier inhibidor que inhiba la actividad de una enzima para proteger el o los agentes biológicamente activos puede ser útil para usar en las composiciones y procedimientos de la invención. Los inhibidores de enzimas útiles para proteger las proteínas y péptidos biológicamente activos incluyen, por ejemplo, inhibidor de la tripsina de soja, inhibidor de la tripsina exendina, inhibidor de quimotripsina e inhibidores de tripsina y quimotripsina aislados de tubérculos de patata (*solanum tuberosum* L.). Se puede usar una combinación o mezclas de inhibidores. Los inhibidores adicionales de enzimas proteolíticas para usar en la invención incluyen enzima ovomucoide, mesilato de gabaxate, alfa-1 antitripsina, aprotinina, amastatina, bestatina, puromicina, bacitracina, leupepsina, alfa2-macroglobulina, pepstatina e inhibidor de tripsina de soja o clara de huevo. Estos y otros inhibidores se pueden usar solos o combinados. El o los inhibidores se pueden incorporar o unir al portador, p. ej., un polímero hidrófilo como revestimiento sobre la superficie de la forma de dosificación que se va a poner en contacto con la mucosa nasal, o se incorpora en la fase superficial de la superficie, en combinación con el agente biológicamente activo o en una formulación administrada por separado (p. ej. administrada previamente).

La cantidad del inhibidor, p. ej., de un inhibidor de enzima proteolítica que se incorpora opcionalmente en la composición de la invención, variará dependiendo de (a) las propiedades del inhibidor específico, (b) el número de grupos funcionales presentes en la molécula (que se pueden hacer reaccionar para introducir insaturación etilénica necesaria para la copolimerización con monómeros que forman hidrogel), y (c) el número de grupos lecitina, tales como glicósidos, que están presentes en la molécula inhibidora. También puede depender del agente terapéutico específico que se pretende administrar. Hablando en general, una cantidad útil de un inhibidor de enzima es de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, a menudo de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, y más comúnmente de aproximadamente 0,5 mg/ml a 5 mg/ml de la formulación (es decir, una formulación de inhibidor de proteasa separada o formulación combinada con el inhibidor y el agente biológicamente activo).

En el caso de la inhibición de tripsina, los inhibidores adecuados se pueden seleccionar, p. ej., de aprotinina, BBI, inhibidor de tripsina de soja, ovomucoide de pollo, ovinhibidor de pollo, inhibidor de tripsina exendina humana, mesilato de camostat, inhibidores de flavonoides, antipaina, leupeptina, p-aminobenzamidina, AEBSF, TLCK (tosil-lisina clorometilcetona), APMSF, DFP, PMSP, y derivados de poli(acrilato). En el caso de la inhibición de quimotripsina, los inhibidores adecuados se pueden seleccionar, p. ej., de aprotinina, BBI, inhibidor de tripsina de soja, quimostatina, benciloxycarbonil-Pro-Phe-CHO, FK-448, ovinhibidor de pollo, complejos de azúcar y ácidos bifenilborónicos, DFP, PMSF, β -fenilpropionato y derivados de poli(acrilato). En el caso de la inhibición de elastasa, los inhibidores adecuados se pueden seleccionar, p. ej., de elastatinal, metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-clorometilcetona (MPCMK), BBI, inhibidor de tripsina de soja, ovinhibidor de pollo, DFP y PMSF.

Los inhibidores de enzimas adicionales para usar en la invención se seleccionan de una amplia variedad de inhibidores no proteínicos que varían en su grado de potencia y toxicidad. Como se describe con más detalle a continuación, la inmovilización de estos agentes adyuvantes en matrices u otros vehículos de suministro, o el desarrollo de análo-

gos químicamente modificados, se puede implementar fácilmente para reducir o incluso eliminar los efectos tóxicos, cuando se encuentran. Entre este amplio grupo de inhibidores de enzimas candidatos para usar en la invención, están los inhibidores organofosforosos, tales como fluorofosfato de diisopropilo (DFP) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), que son inhibidores irreversibles y potentes de serina proteasas (p. ej., tripsina y quimotripsina). La inhibición adicional de la acetilcolinesterasa por estos compuestos hace que seas muy tóxicos en marcos de suministro no controlados. Otro inhibidor candidato, el fluoruro de 4-(2-aminofenil)metanosulfonilo (AEBSF) tiene una actividad inhibidora comparable a DFP y PMSF, pero es notablemente menos tóxico. El hidrocloreto del fluoruro de (4-aminofenil)-metanosulfonilo (APMSF) es otro inhibidor potente de tripsina, pero no es tóxico en marcos no controlados. En contraste con estos inhibidores el metanosulfonato de 1,2,3,4-tetrahidro-1-naftoato de 4-(4-isopropilpiperadino-carbonil)fenilo (FK-448) es una sustancia de toxicidad baja, que representa un inhibidor potente y específico de la quimotripsina. Otro representante de este grupo de candidatos de inhibidores no proteínicos, y que también presentan un riesgo tóxico bajo es el mesilato de camostat (metanosulfonato de p-(p'-guanidino-benzoiloxi)fenilacetato de N,N'-dimetilcarbamoil-metilo).

Otro tipo más de agente inhibidor de enzimas para usar en los procedimientos y composiciones de la invención, son los aminoácidos y aminoácidos modificados que interfieren con la degradación enzimática de compuestos terapéuticos específicos. Para usar en este contexto, los aminoácidos y aminoácidos modificados son sustancialmente no tóxicos y se pueden producir con un coste bajo. Sin embargo, debido a su pequeño tamaño molecular y buena solubilidad, se diluyen fácilmente y son absorbido en los entornos de las mucosas. No obstante, en condiciones adecuadas, los aminoácidos pueden actuar como inhibidores competitivos reversibles de enzimas proteasas. Algunos aminoácidos modificados pueden presentar una actividad inhibidora mucho más fuerte. Un aminoácido modificado deseado en este contexto se conoce como un inhibidor de "estado de transición". La fuerte actividad inhibidora de estos compuestos se basa en su similitud estructural con un sustrato en su geometría de estado de transición, mientras que normalmente se seleccionan para tener una afinidad mucho mayor para el sitio activo de una enzima que para el propio sustrato. Los inhibidores del estado de transición son inhibidores competitivos reversibles. Los ejemplos de este tipo de inhibidor son derivados del ácido α -aminoborónico, tales como boro-leucina, boro-valina y boro-alanina. El átomo de boro en estos derivados puede formar un ion boronato tetraédrico que se cree que se parece al estado de transición de los péptidos durante su hidrólisis a aminopeptidasas. Estos derivados de aminoácidos son inhibidores potentes y reversibles de aminopeptidasas y se describe que la boro-leucina es más de 100 veces más eficaz en la inhibición de enzimas que la bestatina y más de 1000 veces más eficaz que la puromicina. Otro aminoácido modificado para el que se ha descrito una actividad inhibidora de proteasa fuerte es la N-acetilcisteína, que inhibe la actividad enzimática de la aminopeptidasa N. Este agente adyuvante también presenta propiedades mucolíticas que se pueden usar en los procedimientos y composiciones de la invención para reducir los efectos de la barrera de difusión de moco.

Otros inhibidores de enzimas más para usar en los procedimientos de administración coordinada y formulaciones combinatorias de la invención, se pueden seleccionar de péptidos y péptidos modificados inhibidores de enzimas. Una representación importante de esta clase de inhibidores es el dodecapéptido cíclico, bacitracina, obtenido de *Bacillus licheniformis*. Además de estos tipos de péptidos, algunos dipéptidos y tripéptidos presentan actividad inhibidora débil y no específica hacia algunas proteasas. Por analogía con los aminoácidos, su actividad inhibidora se puede mejorar por modificaciones químicas. Por ejemplo, los análogos dipeptídicos de ácido fosfínico también son inhibidores del "estado de transición" con una actividad inhibidora fuerte hacia las aminopeptidasas. Se han usado supuestamente para estabilizar la leucina encefalina administrada por vía nasal. Otro ejemplo de un análogo del estado de transición es el pentapéptido pepstatina modificado, que es un inhibidor muy potente de la pepsina. El análisis estructural de la pepstatina, mediante ensayo de la actividad inhibidora de varios análogos sintéticos, demostró las principales características estructura-función de la molécula responsable de la actividad inhibidora. Otro tipo especial de péptido modificado incluye inhibidores con una función aldehído en posición terminal en su estructura. Por ejemplo, la secuencia de benciloxycarbonil-Pro-Phe-CHO, que cumple los requisitos de especificidad primarios y secundarios conocidos de la quimotripsina, se ha encontrado que es un potente inhibidor reversible de esta proteasa objetivo. Las estructuras químicas de inhibidores adicionales con una función aldehído en posición terminal, p. ej., antipaina, leupeptina, quimostatina y elastatinal, también se conocen en la técnica, así como las estructuras de otros inhibidores peptídicos modificados, reversibles conocidos, tales como fosforamidón, bestatina, puromicina y amastatina.

Debido a su masa molecular comparablemente alta, los inhibidores de proteasa polipeptídicos son más adecuados que los compuestos más pequeños para el suministro concentrado en una matriz de portador-fármaco. Los agentes adicionales para la inhibición de proteasas en las formulaciones y procedimientos de la invención implican el uso de agentes de formación de complejos. Estos agentes median la inhibición de enzimas privando el entorno intranasal (o la composición preparativa o terapéutica) de cationes divalentes, los cuales son cofactores para muchas proteasas. Por ejemplo, los agentes de formación de complejos EDTA y DTPA cuando se administran de forma coordinada o los agentes adyuvantes formulados de forma combinatoria, en concentración adecuada, serán suficientes para inhibir proteasas seleccionadas potenciando de esta forma el suministro intranasal de agentes biológicamente activos de acuerdo con la invención. Otros representantes de esta clase de agentes inhibidores son EGTA, 1,10-fenantrolinea e hidroxicolina. Además, debido a su propensión a quelar cationes divalentes, estos y otros agentes de formación de complejos son útiles en la invención como agentes de promoción de la absorción directos.

Como se indica con más detalle en otra parte del presente documento, también se contempla el uso de diferentes polímeros, en particular polímeros mucoadhesivos, como agentes inhibidores de enzimas dentro de los procedimientos y composiciones de la invención de administración coordinada, multiprocesamiento y/o formulación combinatoria. Por ejemplo, los derivados de poliácido, tales como poli(ácido acrílico) y policarbofilo, pueden afectar a la activi-

dad de diferentes proteasas, incluyendo tripsina, quimotripsina. El efecto inhibidor de estos polímeros se puede basar también en la formación de un complejo con cationes divalentes tales como Ca^{2+} y Zn^{2+} . También se contempla que estos polímeros pueden servir como parejas de conjugados o portadores para agentes inhibidores de enzimas adicionales, como se ha descrito antes. Por ejemplo, se ha desarrollado un conjugado de quitosán-EDTA que es útil en la invención, y presenta un efecto inhibidor fuerte hacia la actividad enzimática de las proteasas dependientes de cinc. Las propiedades mucoadhesivas de los polímeros después de la unión covalente de otros inhibidores de enzimas en este contexto, no se espera que estén sustancialmente comprometidas, ni tampoco se espera que disminuya la utilidad general de dichos polímeros como un vehículo de suministro para agentes biológicamente activos dentro de la invención. Al contrario, la reducida distancia entre el vehículo de suministro y la superficie de mucosa proporcionada por el mecanismo mucoadhesivo minimizará el metabolismo presistémico del agente activo, mientras que los inhibidores de enzimas covalentemente unidos permanecen concentrados en el sitio de suministro del fármaco, minimizando los efectos de dilución indeseados de los inhibidores, así como los efectos tóxicos y otros efectos secundarios causados por ese modo. De esta forma la cantidad eficaz de un inhibidor de enzima administrado de forma coordinada se puede reducir debido a la exclusión de efectos de dilución.

Los complejos de polímero mucoadhesivo-inhibidor de enzima ilustrativos que son útiles en las formulaciones para mucosa y procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a: carboximetilcelulosa-pepstatina (con actividad anti-pepsina); inhibidor poli(ácido acrílico)-Bowman-Birk (anti-quimotripsina); poli(ácido acrílico)-quimostatina (anti-quimotripsina); poli(ácido acrílico)-elastatinal (anti-elastasa); carboximetilcelulosa-elastatinal (anti-elastasa); policarbofilo-elastatinal (anti-elastasa); quitosán-antipaina (anti-tripsina); poli(ácido acrílico)-bacitracina (anti-aminopeptidasa N); quitosán-EDTA (anti-aminopeptidasa N, anti-carboxipeptidasa A); quitosán-EDTA-antipaina (anti-tripsina, anti-quimotripsina, anti-elastasa).

Agentes y procedimientos de mucolíticos y de eliminación de moco

El suministro eficaz de agentes bioterapéuticos por administración intranasal debe tener en cuenta la menor velocidad de transporte del fármaco a través del revestimiento protector de moco, además de la pérdida de fármaco debida a la unión a glicoproteínas de la capa de moco. El moco normal es una sustancia tipo gel viscoelástica que consiste en agua, electrolitos, mucinas, macromoléculas y células epiteliales desprendidas. Sirve principalmente como un citoprotector y lubricante que cubre los tejidos de mucosa subyacentes. El moco es secretado por células secretoras distribuidas aleatoriamente, situadas en el epitelio nasal y otros epitelios mucosos. La unidad estructural del moco es la mucina. Esta glicoproteína es la responsable principal de la naturaleza viscoelástica del moco, aunque otras macromoléculas también pueden contribuir a esta propiedad. En el moco de la vía aérea, dichas macromoléculas incluyen IgA, IgM, IgE, lisozima y broncotransferrina secretoras producidas localmente, que también tienen una función importante en mecanismos de defensa del huésped.

Los procedimientos de administración coordinada de la presente invención incorporan opcionalmente agentes mucolíticos o eliminadores de moco eficaces, que sirven para degradar, reducir o eliminar moco de las superficies mucosas intranasales para facilitar la absorción de los agentes bioterapéuticos administrados por vía intranasal. En estos procedimientos, se administra de forma coordinada un agente mucolítico o de eliminación de moco como un compuesto adyuvante para potenciar el suministro intranasal del agente biológicamente activo. Alternativamente, se incorpora una cantidad eficaz de un agente mucolítico o de eliminación de moco como un agente de procesamiento en un procedimiento de multiprocesamiento de la invención, o como un aditivo en una formulación combinatoria de la invención, para proporcionar una formulación mejorada que potencia el suministro intranasal de compuestos bioterapéuticos, reduciendo los efectos de barrera del moco intranasal.

Está disponible una variedad de agentes mucolíticos o de eliminación de moco para incorporar en los procedimientos y composiciones de la invención. Basándose en sus mecanismos de acción, los agentes mucolíticos o de eliminación de moco a menudo se pueden clasificar en los siguientes grupos: proteasas (p. ej., pronasa, papaína) que escinden el núcleo de proteína de las glicoproteínas de mucina; compuestos de sulfhidrilo que escinden los enlaces disulfuro de la mucoproteína; y detergentes (p. ej., Triton X-100, Tween 20) que rompen enlaces no covalentes dentro del moco. Los compuestos adicionales en este contexto incluyen, pero no se limitan a sales biliares y tensioactivos, por ejemplo desoxicolato sódico, taurodesoxicolato sódico, glicocolato sódico y lisofosfatidilcolina.

La eficacia de las sales biliares para causar la rotura estructural del moco está en el orden desoxicolato > taurocolato > glicocolato. Otros agentes eficaces que reducen la viscosidad del moco o adhesión para potenciar el suministro intranasal de acuerdo con los procedimientos de la invención, incluyen, p. ej., ácidos grasos de cadena corta y agentes mucolíticos que funcionan por quelación, tales como péptidos de N-acilcolágeno, ácidos biliares y saponinas (la última función en parte quelando Ca^{2+} y/o Mg^{2+} que tienen una función importante en el mantenimiento de la estructura de capa del moco).

Los agentes mucolíticos adicionales para usar en los procedimientos y las composiciones de la invención incluyen N-acetil-L-cisteína (ACS), un potente agente mucolítico que reduce tanto la viscosidad como la adherencia del moco broncopulmonar y se ha publicado que aumenta modestamente la biodisponibilidad nasal de la hormona del crecimiento humana en ratas anestesiadas (de 7,5 a 12,2%). Estos y otros agentes mucolíticos o de eliminación de moco se ponen en contacto con la mucosa nasal, normalmente en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,2 a 20 mM, de forma coordinada con la administración del agente biológicamente activo, para reducir la viscosidad polar y/o elasticidad del moco intranasal.

También se pueden seleccionar otros agentes mucolíticos o de eliminación de moco de una variedad de enzimas glicosidasas, que son capaces de escindir los enlaces glicosídicos dentro de la glicoproteína del moco. La α -amilasa y β -amilasa son representativas de esta clase de enzimas, aunque su efecto mucolítico puede ser limitado. A diferencia de las glicosidasas bacterianas que permiten que estos microorganismos permeen las capas de moco de sus huéspedes.

Para el uso combinatorio con la mayoría de los agentes biológicamente activos en la invención, incluyendo los péptidos y proteínas terapéuticas, en general también son útiles los detergentes no ionogénicos como agentes mucolíticos o de eliminación de moco. Estos agentes normalmente no modificarán o dañarán sustancialmente la actividad de los polipéptidos terapéuticos.

Agentes y procedimientos ciliostáticos

Debido a la capacidad de autolimpieza de algunos tejidos mucosos (p. ej., tejidos de la mucosa nasal) por depuración mucociliar es necesaria como una función protectora (p. ej., para eliminar polvo, alérgenos y bacterias), se ha considerado generalmente que esta función no debía ser deteriorada por los medicamentos para la mucosa. El transporte mucociliar en el tracto respiratorio es un mecanismo de defensa particularmente importante frente a infecciones. Para lograr esta función, el batido ciliar en los pasos nasal y de la vía aérea mueve una capa de moco a lo largo de la mucosa eliminando partículas y microorganismo inhalados.

Los agentes ciliostáticos tienen utilidad en los procedimientos y composiciones de la invención para aumentar el tiempo de permanencia del péptido regulador de glucosa análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento, administrados por vía mucosa (p. ej., intranasal). En particular, el suministro de estos agentes en los procedimientos y composiciones de la invención es potenciado significativamente en algunos aspectos por la administración coordinada o formulación combinatoria de uno o más agentes ciliostáticos que funcionan para inhibir de forma reversible la actividad ciliar de las células mucosas, para proporcionar de forma temporal, el aumento reversible del tiempo de permanencia del agente o agentes administrados por vía mucosa. Para usar en estos aspectos de la invención, los factores ciliostáticos anteriores, específicos o indirectos en su actividad, son todos candidatos para el uso satisfactorio como agentes ciliostáticos en cantidades adecuadas (dependiendo de la concentración, duración y modo de suministro), de modo que dan una reducción o cese transitorio (es decir, reversible) de la depuración mucociliar en el sitio de la mucosa de la administración, para potenciar el suministro del péptido regulador de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento, sin efectos secundarios adversos inaceptables.

En aspectos más detallados, se usa un factor ciliostático específico en una formulación combinada o protocolo de administración coordinada con uno o más proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos, y/u otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento. Se pueden usar diferentes factores ciliostáticos bacterianos aislados y caracterizados en la bibliografía en estas realizaciones de la invención. Los factores ciliostáticos de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* incluyen un derivado de fenacina, un compuesto pio (2-alkil-4-hidroxiquinolinas), y un ramnolípido (también conocido como hemolisina). El compuesto pio produce ciliostasis en concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ y sin lesiones ultraestructurales evidentes. El derivado de fenacina también inhibía la movilidad ciliar pero produce alguna alteración de membrana, aunque en concentraciones sustancialmente mayores de 400 $\mu\text{g/ml}$. La exposición limitada de los explantes de tráquea al ramnolípido dio como resultado ciliostasis, que estaba asociada con membranas ciliares alteradas. La exposición más extensa a ramnolípidos está asociada con la eliminación de los brazos de dineína de los axonemas.

Agentes tensioactivos y procedimientos

En aspectos más detallados de la invención, se puede usar uno o más agentes potenciadores de la penetración en un procedimiento o formulación de suministro en mucosas de la invención, para potenciar el suministro en la mucosa de proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento. Los agentes potenciadores de penetración en la membrana, en este contexto se pueden seleccionar de: (i) un tensioactivo; (ii) una sal biliar; (iii) un aditivo fosfolípido, micela mixta, liposoma o vehículo; (iv) un alcohol; (v) una enamina; (vi) un compuesto donador de NO; (vii) una molécula anfipática de cadena larga; (viii) un potenciador de la penetración hidrófobo pequeño; (ix) sodio o un derivado de ácido salicílico; (x) un éster de glicerol del ácido acetoacético; (xi) un derivado de ciclodextrina o beta-ciclodextrina; (xii) un ácido graso de cadena media; (xiii) un agente de quelación; (xiv) un aminoácido o sal del mismo; (xv) un N-acetilaminoácido o sal del mismo; (xvi) una enzima degradativa para un componente de membrana seleccionado; (xvii) un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos; (xviii) un inhibidor de la síntesis de colesterol; o (xix) cualquier combinación de los agentes potenciadores de penetración en la membrana citados en (i)-(xviii).

Algunos agentes tensioactivos se incorporan fácilmente en las formulaciones y procedimientos de suministro en la mucosa de la invención, como agentes potenciadores de la absorción de la mucosa. Estos agentes, que se pueden administrar de forma coordinada o formular de forma combinatoria con proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento, se pueden seleccionar de un amplio conjunto de tensioactivos conocidos. Los tensioactivos, en general estarán dentro de 3 clases: (1) éteres de polioxietileno no iónicos; (2) sales biliares tales como glicolato sódico (SGC) y desoxicolato (DOC); y (3) derivados de ácido fusídico tales como taurodihidrofusidato (STDHF). Los mecanismos de acción de estas diferentes clases de agentes tensioactivos normalmente incluyen la solubilización del agente biológicamente activo. Para las pro-

teínas y péptidos que forman agregados a menudo, las propiedades tensioactivas de estos promotores de la absorción pueden permitir interacciones con proteínas de modo que se pueden mantener en disolución más fácilmente unidas más pequeñas tales como monómeros recubiertos de tensioactivo. Los ejemplos de otros agentes tensioactivos son dodecanoil-L- α -fosfatidilcolina (DDPC), polisorbato 80 y polisorbato 20. Es de suponer que estos monómeros son unidades más transportables que los agregados. Un segundo mecanismo potencial es la protección del péptido o proteína frente a la degradación proteolítica por las proteasas en el entorno de la mucosa. Se dice que tanto las sales biliares como algunos derivados de ácido fusídico inhiben la degradación proteolítica de proteínas por homogenatos nasales en concentraciones menores o equivalentes a las necesarias para potenciar la absorción de proteínas. Esta inhibición de proteasas puede ser especialmente importante para péptidos con semividas biológicas cortas.

Así pues, algunos ejemplos de agentes tensioactivos incluyen éter polioxietilénico no iónico, ácido fusídico y sus derivados, taurodihidrofusidato sódico, dodecanoil-L- α -fosfatidilcolina, polisorbato 80, polisorbato 20, polietilenglicol, alcohol cetílico, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), alcohol de lanolina, monooleato de sorbitán y mezclas de los mismos.

Agentes potenciadores de la viscosidad

Los agentes potenciadores de la viscosidad o de suspensión pueden afectar a la velocidad de liberación de un fármaco de la formulación de dosificación y a la absorción. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como agentes potenciadores de la viscosidad farmacéuticamente aceptables son gelatina; metilcelulosa (MC); hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC); carboximetilcelulosa; (CMC); celulosa; almidón; Hetastarch; poloxámeros; plurónicos; CMC sódica; sorbitol; goma arábiga; povidona; carbomer; polycarbofil; quitosán; microesferas de clutosán; microesferas de alginato; glutamato de quitosán; resina amberlite; hialuronano; etilcelulosa; maltodextrina DE; almidón de maíz del procedimiento de secado en tambor (DDWM); microesferas de almidón degradables (DSM); desoxiglicolato (GDC); hidroxietilcelulosa (HEC); hidroxipropilcelulosa (HPC); celulosa microcristalina (MCC); poli(ácido metacrílico) y polietilenglicol; sulfobutiléter-B-ciclodextrina; bioesferas de almidón eldexómero reticulado; taurodihidrofusidato sódico (STDHF); cloruro de N-trimetilquitosán (TMC); microesferas de almidón degradado; resina de amberlite; nanopartículas de quitosán; crosopovidona secada por atomización; microesferas de dextrano secadas por atomización; celulosa microcristalina secada por atomización; y microesferas de almidón de eldexómero reticulado. Otros agentes potenciadores de la viscosidad en Ugwoke, y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29:1656-57, 1998, se incorporan por referencia.

Enzimas de degradación e inhibidores de la síntesis de ácidos grasos y colesterol

En aspectos relacionados de la invención, las proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos para la administración en la mucosa se formulan o administran de forma coordinada con un agente potenciador de la penetración seleccionado de una enzima de degradación o un agente estimulador metabólico o inhibidor de la síntesis de ácidos grasos, esteroides y otros componentes de la barrera epitelial seleccionados, patente de EE.UU. nº 6.190.894. Por ejemplo, se pueden usar enzimas degradativas tales como fosfolipasa, hialuronidasa, neuramidasa y condroitinasa para potenciar la penetración en la mucosa de proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos, sin causar daño irreversible a la barrera de mucosa. En una realización, se usa condroitinasa en un procedimiento o composición proporcionados en el presente documento para alterar los constituyentes de glicoproteína o glicolípido de la barrera de permeabilidad de la mucosa, potenciando así la absorción en la mucosa de proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento.

Con respecto a los inhibidores de la síntesis de constituyentes de la barrera de mucosa, hay que indicar que los ácidos grasos libres dan cuenta de 20-25% en peso de los lípidos epiteliales. Dos enzimas limitantes de la velocidad en la biosíntesis de ácidos grasos libres, son la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintetasa. A lo largo de una serie de etapas, los ácidos grasos libres son metabolizados en fosfolípidos. Por lo tanto, los inhibidores de la síntesis y metabolismo de ácidos grasos libres para usar en los procedimientos y composiciones de la invención incluyen, pero sin limitar, inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa tales como ácido 5-tetradeciloxi-2-furancarboxílico (TOFA); inhibidores de la ácido graso sintetasa; inhibidores de la fosfolipasa A tales como gomisina A, ácido 2-(p-amilcinamilo)amino-4-clorobenzoico, bromuro de bromofenacilo, manoalida, ácido 7,7-dimetil-5,8-icosadienoico, nicergolina, cefarantina, nicardipina, quercetina, dibutiril-AMP cíclico, R-24571, N-oleoiletanolamina, N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il) fosfatidil-serina, ciclosporina A, anestésicos tópicos, incluyendo dibucaina, prenilamina, retinoides, tales como ácido todo trans y 13-cis-retinoico, W-7, trifluoperazina, R-24571 (calmidazolio), 1-hexadecil-3-trifluoroetilglicero-sn-2-fosfomentol (MJ33); bloqueadores de canales de calcio incluyendo nicardipina, verapamilo, diltiazem, nifedipina y nimodipina; compuestos antimalaria incluyendo quinacrina, mepacrina, cloroquina e hidroxicloroquina; bloqueadores beta incluyendo propanolol y labetalol; antagonistas de calmodulina; EGTA; timersol; glucocorticosteroides incluyendo dexametasona y prednisolona; y agentes antiinflamatorios no esteroideos incluyendo indometacina y naproxeno.

Los esteroides libres, principalmente el colesterol, dan cuenta de 20-25% en peso de los lípidos epiteliales. La enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol es la 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) CoA reductasa. Los inhibidores de la síntesis del colesterol para usar en los procedimientos y composiciones de la invención incluyen, pero sin limitar, inhibidores competitivos de la (HMG) CoA reductasa, tales como simvastatina, lovastatina, fluvastatina (fluvastatina), pravastatina, mevastatina, así como otros inhibidores de la HMG CoA reductasa, tales como oleato de

colesterol, sulfato y fosfato de colesterol, y esteroides oxigenados, tales como 25-OH- y 26-OH-colesterol; inhibidores de la escualeno sintetasa; inhibidores de la escualeno epoxidasa; inhibidores de las DELTA7 o DELTA24 reductasas tales como 22,25-diazacolesterol, 20,25-diazacolesterol, AY9944 y triparanol.

5 Cada uno de los inhibidores de la síntesis de ácidos grasos o inhibidores de la síntesis de esteroides se puede administrar de forma coordinada o formular de forma combinatoria con uno o más proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento para lograr la penetración epitelial potenciada del agente o agentes activos. Un intervalo de concentración eficaz para el inhibidor de esteroides en una formulación terapéutica o adyuvante para el suministro en la mucosa, en general es de
10 aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 20% en peso del total, más típicamente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5%.

Agentes donadores de ácido nítrico y procedimientos

15 En otros aspectos relacionados de la invención, se selecciona un donador de óxido nítrico (NO) como agente potenciador de penetración en la membrana para potenciar el suministro en la mucosa de uno o más proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento. Se conocen diferentes donadores de NO en la técnica y son útiles en concentraciones eficaces en los procedimientos y formulaciones de la invención. Los donadores de NO de ejemplo incluyen, pero no se limitan a
20 nitroglicerina, nitroprusida, NOC5 [3-(2-hidroxi-1-(metil-etil)-2-nitrosohidrazino)-1-propanamina], NOC12 [N-etil-2-(1-etil-hidroxi-2-nitrosohidrazino)-etanamina], SNAP [S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina], NOR1 y NOR4. En los procedimientos y composiciones de la invención, una cantidad eficaz de un donador de NO se administra de forma coordinada o se formula de forma combinatoria con uno o más proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento, en o a través del epitelio de
25 la mucosa.

Agentes para modular la estructura y/o fisiología de la unión epitelial

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene uno o más proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y/u otros agentes biológicamente activos en combinación con agentes potenciadores de la administración en la mucosa descritos en el presente documento formulados en una preparación farmacéutica para el suministro en la mucosa.

35 El agente de permeabilización potencia de forma reversible el transporte paracelular epitelial de la mucosa, normalmente modulando la estructura y/o fisiología de la unión epitelial en la superficie epitelial de la mucosa en un sujeto. Este efecto normalmente implica la inhibición por el agente de permeabilización de la unión homotípica o heterotípica entre proteínas adhesivas de la membrana epitelial de células epiteliales vecinas. Las proteínas objetivo para este bloqueo de la unión homotípica o heterotípica, se pueden seleccionar de diferentes moléculas de adhesión de la unión (JAM), ocludinas o claudinas. Ejemplos de estas son anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos
40 monocatenarios que se unen a los dominios extracelulares de estas proteínas.

En más realizaciones detalladas adicionales, la invención proporciona péptidos de permeabilización y análogos y miméticos de péptidos para potenciar el transporte paracelular epitelial de la mucosa. Los péptidos objetivo y análogos de péptidos y miméticos normalmente funcionan en las composiciones y procedimientos de la invención modulando la
45 estructura y/o fisiología de la unión epitelial en un sujeto mamífero. En algunas realizaciones, los péptidos y análogos y miméticos de péptidos inhiben eficazmente la unión homotípica y/o heterotípica de una proteína adhesiva de la membrana epitelial seleccionada de las moléculas de adhesión de la unión (JAM) ocludina o claudina.

Uno de dichos agentes que se ha estudiado ampliamente es la toxina bacteriana de *Vibrio cholerae* conocida como
50 "toxina de la zónula oclusiva" (ZOT). Esta toxina media la permeabilidad de la mucosa intestinal aumentada y causa síntomas de enfermedad incluyendo diarrea en los sujetos infectados. Fasano, y col., *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 8:5242-5246, 1991. Cuando se ensaya en la mucosa ileal de conejo, ZOT aumentaba la permeabilidad intestinal modulando la estructura de las uniones estrechas intercelulares. Más recientemente, se ha encontrado que ZOT es capaz de abrir de forma reversible las uniones estrechas en la mucosa intestinal. También se ha publicado que ZOT es
55 capaz de abrir de forma reversible las uniones estrechas en la mucosa nasal. Patente de EE.UU. n° 5.908.825.

En los procedimientos y composiciones de la invención, ZOT, así como diferentes análogos y miméticos de ZOT que funcionan como agonistas o antagonistas de la actividad de ZOT, son útiles para potenciar el suministro intranasal de agentes biológicamente activos, aumentando la absorción paracelular en y a través de la mucosa nasal. En este
60 contexto, ZOT actúa típicamente causando una reorganización estructural de las uniones estrechas marcadas por la localización alterada de la proteína de unión ZO1. En estos aspectos de la invención, ZOT se administra de forma coordinada o se formula de forma combinatoria con el agente biológicamente activo en una cantidad eficaz para dar una absorción significativamente potenciada del agente activo, aumentando de forma reversible la permeabilidad de la mucosa nasal sin sustanciales efectos secundarios adversos.

65

Agentes vasodilatadores y procedimientos

Otra clase más de agentes promotores de la absorción que presentan utilidad beneficiosa en los procedimientos y composiciones de administración coordinada y formulación combinatoria de la invención, son los compuestos vasoactivos, más específicamente vasodilatadores. Estos compuestos funcionan en la invención para modular la estructura y la fisiología de la vasculatura submucosa, aumentando la velocidad de transporte del péptido regulador de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos, en o a través del epitelio de la mucosa y/o a tejidos objetivo específicos o compartimentos (p. ej., la circulación sistémica o el sistema nervioso central).

Los agentes vasodilatadores para usar en la invención normalmente causan la relajación de los vasos sanguíneos de la submucosa por disminución del calcio citoplasmático, un aumento del óxido nítrico (NO) o por inhibición de la cadena ligera de miosina de la quinasa. En general se dividen en 9 clases: antagonistas de calcio, agente de apertura de canales de potasio; inhibidores de ACE; antagonistas del receptor de angiotensina II, antagonistas del receptor α -adrenérgico y de imidazol, agonistas β 1-adrenérgicos, inhibidores de fosfoesterasa, icosanoides y donadores de NO.

A pesar de las diferencias químicas, las propiedades farmacocinéticas de los antagonistas de calcio son similares. La absorción en la circulación sistémica es alta, y por lo tanto, estos agentes experimentan un metabolismo de primer paso considerable por el hígado, dando como resultado la variación individual en la farmacocinética. Excepto para los fármacos más nuevos del tipo dihidropiridina (amlodipina, felodipina, isradipina, nilvadipina, nislodipina y nitrendipina), la semivida de los antagonistas de calcio es corta. Por lo tanto, para mantener una concentración de fármaco eficaz para muchos de estos, puede ser necesario el suministro de múltiples dosis o de formulaciones de liberación controlada, como se describe en otra parte en el presente documento. El tratamiento con el agente de apertura de canales de potasio minoxidil también puede estar limitado en forma y nivel de administración debido a los potenciales efectos secundarios adversos.

Los inhibidores de ACE evitan la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, y son más eficaces cuando se aumenta la producción de renina. Puesto que la ACE es idéntica a la quininasa II, que inactiva la potente vasodilatadora endógena bradiquinina, la inhibición de ACE produce una reducción en la degradación de la bradiquinina. Los inhibidores de ACE proporcionan la ventaja añadida de los efectos cardioprotectores y cardioperativos, previniendo e invirtiendo la fibrosis cardíaca e hipertrofia ventricular en modelos animales. La ruta de eliminación predominante de la mayoría de los inhibidores de ACE es la excreción renal. Por lo tanto, la insuficiencia renal está asociada con la menor eliminación y se recomienda una reducción de la dosificación de 25 a 50% en pacientes con insuficiencia renal de moderada a grave.

Con respecto a los donadores de NO, estos compuestos son particularmente útiles en la invención por sus efectos adicionales en la permeabilidad de la mucosa. Además de los donadores de NO indicados antes, los complejos de NO con nucleófilos llamados NO/nucleófilos o NONOatos, liberan NO de forma espontánea y no enzimática cuando se disuelven en disolución acuosa a pH fisiológico. A diferencia de estos, los vasodilatadores de tipo nitro tales como la nitroglicerina requieren la actividad enzimática específica para la liberación de NO. Los NONOatos liberan NO con una estequiometría definida y velocidades predecibles en el intervalo de <3 minutos para la dietilamina/NO a aproximadamente 20 horas para la dietilentriamina/NO (DETANO).

En algunos procedimientos y composiciones de la invención, un agente vasodilatado seleccionado se administra de forma coordinada (p. ej., por vía sistémica o intranasal, simultáneamente o en una asociación temporal eficaz combinatoria) o se formula de forma combinatoria con uno o más péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otro agente o agentes biológicamente activos en una cantidad eficaz para potenciar la absorción en la mucosa del agente o agentes activos para alcanzar un tejido o compartimento objetivo en el sujeto (p. ej., el hígado, la vena porta hepática, tejido o fluido del SNC o plasma sanguíneo).

Agentes potenciadores del transporte selectivo y procedimientos

Las composiciones y los procedimientos de suministro de la invención incorporan opcionalmente un agente potenciador del transporte selectivo que facilita el transporte de uno o más agentes biológicamente activos. Estos agentes potenciadores del transporte se pueden usar en una formulación combinatoria o protocolo de administración coordinada con uno o más de las proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos descritos en el presente documento, para potenciar de forma coordinada el suministro de uno o más agentes biológicamente activos adicionales a través de las barreras de transporte de la mucosa, para potenciar el suministro en la mucosa del agente o agentes activos para alcanzar un tejido o compartimento objetivo en el sujeto (p. ej., el epitelio de la mucosa, hígado, tejido o fluido del SNC o plasma sanguíneo). Alternativamente, los agentes potenciadores del transporte se pueden usar en una formulación combinatoria o protocolo de administración coordinada para potenciar directamente el suministro en la mucosa de uno o más proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos, con o sin el suministro potenciado de un agente biológicamente activo adicional.

Los agentes potenciadores del transporte selectivos ilustrativos para usar en este aspecto de la invención incluyen, pero sin limitar, glicósidos, moléculas que contienen azúcar y agentes aglutinantes tales como agentes aglutinantes de lecitina, que se sabe que interaccionan específicamente con componentes de la barrera del transporte epitelial. Por ejemplo, los ligandos "bioadhesivos" específicos, incluyendo diferentes lecitinas vegetales y bacterianas, que se unen a los restos de azúcar de la superficie celular por interacciones mediadas por el receptor, se pueden usar como portadores

o mediadores de transporte conjugados para potenciar el suministro en la mucosa, p. ej. nasal, de agentes biológicamente activos de la invención. Algunos ligandos bioadhesivos para usar con la invención mediarán la transmisión de señales biológicas de células epiteliales objetivo que desencadenan la absorción selectiva del ligando adhesivo por procesos de transporte celular especializado (endocitosis o transcitosis). Por lo tanto, estos mediadores del transporte se pueden usar como un “sistema portador” para estimular o para la absorción selectiva directa de uno o más proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otro agente o agentes biológicamente en y/o a través del epitelio de la mucosa. Estos y otros agentes potenciadores del transporte selectivos potencian significativamente el suministro en la mucosa de productos biofarmacéuticos macromoleculares (en particular péptidos, proteínas, oligonucleótidos y vectores polinucleótidos) de la invención. Las lecitinas son proteínas vegetales que se unen a azúcares específicos que se encuentran en la superficie de glicoproteínas y glicolípidos de células eucariotas. Las disoluciones concentradas de lecitinas tienen un efecto “atractor de moco”, y varios estudios han demostrado la rápida endocitosis mediada por receptor (RME) de lecitinas y conjugados de lecitinas (p. ej. conjugado de concanavalina A con partículas de oro coloidal) a través de las superficies de mucosas. Se ha publicado en estudios adicionales que los mecanismos de absorción para las lecitinas se pueden usar para dirigir fármacos intestinales *in vivo*. En algunos de estos estudios, se acoplaron covalentemente nanopartículas de poliestireno (500 nm) con lecitina de tomate y se describió que daba una absorción sistémica mejorada después de la administración oral a ratas.

Además de las lecitinas vegetales, los factores de adhesión e invasión microbiana proporcionan una fuente rica de candidatos para usar como portadores de transporte selectivo/adhesivo en los procedimientos y composiciones de suministro en la mucosa de la invención. Son necesarios dos componentes para procesos de adherencia bacteriana, una “adhesina” bacteriana (factor de adherencia o colonización) y un receptor en la superficie de la célula huésped. Las bacterias que causan infecciones en mucosas necesitan penetrar en la capa de moco antes de unirse ellas mismas a la superficie epitelial. Esta unión normalmente es mediada por estructuras bacterianas de fimbrias o pilis, aunque también pueden formar parte del procedimiento otros componentes de la superficie celular. Las bacterias adherentes colonizan el epitelio de la mucosa por multiplicación e inicio de una serie de reacciones bioquímicas dentro de la célula objetivo por mecanismos de transducción de señales (con o sin la ayuda de toxinas). Asociados con estos mecanismos invasivos, se conoce una amplia diversidad de proteínas bioadhesivas (p. ej., invasina, internalina) producidos originalmente por diferentes bacterias y virus. Esto permite la unión extracelular de dichos microorganismos con una selectividad espectacular para las especies huésped e incluso tejidos objetivo particulares. Las señales transmitidas por dichas interacciones de receptor-ligando desencadenan el transporte de microorganismos vivos intactos en, y finalmente a través, de las células epiteliales por procesos de endocitosis y transcitosis. Dichos fenómenos naturales se pueden aprovechar (p. ej., por formación de complejos con agentes biológicamente activos tales como el péptido regulador de glucosa con una adhesina) de acuerdo con las enseñanzas del presente documento, para potenciar el suministro de compuestos biológicamente activos en o a través del epitelio de la mucosa y/o de otros sitios objetivos designados de acción del fármaco.

También son útiles diferentes bacterias y toxinas de plantas que se unen a superficies epiteliales de una forma específica como la lecitina, en los procedimientos y composiciones de la invención. Por ejemplo, la toxina diftérica (DT) entra en las células huésped rápidamente por RME. Igualmente, la subunidad B de la toxina lábil al calor de *E. coli* se une al borde del cepillo de las células epiteliales intestinales de una forma muy específica, como la lecitina. La absorción de esta toxina y la transcitosis al lado basolateral de los enterocitos se ha descrito *in vivo* e *in vitro*. Otras investigaciones han expresado el dominio de transmembrana de la toxina diftérica en *E. coli* como una proteína de fusión de unión de maltosa y que se acopla químicamente a poli-L-lisina de alto peso molecular. El complejo resultante se usa satisfactoriamente para mediar la internalización de un gen indicador *in vitro*. Además de estos ejemplos, *Staphylococcus aureus* produce un conjunto de proteínas (p. ej., enterotoxina A estafilocócica (SEA), SEB, toxina 1 de síndrome de choque tóxico (TSST-1) que actúan ambas como superantígenos y como toxinas. Los estudios relacionados con estas proteínas han descrito la transcitosis dependiente de la dosis facilitada por SEB y TSST-1 en células Caco-2.

Las hemaglutininas víricas comprenden otro tipo de agente de transporte para facilitar el suministro en la mucosa de agentes biológicamente activos en los procedimientos y composiciones de la invención. La etapa inicial en muchas infecciones víricas es la unión de proteínas de superficie (hemaglutininas) a células de la mucosa. Estas proteínas de unión se han identificado para la mayoría de los virus, incluyendo rotavirus, virus de varicela zoster, virus del bosque de Semliki, adenovirus, virus del enrollamiento de la hoja de la patata, y reovirus. Estas y otras hemaglutininas víricas de ejemplo se pueden usar en una formulación combinatoria (p. ej., una mezcla o formulación conjugada) o protocolo de administración coordinada con uno o más péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos descritos en el presente documento, para potenciar de forma coordinada el suministro en la mucosa de uno o más agentes biológicamente activos adicionales. Alternativamente, las hemaglutininas víricas se pueden usar en una formulación combinatoria o protocolo de administración combinada para potenciar directamente el suministro en la glucosa de uno o más proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos, con o sin el suministro potenciado de un agente biológicamente activo adicional.

También están disponibles una variedad de factores endógenos mediadores del transporte selectivo para usar en la invención. Las células de mamífero han desarrollado una serie de mecanismos para facilitar la internalización de sustratos específicos o dirigirlos a compartimentos definidos. De forma colectiva, estos procesos de deformaciones de membrana se denominan “endocitosis” y comprenden fagocitosis, pinocitosis, endocitosis mediada por receptor (RME mediada por clatrina) y potocitosis (RME no mediada por clatrina). La RME es un proceso biológico celular muy específico, mediante el cual, como implica su nombre, diferentes ligandos se unen a los receptores de superficie

celular y posteriormente son internalizados y transportados dentro de la célula. En muchas células, el proceso de endocitosis es tan activo que la superficie entera de la membrana es internalizada y sustituida en menos de media hora. Se proponen dos clases de receptores basados en su orientación en la membrana celular; el extremo amino de los receptores de tipo I está situado en el lado extracelular de la membrana, mientras que los receptores de tipo II tienen esta misma cola de proteína en el medio intracelular.

Otras realizaciones más de la invención usan transferrina como un portador o estimulante de la RME de agentes biológicamente activos suministrados por vía mucosa. La transferrina, una glicoproteína transportadora de hierro de 80 kDa, es absorbida eficazmente en las células por RME. Los receptores de transferrina se encuentran en la superficie de la mayoría de las células que proliferan, en número elevado en eritroblastos y en muchas clases de tumores. Se dice que la transcitosis de transferrina (Tf) y los conjugados de transferrina están potenciados en presencia de Brefeldina A (BFA), un metabolito fúngico. En otros estudios, se ha descrito que el tratamiento con BFA aumenta rápidamente la endocitosis apical tanto de ricina como HRP en células MDCK. Por lo tanto, la BFA y otros agentes que estimulan el transporte mediado por receptor se pueden usar en los procedimientos de la invención como agentes formulados de forma combinatoria (p. ej. conjugados) y/o administrados de forma coordinada, para potenciar el transporte mediado por receptor de agentes biológicamente activos, incluyendo proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos.

Vehículos poliméricos de administración y procedimientos

En algunos aspectos de la invención, las proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos, otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento, y los agentes potenciadores de la administración descritos antes, de forma individual o combinatoria, se incorporan en una formulación administrada por vía mucosa (p. ej., nasal) que incluye un polímero biocompatible que funciona como un portador o base. Dichos portadores polímeros incluyen vehículos de suministro de tipo polvos polímeros, matrices o micropartículas, entre otras forma de polímero. El polímero puede ser de origen vegetal, animal o sintético. Con frecuencia, el polímero está reticulado. Además, en estos sistemas de suministro, el péptido regulador de glucosa, análogo o mimético, se puede funcionalizar de una forma en la que se puede unir covalentemente al polímero y convertirse en inseparable del polímero por simple separación. En otras realizaciones, el polímero se modifica químicamente con un inhibidor de enzimas u otros agentes que pueden degradar o inactivar el agente o agentes biológicamente activos y/o agente o agentes potenciadores de la administración. En algunas formulaciones, el polímero es parcialmente o completamente insoluble en agua pero el polímero se hincha en agua, p. ej., un hidrogel. Los polímeros útiles en este aspecto de la invención es deseable que sean de naturaleza interactiva con el agua y/o hidrófilos para absorber cantidades significativas de agua, y a menudo forman hidrogeles cuando se ponen en contacto con agua o medio acuoso durante un período de tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio con el agua. En realizaciones más detalladas, el polímero es un hidrogel que, cuando se pone en contacto con exceso de agua, absorbe al menos dos veces su peso de agua en el equilibrio, cuando se expone a agua a temperatura ambiente. Patente de EE.UU. n° 6.004.583.

Se prefieren los sistemas de administración de fármacos basados en polímeros biodegradables en muchas aplicaciones biomédicas porque dichos sistemas se rompen por hidrólisis o por reacción enzimática en moléculas no tóxicas. La velocidad de degradación se controla manipulando la composición de la matriz polímera biodegradable. Por lo tanto, estos tipos de sistemas se pueden usar en determinadas situaciones para la liberación a largo plazo de agentes biológicamente activos. Los polímeros biodegradables tales como poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA) y poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) han recibido una atención considerable como posibles portadores de suministro de fármaco, puesto que se ha encontrado que los productos de degradación de estos polímeros tienen toxicidad baja. Durante la función metabólica normal del cuerpo, estos polímeros se degradan en dióxido de carbono y agua. Estos polímeros también han presentado una biocompatibilidad excelente.

Para prolongar la actividad biológica del péptido regulador de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento, así como agentes potenciadores de la administración opcionales, estos agentes se pueden incorporar en matrices polímeras, p. ej., poliortoésteres, polianhídridos o poliésteres. Esto da una actividad y liberación sostenidas del agente o agentes activos, p. ej, determinado por la degradación de la matriz de polímero. Aunque la encapsulación de las moléculas bioterapéuticas dentro de polímeros sintéticos puede estabilizarlas durante el almacenamiento y el suministro, el mayor obstáculo de la tecnología de liberación basada en polímeros es la pérdida de actividad de las moléculas terapéuticas durante los procedimientos de formulación que a menudo implican calor, ultrasonidos o disolventes orgánicos.

Los polímeros promotores de la absorción contemplados para usar en la invención, pueden incluye derivados y versiones química o físicamente modificadas de los tipos de polímeros anteriores, además de otros polímeros naturales o sintéticos, gomas, resinas y otros agentes, así como mezclas de estos materiales entre sí o con otros polímeros, siempre que las alteraciones, modificaciones o la mezcla no afecten de forma adversa a las propiedades deseadas, tales como la absorción de agua, formación de hidrogel y/o estabilidad química para una aplicación útil. En aspectos más detallados de la invención, los polímeros como el nailon, acrilán y otros polímeros sintéticos normalmente hidrófobos, se pueden modificar suficientemente por reacción, para convertirse en hinchables en agua y/o formar geles estables en medio acuoso.

Los polímeros promotores de la invención pueden incluir polímeros del grupo de homo y copolímeros basados en diferentes combinaciones de los siguientes monómeros de vinilo: ácidos acrílico y metacrílico, acrilamida, metacril-

mida, acrilato o metacrilato de hidroxietilo, vinilpirrolidonas, así como poli(alcohol vinílico) y sus co y terpolímeros, poli(acetato de vinilo), sus co y terpolímeros con los monómeros listados antes y ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPS®). Son muy útiles los copolímeros de los monómeros listados antes con monómeros funcionales copolimerizables, tales como acrilamida o metacrilamida, ésteres de acrilato o metacrilato, en los que los grupos ésteres derivan de alquilo de cadena lineal o ramificada, arilo que tiene hasta 4 anillos aromáticos, que pueden contener sustituyentes alquilo de 1 a 6 carbonos, monómeros esteroideos, sulfatos, fosfatos o monómeros catiónicos tales como N,N-dimetilaminoalquil(met)acrilamida, (met)acrilato de dimetilaminoalquilo, cloruro de (met)acriloxialquiltrimetilamonio, cloruro de (met)acriloxialquildimetilbencilamonio.

Los polímeros promotores de la absorción adicionales para usar en la invención, son los clasificados como dextrans, dextrinas, y de la clase de materiales clasificados como gomas naturales y resinas, o de la clase de polímeros naturales tales como colágeno procesado, quitina, quitosán, pululano, zooglano, alginatos y alginatos modificados tales como "Kelcoloid" (un alginato modificado con polipropilenglicol), gomas de gelano tales como "Kelcogel", gomas de xantano tales como "Keltrol", estatina, alfa-hidroxibutirato y sus copolímeros, ácido hialurónico y sus derivados, poli(ácidos láctico y glicólico).

Una clase de polímeros muy útil que se pueden aplicar en la presente invención, son los ácidos carboxílicos etilénicamente insaturados que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono olefínico activado, y al menos un grupo carboxilo; es decir, un ácido o grupo funcional que se puede convertir fácilmente en un ácido que contiene un doble enlace olefínico que funciona fácilmente en la polimerización debido a su presencia en la molécula de monómero, sea en la posición alfa con respecto a un grupo carboxilo, o como parte de un grupo metileno terminal. Los ácidos olefínicamente insaturados de esta clase incluyen materiales tales como ácidos acrílicos caracterizados por el propio ácido acrílico, ácido alfa-cianoacrílico, ácido beta-metilacrílico (ácido crotónico), ácido alfa-fenilacético, ácido beta-acriloxipropiónico, ácido cinámico, ácido p-clorocinámico, ácido 1-carboxi-4-fenil-1,3-butadieno, ácido itacónico, ácido citracónico, ácido mesacónico, ácido glutacónico, ácido aconítico, ácido maleico, ácido fumárico y ácido tricarboxietileno. Tal según se usa en el presente documento, la expresión "ácido carboxílico" incluye poli(ácidos carboxílicos) y los ésteres acrílicos de alquilo superior son acrilato de decilo, metacrilato de isodecilo, acrilato de laurilo, acrilato de estearilo, acrilato de behenilo y acrilato de melisilo y versiones de metacrilato del mismo. Se pueden polimerizar satisfactoriamente mezclas de dos o tres o más ésteres acrílicos de cadena larga con uno de los monómeros carboxílicos. Otros comonómeros incluyen olefinas, incluyendo alfa-olefinas, éteres vinílicos, ésteres vinílicos y mezclas de los mismos.

Los acrilatos representativos útiles como agentes promotores de la absorción en la invención, incluyen acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de propilo, acrilato de isopropilo, acrilato de butilo, acrilato de isobutilo, metacrilato de metilo, etacrilato de metilo, metacrilato de etilo, acrilato de octilo, acrilato de heptilo, metacrilato de octilo, metacrilato de isopropilo, metacrilato de 2-etilhexilo, acrilato de nonilo, acrilato de hexilo, metacrilato de n-hexilo, y similares. Los ésteres acrílicos de alquilo superior son acrilato de decilo, metacrilato de isodecilo, acrilato de laurilo, acrilato de estearilo, acrilato de behenilo y acrilato de melisilo y versiones de metacrilato del mismo. Se pueden polimerizar satisfactoriamente mezclas de dos o tres o más ésteres acrílicos de cadena larga con uno de los monómeros carboxílicos. Otros comonómeros incluyen olefinas, incluyendo alfa-olefinas, éteres vinílicos, ésteres vinílicos y mezclas de los mismos.

También se pueden usar otros monómeros de vinilideno, incluyendo los nitrilos acrílicos, como agentes promotores de la absorción en los procedimientos y composiciones de la invención para potenciar el suministro y la absorción de uno o más proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otro agente o agentes biológicamente activos, incluyendo potenciar el suministro del agente o agentes activos a un tejido o compartimento objetivo en el sujeto (p. ej., el hígado, la vena porta hepática, tejido o fluido del SNC o plasma sanguíneo). Los nitrilos olefínicamente insaturados en alfa,beta útiles, son preferiblemente nitrilos monoolefínicamente insaturados que tienen de 3 a 10 átomos de carbono tales como acrilonitrilo, metacrilonitrilo y similares. Los más preferidos son el acrilonitrilo y metacrilonitrilo. También se pueden usar amidas acrílicas que contienen de 3 a 35 átomos de carbono, incluyendo amidas monoolefínicamente insaturadas. Las amidas representativas incluyen acrilamida, metacrilamida, N-t-butilacrilamida, N-ciclohexil-acrilamida, amidas de alquilo superior, en las que el grupo alquilo en el nitrógeno contiene de 8 a 32 átomos de carbono, amidas acrílicas incluyendo N-alquiloilamidas de ácidos carboxílicos olefínicamente insaturados en alfa,beta, incluyendo las que tienen de 4 a 10 átomos de carbono tales como N-metilol-acrilamida, N-propanol-acrilamida, N-metilol-metacrilamida, N-metilol-maleimida, ésteres del ácido N-metilol-maleámico, N-metilol-p-vinil-benzamida y similares.

Materiales promotores de la absorción adicionales también útiles son las alfa-olefinas que contienen de 2 a 18 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a 8 átomos de carbono; dienos que contienen de 4 a 10 átomos de carbono; ésteres de vinilo y ésteres de alilo tales como acetato de vinilo; compuestos aromáticos vinílicos tales como estireno, metilestireno y cloroestireno; éteres de vinilo y alilo y cetonas tales como éter de metilo y vinilo y metilvinilcetona; cloroacrilatos; acrilatos de cianoalquilo tales como acrilato de alfa-cianoalquilo, y los acrilatos de alfa-, beta- y gamma-cianoalquilo; alcóxiacrilatos tales como acrilato de metoxietilo; halogenoacrilatos tales como acrilato de cloroetilo; haluros de vinilo y cloruro de vinilo, cloruro de vinilideno y similares; divinilos, diacrilatos y otros monómeros polifuncionales tales como éter divinílico, diacrilato de dietilenglicol, dimetacrilato de etilenglicol, metilén-bis-acrilamida, alilpentaeritritol y similares; y fosfonatos de bis(beta-halogenoalquilo)alqueno tales como fosfonato de bis(beta-cloroetil)vinilo y similares como conocen los expertos en la materia. Los copolímeros en los que el monómero que contiene carboxi es un constituyente minoritario y los otros monómeros de vinilideno están presentes como componentes principales, se preparan fácilmente de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

Cuando se usan hidrogeles como agentes promotores de la absorción en la invención, estos pueden estar compuestos de copolímeros sintéticos del grupo de ácidos acrílico y metacrílico, acrilamida, metacrilamida, acrilato de hidroxietilo (HEA) o metacrilato (HEMA), y vinilpirrolidonas que son interactivas con el agua y se hinchan. Los ejemplos específicos ilustrativos de polímeros útiles, en especial para el suministro de péptidos o proteínas, son los siguientes tipos de polímeros: (met)acrilamida y de 0,1 a 99% en peso de ácido (met)acrílico; (met)acrilamidas y 0,1-75% en peso de cloruro de (met)acriloxietiltrimetilamonio; (met)acrilamida y 0,1-75% en peso de (met)acrilamida; ácido acrílico y 0,1-75% en peso de (met)acrilatos de alquilo; (met)acrilamida y 0,1-75% en peso de AMPS.RTM. (marca registrada de Lubrizol Corp.); (met)acrilamida y de 0 a 30% en peso de alquil(met)acrilamidas y 0,1-75% en peso de AMPS.RTM.; (met)acrilamida y 0,1-99% en peso de HEMA; (met)acrilamida y de 0,1 a 75% en peso de HEMA y de 0,1 a 99% de ácido (met)acrílico; ácido (met)acrílico y 0,1-99% en peso de HEMA; 50% en moles de éter vinílico y 50% en moles de anhídrido maleico; (met)acrilamida y de 0,1 a 75% en peso de cloruro de (met)acriloxialquildimetil bencilamonio; (met)acrilamida y de 0,1 a 99% en peso de vinilpirrolidona; (met)acrilamida y 50% en peso de vinilpirrolidona y 0,1-99,9% en peso de ácido (met)acrílico; ácido (met)acrílico y de 0,1 a 75% en peso de AMPS.RTM. y 0,1-75% en peso de alquil(met)acrilamida. En los ejemplos anteriores, alquilo significa de C₁ a C₃₀, preferiblemente de C₁ a C₂₂, lineal y ramificado, y de C₄ a C₁₆ cíclico; cuando se usa (met) significa que están incluidos los monómeros con y sin el grupo metilo. Otros polímeros hidrogeles muy útiles son las versiones que se hinchan pero insolubles de poli(vinil pirrolidona), almidón, carboximetilcelulosa y poli(alcohol vinílico).

Los materiales de hidrogel polímeros adicionales útiles en la invención incluyen (met)acrilato de (poli)hidroxialquilo; hidrogeles aniónicos y catiónicos; complejos poli(electrolitos); poli(alcohol vinílico) que tienen un resto acetato inferior; una mezcla hinchable de agar reticulado y carboximetilcelulosa reticulada; una composición hinchable que comprende metilcelulosa mezclada con un agar reticulado en pequeña cantidad; un copolímero hinchable en agua producido por una dispersión de copolímero finamente dividido de anhídrido maleico con estireno, etileno, propileno o isobutileno; un polímero hinchable en agua o N-vinil-lactamas; sales de sodio de carboximetilcelulosa hinchables; y similares.

Otros polímeros que retienen y absorben fluidos, gelificables, útiles para formar el hidrogel hidrófilo para el suministro en la mucosa de agentes activos en la invención incluyen pectina; polisacáridos tales como agar, goma arábica, goma de karaya, tragacanto, alginas y guar y sus versiones reticuladas; polímeros de ácido acrílico, copolímeros y derivados salinos, polacrilamidas; polímeros de indeno y anhídrido maleico hinchables en agua; copolímeros de injerto de almidón; polímeros y copolímeros de tipo acrilato con una capacidad de absorción de agua de aproximadamente 2 a 400 veces su peso original; diésteres de poliglucano; una mezcla de poli(alcohol vinílico) reticulado y poli(N-vinil-2-pirrolidona); geles de copolímero de bloques de polioxibutileno-polietileno; goma de algarrobo; geles de poliéster; geles de poliurea; geles de poliéter; geles de poliamida; geles de polimida; geles de polipéptido; geles de poliaminoácidos; geles policelulósicos; polímeros de indeno-acrilato de anhídrido maleico reticulados; y polisacáridos.

Los polímeros de hidrogel para usar en la invención se pueden hacer mediante una combinación infinita de varios monómeros en varias proporciones. El hidrogel se puede reticular y en general tiene la capacidad de embeber y absorber fluido y de hincharse o expandirse a un estado de equilibrio más grande. El hidrogel normalmente se hincha o expande después del suministro a la superficie de la mucosa nasal, absorbiendo de aproximadamente 2-5, 5-10, 10-50 hasta 50-100 o más veces su peso de agua. El grado de hinchamiento óptimo para un hidrogel dado estará determinado por los diferentes agentes biológicamente activos que dependen de factores tales como el peso molecular, tamaño, características de solubilidad y difusión del agente activo que lleva, o está atrapado o encapsulado con el polímero, y el espaciado específico y movimiento de la cadena cooperativa asociada con cada polímero individual.

Los polímeros hidrófilos útiles en la invención son insolubles pero se hinchan en agua. Dichos polímeros que se hinchan en agua se denominan normalmente hidrogeles o geles. Dichos geles se pueden producir de forma conveniente a partir del polímero soluble en agua por el procedimiento de reticulación de polímeros por un agente de reticulación adecuado. Sin embargo, los hidrogeles estables también se pueden formar a partir de polímeros específicos en condiciones definidas de pH, temperatura y/o concentración iónica, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Normalmente, los polímeros se reticulan, es decir, se reticulan para que los polímeros tengan buenas propiedades hidrófilas, tengan integridad física mejorada (comparado con los polímeros no reticulados iguales o de tipo similar) y presenten una capacidad mejor para retener en la red de gel tanto el agente biológicamente activo de interés como compuestos adicionales para la coadministración con los mismos, tales como un inhibidor de citoquina o enzima, mientras retienen la capacidad para liberar el agente o agentes activos en el sitio y momento adecuados.

En general, los hidrogeles polímeros para usar en la invención se reticulan con un agente de reticulación difuncional en la cantidad de 0,01 a 25 por ciento en peso, basado en el peso de los monómeros que forman el copolímero, y más preferiblemente de 0,1 a 20 por ciento en peso y más a menudo de 0,1 a 15 por ciento en peso del agente de reticulación. Otra cantidad útil de un agente de reticulación es de 0,1 a 10 por ciento en peso. También se pueden usar agentes de reticulación tri, tetra o de multifuncionalidad superior. Cuando se usan dichos reactivos, pueden ser necesarias cantidades inferiores para lograr la densidad de reticulación equivalente, es decir, el grado de reticulación o las propiedades de la red que son suficientes para contener el agente o agentes biológicamente activos de forma eficaz.

Las reticulaciones pueden ser covalentes, iónicas o con enlaces de hidrógeno con el polímero que tiene la capacidad de hincharse en presencia de fluidos que contienen aguas. Dichos agentes de reticulación y las reacciones de reticulación son conocidas para los expertos en la materia, y en muchos casos dependen del sistema de polímero. Por lo tanto, se puede formar una red reticulada por copolimerización por radicales libres de monómeros insaturados. Los

hidrogeles polímeros también se pueden formar por reticulación de polímeros previamente formados haciendo reaccionar grupos funcionales encontrados en los polímeros tales como alcoholes, ácidos, aminas con grupos tales como glioxal, formaldehído o glutaraldehído, bis-anhídridos y similares.

- 5 Los polímeros también se pueden reticular con cualquier polieno, p. ej., decadieno o trivinil-ciclohexano; acrilamidas tales como N,N-metilen-bis (acrilamida); acrilatos polifuncionales, tales como triacrilato de trimetilol-propano; o monómero de vinilideno polifuncional que contiene al menos 2 grupos CH_2 terminales, incluyendo, por ejemplo, divinilbenceno, divinilnaftaleno, acrilatos de alilo y similares. En algunas realizaciones los monómeros de reticulación para usar para preparar los copolímeros son polialquenil-poliéteres que tienen más de un grupo alqueniléter por molécula, que pueden tener opcionalmente grupos alquenilo en los que está presente un doble enlace olefínico unido a un grupo metileno terminal (p. ej., hecho por la eterificación de un alcohol polihídrico que contiene al menos 2 átomos de carbono y al menos 2 grupos hidroxilo). Los compuestos de esta clase se pueden producir haciendo reaccionar un haluro de alquenilo, tal como cloruro de alilo o bromuro de alilo, con una disolución acuosa alcalina fuerte de uno o más alcoholes polihídricos. El producto puede ser una mezcla compleja de poliéteres con diferentes números de grupos éter. La eficacia del agente de reticulación poliéter aumenta con el número de grupos potencialmente polimerizables en la molécula. Típicamente, se usan los poliéteres que contienen una media de dos o más grupos alqueniléter por molécula. Otros monómeros de reticulación incluyen, por ejemplo, ésteres de dialilo, éteres dimetalílicos, acrilatos o metacrilato de alilo y acrilamidas, tetravinilsilano, polialquenil-metanos, diacrilatos y dimetacrilatos, compuestos divinílicos tales como divinilbenceno, poli(fosfato de alilo), compuestos dialiloxi y ésteres de fosfina y similares. Los agentes típicos son alilpentaeritritol, alilsacarosa, triacrilato de trimetilolpropano, diacrilato de 1,6-hexanodiol, éter dialílico del trimetilolpropano, triacrilato de pentaeritritol, dimetacrilato de tetrametileno, diacrilato de etileno, dimetacrilato de etileno, dimetacrilato de trietilenglicol y similares. El alilpentaeritritol, éter dialílico del trimetilolpropano y alilsacarosa proporcionan polímeros adecuados. Cuando está presente el agente de reticulación, las mezclas de polímeros normalmente contienen entre aproximadamente 0,01 y 20 por ciento en peso, p. ej., 1%, 5% o 10% en peso o más de monómero de reticulación basado en el total de monómero de ácido carboxílico más otros monómeros.

- En aspectos más detallados de la invención, el suministro en la mucosa de péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento, se potencia por retención del agente o agentes activos en un portador o vehículo de liberación lenta o enzimática o fisiológicamente protector, por ejemplo un hidrogel que protege al agente activo de la acción de las enzimas degradativas. En algunas realizaciones, el agente activo se une por medios químicos al portador o vehículo, al que también se pueden mezclar o unir agentes adicionales tales como inhibidores de enzimas, citoquinas, etc. El agente activo alternativamente se puede inmovilizar por un atrapamiento físico suficiente dentro del portador o vehículo, por ejemplo una matriz polímera.

- 35 Los polímeros tales como los hidrogeles útiles en la invención, pueden incorporar agentes funcionales unidos tales como glicósidos incorporados químicamente en el polímero para potenciar la biodisponibilidad intranasal de los agentes activos formulados con los mismos. Los ejemplos de dichos glicósidos son glucósidos, fructósidos, galactósidos, arabinósidos, manósidos y sus derivados sustituidos con alquilo y glicósidos naturales tales como arbutina, florizina, amigdalina, digitonina, saponina e indicano. Hay varias formas en las que un glicósido típico se puede unir a un polímero. Por ejemplo, el hidrógeno de los grupos hidroxilo de un glicósido y otro carbohidrato similar se puede sustituir por el grupo alquilo de un polímero hidrogel para formar un éter. También, los grupos hidroxilo de los glicósidos se pueden hacer reaccionar para esterificar los grupos carboxilo de un hidrogel polímero para formar éster polímeros in situ. Otro procedimiento es usar la condensación de acetobromoglucosa con colest-5-en-3-beta-ol en un copolímero de ácido maleico. Las poli(acrilamidas N-sustituidas se pueden sintetizar por reacción de polímeros activados con omega-aminoalquilglicósidos: (1) (carbohidrato-espaciador)(n)-poli(acrilamida, pseudopolisacáridos) (2) (carbohidrato-espaciador)(n)-fosfatidiletanolamina(m)-poli(acrilamida, neoglicolípidos, derivados de fosfatidiletanolamina; y (3) (carbohidrato-espaciador)-(n)-biotina(m)-poli(acrilamida. Estos derivados biotinilados pueden unir lecitinas en la superficie de mucosa para facilitar la absorción del agente o agentes biológicamente activos, p. ej., un péptido regulador de glucosa encapsulado en polímero.

- 50 En aspectos más detallados de la invención, uno o más péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y/u otros agentes biológicamente activos, descritos en el presente documento, incluyendo opcionalmente agentes activos secundarios tales como inhibidor(es) de proteasas, citoquina(s), modulador(es) adicionales de la fisiología intracelular de la unión, etc., se modifican y se unen a un portador o matriz polímero. Por ejemplo, esto se puede llevar a cabo mediante la unión química de un agente activo péptido o proteína y otro agente o agentes opcionales en una red de polímero reticulado. También se puede modificar químicamente el polímero por separado con un agente interactivo tal como una molécula que contiene glicósido. En algunos aspectos, el agente o agentes biológicamente activos, y el agente o agentes activos secundarios opcionales, se pueden funcionalizar, es decir, se identifica o añade químicamente un grupo reactivo adecuado al agente o agentes activos. Con más frecuencia se añade un grupo etilénico polimerizable y el agente activo funcionalizado después se copolimeriza con monómeros y un agente de reticulación usando un procedimiento de polimerización estándar tal como polimerización en disolución (normalmente agua), emulsión, suspensión o polimerización en dispersión. Con frecuencia, el agente de funcionalización se proporciona con una concentración suficientemente alta de los grupos funcionales o polimerizables para asegurar que varios sitios en el agente o agentes activos están funcionalizados. Por ejemplo, en un polipéptido que comprende 16 sitios de amina, en general se desea funcionalizar al menos 2, 4, 5, 7 hasta 8 o más de los sitios.

Después de la funcionalización, el agente o agentes activos funcionalizados se mezclan con monómeros y un agente de reticulación que comprende los reactivos a partir de los cuales se forma el polímero de interés. Después,

la polimerización se induce en este medio para crear un polímero que contiene el agente o agentes activos unidos. El polímero después se trata con agua u otros disolventes adecuados y por otra parte se purifica para eliminar las impurezas en trazas que no han reaccionado, y si es necesario, se tritura o se rompe por medios físicos tales como por agitación, forzándolo a través de una malla, por ultrasonidos u otros medios adecuados para el tamaño de partículas deseado. El disolvente, normalmente agua, después se separa de forma que no se desnaturalice o degrade de otra forma el agente o agentes activos. Un procedimiento deseado es la liofilización, pero están disponibles y se pueden usar otros procedimientos (p. ej., secado con vacío, secado al aire, secado por atomización, etc.).

Para introducir grupos polimerizables en péptidos y proteínas y otros agentes activos en la invención, se puede hacer reaccionar grupos amino, hidroxilo, tiol y otros grupos reactivos disponibles con electrófilos que contienen grupos insaturados. Por ejemplo, los monómeros insaturados que contiene grupos N-hidroxi-succinimidilo, carbonato activos tales como carbonato de p-nitrofenilo, carbonatos de triclorofenilo, tresilato, oxicarbonilimidazoles, epóxido, isocianatos y aldehído y carboximetilazidas insaturadas y ortopiridildisulfuro insaturado pertenecen a esta categoría de reactivos. Los ejemplos ilustrativos de reactivos insaturados son éter de alilo y glicidilo, cloruro de alilo, bromuro de alilo, yoduro de alilo, cloruro de acrililo, isocianato de alilo, cloruro de alilsulfonilo, anhídrido maleico, copolímeros de anhídrido maleico y éter de alilo, y similares.

Todos los derivados activos de lisina, excepto el aldehído, en general pueden reaccionar con otros aminoácidos tales como grupos imidazol de hisitidina y grupos hidroxilo de tirosina y los grupos tiol de cistina si el entorno local potencia la nucleofilia de estos grupos. Los reactivos de funcionalización que contienen aldehído son específicos para la lisina. Estos tipos de reacciones con grupos disponibles de lisinas, cisteínas, tirosina, están ampliamente documentadas en la bibliografía y son conocidas para el experto en la materia.

En el caso de agentes biológicamente activos que contienen grupos amina, es conveniente hacer reaccionar dichos grupos con un cloruro de aciloilo, tal como cloruro de acrililo, e introducir el grupo acrílico polimerizable en el agente que se ha hecho reaccionar. Después, durante la preparación del polímero, tal como durante la reticulación del copolímero de acrilamida y ácido acrílico, el agente activo funcionalizado, mediante los grupos acrílicos, se une al polímero y queda unido al mismo.

En aspectos adicionales de la invención, los agentes biológicamente activos, incluyendo péptidos, proteínas, nucleósidos y otras moléculas que son bioactivas *in vivo*, se estabilizan por conjugación por unión covalente de uno o más agentes activos a un polímero que incorpora como parte integral del mismo tanto un resto hidrófilo, p. ej., un polialquilenglicol lineal, como un resto lipófilo (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 5.681.811). En un aspecto, un agente biológicamente activo se acopla covalentemente con un polímero que comprende (i) un resto polialquilenglicol lineal, y (ii) un resto lipófilo, en el que el agente activo, el resto polialquilenglicol lineal y el resto lipófilo están dispuestos en una conformación uno en relación con otro de modo que el agente activo terapéutico tiene una resistencia *in vivo* potenciada frente a la degradación enzimática (es decir, con respecto a su estabilidad en condiciones similares en una forma no conjugada desprovista del polímero acoplado al mismo). En otro aspecto, la formulación estabilizada por conjugación tiene una conformación tridimensional que comprende el agente biológicamente activo acoplado covalentemente con un complejo de polisorbato que comprende (i) un resto polialquilenglicol lineal, y (ii) un resto lipófilo, en el que el agente activo, el resto polialquilenglicol lineal y el resto lipófilo están dispuestos en una conformación uno en relación con otro de modo que (a) el resto lipófilo está disponible en la parte exterior en la conformación tridimensional, y (b) el agente activo en la composición tiene una resistencia *in vivo* potenciada frente a la degradación enzimática.

En un aspecto relacionado adicional, se proporciona un complejo conjugado multiligandos que comprende un agente biológicamente activo acoplado con un resto de cadena principal de triglicérido por un grupo espaciador de polialquilenglicol unido a un átomo de carbono del resto de cadena principal de triglicérido, y al menos un resto de ácido graso unido covalentemente de forma directa a un átomo de carbono del resto de cadena principal de triglicérido o unido covalentemente a través de un resto espaciador de polialquileo (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 5.681.811). En dicho complejo del agente terapéutico conjugado con multiligandos, los átomos de carbono alfa' y beta del resto de triglicérido bioactivo, pueden tener restos de ácido graso unidos por enlace covalente a los mismos directamente, o unidos por enlace covalente a los mismos indirectamente a través de restos espaciadores de polialquilenglicol. Alternativamente, un resto de ácido graso puede estar unido covalentemente sea directamente o a través de un resto espaciador de polialquileo a los carbonos alfa y alfa' del resto de cadena principal de triglicérido, estando el agente terapéutico bioactivo acoplado covalentemente con el carbono gamma del resto de cadena principal de triglicérido, sea unido directamente al mismo con enlace covalente o indirectamente unido al mismo a través de un resto espaciador de polialquileo. Se reconocerá que son posibles una amplia variedad de formas estructurales, de composición y conformaciones para el complejo de agente terapéutico conjugado con multiligandos que comprende el resto de cadena principal de triglicérido, dentro del alcance de la invención. Se observa además que en dicho complejo de agente terapéutico conjugado con multiligandos, el agente o agentes biológicamente activos se pueden acoplar covalentemente de forma ventajosa con el resto de cadena principal modificada de triglicérido, por grupos alquilo espaciadores, o alternativamente otros grupos espaciadores aceptables, dentro del alcance de la invención. Según se usa en dicho contexto, la aceptabilidad del grupo espaciador se refiere a las características de aceptabilidad específicas estérica, de composición y aplicación de uso final.

En más aspectos adicionales de la invención, se proporciona un complejo estabilizado pro conjugación que comprende un complejo de polisorbato que comprende un resto de polisorbato que incluye una cadena principal de triglicé-

rido que tiene acoplado covalentemente en los átomos de carbono alfa, alfa' y beta del mismo grupos funcionalizados que incluyen (i) un grupo ácido graso; y (ii) un grupo polietilenglicol que tiene un agente biológicamente activo o resto unido covalentemente al mismo, p. ej., unido a un grupo funcional adecuado del grupo polietilenglicol. Dicha unión covalente puede ser directa, p. ej., a un grupo funcional hidroxilo terminal del grupo polietilenglicol, o alternativamente, la unión covalente puede ser indirecta, p. ej., rematando reactivamente el extremo hidroxilo del grupo polietilenglicol con un grupo espaciador con grupo funcional carboxi terminal, de modo que el grupo polietilenglicol rematado resultante tiene un grupo funcional carboxi terminal al que se puede unir covalentemente el agente o resto biológicamente activo.

En más aspectos adicionales de la invención, se proporciona un complejo estabilizado por conjugación, soluble en medio acuoso, estable, que comprende uno o más proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y/u otro agente o agentes biológicamente activos descritos en el presente documento, acoplados covalentemente a un resto de glicolípido modificado con polietilenglicol (PEG) fisiológicamente compatible. En dicho complejo, el agente o agentes biológicamente activos pueden estar acoplados covalentemente al resto de glicolípido modificado con PEG fisiológicamente compatible por un enlace covalente lábil a un grupo aminoácido libre del agente activo, en el que el enlace covalente lábil se puede escindir *in vivo* mediante hidrólisis y/o proteólisis bioquímica. El resto de glicolípido modificado con PEG fisiológicamente compatible puede comprender de forma ventajosa un polímero de polisorbato, p. ej., un polímero de polisorbato que comprende grupos éster de ácidos graso seleccionados del grupo que consiste en monopalmitato, dipalmitato, monolaurato, dilaurato, trilaurato, monoleato, dioleato, trioleato, monoestearato, diestearato y tristearato. En dicho complejo, el resto de glicolípido modificado con PEG fisiológicamente compatible puede comprender de forma adecuada un polímero seleccionado del grupo que consiste en éteres de polietilenglicol de ácidos grasos y ésteres de polietilenglicol de ácidos grasos, en los que los ácidos grasos comprenden, por ejemplo, un ácido graso seleccionado del grupo que consiste en los ácidos láurico, palmítico, oleico y esteárico.

Almacenamiento y fabricación del material

En algunos aspectos de la invención, las formulaciones combinatorias y/o los procedimientos de administración coordinada del presente documento, incorporan una cantidad eficaz de péptidos y proteínas que se pueden adherir al vidrio cargado reduciendo así la concentración eficaz en el recipiente. Los recipientes silanizados, por ejemplo, los recipientes de vidrio silanizado se usan para almacenar el producto acabado para reducir la adsorción del polipéptido o proteína a un recipiente de vidrio.

En más aspectos adicionales de la invención, un kit para el tratamiento de un sujeto mamífero comprende una composición farmacéutica estable de uno o más compuestos peptídicos reguladores de glucosa para el suministro en la mucosa del sujeto mamífero, en el que la composición es eficaz para aliviar uno o más síntomas de la obesidad, cáncer, o malnutrición o trastornos relacionados con el cáncer en dicho sujeto, sin efectos secundarios adversos inaceptables. El kit comprende además un vial de reactivo farmacéutico para contener uno o más compuestos peptídicos reguladores de glucosa. El vial de reactivo farmacéutico está compuesto de polímero de calidad farmacéutica, vidrio u otro material adecuado. El vial de reactivo farmacéutico es, por ejemplo, un vial de vidrio silanizado. El kit comprende además una apertura para suministrar la composición a una superficie de la mucosa nasal del sujeto. La apertura para el suministro está compuesta de un polímero de calidad farmacéutica, vidrio u otro material adecuado. La apertura para el suministro es, por ejemplo, de vidrio silanizado.

Una técnica de silanización combina una técnica de limpieza especial de las superficies que se van a silanizar con un procedimiento de silanización a baja presión. El silano está en fase gaseosa y a una temperatura mayor de las superficies que se van a silanizar. El procedimiento proporciona superficies reproducibles con capas de silano estables, homogéneas y funcionales que tienen características de una monocapa. Las superficies silanizadas previenen la unión al vidrio de polipéptidos o agentes potenciadores de la administración en la mucosa de la presente invención.

El procedimiento es útil para preparar viales silanizados de reactivo farmacéutico para contener composiciones de péptido regulador de glucosa de la presente invención. Se limpian bandejas de vidrio mediante aclarado con agua bidestilada (ddH₂O) antes de usarlas. Después la bandeja de silano se aclara con EtOH al 95% y la bandeja de acetona se aclara con acetona. Los viales de reactivo farmacéutico se tratan con ultrasonidos en acetona durante 10 minutos. Después del tratamiento con ultrasonidos en acetona, los viales de reactivo se lavan en la bandeja de ddH₂O al menos dos veces. Los viales de reactivo se tratan con ultrasonidos en NaOH 0,1 M durante 10 minutos. Mientras los viales de reactivo se tratan con ultrasonidos en NaOH, se prepara la disolución de silano bajo una campana de extracción. (Disolución de silano: 800 ml de etanol al 95%, 96 litros de ácido acético glacial; 25 ml de glicidopropiltrimetoxisilano). Después del tratamiento con ultrasonidos en NaOH, los viales de reactivos se lavan en la bandeja de ddH₂O al menos dos veces. Los viales de reactivo se tratan con ultrasonidos en disolución de silano durante 3 a 5 minutos. Los viales de reactivo se lavan en la bandeja de EtOH al 100%. Los viales de reactivo se secan con N₂ gaseoso prepurificado y se almacenan en un horno a 100°C durante al menos 2 h antes de usar.

El procedimiento de fabricación del producto de pulverización nasal puede incluir la preparación de un diluyente para la pulverización nasal, que incluye agua al ~85% más los componentes de la formulación de pulverización nasal sin el péptido regulador de glucosa. Después, el pH del diluyente se mide y se ajusta a pH 4,0 ± 0,3 con hidróxido sódico o ácido clorhídrico, si es necesario. El pulverizador nasal se prepara mediante transferencia no aséptica de ~85% del volumen objetivo final del diluyente a una botella con tapón de rosca. Se añade una cantidad adecuada de péptido regulador de glucosa y se mezcla completamente hasta disolverse. El pH se mide y se ajusta a pH 7,0 ± 0,3

con hidróxido sódico o ácido clorhídrico, si es necesario. Se añade una cantidad suficiente de diluyente para alcanzar el volumen objetivo final. Las botellas con tapón de rosca se llenan y se fija el tapón. La descripción anterior del procedimiento de fabricación representa un procedimiento usado para preparar los lotes clínicos iniciales del fármaco. Este procedimiento se puede modificar durante el procedimiento de desarrollo para optimizar el procedimiento de fabricación.

El péptido regulador de glucosa inyectable actualmente comercializado requiere condiciones de fabricación estériles para cumplir las normas de la FDA. La administración parenteral, incluyendo la insulina para inyección o infusión, requiere un procedimiento de fabricación estéril (aséptico). Las buenas prácticas de fabricación (BPF) actuales para la fabricación de fármaco estéril incluyen los estándares para las características de diseño y fabricación (21 CFR parte 211.42 (1 de abril, 2005)); los estándares para el ensayo y aprobación o rechazo de componentes, recipientes para fármacos, y cierres (parte 211.84); estándares para el control de contaminación microbiológica (parte 211.113); y otros requisitos de ensayo especiales (parte 211.167). Los productos no parenterales (no asépticos), tales como el producto intranasal de la invención, no requieren estas condiciones de fabricación estériles especializadas. Como puede apreciarse fácilmente, los requisitos para un procedimiento de fabricación estéril son sustancialmente mayores y en correspondencia más costosos que los requeridos para un procedimiento de fabricación de producto no estéril. Estos costes incluyen costes de capitalización mucho mayores para las instalaciones, así como un coste de fabricación más costoso: las instalaciones extra para la fabricación estéril incluyen habitaciones y ventilación adicionales; costes extra asociados con la fabricación estéril incluyen más mano de obra, control de calidad amplio y seguro de calidad y apoyo administrativo. Como resultado, los costes de fabricación de un producto peptídico regulador de glucosa intranasal, tal como el de la invención, son mucho menores que los de un producto peptídico regulador de glucosa administrado por vía parenteral. La presente invención satisface la necesidad de un procedimiento de fabricación no estéril para un péptido regulador de glucosa.

Las disoluciones estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados antes, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados antes. En el caso de polvos estériles, los procedimientos de preparación incluyen el secado al vacío y la liofilización que dan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución del mismo previamente esterilizada por filtración. La prevención de la acción de microorganismos se puede llevar a cabo por diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenes, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares.

La administración en la mucosa de acuerdo con la invención, permite la autoadministración eficaz del tratamiento por los pacientes, siempre que se asegure el suficiente control y seguimiento de la dosificación y los efectos secundarios. La administración en la mucosa también supera algunos inconvenientes de otras formas de administración, tales como inyecciones, que son dolorosas y exponen al paciente a posibles infecciones y pueden presentar problemas de biodisponibilidad del fármaco.

Vehículos de suministro bioadhesivos y procedimientos

En algunos aspectos de la invención, las formulaciones combinatorias y/o los procedimientos de administración coordinada del presente documento, incorporan una cantidad eficaz de un bioadhesivo no tóxico como un compuesto adyuvante o portador para potenciar el suministro en la mucosa de uno o más agentes biológicamente activos. Los agentes bioadhesivos en este contexto presentan adhesión general o específica a uno o más componentes de las superficies de la mucosa objetivo. El bioadhesivo mantiene un gradiente de concentración deseado del agente biológicamente activo en o a través de la mucosa para asegurar la penetración de moléculas incluso grandes (p. ej., péptidos y proteínas) en o a través del epitelio de la mucosa. Normalmente, el uso de bioadhesivos en los procedimientos y composiciones de la invención da un aumento de 2 a 5 veces, a menudo de 5 a 10 veces de la permeabilidad para los péptidos y proteínas en o a través del epitelio de la mucosa. Esta potenciación de la permeación epitelial a menudo permite el suministro eficaz a través de la mucosa de macromoléculas grandes, por ejemplo, a la parte basal del epitelio nasal o en los compartimentos extracelulares adyacentes o un plasma sanguíneo o tejido o fluido del SNC.

Este suministro potenciado proporciona una eficacia muy mejorada del suministro de péptidos, proteínas bioactivas y otras especies terapéuticas macromoleculares. Estos resultados dependerán en parte de la hidrofiliya del compuesto, de modo que se obtendrá una penetración mayor con especies hidrófilas comparadas con compuestos insolubles en agua. Además de estos efectos, el uso de bioadhesivos para potenciar la persistencia del fármaco en la superficie de la mucosa puede provocar un mecanismo de reserva para el suministro de fármaco prolongado, de modo que los compuestos no solo penetran a través del tejido de la mucosa sino que también se vuelven a difundir hacia la superficie de la mucosa una vez que se ha agotado el material en la superficie.

Se describe una variedad de bioadhesivos en la técnica para la administración oral, patentes de EE.UU. n° 3.972.995; 4.259.314; 4.680.323; 4.740.365; 4.573.996; 4.292.299; 4.715.369; 4.876.092; 4.855.142; 4.250.163; 4.226.848; 4.948.580; y patente de EE.UU. reotorgada n° 33.093, que tiene utilidad en los procedimientos y composiciones nuevos de la invención. El potencial de los diferentes polímeros bioadhesivos como plataforma de suministro en la mucosa, p. ej., nasal, en los procedimientos y composiciones de la invención, se puede evaluar fácilmente determinando su capacidad para retener y liberar el péptido regulador de glucosa, así como por su capacidad para interaccionar

con las superficies de mucosa después de la incorporación del agente activo en el mismo. Además, se aplicarán procedimientos bien conocidos para determinar la biocompatibilidad de los polímeros seleccionados con el tejido en el sitio de administración de la mucosa. Cuando la mucosa sana está cubierta de moco (es decir, en ausencia de tratamiento mucolítico o de depuración de moco), puede servir como un enlace de conexión al epitelio de mucosa subyacente.

Por lo tanto, el término “bioadhesivo” según se usa en el presente documento, también cubre los compuestos mucoadhesivos útiles para potenciar el suministro en la mucosa de agentes biológicamente activos de la invención. Sin embargo, el contacto del adhesivo con el tejido de la mucosa a través de la adhesión a una capa de gel de moco puede estar limitado por la unión incompleta o transitoria entre la capa de moco y el tejido subyacente, en particular en las superficies nasales en las que se produce rápido la depuración de moco. En relación con esto, las glicoproteínas mucinas son secretadas continuamente, e inmediatamente después de su liberación de las células o glándulas, forman un gel viscoelástico. Sin embargo, la superficie luminal de la capa de gel adherente es erosionada continuamente por la acción mecánica, enzimática y/o ciliar. Cuando dichas actividades son más importantes o cuando se desean tiempos de adhesión más largos, los procedimientos de administración coordinada y formulación combinatoria de la invención pueden incorporar además procedimientos o agentes mucolíticos y/o ciliostáticos, como se ha discutido antes en el presente documento.

Normalmente, los polímeros mucoadhesivos para usar en la invención son macromoléculas naturales o sintéticas que se adhieren a superficies de tejido de mucosa húmeda mediante mecanismos complejos pero no específicos. Además de estos polímeros mucoadhesivos, la invención también proporciona procedimientos y composiciones que incorporan bioadhesivos que se adhieren directamente a una superficie celular, en lugar de al moco, mediante interacciones específicas, incluyendo las mediadas por receptor. Un ejemplo de bioadhesivos que funcionan de esta forma específica es el grupo de compuestos conocidos como lecitinas. Estas son glicoproteínas con la capacidad para reconocer específicamente y unirse a moléculas de azúcar, p. ej., glicoproteínas o glicolípidos, que forman parte de membranas celulares epiteliales intranasales y se pueden considerar como “receptores de lecitina”.

En algunos aspectos de la invención, los materiales bioadhesivos para potenciar el suministro intranasal de agentes biológicamente activos, comprende una matriz de un polímero o mezcla de polímeros hidrófila, p. ej. soluble o que se hincha en agua, que se puede adherir a una superficie de moco húmeda. Estos adhesivos se pueden formular como pomadas, hidrogeles (véase antes), películas finas, y otras formas de aplicación. A menudo, estos adhesivos tienen el agente biológicamente activo mezclado con los mismos para realizar una liberación lenta o liberación local del agente activo. Algunos se formulan con ingredientes adicionales para facilitar la penetración del agente activo a través de la mucosa nasal, p. ej., en el sistema circulatorio del individuo.

Diferentes polímeros, tanto naturales como sintéticos, presentan unión significativa al moco y/o las superficies epiteliales de la mucosa en condiciones fisiológicas. La resistencia de esta interacción se puede medir fácilmente por ensayos de adherencia de película mecánicos o de cizalladura. Cuando se aplican a una superficie de mucosa húmeda, muchos materiales secos se pueden adherir espontáneamente, al menos ligeramente. Después de dicho contacto inicial, algunos materiales hidrófilos empiezan a atraer agua por adsorción, hinchamiento o fuerzas capilares, y si este agua es absorbida del sustrato subyacente o de la interfase de polímero-tejido, la adhesión puede ser suficiente para lograr el objetivo de potenciar la absorción en la mucosa de los agentes biológicamente activos. Dicha “adhesión por hidratación” puede ser bastante fuerte, pero las formulaciones adaptadas para usar este mecanismo deben dar cuenta del hinchamiento que continua a medida que la dosificación se transforma en un mucilago hidratado. Esto se supone para muchos hidrocoloides útiles en la invención, en especial algunos derivados de celulosa, que en general no son adhesivos cuando se aplican en estado prehidratado. No obstante, los sistemas de administración de fármaco bioadhesivos para la administración en mucosas son eficaces en la invención cuando dichos materiales se aplican en forma de un polvo polímero seco, microesfera o forma de suministro de tipo película.

Otros polímeros se adhieren a las superficies de mucosa no solo cuando se aplican en seco, sino también en estado completamente hidratado, y en presencia de cantidades en exceso de agua. Por lo tanto, la selección de un mucoadhesivo requiere la consideración de las condiciones fisiológicas así como fisicoquímicas, en las que se formará y mantendrá el contacto con el tejido. En particular, la cantidad de agua o humedad normalmente presentes en el sitio de adhesión pretendido y la prevalencia de pH, se sabe que afectan mucho a la resistencia de la unión mucoadhesiva de diferentes polímeros.

Se han fabricado y estudiado varios sistemas de administración de fármaco bioadhesivos polímeros en los últimos 20 años, no siempre con éxito. Sin embargo, actualmente se usa una variedad de dichos portadores en aplicaciones clínicas que implican usos dentales, ortopédicos, oftalmológicos y quirúrgicos. Por ejemplo, los hidrogeles basados en acrílico se han usado ampliamente para los dispositivos bioadhesivos. Los hidrogeles basados en acrílico son adecuados para la bioadhesión debido a su flexibilidad y características no abrasivas en el estado parcialmente hinchado, que reducen el desgaste que produce daño de los tejidos en contacto. Además, su alta permeabilidad en el estado hinchado permite que el monómero sin reaccionar, las cadenas polímeras no reticuladas y el iniciador se separen por lavado de la matriz después de polimerización, lo cual es una característica importante para la selección de materiales bioadhesivos para usar en la invención. Los dispositivos polímeros basados en acrílico presentan una resistencia de la unión adhesiva muy fuerte. Para el suministro controlado en la mucosa de fármacos peptídicos o proteínicos, los procedimientos y composiciones de la invención incluyen opcionalmente el uso de portadores, p. ej., vehículos poliméricos de administración que funcionan en parte para proteger al agente biológicamente activo de la rotura proteolítica, mientras que al mismo tiempo proporcionan una penetración potenciada del péptido o proteína en o a través de la mucosa nasal. En este contexto, los polímeros bioadhesivos han demostrado un potencial considerable para potenciar el suministro

oral de fármaco. Como ejemplo, la biodisponibilidad de la 9-desglicinamida-8-arginina-vasopresina (DGAVP) administrada por vía intraduodenal a ratas junto con una dispersión salina al 1% (p/v) del derivado de poli(ácido acrílico) mucoadhesivo policarbofil, es 3-5 veces mayor comparado con una disolución acuosa del fármaco peptídico sin este polímero.

Los polímeros mucoadhesivos de tipo poli(ácido acrílico) son inhibidores potentes de algunas proteasas intestinales. El mecanismo de inhibición enzimática se explica por la fuerte afinidad de esta clase de polímeros por los cationes divalentes, tales como el calcio o el cinc, que son cofactores esenciales para las metaloproteasas, tales como la tripsina y quimotripsina. Se ha descrito que al desproveer el poli(ácido acrílico) a las proteasas de sus cofactores, se inducen cambios estructurales irreversibles en las proteínas enzimáticas que van acompañados de la pérdida de actividad enzimática. Al mismo tiempo, otros polímeros mucoadhesivos (p. ej., algunos derivados de celulosa y quitosán) pueden no inhibir las enzimas proteolíticas en determinadas condiciones. A diferencia de otros inhibidores enzimáticos contemplados para usar en la invención (p. ej., aprotinina, bestatina) que son moléculas relativamente pequeñas, la absorción transnasal de polímeros inhibidores es probable que sea mínima a la luz del tamaño de estas moléculas, y por lo tanto elimina los posibles efectos secundarios adversos. Por lo tanto, los polímeros mucoadhesivos, en particular los de tipo poli(ácido acrílico), pueden servir como un adhesivo promotor de la absorción y como agente protector de enzima para potenciar el suministro controlado de fármacos peptídicos o proteínicos, en especial cuando se consideran los problemas de seguridad.

Además de proteger contra la degradación enzimática, los bioadhesivos y otros agentes promotores de la absorción de polímeros y no polímeros para usar en la invención, pueden aumentar directamente la permeabilidad de la mucosa a los agentes biológicamente activos. Para facilitar el transporte de moléculas grandes e hidrófilas, tales como péptidos y proteínas, a través de la barrera epitelial nasal, se ha postulado que los polímeros mucoadhesivos y otros agentes dan efectos de permeación potenciados más allá de los que se espera para el tiempo de permanencia premucosa prolongado del sistema de suministro. El transcurso del tiempo de las concentraciones de fármaco en el plasma sugerían que las microesferas adhesivas causaban un aumento agudo, pero transitorio, de permeabilidad de la insulina a través de la mucosa nasal. Se dice que otros polímeros mucoadhesivos para usar en la invención, por ejemplo el quitosán, potencian la permeabilidad de determinados epitelios de mucosa, incluso cuando se aplican en forma de una disolución acuosa o gel. Un agente bioadhesivo particularmente útil en la administración coordinada y/o procedimientos de formulación combinatoria y composiciones de la invención, es el quitosán, así como sus análogos y derivados. El quitosán es un polímero no tóxico, biocompatible y biodegradable, que se usa ampliamente para aplicaciones farmacéuticas y médicas debido a sus propiedades favorables de baja toxicidad y buena biocompatibilidad. Es un poliaminosacárido natural preparado a partir de quitina por N-desacetilación con álcali. Según se usa en los procedimientos y composiciones de la invención, el quitosán aumenta la retención de proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos, y otros agentes biológicamente activos discutidos en el presente documento, en el sitio de aplicación en la mucosa. Este modo de administración también puede mejorar la observancia y aceptación del paciente. Como se proporciona además en el presente documento, los procedimientos y composiciones de la invención incluirán opcionalmente un nuevo derivado de quitosán o forma de quitosán químicamente modificada. Uno de dichos derivados nuevos para usar en la invención es el llamado polímero de β -[1 $\rightarrow$ 4]-2-guanidinio-2-desoxi-D-glucosa (poli-GuD). El quitosán es el producto N-desacetilado de la quitina, un polímero natural que se ha usado ampliamente para preparar microesferas para formulaciones orales e intranasales. El polímero de quitosán también se ha propuesto como un portador soluble para la administración parenteral de fármaco. En un aspecto de la invención, se usa o-metilisourea para convertir una amina de quitosán en su resto guanidinio. El compuesto de guanidinio se prepara, por ejemplo, por reacción entre disoluciones equinormales de quitosán y o-metilisourea a pH superior a 8,0.

Compuestos adicionales clasificados como agentes bioadhesivos para usar en la presente invención, actúan mediante interacciones específicas, normalmente clasificadas como "interacciones de receptor-ligando" entre estructuras complementarias del compuesto bioadhesivo y un componente de la superficie epitelial de mucosa. Muchos ejemplos naturales ilustran esta forma de bioadhesión de unión específica, como se ilustra por las interacciones de lecitina-azúcar. Las lecitinas son (glico)proteínas de origen no inmunitario que se unen a polisacáridos o glicoconjugados.

Se han investigado algunas lecitinas vegetales como posibles agentes farmacéuticos promotores de la absorción. Una lecitina vegetal, la hemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA), presenta una biodisponibilidad oral alta de más de 10% después de alimentar a ratas. La lecitina de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (TL) parece segura para diferentes modelos de administración.

En resumen, los agentes bioadhesivos anteriores son útiles en las formulaciones combinatorias y procedimientos de administración coordinada de la presente invención, que opcionalmente incorporan una cantidad y forma eficaz de un agente bioadhesivo para prolongar la permanencia o aumentar de otra forma la absorción en la mucosa de uno o más péptidos y proteínas reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos. Los agentes bioadhesivos se pueden administrar de forma coordinada como compuestos adyuvantes o como aditivos en las formulaciones combinatorias de la invención. En determinadas realizaciones, el agente bioadhesivo actúa como un pegamento farmacéutico, mientras que en otras realizaciones la formulación combinatoria o suministro adyuvante del agente bioadhesivo, sirve para intensificar el contacto del agente biológicamente activo con la mucosa nasal, en algunos casos promoviendo las interacciones receptor-ligando específicas con "receptores" celulares epiteliales, y en otros aumentando la permeabilidad epitelial para aumentar significativamente el gradiente de concentración de fármaco medido en el sitio objetivo de suministro (p. ej., hígado, plasma sanguíneo, o tejido o fluido del SNC). También los agentes bioadhesivos adicionales para usar en la invención, actúan como inhibidores enzimáticos (p. ej. de proteasas)

para potenciar la estabilidad de los agentes bioterapéuticos administrados en la mucosa de forma coordinada o en una formulación combinatoria con el agente bioadhesivo.

Vehículos de suministro micelares y liposomas

Los procedimientos de administración coordinada y formulaciones combinatorias de la presente invención incorporan opcionalmente portadores eficaces basados en lípidos o ácidos grasos, agentes de procesamiento o vehículos de suministro para proporcionar formulaciones mejoradas para el suministro en la mucosa de proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos. Por ejemplo, se proporciona una variedad de formulaciones y procedimientos para el suministro en la mucosa, que comprenden uno o más de estos agentes activos, tales como un péptido o proteína, mezclados o encapsulados en, o administrados de forma coordinada con, un liposoma, portador micelar mixto, o emulsión para potenciar la estabilidad química y física y aumentar la semivida de los agentes biológicamente activos (p. ej., reduciendo la susceptibilidad a la proteólisis, modificación química y/o desnaturalización) tras el suministro en la mucosa.

En algunos aspectos de la invención, los sistemas de suministro especializados para los agentes biológicamente activos comprenden vesículas lipídicas pequeñas conocidas como liposomas. Estos están hechos normalmente de moléculas de lípidos naturales, biodegradables, no tóxicos y no inmunógenos, y pueden atrapar o unir eficazmente moléculas de fármaco, incluyendo péptidos y proteínas, en o sobre sus membranas. Lo atractivo de los liposomas como un sistema de suministro de péptidos y proteínas en la invención, aumenta por el hecho de que las proteínas encapsuladas pueden permanecer en su entorno acuoso preferido en las vesículas, mientras que la membrana liposómica las protege frente a la proteólisis y otros factores desestabilizantes. Incluso cuando no todos los procedimientos de preparación de liposomas son factibles en la encapsulación de péptidos y proteínas debido a sus propiedades físicas y químicas únicas, varios procedimientos permiten la encapsulación de estas macromoléculas sin desactivación sustancial.

Están disponibles una variedad de procedimientos para preparar liposomas para uso en la invención, patentes de EE.UU. n° 4.235.871; 4.501.728; y 4.837.028. Para usar con el suministro de liposomas, el agente biológicamente activo normalmente se atrapa dentro del liposoma o vesícula de lípido, o se une en el exterior de la vesícula.

Como liposomas, los ácidos grasos de cadena larga insaturados, que también tienen actividad potenciadora para la absorción en la mucosa, pueden formar vesículas cerradas con estructuras de tipo bicapa (llamadas "ufasomas"). Estas se pueden formar, por ejemplo, usando ácido oleico para atrapar los péptidos y proteínas biológicamente activos para el suministro en la mucosa, p.ej., intranasal, en la invención.

Otros sistemas de suministro para usar en la invención, combinan el uso de polímeros y liposomas para asociar las propiedades ventajosas de ambos vehículos, como la encapsulación dentro del polímero natural fibrina. Además, la liberación de compuestos terapéuticos de este sistema de suministro se puede controlar mediante el uso de la reticulación covalente y la adición de agentes antifibrinolíticos al polímero de fibrina.

Los sistemas de suministro más simplificados para usar en la invención, incluyen el uso de lípidos catiónicos como vehículos o portadores de suministro, que se pueden usar eficazmente para proporcionar una interacción electrostática entre el portador lipídico y dichos agentes biológicamente activos cargados como proteínas y ácidos nucleicos polianiónicos. Esto permite el envasado eficaz de los fármacos en una forma adecuada para la administración en la mucosa y/o posterior suministro a compartimentos sistémicos.

Los vehículos de suministro adicionales para usar en la invención incluyen ácidos grasos de cadena larga y media, así como micelas mixtas tensioactivas con ácidos grasos. La mayoría de los lípidos naturales en forma de ésteres tienen importantes implicaciones con respecto a su propio transporte a través de las superficies de mucosa. Los ácidos grasos y sus monoglicéridos que tienen grupos polares unidos, han demostrado que en forma de micelas mixtas actúan en la barrera intestinal como potenciadores de la penetración. Este descubrimiento de la función modificadora de la barrera de los ácidos grasos libres (ácidos carboxílicos con una longitud de cadena que varía de 12 a 20 átomos de carbono) y sus derivados polares, han estimulado la amplia investigación de las aplicaciones de estos agentes como potenciadores de la absorción en la mucosa.

Para usar en los procedimientos de la invención, los ácidos grasos de cadena larga, en especial los lípidos fusogénicos (ácidos grasos insaturados y monoglicéridos tales como ácido oleico, ácido linoleico, ácido linoleico, monooleína, etc.) proporcionan portadores útiles para potenciar el suministro en la mucosa del péptido regulador de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos, descritos en el presente documento. También se ha mostrado que los ácidos grasos de cadena media (C6 a C12) y monoglicéridos presentan una actividad potenciada en la absorción intestinal de fármacos y se pueden adaptar para usar en las formulaciones y procedimientos de suministro en la mucosa de la invención. Además, las sales de sodio de ácidos grasos de cadena media y larga son vehículos de suministro eficaces y agentes potenciadores de la absorción para el suministro en la mucosa de agentes biológicamente activos de la invención. Por lo tanto, los ácidos grasos se pueden usar en formas solubles de sales de sodio o por la adición de tensioactivos no tóxicos, p. ej., aceite de ricino hidrogenado polioxietilado, taurocolato sódico, etc. Otras preparaciones de ácidos grasos y micelares mixtas que son útiles en la invención incluyen, pero sin limitar, caprilato de Na (C8), caprato de Na (C10), laurato de Na (C12) u oleato de Na (C18), opcionalmente combinado con sales biliares, tales como glicocolato y taurocolato.

Pegilación

Procedimientos y composiciones adicionales proporcionados en la invención, implican la modificación química de péptidos y proteínas biológicamente activos mediante unión covalente de materiales polímeros, por ejemplo dextranos, polivinilpirrolidonas, glicopéptidos, polietilenglicol y poliaminoácidos. Los péptidos y proteínas conjugados resultantes retienen sus actividades biológicas y solubilidad para la administración en la mucosa. En realizaciones alternativas, las proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros péptidos y proteínas biológicamente activos, se conjugan con polímeros de poli(óxido de alquileno), en particular polietilenglicol (PEG). Patente de EE.UU. n° 4.179.337.

Los polímeros de PEG reactivos con amina para usar en la invención incluyen SC-PEG con masas moleculares de 2000, 5000, 10000, 12000 y 20.000; U-PEG-10000; NHS-PEG-3400-biotina; T-PEG-5000; T-PEG-12000; y TPC-PEG-5000. La pegilación de péptidos y proteínas biológicamente activos se puede lograr por modificación de los sitios carboxilo (p. ej. grupos ácido aspártico o ácido glutámico, además del extremo carboxilo). Se ha descrito la utilidad de la PEG-hidrazida en la modificación selectiva de grupos carboxilo de proteínas activadas con carbodiimida en condiciones ácidas. Alternativamente, se puede usar la modificación bifuncional con PEG de péptidos y proteínas biológicamente activos. En algunos procedimientos, los restos de aminoácidos cargados, incluyendo de lisina, ácido aspártico y ácido glutámico, tienen una tendencia notable a ser accesibles al disolvente en la superficie de las proteínas.

Otras modificaciones de estabilización de agentes activos

Además de la pegilación, los agentes biológicamente activos tales como péptidos y proteínas para usar en la invención se pueden modificar para potenciar la semivida en la circulación, protegiendo el agente activo por conjugación con otros compuestos protectores o estabilizantes conocidos, por ejemplo mediante la creación de proteínas de fusión con un péptido, proteína, análogo o mimético activos, unidos a una o más proteínas portadoras, tales como una o más cadenas de inmunoglobulina.

Formulación y administración

Las formulaciones de suministro en la mucosa de la presente invención comprenden el péptido regulador de glucosa, análogos y miméticos, normalmente combinados junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos. El portador o portadores, deben ser "farmacéuticamente aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no provocar efectos perjudiciales inaceptables en el sujeto. Dichos portadores se han descrito antes en el presente documento o son por otra parte conocidos por los expertos en la materia de la farmacología. Es deseable que la formulación no incluya sustancias tales como enzimas o agentes oxidantes con los que se sabe que el agente biológicamente activo que se va a administrar es incompatible. Las formulaciones se pueden preparar por cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica de la farmacia.

En las composiciones y procedimientos de la invención, los proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos descritos en la presente invención, se pueden administrar a sujetos por una variedad de modos de administración en la mucosa, incluyendo el suministro oral, rectal, vaginal, intranasal, intrapulmonar o transdérmico, o pos suministro tópico en los ojos, oídos, piel u otras superficies de mucosa. Opcionalmente, las proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y otros agentes biológicamente activos descritos en el presente documento, se pueden administrar de forma coordinada o conjunta por vías no mucosas, incluyendo las vías intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraatrial, intraarticular, intraperitoneal o parenteral. En otras realizaciones alternativas, el agente o agentes biológicamente activos se pueden administrar *ex vivo* por exposición directa a las células, tejidos u órganos procedentes de un sujeto mamífero, por ejemplo, como un componente de una formulación de tratamiento de tejido u órgano *ex vivo*, que contiene el agente biológicamente activos en un portador líquido o sólido adecuado.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden administrar en una disolución acuosa como una pulverización nasal o pulmonar y se pueden dispensar en forma de pulverización por una variedad de procedimientos conocidos para los expertos en la materia. Los sistemas preferidos para dispensar líquidos en forma de un pulverizador nasal se describen en la patente de EE.UU. n° 4.511.069. Las formulaciones se pueden presentar en envases de multidosis, por ejemplo en el sistema de dispensación sellado descrito en la patente de EE.UU. n° 4.511.069. Las formas de suministro en aerosol adicionales pueden incluir, p. ej., nebulizadores de aire comprimido, de chorro, ultrasónicos y piezoeléctricos, que suministran el agente biológicamente activo disuelto o suspendido en un disolvente farmacéutico, p. ej., agua, etanol o una mezcla de los mismos. Una formulación en aerosol de esta invención puede tener gotitas que tienen diámetros de 1 a 700 micrómetros de tamaño.

Las composiciones y formulaciones de esta invención pueden tener una osmolaridad de 50 a 350 mOsm/l o de 50 a 300 mOsm/l. Se puede usar un tónico para ajustar la osmolaridad, osmolalidad o tonicidad de una formulación.

Las disoluciones de pulverización nasal y pulmonar de la presente invención normalmente comprenden el fármaco o el fármaco que se va a suministrar, opcionalmente formulados con un agente tensioactivo, tal como un tensioac-

tivo no iónico (p. ej., polisorbato-80), y uno o más tampones. En algunas realizaciones de la presente invención, la disolución de pulverización nasal comprende además un propulsor. El pH de la disolución de pulverización nasal está opcionalmente entre aproximadamente 3,0 y 9, preferiblemente $7,0 \pm 0,5$. Los tampones adecuados para usar en estas composiciones son como se han descrito antes o los conocidos en la materia. Se pueden añadir otros componentes para potenciar o mantener la estabilidad química, incluyendo conservantes, tensioactivos, dispersantes o gases. Los conservantes adecuados incluyen, pero sin limitar, fenol, metilparabeno, parabeno, m-cresol, tiomersal, clorobutanol, cloruro de benzalconio, benzoato sódico y similares. Los tensioactivos adecuados incluyen, pero sin limitar, ácido oleico, trioleato de sorbitán, polisorbatos, lecitina, fosfatidilcolina, y diferentes diglicéridos y fosfolípidos de cadena larga. Los dispersantes adecuados incluyen, pero sin limitar, ácido etilendiaminatetraacético, y similares. Los gases adecuados incluyen, pero sin limitar, nitrógeno, helio, clorofluorocarbonos (CFC), hidrofluorocarbonos (HFC), dióxido de carbono, aire y similares.

En realizaciones alternativas, las formulaciones para la mucosa se administran en forma de formulaciones de polvo seco que comprenden el agente biológicamente activo en una forma seca, normalmente liofilizada, de un tamaño de partículas adecuado, o dentro de un intervalo adecuado de tamaños de partículas, para el suministro intranasal. El tamaño de partículas mínimo adecuado para la deposición en los pasos nasal o pulmonar a menudo es un diámetro aerodinámico equivalente medio ponderado (DAEMP) de aproximadamente $0,5 \mu\text{m}$, normalmente DAEMP de $1 \mu\text{m}$, y más normalmente aproximadamente DAEMP de aproximadamente $2 \mu\text{m}$. El tamaño de partículas máximo adecuado para la deposición en los pasos nasales es a menudo un DAEMP de aproximadamente $10 \mu\text{m}$, normalmente un DAEMP de aproximadamente $8 \mu\text{m}$, y más normalmente un DAEMP de aproximadamente $4 \mu\text{m}$. Los polvos para respirar intranasales dentro de estos intervalos de tamaños se pueden producir por una variedad de técnicas convencionales, tales como molienda por chorro, secado por atomización, precipitación con disolvente, condensación con fluido supercrítico y similares. Estos polvos secos de DAEMP adecuado se pueden administrar a un paciente mediante un inhalador de polvo seco convencional (IPS), que se basan en la respiración del paciente, tras la inhalación pulmonar o nasal, para dispersar el polvo en una cantidad aerolizada. Alternativamente, el polvo seco se puede administrar mediante dispositivos asistidos por aire que usan una fuente de alimentación externa para dispersar el polvo en una cantidad aerolizada, p. ej., una bomba de pistón.

Los dispositivos de polvo seco normalmente requieren una masa en polvo en el intervalo de aproximadamente 1 mg a 20 mg para producir una dosis individual aerolizada ("soplo"). Si la dosis requerida o deseada del agente biológicamente activo es menor que esta cantidad, el agente activo en polvo normalmente se combinará con un polvo de carga farmacéutico seco para proporcionar la masa en polvo total requerida. Los polvos de carga secos preferidos incluyen sacarosa, lactosa, dextrosa, manitol, glicina, trehalosa, albúmina de suero humano (HSA) y almidón. Otros polvos de carga secos adecuados incluyen celobiosa, dextranos, maltotriosa, pectina, citrato sódico, ascorbato sódico, y similares.

En las composiciones formuladas para el suministro en la mucosa de la presente invención, el agente biológicamente activo se puede combinar con diferentes aditivos farmacéuticamente aceptables, así como con una base o portador para la dispersión del agente o agentes activos. Los aditivos deseados incluyen, pero sin limitar, agentes de control del pH tales como arginina, hidróxido sódico, glicina, ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido acético, etc. Además, se pueden incluir anestésicos locales (p. ej., alcohol bencílico), agentes de isotonicidad (p. ej., cloruro sódico, manitol, sorbitol), inhibidores de la adsorción (p. ej., Tween 80), agentes potenciadores de la solubilidad (p. ej., ciclodextrinas y derivados de las mismas), estabilizantes (p. ej., albúmina de suero) y agentes de reducción (p. ej. glutatión). Cuando la composición para el suministro en la mucosa es un líquido, la tonicidad de la formulación, medida con referencia a la tonicidad de una disolución salina fisiológica al 0,9% (p/v) tomada como unidad, normalmente se ajusta a un valor al cual no se inducirá daño sustancial e irreversible en el tejido en la mucosa nasal en el sitio de administración. En general, la tonicidad de la disolución se ajusta a un valor de aproximadamente 1/3 a 3, más típicamente 1/2 a 2, y con más frecuencia 3/4 a 1,7.

El agente biológicamente activo se puede dispersar en una base o vehículo, que puede comprender un compuesto hidrófilo que tiene una capacidad para dispersar el agente activo y cualesquiera aditivos deseados. La base se puede seleccionar de una amplia variedad de portadores adecuados, incluyendo, pero sin limitar, copolímeros de poli(ácidos carboxílicos) o sales de los mismos, anhídridos carboxílicos (p. ej. anhídrido maleico) con otros monómeros (p. ej., (met)acrilato de metilo, ácido acrílico, etc.), polímeros de vinilo hidrófilos tales como poli(acetato de vinilo), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, derivados de celulosa tales como hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etc., y polímeros naturales tales como quitosán, colágeno, alginato sódico, gelatina, ácido hialurónico y sales de metales no tóxicos de los mismos. Con frecuencia, se selecciona un polímero biodegradable como una base o portador, por ejemplo, poli(ácido láctico), copolímero de poli(ácido láctico-ácido glicólico), poli(ácido hidroxibutírico), copolímero de poli(ácido hidroxibutírico-ácido glicólico) y mezclas de los mismos. Alternativamente o adicionalmente, se pueden usar como portadores ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como ésteres de ácido graso y poliglicerina, ésteres de ácido graso y sacarosa, etc. Los polímeros hidrófilos y otros portadores se pueden usar solos o combinados, y se puede impartir mayor integridad estructural al portador por cristalización parcial, enlace iónico, reticulación y similares. El portador se puede proporcionar en una variedad de formas, incluyendo, disoluciones fluidas o viscosas, geles, pastas, polvos, microesferas y películas para la aplicación directa a la mucosa nasal. El uso de un portador seleccionado en este contexto puede dar como resultado la promoción de la absorción del agente biológicamente activo.

El agente biológicamente activo se puede combinar con la base o portador de acuerdo con una variedad de procedimientos, y la liberación del agente activo puede ser por difusión, disgregación del portador, o formulación asociada de canales de agua. En algunas circunstancias, el agente activo se dispersa en microcápsulas (microesferas) o nanocápsulas (nanoesferas) preparadas a partir de un polímero adecuado, p. ej., 2-cianoacrilato de isobutilo, y se dispersa en un medio de dispersión biocompatible aplicado a la mucosa nasal, que da el suministro sostenido y actividad biológica a lo largo de un tiempo prolongado.

Para potenciar más el suministro en la mucosa de agente farmacéuticos de la invención, las formulaciones que comprenden el agente activo también pueden contener un compuesto hidrófilo de bajo peso molecular como una base o excipiente. Dichos compuestos hidrófilos de bajo peso molecular proporcionan un medio de paso a través del cual el agente activo soluble en agua, tal como un péptido o proteína fisiológicamente activo, se puede difundir a través de la base a la superficie del cuerpo donde el agente activo es absorbido. El compuesto hidrófilo de bajo peso molecular opcionalmente absorbe humedad de la mucosa o la atmósfera de administración y disuelve el péptido activo soluble en agua. El peso molecular del compuesto hidrófilo de bajo peso molecular en general no es mayor que 10000 y preferiblemente no mayor que 3000. El compuesto hidrófilo de bajo peso molecular de ejemplo incluye compuestos polioles, tales como oligo-, di- y monosacáridos tales como sacarosa, manitol, sorbitol, lactosa, L-arabinosa, D-eritrosa, D-ribosa, D-xilosa, D-manosa, trehalosa, D-galactosa, lactulosa, celobiosa, gentibiosa, glicerina y polietilenglicol. Otros ejemplos de compuestos hidrófilos de bajo peso molecular útiles como portadores en la invención, incluyen N-metilpirrolidona y alcoholes (p. ej., oligo(alcohol vinílico), etanol, etilenglicol, propilenglicol, etc.). Estos compuestos hidrófilos de bajo peso molecular se pueden usar solos o combinados con otro o con otros componentes activos o inactivos de la formulación intranasal.

Las composiciones de la invención pueden contener alternativamente como portadores farmacéuticamente aceptables, sustancias que se necesiten para acercarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc. Para composiciones sólidas se pueden usar los portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico de calidades farmacéuticas; sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato magnésico y similares.

Las composiciones terapéuticas para administrar el agente biológicamente activo también se pueden formular como una disolución, microemulsión u otra estructura ordenada adecuada para una concentración alta de principios activos. El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada para las disoluciones se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como de lecitina, manteniendo el tamaño de partículas deseado en el caso de formulaciones dispersables, y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico, en la composición. La absorción prolongada del agente biológicamente activo se puede llevar a cabo incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo sales de monoestearato y gelatina.

En algunas realizaciones de la invención, el agente biológicamente activo se administra en una formulación de liberación en el tiempo, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. El agente activo se puede preparar con vehículos que protegerán frente a la liberación rápida, por ejemplo un vehículo de liberación controlada tal como un polímero, sistema de suministro microencapsulado o gel bioadhesivo. El suministro prolongado del agente activo en diferentes composiciones de la invención se puede llevar a cabo incluyendo en la composición agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio, hidrogeles y gelatina. Cuando se desean formulaciones de liberación controlada del agente biológicamente activo, los aglutinantes de liberación controlada adecuados para usar de acuerdo con la invención, incluyen cualquier material de liberación controlada biocompatible que sea inerte para el agente activo y que sea capaz de incorporar el agente biológicamente activo. Se conocen numerosos materiales de estos en la técnica. Los aglutinantes de liberación controlada útiles son materiales que son metabolizados lentamente en condiciones fisiológicas después de su suministro intranasal (p. ej., en la superficie de la mucosa nasal, o en presencia de fluidos corporales después del suministro transmucosa). Los aglutinantes adecuados incluyen, pero sin limitar, polímeros y copolímeros biocompatibles usados previamente en la técnica en formulaciones de liberación sostenida. Dichos compuestos biocompatibles no son tóxicos y son inertes para los tejidos que los rodean, y no provocan efectos secundarios adversos significativos tales como irritación nasal, respuesta inmunitaria, inflamación o similares. Son metabolizados en productos metabólicos que también son biocompatibles y fácilmente eliminados del cuerpo.

Los ejemplos de materiales polímeros para usar en este contexto incluyen, pero sin limitar, matrices polímeras derivadas de poliésteres copolímeros y homopolímeros que tienen enlaces éster hidrolizables. Una serie de ellos se sabe en la técnica que son biodegradables y que conducen a productos de degradación que no tienen toxicidad o es baja. Los polímeros de ejemplo incluyen poli(ácidos glicólicos) (PGA) y poli(ácidos lácticos) (PLA), poli(DL-ácido láctico-co-ácido glicólico) (DL PLGA), poli(D-ácido láctico-co-ácido glicólico) (D PLGA) y poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (L PLGA). Otros polímeros biodegradables o bioerosionables útiles incluyen, pero sin limitar, polímeros tales como poli(epsilon-caprolactona), poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido láctico), poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico), poli(ácido beta-hidroxibutírico), poli(alquil-2-cianoacrilato), hidrogeles tales como poli(metacrilato de hidroxietilo), poliamidas, poliaminoácidos (es decir, L-leucina, ácido glutámico, L-ácido aspártico y simi-

lares), poli(ésteres de urea), poli(2-hidroxietil-DL-aspartamida), polímeros de poliacetales, poliortoésteres, policarbonato, polimaleamidas, polisacáridos y copolímeros de los mismos. Muchos procedimientos para preparar dichas formulaciones son conocidas en general para los expertos en la materia. Otras formulaciones útiles incluyen composiciones de liberación controlada, p. ej., microcápsulas, patentes de EE.UU. n° 4.652.441 y 4.917.893, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico útiles para hacer microcápsulas y otras formulaciones, patentes de EE.UU. n° 4.677.191 y 4.728.721, y composiciones de liberación sostenida para péptidos solubles en agua, patente de EE.UU. n° 4.675.189.

Para el suministro nasal y pulmonar, se conocen bien los sistemas de dispensación de aerosol controlada de líquidos terapéuticos en forma de pulverizador. En una realización, se administran dosis medidas de agente activo mediante una válvula de bomba mecánica especialmente construida, patente de EE.UU. n° 4.511.069.

Dosificación

Para los propósitos de tratamiento y profiláctico, el agente o agentes biológicamente activos descritos en el presente documento, se pueden administrar a un sujeto en un solo suministro de bolo, por suministro continuo (p. ej., suministro transdérmico, en mucosa o intravenoso) a lo largo de un periodo de tiempo prolongado, o en un protocolo de administración repetida (p. ej., un protocolo de administración repetida cada hora, diaria o semanal). En este contexto, una dosificación terapéuticamente eficaz del péptido regulador de glucosa puede incluir dosis repetidas dentro de un régimen de profilaxis o tratamiento prolongado, que dará resultados clínicamente significativos para aliviar uno o más síntomas o afecciones detectables asociadas con una enfermedad o afección objetivo como se ha expuesto antes. La determinación de las dosificaciones eficaces en este contexto se basa normalmente en estudios de modelos animales seguido de ensayos clínicos con seres humanos, y se guía por la determinación de dosificaciones eficaces y protocolos de administración que reducen significativamente la aparición o gravedad de los síntomas de enfermedad o afecciones objetivo en el sujeto. En relación con esto, los modelos adecuados incluyen, por ejemplo, modelos murino, de rata, porcino, felino, primate no humano, y otros sujetos modelos animales aceptados conocidos en la técnica. Alternativamente, las dosificaciones eficaces se pueden determinar usando modelos *in vitro* (p. ej., ensayos inmunológicos e histopatológicos). Usando dichos modelos, normalmente solo son necesarios cálculos y ajustes ordinarios para determinar una concentración y dosis adecuadas para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente o agentes biológicamente activos (p. ej., cantidades que son eficaces por vía intranasal, eficaces por vía transdérmica, eficaces por vía intravenosa, o eficaces por vía intramuscular, para provocar la respuesta deseada).

En una realización alternativa, la invención proporciona composiciones y procedimientos para el suministro intranasal del péptido regulador de glucosa, en los que el compuesto o compuestos peptídicos reguladores de glucosa se administran repetidamente por un régimen de dosificación intranasal eficaz que implica múltiples administraciones del péptido regulador de glucosa al sujeto durante un programa diario o semanal, para mantener un nivel terapéuticamente eficaz de pulsos elevados y disminuidos del péptido regulador de glucosa durante un periodo de dosificación prolongado. Las composiciones y procedimientos proporcionan un compuesto o compuestos peptídicos reguladores de glucosa que son autoadministrados por el sujeto en una formulación nasal entre 1 y 6 veces al día para mantener un nivel terapéuticamente eficaz de pulsos elevados y reducidos del péptido regulador de glucosa durante un periodo de dosificación prolongado de 8 h a 24 h.

Kits

La presente invención incluye kits, envases y unidades multienvase que contiene las composiciones farmacéuticas descritas antes, principios activos, y/o medios para administrarlos, para usar para prevenir y tratar enfermedades y otras afecciones en sujetos mamíferos. Brevemente, estos kits incluyen un envase o formulación que contiene uno o más proteínas y péptidos reguladores de glucosa, análogos y miméticos y/u otros agentes biológicamente activos en combinación con agentes potenciadores de la administración en la mucosa descritos en el presente documento, formulados en una preparación farmacéutica para el suministro en la mucosa.

Las formulaciones intranasales de la presente invención se pueden administrar usando cualquier botella pulverizadora o jeringuilla, o por instilación. Un ejemplo de botella de pulverización nasal es "Nasal Spray Pump w/ Safety Clip", (bomba de pulverización nasal con clip de seguridad) Pfeiffer SAP n° 60548, que suministra una dosis de 0,1 ml por chorro y tiene una longitud de profundidad del tubo de 36,05 mm. Se puede adquirir en Pfeiffer of America of Princeton, NJ.

Administración nasal con aerosol de un péptido regulador de glucosa

Los autores de la invención han descubierto que los PRG (péptidos reguladores de glucosa) se pueden administrar por vía intranasal usando un pulverizador o aerosol nasal. Esto es sorprendente porque muchas proteínas y péptidos han mostrado que se escinden o desnaturalizan debido a fuerzas mecánicas generadas por el accionador al producir la pulverización o aerosol. En este área son útiles las siguientes definiciones.

1. Aerosol - Un producto que está envasado bajo presión y contiene principios terapéuticamente activos que son liberados tras activación de un sistema de válvula adecuado.

ES 2 345 509 T3

2. Aerosol dosificado - Una forma de dosificación presurizada compuesta de válvulas dosificadoras, que permiten el suministro de una cantidad uniforme de pulverización tras cada activación.

3. Aerosol de polvo - Un producto que está envasado bajo presión y contiene principios terapéuticamente activos en forma de un polvo, que es liberado tras activación de un sistema de válvula adecuado.

4. Aerosol de pulverización - Un producto de aerosol que usa un gas comprimido como propulsor para proporcionar la fuerza necesaria para expulsar el producto como una pulverización húmeda; en general es aplicable a disoluciones de agentes médicos en disolventes acuosos.

5. Pulverización - Un líquido finamente dividido tal como por un chorro de aire o vapor. Los fármacos en pulverización nasal contienen principios terapéuticamente activos disueltos o suspendidos en disoluciones o mezclas de excipiente en dispensadores no presurizados.

6. Pulverización dosificada - Una forma de dosificación no presurizada que consiste en válvulas que permiten dispensar una cantidad especificada de pulverizador tras cada activación.

7. Pulverización de suspensión - Una preparación líquida que contiene partículas sólidas dispersas en un vehículo líquido y en forma de gotitas o en forma de sólidos finamente divididos.

Caracterización dinámica de fluidos de la pulverización en aerosol emitida por bombas de pulverización nasal dosificadoras como dispositivo de suministro de fármaco (DSF). La caracterización de la pulverización es una parte integral de la normativa reguladora necesaria para la aprobación de la Administración de Alimentos y Fármacos ("FDA") de la investigación y desarrollo, seguro de calidad y procedimientos de ensayos de estabilidad para bombas de pulverización nasal nuevas y existentes.

Se ha encontrado que la caracterización detallada de la geometría de las pulverizaciones es el mejor indicador del rendimiento global de las bombas de pulverización nasal. En particular, se ha encontrado que las mediciones del ángulo de divergencia (geometría del penacho) cuando sale del dispositivo; la forma elíptica del corte transversal de la pulverización, uniformidad y distribución de partículas/gotitas (patrón de pulverización); y la evolución en el tiempo de la pulverización en desarrollo, son las cantidades más representativas del rendimiento en la caracterización de una bomba de pulverización nasal. Durante los ensayos de seguridad y estabilidad de la calidad, las mediciones de la geometría del penacho y el patrón de la pulverización son identificadores clave para verificar la consistencia y conformidad con los criterios de datos aprobados para las bombas de pulverización nasal.

Definiciones

Altura del penacho - la medición desde el extremo del accionador al punto en el que el ángulo del penacho se convierte en no lineal debido a que se rompe el flujo lineal. Se basa en un examen visual de imágenes digitales, y para establecer un punto de medición para la anchura que sea coherente con el punto de medición más alejado del patrón de la pulverización, para este estudio se define una altura de 30 mm.

Eje mayor - la línea más larga que se puede trazar en el patrón de pulverización ajustado que cruza el centro de masas en unidades base (mm).

Eje menor - la línea más corta que se puede trazar en el patrón de pulverización ajustado que cruza el centro de masas en unidades base (mm).

Relación de elipticidad - la relación del eje mayor al eje menor, preferiblemente entre 1,0 y 1,5, y más preferiblemente entre 1,0 y 1,3.

D_{10} - el diámetro de la gotita para el que el 10% del volumen líquido total de la muestra consiste en gotitas de un diámetro menor (μm).

D_{50} - el diámetro de la gotita para el que el 50% del volumen líquido total de la muestra consiste en gotitas de un diámetro menor (μm), conocido también como diámetro medio ponderado.

D_{90} - el diámetro de la gotita para el que el 90% del volumen líquido total de la muestra consiste en gotitas de un diámetro menor (μm).

Anchura - medición de la anchura de la distribución, cuanto menor es el valor menor es la distribución. La anchura se calcula como:

$$\frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}}.$$

% DTR - porcentaje de la desviación típica relativa, la desviación típica se divide entre la media de la serie y se multiplica por 100, también se conoce como % CV.

5 Volumen - el volumen de líquido o polvo descargado del dispositivo de suministro con cada accionamiento, preferiblemente entre 0,01 ml y aproximadamente 2,5 ml y lo más preferiblemente entre 0,02 ml y 0,25 ml.

Todas las publicaciones, referencias, patentes, publicaciones de patente y solicitudes de patente citadas en el presente documento se incorporan cada uno específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad.

10 Aunque la invención se ha descrito en relación con determinadas realizaciones, y muchos detalles se han expuesto con propósitos de ilustración, será evidente para el experto en la materia que esta invención incluye realizaciones adicionales, y que algunos detalles descritos en el presente documento pueden variar considerablemente sin salirse de esta invención. Esta invención incluye dichas realizaciones adicionales, modificaciones y equivalentes. En particular, esta invención incluye cualquier combinación de características, términos o elementos de los diferentes componentes
15 y ejemplos ilustrativos.

El uso en el presente documento de los términos “un”, “una”, “el”, “la”, y términos similares que describen la invención y en las reivindicaciones, se considera que incluyen tanto el singular como el plural. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben considerarse términos abiertos que significan, por
20 ejemplo “que incluye, pero sin limitar”. La enumeración de un intervalo de valores en el presente documento, se refiere individualmente a cada valor separado que está en el intervalo como si se enumeraran individualmente en el presente documento, se citen o no expresamente algunos de los valores del intervalo. Los valores específicos usados en el presente documento se entenderán como ilustrativos y no limitantes del alcance de la invención.

25 Los ejemplos dados en el presente documento, y el lenguaje de ejemplo usado en el presente documento, tienen solo el propósito de ilustración y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Ejemplos

30 Ejemplo 1

Formulaciones de insulina Aspart

35 La tabla 1 describe las 12 formulaciones de insulina Aspart ensayada usando el sistema del modelo EpiAirway *in vitro* para el ensayo de resistencia transepitelial (TER), ensayo de viabilidad celular (MTT), ensayo de muerte celular por lactato deshidrogenasa (LDH), y ensayo de permeación tisular. Los resultados se usaron para determinar que formulación lograba el mejor grado de permeación tisular y reducción de TER sin producir una toxicidad celular significativa.

40 La insulina Aspart es un análogo de insulina que es homóloga a la insulina humana regular excepto por una única sustitución de prolina por ácido aspártico en la posición B28. NovoLog (NovoLogTM; Novo Nordisk Pharmaceuticals) es una disolución estéril, acuosa, transparente e incolora, que contiene insulina Aspart (análogo de insulina humana regular B28 asp) 100 unidades/ml, glicerina 16 mg/ml, fenol 1,50 mg/ml, metacresol 1,72 mg/ml, cinc 19,6 µg/ml, hidrogenofosfato disódico dihidrato 1,25 mg/ml, y cloruro sódico 0,58 mg/ml. NovoLog tiene un pH de 7,2-7,6. Se generaron nuevas formulaciones de insulina Aspart. Se fabricó un volumen total de 0,5 ml para cada formulación. Las formulaciones contenían diferentes concentraciones de insulina Aspart, diluyente NovoLog, y excipientes metil-β-ciclodextrina (M-β-CD), didecanoil-L-α-fosfatidilcolina (DDPC), y edetato disódico (EDTA), solo o combinado. También se incluyeron controles sin excipiente en el estudio. Se añadieron pequeñas cantidades de HCl o NaOH 2 N, cuando era necesario, a las formulaciones hasta alcanzar el pH deseado. Los reactivos que se usaron para preparar las
50 formulaciones se muestran en la tabla 2.

55

60

65

ES 2 345 509 T3

TABLA 1

Formulaciones de insulina Aspart para estudios in vitro				
Muestra	Insulina Aspart (U/ml)	Me- β -CD/DDPC/EDTA (mg/ml)	% de diluyente NovoLog que queda en la formulación	pH
1	5	45/1/1	5% de diluyente NovoLog	7
2	5	45/1/1	5% de diluyente NovoLog	4
3	5	0	5% de diluyente NovoLog	7
4	5	0	5% de diluyente NovoLog	4
5	5	45/1/1	100% de diluyente NovoLog	7
6	5	45/1/1	100% de diluyente NovoLog	4
7	5	0	100% de diluyente NovoLog	7
8	5	0	100% de diluyente NovoLog	4
9	20	45/1/1	20% de diluyente NovoLog	4
10	20	45/1/1	20% de diluyente NovoLog	3
11	5	0/0/10	5% de diluyente NovoLog	4
12	5	45/2//10	5% de diluyente NovoLog	4

TABLA 2

Reactivos de formulaciones de insulina Aspart				
Reactivo	Calidad	Proveedor	Cat n°	Lote Nastech n° / Lote proveedor n°
NovoLog	n/a	Novo Nordisk	n/a	PW51706
Metil- β -Ciclodextrina	Parma	Wacker	60007005	71P018
Didecanoil-L- α -Fosfatidicolina	GMP	NOF	MC-1010	0412101
Edetato disódico	USP	Spectrum	ED150	TF0419
Agua esteril para irrigación	USP	Spectrum/Braun	S1944	J5C225
Ácido clorhídrico 2 N	Research	JT Baker	5616-02	B18512
Hidróxido sódico 2 N	Research	JT Baker	5633-02	B06503

Ejemplo 2

Suministro en la mucosa nasal - Cinéticas de permeación y citotoxicidad

- 5 Los siguientes procedimientos se usan en general para evaluar parámetros de suministro en la mucosa nasal, cinéticas y efectos secundarios para la insulina en las formulaciones y los procedimientos de la invención, así como para determinar la eficacia y características de los diferentes agentes potenciadores de suministro en la mucosa descritos en el presente documento para la formulación combinatoria o administración coordinada con la insulina Aspart. En un protocolo de ejemplo, se demuestran las cinéticas de permeación y la carencia de citotoxicidad inaceptable para un agente potenciador del suministro intranasal, como se ha descrito antes, en combinación con un agente terapéutico biológicamente activo, ilustrado por la insulina Aspart.

Cultivos celulares

- 15 El sistema EpiAirway fue desarrollado por MatTek Corp (Ashland, MA) como un modelo para el revestimiento del epitelio pseudoestratificado del tracto respiratorio. Las células epiteliales se hacen crecer en insertos de cultivo celular con membrana porosa inferior en una interfase aire-líquido, que da como resultado la diferenciación de las células a una morfología altamente polarizada. La superficie apical es ciliada con una ultraestructura microvellosa y el epitelio produce moco (la presencia de mucina se ha confirmado por inmunotransferencia). Los insertos tienen un diámetro de 0,875 cm, proporcionando un área superficial de 0,6 cm². Las células se cultivan sobre los insertos en la fábrica aproximadamente 3 semanas antes del envío.

- Las membranas de cultivo EpiAirwayTM se recibieron el día antes de iniciar los experimentos. Se enviraron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) exento de rojo fenol y exento de hidrocortisona. Cada inserto de tejido se puso en un pocillo de una placa de 6 pocillos que contenían 0,9 ml de DMEM exento de suero. Después, las membranas se cultivaron durante 24 h a 37°C/CO₂ al 5% para dejar que los tejidos se equilibraran. Los insertos se alimentan cada día de recuperación. El medio basado en DMEM está exento de suero pero está complementado con factor de crecimiento epidérmico y otros factores. Se ensayó en el medio los niveles endógenos de cualquier citoquina o factor de crecimiento considerado para el suministro intranasal, y carecía de todas las citoquinas y factores estudiados hasta la fecha, excepto la insulina. El volumen era suficiente para proporcionar contacto del fondo de las unidades en sus soportes, pero la superficie apical del epitelio se dejó que permaneciera en contacto directo con el aire. Se usaron pinzas estériles en esta etapa y en todas las etapas posteriores que implicaban la transferencia de unidades a pocillos que contenían líquido para asegurar que no se atrapaba aire entre los fondos de las unidades y el medio.

- 35 El sistema del modelo EpiAirwayTM se usó para evaluar el efecto de cada formulación que contenía NovoLog en la TER, viabilidad celular (MTT), citotoxicidad (LDH) y permeación. Estos ensayos se describen a continuación en detalle. En todos los experimentos, la formulación de suministro en la mucosa nasal que se iba a estudiar se aplicó a la superficie apical de cada unidad en un volumen de 100 µl, que era suficiente para cubrir la superficie apical entera. Se dejó aparte un volumen adecuado de la formulación de ensayo a la concentración aplicada en la superficie apical (en general no es necesario más de 100 µl) para la determinación posterior de la concentración del material activo por ELISA u otro ensayo designado.

Resistencia eléctrica transepitelial (TER)

- 45 Las mediciones de TER se leyeron usando una Cámara de Medición de Resistencia de Tejidos conectada a un Voltímetro Epitelial con ambos terminales de los electros de World Precision Instruments ambos. Primero se leyó la TER base para cada inserto el día en que se inició el experimento. Después de leer la TER, se puso 1 ml de medio reciente en el fondo de cada pocillo en una placa de 6 pocillos. Los insertos se drenaron en una toalla de papel y se pusieron en los nuevos pocillos con medio de nueva aportación, mientras se mantenían los insertos numerados para la correlación con las mediciones de la TER base. Se añadieron 100 µl de formulación experimental a cada inserto. Los insertos se pusieron en un incubador con agitación a 100 rpm y 37°C durante 1 h.

- 55 Los electrodos y un inserto de blanco del cultivo tisular se equilibraron durante al menos 20 minutos en medio de nueva aportación con la alimentación eléctrica apagada antes de comprobar la calibración. Se midió la resistencia base con 1,5 ml de medio en la cámara de tejidos Endhom y 300 µl de medio en un inserto Millicell-CM de blanco. El electrodo superior se ajustó de modo que estaba sumergido en el medio pero no estaba en contacto con la superficie superior de la membrana del inserto. La resistencia base del inserto de blanco era 5-20 ohmios. Para cada determinación de la TER, se añadieron 300 µl de medio al inserto seguido de una incubación de 20 minutos a t.a. antes de ponerlo en la cámara Endhom para leer la TER. La resistencia se expresó como: (resistencia medida - blanco) x 0,6 cm². Todos los valores de TER se dieron en función del área superficial del tejido.

La TER se calculó como:

$$65 \quad TER = (R_I - R_b) \times A$$

ES 2 345 509 T3

En la que R_i es la resistencia del inserto con una membrana, R_b es la resistencia del inserto de blanco, y A es el área de la membrana ($0,6 \text{ cm}^2$). Una disminución del valor de la TER con respecto al valor de control (control = aproximadamente 1000 ohmios-cm^2 ; normalizado a 100) indica una disminución de la resistencia de la membrana celular y un aumento de la permeabilidad celular epitelial de la mucosa. Después de 1 h la incubación se había completado, los insertos de tejidos se retiraron del incubador. Se pusieron $200 \mu\text{l}$ de medio de nueva aportación en cada pocillo de una placa de 24 pocillos y los insertos de tejidos se transfirieron a la placa de 24 pocillos. Se añadieron suavemente a cada inserto de tejido $200 \mu\text{l}$ de medio de nueva aportación. Se midió otra vez la TER para cada inserto.

Después de transferir los insertos de los cultivos de tejido de la placa de 6 pocillos a la placa de 24 pocillos, el medio basal se subdividió en tres partes y se almacenó en tubos Eppendorf. Las tres subdivisiones se pusieron a -80°C hasta su uso.

Ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH)

Se ensayó la cantidad de muerte celular midiendo la liberación de LDH de las células usando un kit de ensayo de citotoxicidad CytoTox 96 de Promega Corp. Se realizaron muestras por triplicado para cada inserto de cultivo tisular en el estudio. Se cargaron $50 \mu\text{l}$ de medio recogido (almacenado a 4°C) por triplicado en una placa de 96 pocillos. Se usó medio exento de células de nueva aportación como blanco. Se añadieron $50 \mu\text{l}$ de disolución de sustrato (12 ml de tampón de ensayo añadidos a una botella reciente de mezcla de sustrato, hecha de acuerdo con el kit) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 30 min a T.a. en la oscuridad. Después de la incubación, se añadieron $50 \mu\text{l}$ de disolución de parada a cada pocillo y las placas se leyeron en un lector de placa de densidad óptica μQuant a 490 nm usando el software KCJr.

Ensayo de MTT

La viabilidad celular de cada inserto de cultivo tisular se ensayó por el ensayo de MTT (MTT-100, kit MatTek) que ensaya la actividad de la reductasa mitocondrial. Este kit mide la absorción y transformación de la sal de tetrazolio en el colorante formazán. El concentrado de MTT se descongeló y se diluyó con medio en una relación de 2 ml de MTT: 8 ml de medio. El concentrado de MTT diluido se transfirió con pipeta ($300 \mu\text{l}$) a una placa de 24 pocillos. Los insertos de tejido se secaron suavemente, se pusieron en los pocillos de las placas y se incubaron durante 3 h en la oscuridad a 37°C . Después de incubación, cada inserto se retiró de la placa, se secó suavemente y se puso en una placa de extracción de 24 pocillos. Los insertos de cultivo celular después se sumergieron en $2,0 \text{ ml}$ de disolución de extractante por pocillo (hasta cubrir completamente la muestra). La placa de extracción se cubrió y se cerró para reducir la evaporación del extractante. Después de incubación durante una noche a temperatura ambiente en la oscuridad, el líquido en cada inserto se volvió a decantar al pocillo del que se había sacado, y se descartaron los insertos. La disolución de extractante ($50 \mu\text{l}$) de cada pocillo se transfirió con pipeta por triplicado a una placa de microvaloración de 96 pocillos, junto con blancos de extractos y se diluyó con adición de $150 \mu\text{l}$ de disolución de extractante de nueva aportación. Se midió la densidad óptica a 550 nm en un lector de placa de densidad óptica μQuant usando el software KCJr.

Resultados de TER

Las mediciones de TER ($\text{ohmios} \times \text{cm}^2$) antes y después de la incubación de 1 h a 37°C para las formulaciones experimentales, se compararon con los controles. Los resultados muestran que las formulaciones que contienen potenciadores, excepto la $n^\circ 7$ y $n^\circ 8$, tienen una reducción de la TER significativa después de 1 h de incubación.

Resultados de MTT

Casi todas las formulaciones presentaron una viabilidad celular de aceptable a buena comparado con los controles. El % de MTT para la mayoría de las formulaciones era mayor que 80% (excepto la $n^\circ 1$, $n^\circ 6$ y $n^\circ 12$).

Resultados de LDH

La mayoría de las formulaciones ensayadas presentaban muy poca LDH, indicando una citotoxicidad muy baja.

Resumen

Los resultados de los ensayos de TER, MTT y LDH indican que las formulaciones $n^\circ 2$, $n^\circ 6$, $n^\circ 9$, $n^\circ 10$ y $n^\circ 11$ presentaban todas una reducción significativa de la TER sin aumento de la toxicidad.

Ejemplo 3

Permeabilidad de la insulina Aspart

Se usó ELISA para cuantificar la cantidad de insulina o de análogo de insulina que permeaba a través de la parte apical a la basolateral del inserto. La insulina está presente en el medio MatTek, por lo que los datos brutos se corrigieron restando la concentración media presente en la muestra de medio para todas las demás muestras.

ES 2 345 509 T3

Los kits de ELISA de iso-insulina se adquirieron en Alpcó Diagnostics, (Windham, NH, Cat. nº 08-10-1128-01). Las muestras se diluyeron con el tampón de ensayo que se proporcionaba con el kit. La dilución se mezcló en viales de HPLC silanizados transparentes con cubiertas revestidas de Teflón, por inversión suave. La densidad óptica de las muestras se midió a 450 nm (como se ha indicado en el protocolo) en el lector de placa de densidad óptica μ Quant usando el software KCJr.

Los volúmenes de carga eran 100 μ l por inserto y el tiempo de muestreo de la permeación era de 60 min. Cada formulación así como los controles, se ensayaron usando n = 3 insertos. Los controles para este estudio incluían medio basal MatTek y Triton X-100 al 9%. Cada inserto de tejido se puso en un pocillo individual que contenía 0,95 ml de medio basal MatTek. En la superficie apical de los insertos, se aplicaron 100 μ l de formulaciones de ensayo de acuerdo con el diseño del estudio, y las muestras se pusieron en un agitador (~100 rpm) durante 1 h a 37°C. Al final del periodo de incubación, se añadieron 50 μ l de ~20.000 kUI de aprotinina a cada medio de cultivo subyacente y se almacenaron a 2-8°C para los análisis de ELISA.

La Tabla 3 presenta los resultados de permeabilidad de las muestras basolaterales ensayadas por ELISA. Las medias se corrigieron restando la cantidad media de insulina presente en la muestras solo con medio, de las muestras experimentales.

TABLA 3

Resultados de % de permeación del ensayo de las formulaciones de insulina Aspart

Muestra nº	μ U/ml						%	
	Inserto a	Inserto b	Inserto c	Media	Media corregida*	Desv. típica	Permeación	Desv. típica
1	143346	121821	149478	138215	76124	14525	15,2	2,9
2	109255	130398	130532	123395	61304	12246	12,3	2,4
3	56179	68222	73138	65846	3755	8726	0,8	1,7
4	49425	65647	75448	63507	1415	13143	0,3	2,6
5	60867	61155	60857	60960	-1132	169	-0,2	0,0
6	51795	62832	65177	59935	-2157	7146	-0,4	1,4
7	38615	58850	69527	55664	-6428	15700	-1,3	3,1
8	50687	67669	63726	60694	-1398	8888	-0,3	1,8
9	248232	204930	281721	244961	182870	38500	9,1	1,9
10	246821	288253	265140	266738	204647	20762	10,2	1,0
11	113468	171342	171056	151955	89864	33331	18,0	6,7
12	190538	148489	169822	169616	107525	21025	21,5	4,2
Media		51745	72438	62092	0	14632	0,0	2,9

Estos resultados de permeación muestran que se pueden usar potenciadores de la permeación para suministrar la insulina Aspart mediante formulaciones intranasales. Todas las formulaciones que contenían potenciador dieron como resultado al menos 9% (~9-21%) de permeación comparado con las formulaciones sin potenciadores que dieron como máximo ~1-2%. Las muestras con la mayor potenciación de la permeabilidad incluían la nº 1, nº 2, nº 9, nº 10, nº 11 y nº 12. Cuando se consideraron junto con los resultados de TER, MTT y LDH, las muestras nº 2 (Insulina Aspart 5 U/ml, Me- β -CD 45 mg/ml, DDPC 1 mg/ml, EDTA 1 mg/ml, diluyente NovoLog al 5%, pH 4); nº 9 (Insulina Aspart

20 U/ml, Me- β -CD 45 mg/ml, DDPC 1 mg/ml, EDTA 1 mg/ml, diluyente NovoLog al 20%, pH 4); n° 10 (Insulina Aspart 20 U/ml, Me- β -CD 45 mg/ml, DDPC 1 mg/ml, EDTA 1 mg/ml, diluyente NovoLog al 20%, pH 3); y n° 11 (Insulina Aspart 5 U/ml, Me- β -CD 0 mg/ml, DDPC 0 mg/ml, EDTA 10 mg/ml, diluyente NovoLog al 5%, pH 4) tienen la mayor potenciación de la permeabilidad con la menor toxicidad celular.

Ejemplo 4

Efectos de NPG y PN159 en la permeabilidad de la insulina

Los experimentos *in vitro* evaluaban el efecto de los potenciadores de la permeación tanto moléculas pequeñas como basados en péptidos, en la permeabilidad de la insulina. Se aplicaron 7 tratamientos diferentes a placas de 96 pocillos EpiAirway durante 1 h a 37°C con 0,1 U de insulina aplicada en el lado apical. La curva patrón y los controles alto y bajo eran como se esperaban, y el aumento de insulina en el medio basolateral mostró casi 100% de recuperación. Los tratamientos incluían: PBS + insulina 0,1 U; PN159 25 μ M + insulina 0,1 U; PN159 50 μ M + insulina 0,1 U; PDF + insulina 0,1 U; PBS + insulina 0,1 U + NTPG 150 mM; PN159 25 μ M + insulina 0,1 U + NPG 150 mM; y PDF + insulina 0,1 U + NPG 150 mM.

La insulina usada en este estudio es la insulina humana recombinante Sigma (derivada de levadura), de secuencia natural. Esta insulina humana recombinante se obtiene de proinsulina y es química, física y biológicamente idéntica a la insulina humana pancreática. PBS es disolución salina tamponada con fosfato. PDF es una mezcla que consiste en metil- β -ciclodextrina 45 mg/ml, tetraacetato de etilendiamina 1 mg/ml, didecanoilfosfatidilcolina 1 mg/ml, y acetato 10 mM, pH 5,5. El estabilizador monomérico (NPG) es N-pivaloil-glucosamina. PN159 es un péptido descrito en la solicitud de patente de EE.UU. en tramitación con la presente n° 11/233.239. Los resultados se muestran en la tabla 4, como sigue:

TABLA 4

Resultados de permeabilidad con formulaciones con PDF, PN159 y NPG			
	% de permeabilidad medio	DT	n° de veces de potenciación
PBS	0,254	0,028	1,00
PN159 25 μ M	0,807	0,289	3,173
PN159 50 μ M	2,504	0,814	9,849
PDF	3,110	2,007	12,235
NPG	0,256	0,045	1,009
PN159 25 μ M/NPG	1,839	1,080	7,233
PDF/NPG	7,673	0,817	30,184

PN159 aumentó la permeabilidad de la insulina: PN159 25 μ M dio como resultado 0,8% de permeabilidad, mientras que PN159 50 μ M aumentó la permeabilidad a 2,5%. Combinado con NPG, PN159 25 μ M dio como resultado una permeabilidad de 1,8%. Los resultados mostraron que PDF solo proporcionaba 3% de permeabilidad, aproximadamente 12 veces mayor que PBS solo. Cuando PDF se combinó con NPG la permeabilidad aumentó a 7,6%, un aumento de 30 veces frente a PBS.

Se llevó a cabo un estudio adicional para ensayar TER, LDH, MTT y la permeabilidad de las formulaciones mostradas en la tabla 5, incluyendo formulaciones que contenían PN159. Todas las formulaciones se ensayaron con n = 3 insertos en el modelo de EpiAirway. La insulina regular era aproximadamente 28 U/mg (es decir, 200 U/ml = ~7,14 mg/ml).

Tabla 5

Formulaciones											
n°	Insulina regular (U/ml)	Me-β-CD (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)	PN159 (μM)	Tampón de Arg (mM)	NaCl (mg/ml)	MP (mg/ml)	PP (mg/ml)	PG (mg/ml)	pH
1	200	45	1	10	0	10	0	0,33	0,17	10	7,3
2	1000	45	1	10	0	10	0	0,33	0,17	10	7,3
3	1200	45	1	10	0	10	0	0,33	0,17	10	7,3
4	400	45	1	10	0	10	0	0,33	0,17	10	7,3
5	400	0	0	0	25 ⁺	10	4	0	0	0	7,3
6	400	0	0	0	50 ⁺	10	4	0	0	0	7,3
7	400	45	0	10	50 ⁺	10	4	0	0	0	7,3
8	400	0	0	0	0	10	7	0	0	0	7,3
9	Control de PBS										
10	Control de Triton al 9% X 100										
Abreviaturas: Arg = Arginina, Me-β-CD = metil-beta-ciclodextrina, EDTA = edetato disódico, NaCl = cloruro sódico, MP = metilparabeno de sodio, PP = propilparabeno de sodio, PG = propilenglicol											

ES 2 345 509 T3

Los resultados de las mediciones de TER (ohmios x cm²) antes y después de la incubación de 1 h a 37°C para las formulaciones experimentales se compararon con los controles. Los resultados muestran que las formulaciones que contenían potenciadores, tenían una reducción de la TER significativa después de 1 h de incubación. Las formulaciones nº 5, nº 6 y nº 8 mostradas, tenían viabilidad celular y todas las formulaciones excepto la nº 7, tenían toxicidad celular mínima, similar al control de PBS. Los resultados de permeación se muestran en la tabla 6.

TABLA 6

Resultados de permeación		
nº	% de permeación media	Desv. Típica
1	4,47	0,70
2	1,99	0,12
3	2,40	0,25
4	2,17	0,13
5	1,42	0,34
6	1,48	0,17
7	4,66	1,68
8	0,00	0,00

Las formulaciones nº 1, (4,47%) y nº 7 (4,66%) tenían el porcentaje más alto de permeabilidad. Estos datos muestran que la adición de PN159 no potenciaba significativamente la permeación de la insulina frente a la formulación de PDF (Me- β -CD, DDPC y EDTA) *in vitro*.

Ejemplo 5

Efecto de tampones alternativos en la permeabilidad de insulina

Se realizó un estudio de permeabilidad para comparar tampones alternativos en combinación con la formulación de PDF (Me- β -CD, DDPC y EDTA). Estos datos de permeabilidad se generaron por ELISA (de LINCO Research, Inc. Catálogo nº EZHI-14K) después de una incubación de 60 min y usando un volumen de carga de 50 μ l. Todas las formulaciones listadas en la tabla 7 tienen una buena viabilidad celular y citotoxicidad baja, medido por los ensayos de MTT y LDH.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 7

Resultados de permeabilidad con tampones alternativos

n°	Conc. insulina (U/ml)	Me- β -CD/DDPC/EDTA (mg/ml)	Conc. de Cremphor EL (mg/ml)	Conc. de Tween 80 (mg/ml)	Conc. de tampón de fosfato (mM)	Conc. de tampón de acetato (mM)	Conc. de tampón de arginina (mM)	Conc. de cloruro sódico (mg/ml)	pH	% de permeación	Desv. típica
1	280	45/1/1	0	0	0	10	0	4	3	9,25	1,06
2	280	45/1/1	0	0	0	10	0	4	4	10,88	3,29
3	280	22,5/0,5/0,5	0	0	0	10	0	4	3	11,76	1,14
4	280	45/1/1	0	0	10	0	0	4	7	28,3	9,54
5	280	45/1/1	0	0	0	10	0	4	3,5	12,82	2,29
6	280	45/1/1	5	0	0	10	0	4	3,5	12,28	4,6
7	280	45/1/1	10	0	0	10	0	4	3,5	11,99	2,16
8	280	45/1/1	0	1	0	10	0	4	3,5	11,32	2,73
9	280	45/1/1	0	10	0	10	0	4	3,5	7,61	1,15
10	840	45/1/1	0	0	10	0	0	4	7	12,82	1,57
11	840	45/1/1	5	0	10	0	0	4	7	13,86	5,72
12	280	45/1/1	0	0	10	0	0	4	7	7,14	4,5
13	840	45/1/1	0	10	10	0	0	4	7	5,45	3,12
14	280	45/1/1	0	0	0	0	10	4	7	5,1	2,2
15	840	45/1/1	0	0	0	0	10	4	7	3,72	2,69
16	280	0/0/0	0	0	0	10	0	7	3,5	0,00003	0,00002

El tampón de arginina era un tampón de rendimiento modesto con un porcentaje de permeabilidad de insulina de 3% a 6%. Las formulaciones con tampón de acetato alcanzaron un % de permeabilidad de 7% a 12%. El % de permeabilidad para las formulaciones con tampón de fosfato variaba de 5% a 28%. El mayor % de permeabilidad, 28%, se logró con tampón de fosfato 10 mM, Me- β -CD 45 mg/ml, DDPC 1 mg/ml, EDTA 1 mg/ml, insulina 280 U/ml a pH 7 (n° 4).

Ejemplo 6

Estudios de cribado in vitro para la formulación de insulina intranasal óptima

- 5 Se realizó un cribado preliminar *in vitro* para formulaciones de insulina de 280 U/ml y 840 U/ml en concentraciones de componentes e intervalos de pH variados. La formulación base 1X PDF incluía Me- β -CD 45 mg/ml, DDPC 1 mg/ml, EDTA 1 mg/ml, acetato 10 mM, fosfatasa 10 mM y NaCl 220 mOsm/kg. Los componentes de la formulación del estudio 1 *in vitro* se muestran en la tabla 8.

TABLA 8

Componentes de la formulación del estudio 1 in vitro			
Componente	Concentración (mg/ml)		
Insulina regular	10 (280 U/ml)	30 (840 U/ml)	
Me- β -CD	45	90	
DDPC	0,5	1	2
EDTA	0,5	1	2
Acetato	0,6 (10 mM)		
Fosfatasa	1,4 (10 mM)		
NaCl	c.s.p. ~220 mOsm/kg de H ₂ O		
pH	3	4	7

- 35 El transcurso de tiempo ensayado para el primer experimento *in vitro* incluía incubaciones de 30, 60 y 120 minutos. Las incubaciones se hicieron en PBS con Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (obsérvese que la insulina está presente en el medio de referencia MatTrek). Las condiciones de ensayo incluían centrifugación a 100 rpm a 37°C y aplicación de 50 μ l de la formulación de ensayo. Se observó una reducción significativa de la TER con todas las formulaciones. Se observó toxicidad alta con el ensayo de MTT, y se observó viabilidad celular baja con los ensayos de LDH.

- 40 Los datos de permeación para la concentración de insulina de 280 U/ml se tomaron a los 30 y 60 minutos y se compararon en formulaciones 1X PDF, pH 3; 2X PDF, pH 3; 1X PDF, pH 4; y 0,5X PDF, pH 3. Se logró una permeación de aproximadamente 10% con 1X PDF, pH 3; 1X PDF, pH 4; y 0,5X PDF, pH 3 a los 60 minutos. 2X PDF, pH 3 dio como resultado una permeación de 2%. El control sin potenciador mostró una permeación menor que 1%.

- 50 Los datos de permeación para las concentraciones de insulina de 280 U/ml y 840 U/ml se compararon a los 30 y 60 minutos en la formulación de 2X PDF, pH 3. No se observaron diferencias significativas en la permeación debido a la alta variabilidad, posiblemente causada por precipitación en la concentración de insulina alta.

- 55 Los datos de permeación para la concentración de insulina de 280 U/ml tomados a los 30 y 60 minutos en 1X PDF, pH 3 se compararon con 1X PDF, pH 7. Los resultados mostraron que la formulación a pH 7 se comportaba mejor que a pH 3. El porcentaje de permeación para 1X PDF, pH 3, era 10%, mientras que la permeación para 1X PDF, pH 7, era 35%.

Resumen del estudio 1 in vitro

- 60 Los estudios de permeación con incubaciones de 30, 60 y 120 minutos en PBS (con Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺) dieron como resultado una alta citotoxicidad y viabilidad celular baja. 1X y 0,5X PDF dieron mejor permeación que 2X PDF. PDF podía solubilizar 10 mg/ml (es decir, 280 U/ml), pero no 30 mg/ml (es decir, 840 U/ml). Los resultados de porcentaje de permeación eran mayores para pH 7 que pH 3.

- 65 Se llevó a cabo un segundo estudio usando 1X PDF (Me- β -CD 45 mg/ml, DDPC 1 mg/ml, EDTA 1 mg/ml, acetato 10 mM, fosfatasa 10 mM y NaCl 220 mOsm/kg) como formulación base. Los componentes de la formulación del estudio 2 *in vitro* se muestran en la tabla 9.

TABLA 9

Componentes de la formulación del estudio 2 in vitro			
Componente	Concentración (mg/ml)		
Insulina regular	10 (280 U/ml)	30 (840 U/ml)	
Me-β-CD	45		
DDPC	1		
EDTA	1		
Polisorbato 80 (Tween 80)	0	1	10
Cremophor EL (CEL)	0	5	10
Acetato	0,6 (10 mM)		
Fosfatasa	1,4 (10 mM)		
NaCl	c.s.p. ~220 mOsm/kg de H ₂ O		
pH	3,5	7	

El transcurso de tiempo para el segundo experimento *in vitro* incluía una incubación de 60 minutos. La incubación se hizo en PBS con Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺. Las condiciones de ensayo incluían centrifugación a 100 rpm a 37°C y aplicación de 50 μ l de la formulación de ensayo. Se observó una reducción significativa de la TER con todas las formulaciones. Se observó toxicidad alta con el ensayo de MTT, y se observó viabilidad celular baja con los ensayos de LDH, incluso sin solubilizadores.

Los datos de permeación para la concentración de insulina de 280 U/ml se tomaron a los 60 minutos y se compararon en formulaciones 1X PDF, pH 3,5; 1X PDF, pH 7; 1X PDF + 0,5% CEL, pH 3,5; 1X PDF + 1% CEL, pH 3,5; 1X PDF + 0,1% Tween 80, pH 3,5; y 1X PDF + 1% Tween 80, pH 3,5. Se logró al menos 10% de permeación con todas las formulaciones a pH 3,5. La permeación aumentó en las formulaciones a pH 7 comparado con pH 3,5.

Los datos de permeación para las concentraciones de insulina de 280 U/ml y 840 U/ml se compararon a los 60 minutos en formulaciones de 1X PDF, pH 7; 1X PDF + 0,5% CEL, pH 3,5; 1X PDF + 0,5% CEL, pH 7; 1X PDF + 1% CEL, pH 3,5; 1X PDF + 0,1% Tween 80, pH 3,5; y 1X PDF + 1% Tween 80, pH 3,5. Las formulaciones de insulina de 840 U/ml eran visiblemente solubles en la superficie del inserto cuando estaban presentes solubilizantes. Todas las formulaciones tenían permeabilidad similar, con la excepción de las formulaciones a pH 7 que tenían mayor permeabilidad que las formulaciones a pH 3,5.

Resumen del estudio 2 *in vitro*

Las formulaciones de insulina de concentración alta (840 U/ml) se estabilizaron (y solubilizaron) satisfactoriamente en presencia de un agente tensioactivo adicional (es decir, Tween o Cremphor). Incluso con 60 min de incubación se observó aumento de la citotoxicidad y disminución de la viabilidad celular para todas las formulaciones *in vitro*.

Se realizó un tercer estudio para determinar los efectos *in vitro* en la permeación de 3 agentes tensioactivos diferentes (Tween 80, Tween 20 y Pluronic F68) usando formulaciones de insulina de 280 U/ml y 840 U/ml, 1X PDF a pH 7. Los componentes de la formulación del estudio 3 *in vitro* se muestran en la tabla 10.

TABLA 10

Componentes de la formulación del estudio 3 in vitro			
Componente		Concentración (mg/ml)	
Insulina regular	10 (280 U/ml)		30 (840 U/ml)
Me-β-CD	45		
DDPC	0	1	
EDTA	1	10	
Tween 80	0	1	10
Tween 20	0	1	10
Pluronic F68	0	0,1	1
Arginina	2,1 (10 mM)		
NaCl	c.s.p. ~220 mOsm/kg deH ₂ O		
pH	7		

El transcurso de tiempo para el tercer experimento *in vitro* incluía una incubación de 60 minutos. La incubación se hizo en PBS con Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺. Las condiciones de ensayo incluían centrifugación a 100 rpm a 37°C y aplicación de 50 μ l de la formulación de ensayo. Se observó una reducción significativa de la TER con todas las formulaciones. Se observó toxicidad alta con el ensayo de MTT, y se observó viabilidad celular baja con los ensayos de LDH.

Los datos de permeación para las concentraciones de insulina de 280 U/ml y 840 U/ml se tomaron a los 60 minutos y se compararon en formulaciones de 1X PDF + Tween 80 al 1%, pH 7; 1X PDF + Pluronic F68 al 0,01%, pH 7; y 1X PDF + Pluronic F68 al 0,1%, pH 7. Los resultados mostraron que Pluronic F68 no solubilizaba la insulina suficientemente para potenciar la permeación.

Se ensayaron los efectos de Tween 80 y Tween 20 en la permeación de la insulina en la formulación 1X PDF (concentración de insulina 280 U/ml y 840 U/ml). Los datos de porcentaje de permeación se compararon a los 60 min en las formulaciones de 1X PDF + Tween 80 al 1%, pH 7; 1X PDF + Tween 80 al 0,1%, pH 7; 1X PDF (sin DDPC) + Tween 80 al 1%, pH 7; 1X PDF (sin DDPC) + Tween 80 al 0,1%, pH 7; 1X PDF + Tween 20 al 1%, pH 7; 1X PDF + Tween 20 al 0,1%, pH 7; y 1X PDF + Tween 80 al 1%, pH 7 (hipotónico). Los resultados mostraron que Tween al 1% (tanto Tween 80 como Tween 20) proporcionan mayor permeación que Tween al 0,1%. Los resultados de permeación para Tween 20 eran los mismos que para Tween 80. La eliminación de DDPC no tenía efecto en el % de permeación en estas formulaciones.

Se ensayó el efecto en la permeación de insulina 280 U/ml en las formulaciones 1X PDF a pH 7, de cantidades crecientes de Tween 80 (0,01%, 0,1%, 0,5% y 1%). La cantidad de Tween 80 en la formulación afectaba al % de permeación. La permeación aumentó con la concentración creciente de Tween 80. Se ensayó además el análisis del efecto de la concentración de Tween en la permeación en las formulaciones de 1X PDF con Tween 80 al 1%, 2% y 5%. Además, se ensayó la permeación con las formulaciones de 2X PDF con Tween 80 al 1% y 2%. Los resultados mostraron que una vez que la concentración de Tween 80 era superior al 1%, en 1X o 2X PDF, no había más potenciación de la permeación *in vitro*.

El efecto de eliminar la Me- β -CD en la permeación, se ensayó con las formulaciones de Tween al 0,1% y Tween al 1% (que contenían EDTA 1 mg/ml y 10 mg/ml). La eliminación de Me- β -CD de la formulación dio como resultado una aumento espectacular de la permeación. Los resultados se observaron con las formulaciones tanto de 280 U/ml como de 840 U/ml.

Resumen del estudio 3 *in vitro*

Tanto Tween 80 como Tween 20 dieron como resultado buena permeación *in vitro* cuando se usaron en combinación con formulaciones de 1X PDF. Pluronic F68 no potenció la permeación, Tween 80 ó 20 solos no son suficientes para lograr mayor permeación de la insulina *in vitro*. La eliminación de la Me- β -CD de la formulación dio como resultado una disminución significativa de la permeación de insulina. El aumento de Tween hasta 1% dio como resultado aumento de la permeación, pero por encima de 1% no se observó beneficio adicional. Una formulación de Tween al 1% es más baja que algunos productos nasales que contienen Tween comercializados.

Ejemplo 7

Datos de estabilidad de la formulación de insulina

- 5 Se llevó a cabo un estudio de estabilidad durante el uso durante hasta 28 días a 5°C, 25°C, 40°C y 50°C para las formulaciones de pulverización de insulina 1X PDF (Me- β -CD 45 mg/ml, DDPC 1 mg/ml, EDTA 1 mg/ml, acetato 10 mM, fosfatasa 10 mM y NaCl 220 mOsm/kg). Se usó la HPLC para ensayar el % de recuperación de péptido. Los parámetros de la formulación evaluados en el estudio se muestran en la Tabla 11.

10

TABLA 11

15

20

25

30

Parámetros de la formulación del estudio de la estabilidad de insulina preliminar			
Componente	Concentración (mg/ml)		
Insulina regular	10 (280 U/ml)		30 (840 U/ml)
Me-P-CD	0		45
DDPC	0		1
EDTA	0		1
Tween 80	0	1	10
Arginina	2,1 (10 mM)		
NaCl	c.s.p. ~220 mOsm/kg de H ₂ O		
pH	3,5		7

35

40

Las formulaciones de pulverización de insulina de 1X PDF permanecieron más estables comparadas con la insulina almacenada con sal y tampón solos. La presencia de Tween no afectó a la estabilidad de las formulaciones de 1X PDF. Las formulaciones a pH 7,0 mantenían una estabilidad mucho mejor que las formulaciones a pH 3,5. La estabilidad de la insulina almacenada en 1X PDF era muy buena en los 28 días a 5°C, 25°C, 40°C y 50°C, y se observó una recuperación reivindicada en la etiqueta de aproximadamente 100% para las concentraciones de insulina tanto de 280 U/ml como de 840 U/ml.

45

50

Se llevaron a cabo más ensayos durante el uso (dosis unitaria y 8 días) para evaluar la estabilidad de las formulaciones de pulverización de insulina de 1X PDF. Se usó la “dosis unitaria” para evaluar la estabilidad de la pulverización de insulina después de cebado y un accionamiento. Las condiciones para el estudio durante el uso de 8 días incluían el accionamiento tres veces al día (TID), 8 días, con almacenamiento a 5°C y 30°C. Los estudios ensayaban el contenido de péptido. Los resultados de los estudios del contenido de péptido durante el uso, mostraron que las formulaciones de pulverización de insulina en PDF demostraron buena estabilidad tanto para la dosis unitaria como para el uso durante 8 días. La estabilidad a la temperatura de almacenamiento de 30°C apareció tan estable como la temperatura de almacenamiento a 5°C en este estudio.

Ejemplo 8

Resultados farmacocinéticos de la insulina administrada por vía intranasal en conejos

- 55 Los valores farmacocinéticos (PK; es decir, mediciones de insulina) se midieron para conejos blancos de Nueva Zelanda tratados con insulina en los tiempos de medición especificados hasta 240 minutos. Se incluyeron en el estudio 4 grupos de administración intranasal (IN), 1 grupo de subcutánea (SC) y 1 grupo de intravenosa (IV), que generaron los datos de biodisponibilidad. Cada grupo incluía 5 conejos macho. Todos los cálculos de datos están normalizados con la dosis y los datos PK están corregidos con los valores iniciales. Los detalles del tratamiento y la dosificación para el estudio PK 1 se muestran en la tabla 12.

65

TABLA 12

Detalles del tratamiento y dosificación para el estudio PK 1 (y PD) en conejo								
Vía/ grupo ID	Nivel de dosis de insulina (UI/kg)	Me- β -CD (mg/ml)	DDPC (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)	Tampón de Arg (mM)	NaCl (mg/ml)	pH
IN/1X PDF (1)	3	45	1	1	0	10	4	7
IN/1X PDF-Tween (2)	3	45	1	1	10	10	4	7
IN/1X PDF-Tween (3)	6	45	1	1	10	10	4	7
Control IN(4)	3	0	0	0	0	10	7	7
SC (5)	0,6	0	0	0	0	10	9	7
Infusión IV (6)	0,3	0	0	0	0	10	9	7

Los resultados del estudio PK 1 se muestran en la tabla 13 y la figura 1. La administración IN de insulina dio como resultado un $T_{\text{máx}}$ más rápido que con la insulina regular SC. El n° 3, IN/1X PDF con Tween al 1% (dosis 6 UI/kg), mostró el máximo más alto de las formulaciones intranasales. El porcentaje de biodisponibilidad (BD) de insulina era ~3-5% tanto para las formulaciones tanto n° 2 como n° 3 IN/1X PDF con Tween al 1% (con respecto a las SC). El % de BD absoluto para la SC era 30%, mientras que para la IN era 1%. El % CV para la IN era 50% mientras que la SC era 20%, basado en el AUC.

TABLA 13

Resultados del estudio PK 1 en el conejo				
Formulación (Grupo)	Dosis (UI/kg)	$T_{\text{máx}}$ (min)	$C_{\text{máx}}$ (uUI/ml)	$AUC_{\text{último}}$ (min*uUI/ml)
IN/1X PDF (1)	3	16,00	11,02	411,20
IN/1X PDF-Tween(2)	3	11,67	35,38	543,44
IN/1X PDF-Tween (3)	6	18,00	81,00	2118,50
Control IN (4)	3	240,00	2,32	164,00
Regular SC (5)	0,6	30,00	128,28	7744,40
Infusión IV (6)	0,3	10,00	1352,30	12701,90

ES 2 345 509 T3

Se llevó a cabo un segundo estudio PK para comparar las formulaciones intranasales de PDF más Tween con la formulación de acción rápida de NovoLog (el diluyente NovoLog consiste en: glicerina 16 mg/ml, fenol 1,5 mg/ml, m-cresol 1,72 mg/ml, cinc 19,6 µg/ml, hidrogenofosfato de disodio dihidrato 1,25 mg/ml y NaCl 0,58 mg/ml, pH 7,2-7,6). Los parámetros del estudio PK 2 se presentan en la tabla 14.

TABLA 14

Parámetros de la formulación para el estudio PK (y PD) 2								
Formulación (grupo)	Dosis de insulina (UI/kg)	Me-β-CD (mg/ml)	DDPC (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)	Tampón de Arg (mM)	NaCl (mg/ml)	pH
IN/1X PDF Tween 1%	6	45	1	1	10	10	4	7
IN/1X PDF (sin DDPC)	6	45	0	1	10	10	4	7
IN/1X PDF Tween 2%	6	45	1	1	20	10	4	7
IN/1X PDF Tween 5%	6	45	1	1	50	10	4	7
IN/2X PDF Tween 1%	6	90	2	2	10	10	4	7
IN 2X PDF Tween 2%	6	90	2	2	20	10	4	7
PDF SC	0,6	45	1	1	10	10	4	7
NovoLog SC	NovoLog 0,6 UI/kg (3 U/ml) en diluyente NovoLog							7,4

En la tabla 15 se presentan $T_{\max}$, % de $C_{\max}$, $AUC_{\text{último}}$, AUC_{inf} y % de BD con respecto a los resultados con NovoLog SC del estudio 2 con los valores base PK restados; también se incluyen los resultados del estudio 1 para las formulaciones IN/1X PDF Tween 1% (nº 3) y Regular SC (nº 5). Los resultados del estudio PK 2 se muestran en la figura 2. La curva PK para el estudio 2 es similar a la curva vista en el estudio 1, que muestra los resultados de IN/1X PDF en un perfil PK de acción rápida. Se observó un segundo máximo de insulina en algunos animales tratados por vía IN.

TABLA 15

Resultados del estudio PK 2 en conejos					
Formulación (Grupo)	T _{máx} (min)	%C _{máx} (μUI/ml)	AUC _{último} (min*μUI/ml)	AUC _{inf} (min*μUI/ml)	%BD
IN/1X PDF Tween 1%	30	73,84	1766,20	3445,μ22	2,2
IN/1X PDF Tween 1%*	18	81,00	2397,00	4192,93	2,9
IN/1X PDF (sin DDPC)	19	56,32	1549,00	2868,44	1,9
IN/1X PDF Tween 2%	27	97,65	4106,48	2436,22	5,0
IN/1X PDF Tween 5%	24	65,30	1412,40	2253,16	1,7
IN/2X PDF Tween 1%	15	79,24	2744,00	4173,69	3,4
IN/2X PDF Tween 2%	22,5	73,28	2283,34	7819,15	2,8
Regular SC*	30	128,38	7750,15	8982,12	95,0
PDF SC	29	141,60	5830,50	8821,04	71,4
NovoLog SC	23	268,84	8160,70	12338,64	
*Resultados del estudio PK 1					

Los resultados del estudio PK 2 muestran que la formulación IN/1X PDF Tween al 2% tiene el % de BD, C_{máx} y AUC_{último} mayores de las formulaciones intranasales ensayadas. El % de BD, C_{máx} y AUC_{último} disminuyeron cuando se eliminó el DDPC. Los resultados para IN/1X PDF Tween al 1% para el estudio 2 estaban de acuerdo con los resultados del estudio 1. Las insulinas regular SC, Novolog SC y PDF SC dieron biodisponibilidades similares. Para el % de BD, las formulaciones intranasales dieron aproximadamente 2-5% de biodisponibilidad. IN/1X PDF Tween 2% mostró la biodisponibilidad más alta de 5%.

Ejemplo 9

Datos farmacodinámicos de insulina administrada por vía intranasal en conejos

Los valores farmacodinámicos (PD; es decir, mediciones de glucosa) se midieron para conejos blancos de Nueva Zelanda tratados con insulina en los tiempos de medición especificados hasta 240 min. La glucosa se midió por duplicado en cada tiempo de medición usando un glucómetro (One-Touch Ultra). Los resultados PD del estudio 1 (los grupos de ensayos se muestran en el ejemplo 8, tabla 12 anterior) se muestran en la tabla 16 y figura 3. Todos los cálculos de datos se normalizaron para la dosis, el % de BD se basó en valores de ensayo nominales del artículo de ensayo.

TABLA 16

Resultados del estudio PD 1					
Formulación (Grupo)	Dosis (UI/kg)	T _{min} (min)	C _{min} (%)	AUC (% de glucosa*min)	% BD de glucosa
IN/1X PDF (1)	3	15	93,5	420,79	1,3
IN/1X PDF-Tween (2)	3	30	64,5	2777,92	8,3
IN/1X PDF-Tween (3)	6	45	43,6	5205,66	7,8
Control IN(4)	3	15	87	197,15	0,6
Regular SC(5)	0,6	120	41,4	6706,55	100,0
Infusión IV (6)	0,3	25	49,6	3179,51	94,8

En el estudio 1, el % de C_{min} para las formulaciones de insulina IN/PDF-Tween (nº 2 y nº 3), SC (nº 5) e IV (nº 6) era aproximadamente 40%. El T_{min} era más rápido para IN/PDF-Tween (30-45 min) que para la vía SC (120 min). El % de BD de glucosa era ~8% para PDF con Tween al 1% IN (con respecto al SC).

Se llevó a cabo un segundo estudio PD para comparar las formulaciones de PDF intranasales con la formulación de acción rápida de NovoLog (el diluyente NovoLog consistía en: glicerina 16 mg/ml, fenol 1,5 mg/ml, m-cresol 1,72 mg/ml, cinc 19,6 µg/ml, hidrogenofosfato de sodio dihidrato 1,25 mg/ml y NaCl 0,58 mg/ml, pH 7,2-7,6). Los parámetros del estudio PD 2 se han mostrado antes en el ejemplo 8, tabla 14. Los resultados de C_{min} y T_{min} del estudio PD 2 se muestran en la tabla 17.

TABLA 17

Resultados de C _{min} y T _{min} para el estudio PD 2		
Formulación (Grupo)	T _{min} (min)	% de C _{min}
IN/1X PDF Tween 1%	45	65,9
IN/1X PDF Tween 1%*	45	43,6
IN/1X PDF (sin DDPC)	45	66,9
IN/1X PDF Tween 2%	45	57,1
IN/1X PDF Tween 5%	30	71
TN/2X PDF Tween 1%	30	50,3
IN 2X PDF Tween 2%	45	71,6
Regular SC*	41,4	120
PDF SC	49,5	30
NovoLog SC	34,8	120
*Resultaos del estudio PD 1		

En la figura 4, los resultados PD del estudio 2 se comparan con el estudio 1. El T_{min} para IN/1X PDF Tween al 5%, IN/2X PDF Tween al 1%, NovoLog SC era aproximadamente 30 min. El T_{min} para la regular SC* era aproximadamente 40 min. El T_{min} para la otra formulación era aproximadamente 45 minutos. Los resultados del estudio PD 2 mostraron que 2X PDF Tween al 1% tenía el mayor efecto en la PD de todas las formulaciones intranasales. La presencia de DDPC en la formulación no afectaba a los resultados PD.

ES 2 345 509 T3

La irritación intranasal estaba ausente o era silenciosa en los conejos de administración IN. Los datos PD descritos apoyan las formulaciones intranasales que suministran insulina para un perfil de acción rápida. Las formulaciones que mejor se comportaban contenían un agente solubilizante y un agente tensioactivo. Se muestra una descripción de las formulaciones de insulina IN para la posterior administración *in vivo* en la Tabla 18.

TABLA 18

Formulaciones para estudios in vivo				
Número de formulación	094-1-0	094-1-250	094-1-500	094-1-1000
Insulina (U/ml)	0	250	500	1000
Me- β -CD (mg/ml)	45	45	45	45
DDPC (mg/ml)	1	1	1	1
EDTA (mg/ml)	1	1	1	1
Tween 80 (mg/ml)	10	10	10	10
Arginina (mM)	10	10	10	10
Cloruro sódico (mg/ml)	4	4	4	4
Propilparabeno sódico (mg/ml)	0,17	0,17	0,17	0,17
Metilparabeno sódico (mg/ml)	0,33	0,33	0,33	0,33
Propilenglicol (mg/ml)	1	1	1	1
pH	7	7	7	7

Ejemplo 10

Estudio preclínico 3: Resultados PK y PD después de la administración intravenosa, subcutánea e intranasal de insulina en conejos

La tabla 19 presenta los grupos de dosificación en el estudio 3. Se usaron las siguientes abreviaturas: PDF = Me- β -CD 45 mg/ml, DDPC 1 mg/ml, EDTA 1 mg/ml, arginina 10 mM pH 7,0 con adición de NaCl para alcanzar aproximadamente 220 mOsm/kg; 2X PDF = Me- β -CD 90 mg/ml, DDPC 2 mg/ml, EDTA 2 mg/ml (los demás componentes son iguales que en PDF); conservante (Con), en este caso era una combinación de propilenglicol 10 mg/ml, metilparabeno 0,33 mg/ml y propilparabeno 0,17 mg/ml. Se añadió polisorbato 80 (Tween) a varias formulaciones al 1% o 2% (10 ó 20 mg/ml) según se indique. Se administraron dosis SC a dos grupos, uno con insulina regular en ausencia de potenciadores y otro con insulina regular en presencia de PDF.

TABLA 19

Formulación	Dosis (UI/kg)
1XPDF Tween 1% -	6
1XPDF Tween 1% (-DDPC)	6
1XPDF Tween 2%	6
1XPDF Tween 2% (-DDPC)	6
1XPDF Tween 1% (-Con)	6
1XPDF Tween 1% (-Con DDPC)	6
Regular PDF SC	0,6
Regular Salina SC	0,6

ES 2 345 509 T3

Los datos PD para los grupos a los que se administró dosis en el estudio preclínico 3 se muestran en la tabla 20 y la figura 5.

TABLA 20

Formulación	Dosis (UI/kg)	T _{mín}	%C _{mín}
1XPDF Tween 1%	6	30	49,8
1XPDF Tween 1% (-DDPC)	6	30	54,6
1XPDF Tween 2%	6	30	49,5
1XPDF Tween 2% (-DDPC)	6	30	48,4
1XPDF Tween 1% (-Con)	6	30	55,6
1XPDF Tween 1% (-Con DDPC)	6	30	57,3
Regular PDF SC	0,6	45	36,4
Regular Salina SC	0,6	60	38,4

Todos los grupos intranasales demostraron aproximadamente el mismo efecto PD (T_{mín} y % de C_{mín}). La insulina regular suministrada por vía subcutánea en ausencia y presencia de PDF tenía efecto PD similar (y un T_{mín} más lento y % de C_{mín} mayor como se esperaba). Los datos mostraron que el inicio (como indica el T_{mín}) es más rápido para la insulina regular en formulaciones de PDF (45 min para la SC; 30 min para la intranasal) comparado con la formulación de control (60 min para SC). Los datos muestran que la insulina regular en las formulaciones de PDF intranasales está de acuerdo con un perfil de insulina de acción rápida.

Los datos PK para los grupos a los que se administró dosis en el estudio preclínico 3 se muestran en la figura 6 y la tabla 21, tabla 22 y tabla 23.

TABLA 21

Formulación	Grupo n°	T _{máx} (min)	%C _{máx} (μUI/ml)	AUC _{último} (min*μUI/ml)
1XPDF Tween 1%	1	29,0	108,4	2504,2
1XPDF Tween 1% (-DDPC)	2	16,3	95,7	2284,8
1XPDF Tween 2%	3	36,3	88,1	2122,7
1XPDF Tween 2% (-DDPC)	4	12,0	138,5	3387,4
1NPDF Tween 1% (-Con)	5	29,0	79,0	1174,5
1XPDF Tween 1% (-Con DDPC)	6	13,0	94,7	2453,3
PDF Regular SC	7	19,0	129,7	5014,3
Solución salina Regular SC	8	17,0	144,2	5885,5

TABLA 22

Datos PK (biodisponibilidad para grupos de administración de dosis en el estudio preclínico 3)		
Formulación	Grupo n°	%F
1XPDF Tween 1%	1	4,3
1XPDF Tween 1% (-DDPC)	2	3,9
1XPDF Tween 2%	3	3,6
1XPDF Tween 2% (-DDPC)	4	5,8
1NPDF Tween 1% (-Con)	5	2,0
1XPDF Tween 1% (-Con DDPC)	6	4,2
PDF Regular SC	7	85,2
Solución salina Regular SC	8	NA

TABLA 23

%CV para los parámetros PK para los grupos de administración de dosis en el estudio preclínico 3				
Formulación	Grupo n°	T _{máx} (mín)	%C _{máx} (uUI/ml)	AUC _{último} (min*uUI/ml)
1XPDF Tween 1%	1	56,4	84,2	84,7
1XPDF Tween 1% (-DDPC)	2	58,2	90,8	124,5
1XPDF Tween 2%	3	75,9	81,4	105,9
1XPDF Tween 2% (-DDPC)	4	22,8	87,9	105,2
1NPDF Tween 1% (-Con)	5	97,8	54,4	95,8
1XPDF Tween 1% (-Con DDPC)	6	34,4	68,2	72,7
PDF Regular SC	7	57,1	58,3	64,2
Solución salina Regular SC	8	73,8	28,7	62,5

El % CV para los diferentes parámetros PK era similar para los diferentes grupos. El % de F (biodisponibilidad relativa al control SC) para formulaciones de PDF con Tween comparado con el control de insulina regular SC era aproximadamente 2-6%, y el T_{máx} estaba en el intervalo de 12-36 minutos. La formulación IN con el % de biodisponibilidad más alto era 2X PDF/Tween al 2% sin DDPC (5,8%). Estos datos PD sugieren que DDPC no es necesario en la formulación de PDF para lograr la biodisponibilidad potenciada.

Ejemplo 11

Estudio preclínico 4: Resultados PK y PD después de administración oral e intranasal de insulina en conejos

La tabla 24 describe los grupos administración de dosis en el estudio 4. Se usan las siguientes abreviaturas: PDF = Me- β -CD 45 mg/ml, DDPC 1 mg/ml, EDTA 1 mg/ml, arginina 10 mM pH 7,0 con adición de NaCl para alcanzar aproximadamente 220 mOsm/kg; 2X PDF = Me- β -CD 90 mg/ml, DDPC 2 mg/ml, EDTA 2 mg/ml (los demás componentes son iguales que en PDF); TDM = tetradecil maltósido 2,5 mg/ml. Se añadió polisorbato 80 (Tween) a varias formulaciones al 1% (10 mg/ml) según se indique. Se añadió propilenglicol (PG) a diferentes formulaciones al 1% o 2,5% (10 o 25 mg/ml). Se ensayó el efecto de gelatina al 0,2% en las formulaciones IN. Se administraron dosis por vía oral a 3 grupos, uno con insulina regular en ausencia de potenciadores (n° 8), uno con insulina regular en presencia de PDF (n° 9) y uno con insulina regular en presencia de PDF sin DDPC (n° 7).

TABLA 24

Descripción de los grupos con administración de dosis en el estudio preclínico 4			
Grupo	Formulación	Vía	Nivel de dosis (UI/kg)
1	1X PDF Tween 1% (-PG)	IN	6
2	1X PDF Tween 1% (PG 2,5%)	IN	6
3	TDM hipotónica	IN	6
4	TDM isotónica	IN	6
5	1X PDF Tween 1% (PG 1%)	IN	6
6	1X PDF Tween 1% (Gelatina 0,2%)	IN	6
7	1X PDF Oral(-DDPC+PG)	Oral	6
8	1X PDF Oral (-DDPC-PG-Tween)	Oral	6
9	1X PDF Oral (+DDPC+PG)	Oral	6

Los datos PD para los grupos a los que se administró dosis en el estudio preclínico 4 se muestran en la figura 7. Los datos PD eran similares entre todas las formulaciones nasales, pero la administración SC tenía un efecto PD prolongado frente a la nasal. No se observó efecto PD para los grupos de dosis oral. La insulina regular suministrada por vía subcutánea en ausencia y presencia de PDF tenía un efecto PD (y $T_{\min}$ más lenta y % de $C_{\min}$ mayor como se esperaba). Los datos muestran que el inicio (indicado por $T_{\min}$) es más rápido para la insulina regular en formulaciones de PDF.

Los datos PK para los grupos a los que se administró dosis en el estudio preclínico 4 se presentan en la figura 8 y tabla 25, tabla 26 y tabla 27.

ES 2 345 509 T3

TABLA 25

Parámetros PK para los grupos con administración de dosis en el estudio preclínico 4				
Formulación	T _{máx} (min)	C _{máx} (μUI/ml)	AUC _{último} (min*μUI/ml)	AUC _{inf} (min*μUI/ml)
1X PDF Tween 1%(-PG)	59	125,06	5001,45	2565,5917
1X PDF Tween 1% (PG 2,5%)	18	95,2	3178	5192,0496
TDM hipotónica	33	206,58	3971	9828,6486
TDM isotónica	23	179,52	5663	9788,9524
1X PDF Tween 1% (PG 1%)	34	108	6218	62759,0604
1X PDF Tween 1% (Gelatina 0,2%)	13	373,6	8755,5	9067,4665
1X PDF Oral (-DDPC+PG)	5	24,56	111,9	N/A
1X PDF Oral (-DDPC-PG-Tween)	5	6,6	16,5	N/A
1X PDF Oral (+DDPC+PG)	5	3,08	64	408,0042
Insulina Regular SC	17	144,2	5885,5	3358,285

TABLA 26

Datos PK (biodisponibilidad) para los grupos con administración de dosis en el estudio preclínico 4		
Formulación	AUC _{último} (min*μUI/ml)	%F
1X PDF Tween 1%(-PG)	5001,45	8,5
1X PDF Tween 1% (PG 2,5%)	3178	5,4
TDM hipotónica	3971	6,7
TDM isotónica	5663	9,6
1X PDF Tween 1% (PG 1%)	6218	10,6
1X PDF Tween 1% (Gelatina 0,2%)	8755,5	14,9
1X PDF Oral (-DDPC+PG)	111,9	0,2
1X PDF Oral (-DDPC-PG-Tween)	16,5	0,0
1X PDF Oral (+DDPC+PG)	64	0,1
Insulina Regular SC	5885,5	

TABLA 27

%CV para los parámetros PK para los grupos con administración de dosis en el estudio preclínico 4			
Formulación	T _{máx} (min)	C _{máx} (μUI/ml)	AUC _{último} (min*μUI/ml)
1X PDF Tween 1%(-PG)	67,4	59,9	111,1
1X PDF Tween 1% (PG 2,5%)	87,0	75,4	77,1
TDM hipotónica	59,3	41,3	56,6
TDM isotónica	42,4	73,4	91,4
1X PDF Tween 1% (PG 1%)	142,0	51,7	95,9
1X PDF Tween 1% (Gelatina 0,2%)	34,4	21,3	35,3
1X PDF Oral (-DDPC+PG)	0,0	164,5	190,0
1X PDF Oral (-DDPC-PG-Tween)	0,0	199,2	199,2
1X PDF Oral (+DDPC+PG)	0,0	116,6	178,3
Insulina Regular SC	73,8	28,7	62,5

Para los grupos de administración intranasal que contenían PDF con o sin PG, así como para los grupos que contenían TDM, los datos PK eran similares, con un % de F (biodisponibilidad comparada con la insulina regular SC) de aproximadamente 5,4-10,6%, y el T_{máx} estaba en el intervalo de 18-59 minutos. En el caso de 1X PDF con Tween al 1% en presencia de gelatina al 0,2%, había un aumento de la biodisponibilidad, aproximadamente de 14,9%. Para los grupos de administración intranasal que contenían PDF con o sin PG, así como para los grupos que contenían TDM, el %CV para la C_{máx} y el AUC estaban entre 50-200%. En cambio, para 1X PDF con Tween al 1% en presencia de gelatina al 0,2%, había una disminución de C_{máx} y el AUC a 21,3% y 35,3%, respectivamente. Se observó que el %CV para C_{máx} y el AUC de la formulación de 1X PDF con Tween al 1% en presencia de gelatina al 0,2% era menor que el observado para la inyección SC.

Estos datos muestran que el inicio (indicado por el T_{min}) es más rápido para la insulina regular en las formulaciones de PDF que las formulaciones de vía SC, y como resultado la insulina tiene el perfil de insulina de acción rápida. La adición de gelatina potencia el efecto PD y PK (biodisponibilidad de 14,9% con respecto al control de vía SC) para las formulaciones de PDF.

Ejemplo 12

Resultados PK y PD para formulaciones que contienen agentes potenciadores de la viscosidad

La PK y PD se evaluaron para conejos a los que se administró dosis de formulaciones de insulina intranasal que contenían diferentes agentes potenciadores de la viscosidad. Los agentes potenciadores de la viscosidad incluían gelatina, HPMC, MC y Carbomer. Carbomer es un nombre genérico para una familia de polímeros conocida como Carbopol®. Los tiempos de medición se tomaron en 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 y 240 minutos. La glucosa se midió en cada tiempo de medición con un glucómetro (One-Touch Ultra). Se añadieron pequeñas cantidades de HCl O NaOH 2 N a la formulación según fuera necesario, para lograr el pH deseado. La insulina usada en el estudio estaba en una concentración de aproximadamente 28 U/mg. La tabla 28 presenta las formulaciones usadas en este estudio.

Tabla 28:

Formulaciones de insulina que contienen agente potenciador de la viscosidad											
n°	Insulina Regular (U/ml)	Me-β-CD (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)	Tampón de arginina (mM)	Agente de viscosidad	MP (mg/ml)	PP (mg/ml)	PG (mg/ml)	NaCl (mg/ml)	PH
1	400	45	1	10	10	0	0,33	0,17	10	0	7,3
2	400	45	1	10	10	Gelatina (2 mg/ml)	0,33	0,17	10	0	7,3
3	400	45	1	10	10	Gelatina (4 mg/ml)	0,33	0,17	10	0	7,3
4	400	45	1	10	10	(2,5 mg/ml)	0,33	0,17	10	0	7,3
5	400	45	1	10	10	MC (2,5 mg/ml)	0,33	0,17	10	0	7,3
6	400	45	1	10	10	Carbomer (Carbopol) 974 P (2,5 mg/ml)	0,33	0,17	10	0	7,3
7	400	45	1	10	10	(1 mg/ml)	0,33	0,17	10	0	7,3
8	400	45	1	10	10	Gelatina (2 mg/ml)	0,33	0,17	10	3	7,3
Abreviaturas: Me-β-CD=metil-beta-ciclodextrina, EDTA=edetato disódico, HPMC = hidroxipropilmetilcelulosa (100 cps), MC = metilcelulosa (15 cps), CMC = carboximetilcelulosa sódica (viscosidad baja), MP = metilparabeno de sodio, PP = propilparabeno de sodio, PG = propilenglicol NaCl = cloruro sódico											

ES 2 345 509 T3

Se fabricaron 15 ml de cada formulación y se almacenaron en viales de vidrio no silanizados transparentes de 3 ml. Todas las formulaciones de insulina ensayadas se almacenaron a 2-8°C. Todas las formulaciones se administraron en dosis de 6,0 UI/kg. La tabla 29 describe los grupos de dosificación usados en este estudio.

TABLA 29

Grupos de dosificación con agente potenciador de la viscosidad		
Grupo n°	Formulación	Dosis UI/kg
1	1X PDF Tween 1%	6,0
2	1X PDF Tween 1%(Gelatina 0,2%)	6,0
3	1X PDF Tween 1% (Gelatina 0,4%)	6,0
4	1X PDF Tween 1%(HPMC 0,25%)	6,0
5	1X PDF Tween 1%(MC 0,25%)	6,0
6	1X PDF Tween 1%(Carbopol 0,25%)	6,0
7	1X PDF Tween 1%(CMC 0,1%)	6,0
8	1X PDF TW 1% (Gelatina 0,2%)	6,0

Los resultados PD para el % de glucosa desde el valor inicial se muestran en la figura 9. La figura 9 presenta el cambio medio en % de glucosa frente al tiempo para los 8 grupos ensayados. El grupo 6 (1X PDF/Tween al 1%/(Carbopol al 0,25%)) mostró la mayor reducción de % de glucosa desde el valor inicial comparado con todos los demás grupos. Las reducciones mayores de glucosa para los 8 grupos ocurrieron en 90 minutos como se muestra en la figura 9. El grupo 8 (que contenía un agente de tonicidad) tenía la mayor reducción de % de glucosa desde el valor inicial comparado con las otras formulaciones de gelatina. Las formulaciones que contenían Carbomer (Carbopol al 0,25%) y CMC tenían la mayor reducción del % de glucosa desde el valor inicial comparado con las otras formulaciones que no tenían gelatina.

Los resultados PK para los datos medios por tiempo de medición se muestran en la figura 10. En la figura 10, se muestra la concentración media de insulina ($\mu\text{UI/ml}$) frente al tiempo para los 8 grupos ensayados. La figura 10 muestra que la $C_{\text{máx}}$ era mayor para el grupo 6, 1X PDF/Tween al 1%/(Carbopol al 0,25%) comparado con las otras formulaciones. Los niveles de insulina máximos en suero para los 8 grupos se encontraron en 60 minutos como se muestra en la figura 10. Los parámetros PK se resumen en la tabla 30.

TABLA 30

Parámetros PK de agentes potenciadores de la viscosidad en conejos					
Grupo n°	Formulación	$T_{\text{máx}}$ (min)	$C_{\text{máx}}$ ($\mu\text{UI/ml}$)	$AUC_{\text{último}}$ (min* $\mu\text{UI/ml}$)	AUC_{inf} (min* $\mu\text{UI/ml}$)
1	1X PDF Tween 1%	13,00	243,68	7409,6	7546,2311
2	1X PDF Tween 1% (Gelatina 0,2%)	18,00	119,28	3487,6	3756,8904
3	1X PDF Tween 1% (Gelatina 0,4%)	22,00	28064	6617,8	10094,2851
4	1X PDF Tween 1% (HPMC 0,25%)	37,00	21274	6570,05	81493682
5	1X PDF Tween 1% (MC 0,25%)	14,00	114,16	3383,2	4536,5694
6	1X PDF Tween 1% (Carbopol 0,25%)	15,00	460,48	11583,6	12107,2492
7	1X PDF Tween 1% (CMC 0,1%)	24,00	320,2	10482,5	11361,0313
8	1X PDF TW 1% (Gelatina 0,2%)	29,00	231,48	6497,95	12461,998

ES 2 345 509 T3

Los resultados de %CV se muestran en la tabla 31.

TABLA 31

Resultados de %CD de agentes potenciadores de la viscosidad en conejos				
Grupo n°	Formulación	T _{máx}	C _{máx}	AUC _{último}
1	1X PDF Tween 1%	21,1	68,4	73,2
2	1X PDF Tween 1% (Gelatina 0,2%)	37,3	27,5	48,1
3	1X PDF Tween 1% (Gelatina 0,4%)	98,5	79,3	69,1
4	1X PDF Tween 1% (HPMC 0,25%)	127,3	74,7	84,0
5	1X PDF Tween 1% (MC 0,25%)	16,0	48,2	60,7
6	1X PDF Tween 1% (Carbopol 0,25%)	0,0	62,0	47,6
7	1X PDF Tween 1% (CMC 0,1%)	55,9	76,4	60,0
8	1X PDF TW 1% (Gelatina 0,2%)	76,5	95,0	76,1

Los resultados de % de F (biodisponibilidad) se muestran en la tabla 32.

TABLA 32

Resultados de %F de agentes potenciadores de la viscosidad en conejos				
Grupo n°	Formulación	Dosis UI/kg	AUC _{último} (min*μUI/ml)	%F
1	1X PDF Tween 1%	6,0	7409,6	12,6
2	1X PDF Tween 1% (Gelatina 0,2%)	6,0	3487,6	5,9
3	1X PDF Tween 1% (Gelatina 0,4%)	6,0	6617,8	11,2
4	1X PDF Tween 1% (HPMC 0,25%)	6,0	6570,05	11,2
5	1X PDF Tween 1% (MC 0,25%)	6,0	3383,2	5,7
6	1X PDF Tween 1% (Carbopol 0,25%)	6,0	11583,6	19,7
7	1X PDF Tween 1% (CMC 0,1%)	6,0	10482,5	17,8
8	1X PDF TW 1% (Gelatina 0,2%)	6,0	6497,95	11,0
	Insulina Regular SC	0,6	5885,5	

Resumen

Los resultados PK y PD muestran que las formulaciones de insulina intranasales ensayadas tenían perfiles de acción rápida de la insulina, con niveles de insulina máximos en suero en 60 minutos y disminuciones máximas de glucosa en 90 minutos. La biodisponibilidad aumentó cuando se añadieron potenciadores de la viscosidad a las formulaciones de insulina intranasales con PDF. El aumento de tonicidad aumentó la biodisponibilidad en formulaciones que contenían gelatina. La formulación que contenía gelatina mostró mejor comportamiento en condiciones isotónicas (grupo n° 8;

gelatina al 0,2% incluyendo NaCl) comparado con condiciones hipotónicas (grupo n° 2; gelatina al 0,2% sin NaCl). Las formulaciones que contenían Carbomer y CMC mostraron el mayor aumento en los resultados PK y PD para las formulaciones de insulina intranasales. La biodisponibilidad mostrada por % de F era 19,7% y 17,8% para Carbomer y CMC, respectivamente. El efecto PD mostrado por el % de glucosa desde el valor inicial, mejoró con la adición de agentes potenciadores de la viscosidad tales como Carbomer y CMC, a las formulaciones de insulina intranasales.

Los datos PK y PD en el conejo confirman los resultados *in vitro* de un aumento de la permeación de insulina a través del epitelio nasal en presencia de potenciadores de la formulación. Los datos de permeación del fármaco *in vitro* y datos PK *in vivo* de conejo mostraron una correlación sustancial para las formulaciones de insulina intranasales. Usando formulaciones intranasales representativas, un análisis gráfico XY con $AUC_{\text{último}}$ ($\text{min} \cdot \mu\text{U/ml}$) en el eje X y % de permeación en el eje Y mostró un $R^2 = 0,8994$, $y = 0,0007x + 0,4191$.

Ejemplo 13

Estudios de EAM 1-8: Ensayo de eficacia antimicrobiana (EAM)

Estudio de EAM 1

Se llevó a cabo el estudio de EAM 1 para determinar la eficacia antimicrobiana (EAM) de un placebo de pulverización nasal de insulina con metilparabeno sódico, propilparabeno sódico y propilenglicol. Además, en el estudio de EAM 1 se examinó la EAM del EDTA aumentado solo. Las formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 1 se muestran en la tabla 33. Se fabricaron aproximadamente 120 ml de cada formulación y se ensayaron por duplicado ($n = 2$ análisis por muestra).

TABLA 33

Formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 1										
n°	Me- β -CD	DDPC	EDTA	Tween 80	PP	MP	PP	NaCl	Tampón de arginina	pH
	(mg/ml)								(mM)	
1	45	1	1	10	25	0,33	0,17	4	10	7
2	45	1	1	10	50	0,33	0,17	4	10	7
3	45	1	1	10	100	0,33	0,17	4	10	7
4	45	1	10	10	0	0	0	4	10	7
5	45	1	50	10	0	0	0	4	10	7
Abreviaturas: Me- β -CD = metil- β -ciclodextrina, DDPC = didecanoil-L- α -fosfatidilcolina, EDTA = edetato disódico, MP = metilparabeno sódico, PP = propilparabeno sódico, PG = propilenglicol, NaCl = cloruro sódico										

Los procedimientos de EAM usados estaban de acuerdo con los requisitos para la EAM de la Farmacopea de EE.UU. (USP) y la Farmacopea Europea (EP) y se describen en las tablas 35 y 35, respectivamente. También se ensayó el pH (por procedimiento estándar 403), aspecto (visual) y osmolalidad (por procedimiento estándar 4000) de las formulaciones.

TABLA 34

Requisitos de la USP para la EAM (USP <51>)										
Micro-organismo	<i>Psudomoas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
Días	14	28	14	28	14	28	14	28	14	28
Log de reducción (min)	2,0	no inc.	2,0 no	inc.	2,0	no inc.	no inc.	no inc.	no inc.	no inc.

TABLA 35

Requisitos de la EP para la EAM (EP <5.1.3>)										
Microorganismo	<i>Psudomoas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Candida albicans</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
Días	2	7	28	2	7	28	14	28	14	28
Log de reducción (min)	2,0	3,0	no inc.	2,0	3,0	no inc.	2,0	no inc.	2,0	no inc.

La combinación de metilparabeno sódico 0,33 mg/ml, propilparabeno sódico 0,17 mg/ml y al menos propilenglicol 25 mg/ml era una combinación de conservación eficaz y satisface los estándares de la USP. Estas formulaciones pasaban todas los requisitos de la USP, pero no de la EP (para *S. aureus* y *A. niger*). El aumento solo de EDTA no parecía ser eficaz para los requisitos de la USP ni de la EP.

Estudio de EAM 2

El estudio de EAM 2 se llevó a cabo para determinar si un humectante (propilenglicol) mejoraba la eficacia antimicrobiana cuando se usaban metilparabeno sódico y propilparabeno sódico como conservantes. También se evaluaron otros conservantes como cloruro benzalconio (BAK), alcohol benéfico y benzoato sódico. Se ensayaron dos grupos de insulinas en niveles de 500 U/ml o 1000 U/ml. Las formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 2 se listan en la tabla 36.

Tabla 36:

Formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 2												
n°	Me-β-CD	DDPC	EDTA	Tween 80	NaCl	MP	PP	Alcohol bencílico	BAK	Benzoato sódico	Tampón de arginina	pH
(mg/ml)												
(mM)												
1	45	1	1	10	4	0,33	0,17	0	0	0	10	7
2	45	1	1	10	4	0,33	0,17	5	0	0	10	7
3	45	1	1	10	4	0	0	5	0	0	10	7
4	45	1	1	10	4	0	0	0	2	0	10	7
5	45	1	1	10	4	0	0	0	2	0	10	7
La muestra 5 también contenía insulina 500 unidades/ml												
6	45	1	1	10	4	0	0	0	2	0	10	7
La muestra 6 también contenía insulina 1000 unidades/ml												
7	45	1	1	10	4	0	0	0	1	0	10	7
8	45	1	1	10	4	0	0	0	0	1	10	7
9	45	1	1	10	4	0	0	0	0	5	10	7
10	PBS (Control sin conservante)											
11	PBS + benzoato sódico 5 mg/ml (control positivo con conservante)											
Abreviaturas: Me-β-CD = metil-β-ciclodextrina; DDPC = didecanoil-L-α-fosfatidilcolina; EDTA = edetato disódico; MP = metilparabeno sódico; PP = propilparabeno sódico; BAK = cloruro de benzalconio; NaCl = cloruro sódico												

ES 2 345 509 T3

Los procedimientos para el estudio de EAM 2 se llevaron a cabo como se ha descrito para el estudio de EAM 1. Además, se incluyeron un control positivo (PBS con benzoato sódico 5 mg/ml) y un control negativo (PBS solo). Los resultados del estudio de EAM 2 mostraron que el metilparabeno sódico y el propilparabeno sódico no eran conservantes eficaces sin humectante (tal como propilenglicol) incluido en la formulación. El cloruro de benzalconio era un excelente conservante con respecto al ensayo de eficacia antimicrobiana tanto de la USP como de la EP, pero se encontró que era incompatible con la insulina (es decir, su presencia en la formulación causaba precipitación de la insulina). El alcohol bencílico y el benzoato sódico tampoco eran conservantes eficaces a pH neutro y por lo tanto no eran adecuados para usar en las formulaciones de pulverización nasal de insulina.

Estudio de EAM 3

El propósito del estudio de EAM 3 era evaluar otros conservantes tales como el cloruro de benzalconio (BAK), alcohol bencílico y benzoato sódico. Se ensayaron dos grupos con insulina en niveles de 500 U/ml o 1000 U/ml. Las formulaciones para el estudio de EAM 3 se listan en la tabla 37.

TABLA 37

Formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 3												
nº	Me-β-CD (mg/ml)	DDPC (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)	tampón de arginina (mM)	MP (mg/ml)	PP (mg/ml)	Alcohol bencílico	BAK	Benzoato sódico	NaCl (mg/ml)	pH
1	45	0	1	10	10	0,33	0,17	5	0	0	4	7
2	45	0	1	10	10	0	0	5	0	0	4	7
3	45	0	1	10	10	0	0	0	2	0	4	7
4	45	0	1	10	10	0	0	0	1,5	0	4	7
5	45	0	1	10	10	0	0	0	1,5	0	4	7
La muestra 5 también contenía insulina 500 unidades/ml												
6	45	0	1	10	10	0	0	0	1,5	0	4	7
La muestra 6 también contenía insulina 1000 unidades/ml												
7	45	0	1	10	10	0	0	0	1	0	4	7
La muestra 7 también contenía insulina 1000 unidades/ml												
8	PBS (Control sin conservante)											
9	PBS + benzoato sódico 5 mg/ml (control positivo con conservante)											
Abreviaturas: Me-β-CD = metil-β-ciclodextrina												
DDPC = didecanoil-L-α-fosfatidilcolina												
EDTA = edetato disódico												
MP = metilparabeno sódico												
PP = propilparabeno sódico												
BAK = cloruro de benzalconio												
NaCl = cloruro sódico												

ES 2 345 509 T3

El análisis en el estudio de EAM 3 se llevó a cabo como se ha descrito para el estudio de EAM 1. Los resultados del estudio de EAM 3 mostraron que el cloruro de benzalconio era incompatible con la insulina (causaba precipitación), pero mantenía el mejor comportamiento antimicrobiano. El alcohol bencílico, y alcohol bencílico/metilparabeno sódico/propilparabeno sódico eran ineficaces como reactivos antimicrobianos en este estudio.

Estudio de EAM 4

El propósito del estudio de EAM 4 era determinar si se podían obtener resultados de EAM satisfactorios con la USP y EP con niveles más bajos de humectante (propilenglicol) cuando se usaba con metilparabeno sódico y propilparabeno sódico. Además, se evaluaron los conservantes alternativos m-cresol y alcohol bencílico. Las formulaciones del estudio de EAM 4 se listan en la tabla 38.

TABLA 38

Formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 4									
n°	Me-β-CD (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)	Arginina (mM)	MP/PP (mg/ml) (mg)	PG	Alcohol bencílico (mg/ml)	m-Cresol (mg/ml)	pH
1	45	1	10	10	0,33/0,17	1	0	0	7,0
2	45	1	10	10	0	0	2,5	0	7,0
3	45	1	10	30	0	0	5	0	7,0
4	45	1	10	10	0	0	0	1	7,0
5	45	1	10	10	0	0	0	1	7,0
6	Control negativo - PBS solo								
7	Control positivo - PBS con benzoato sódico 5 mg/ml								
Abreviaturas: Me-β-CD = metil-β-ciclodextrina									
EDTA = edetato disódico									
MP = metilparabeno sódico									
PP = propilparabeno sódico									
PG = propilenglicol									

Los procedimientos usados para el estudio de EAM 4 se llevaron a cabo como se ha descrito para el estudio de EAM 1. Las formulaciones que contenían metilparabeno sódico y propilparabeno sódico con una concentración baja de humectante (es decir, propilenglicol) no lograron la eficacia antimicrobiana. El nivel óptimo para el metilparabeno sódico y propilparabeno sódico con un propilenglicol, era propilenglicol entre 1 y 25 mg/ml. Además, el alcohol bencílico y el m-cresol no eran conservantes eficaces para las formulaciones de pulverización nasal de insulina.

Estudio de EAM 5

El propósito del estudio de EAM 5 era llevar a cabo ensayos de eficacia antimicrobiana (EAM) de formulaciones de pulverización de insulina (placebo y activas) para determinar si el metilparabeno sódico y propilparabeno sódico son ambos necesarios para la eficacia de conservación óptima y si uno es más eficaz que el otro. Además, se evaluaron niveles mayores de metilparabeno sódico y propilparabeno sódico para determinar si el aumento de su contenido en la formulación aumentaba la eficacia antimicrobiana. Las formulaciones usadas en el estudio de EAM 5 se listan en la tabla 39.

TABLA 39

Formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 5											
nº	Insulina (UI/ml)	Me- β-CD (mg/ ml)	DDPC (mg/ ml)	EDTA (mg/ ml)	Tween 80 (mg/ ml)	Arginina (mM)	MP (mg/ ml)	PP (mg/ ml)	PG (mg/ ml)	NaCl (mg/ ml)	pH
1	0	45	1	1	10	10	0,33	0	0	2	7,0
2	0	45	1	1	10	10	0	0,17	0	2	7,0
3	0	45	1	1	10	10	0,33	0	1	2	7,0
4	0	45	1	1	10	10	0	0,17	1	2	7,0
5	0	45	1	1	10	10	0	0	1	2	7,0
6	0	45	1	1	10	10	0,33	0,17	0	2	7,0
7	500	45	1	1	10	10	0,33	0,17	1	2	7,0
8	500	45	1	1	10	10	3,33	1,7	1	2	7,0
9	500	45	1	1	10	10	7	3	1	2	7,0
6	Control negativo - PBS solo										
7	Control positivo - PBS con benzoato sódico 5 mg/ml										
Abreviaturas: Me-β-CD = metil-β-ciclodextrina DDPC = didecanoil-L-α-fosfatidilcolina EDTA = edetato disódico MP = metilparabeno sódico PP = propilparabeno sódico PG = propilenglicol NaCl = cloruro sódico											

Los procedimientos usados para el estudio de EAM 5 se llevaron a cabo como se ha descrito para el estudio de EAM 1. Los resultados del estudio de EAM 5 mostraron que niveles crecientes de metilparabeno sódico y propilparabeno sódico hasta el menos 10 veces metilparabeno sódico 0,33 mg/ml y propilparabeno sódico 0,17 mg/ml aumentaban la eficacia antimicrobiana. Además era evidente que el metilparabeno sódico 0,33 mg/ml solo tenía la misma eficacia antimicrobiana que el propilparabeno sódico 0,17 mg/ml solo, que también tenía la misma eficacia antimicrobiana que la combinación.

Estudio de EAM 6

El propósito del estudio de EAM 6 era llevar a cabo ensayos de eficacia antimicrobiana (EAM) de formulaciones de pulverización de insulina (placebo) para determina el nivel óptimo de propilenglicol necesario para usar con el metilparabeno sódico y propilparabeno sódico. Además se evaluaron niveles mayores de metilparabeno sódico y propilparabeno sódico con un nivel constante de propilenglicol para determinar si el aumento de su contenido en la formulación aumentaba la eficacia antimicrobiana. Finalmente, también se evaluó el etanol como un potencial conservante. Las formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 6 se listan en la tabla 40.

Tabla 40

Formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 6												
n°	Insulina (UI/ml)	Me-β-CD (mg/ml)	DDPC (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)	Arginina (mM)	EtOH (%)	MP (mg/ml)	PP (mg/ml)	PG (mg/ml)	NaCl (mg/ml)	pH
1	0	45	1	1	10	10	0	0,33	0,17	25	0	7,0
2	0	45	1	1	10	10	0	0	0	25	0	7,0
3	0	45	1	1	10	10	0	0,33	0,17	15	0	7,0
4	0	45	1	1	10	10	0	0,33	0,17	10	0	7,0
5	0	45	1	1	10	10	0	0,33	0,17	5	2	7,0
6	0	45	1	1	10	10	0	0,33	0,17	2,5	3	7,0
7	0	45	1	1	10	10	0	0,33	0,17	1	4	7,0
8	0	45	1	1	10	10	0	0,495	0,255	5	2	7,0
9	0	45	1	1	10	10	0	0,66	0,34	5	2	7,0
10	0	45	1	1	10	10	0	1,65	0,85	5	2	7,0
11	0	45	1	1	10	10	1	0	0	0	0	7,0
12	0	45	1	1	10	10	2	0	0	0	0	7,0
13	Control negativo - PBS solo											
14	Control positivo - PBS con cloruro de benzalconio 5 mg/ml											
Abreviaturas: Me-β-CD = metil-β-ciclodextrina; DDPC = didecanoil-L-α-fosfatidilcolina; EDTA = edetato disódico; EtOH = Etanol; MP = metilparabeno sódico; PP = propilparabeno sódico; PG = propilenglicol; NaCl = cloruro sódico												

ES 2 345 509 T3

Los procedimientos usados para el estudio de EAM 6 se llevaron a cabo como se ha descrito para el estudio de EAM 1. Los resultados del estudio de EAM 6 mostraron que el nivel óptimo de propilenglicol era 10 mg/ml. Los resultados de EAM de las formulaciones de pulverización nasal de insulina con propilenglicol 10, 15, 20 y 25 mg/ml eran muy similares; pero los resultados de EAM eran menos satisfactorios cuando el nivel de propilenglicol era menor que 10 mg/ml. Todas las formulaciones pasaban los requisitos de EAM de la USP excepto el requisito de *P. aeruginosa*. Con respecto a esta categoría, las formulaciones eran bacteriostáticas (es decir, no había indicación de crecimiento microbiano). Ninguna formulación cumplía los requisitos de la EP para los tiempos de mediciones más tempranos para cada organismo requerido. El etanol solo (al 1% o 2%) parecía tener actividad antimicrobiana similar a la del metilparabeno sódico/propilparabeno sódico/propilenglicol.

Estudio de EAM 7

El propósito del estudio de EAM 7 era llevar a cabo ensayos de eficacia antimicrobiana (EAM) de las formulaciones de pulverización de insulina (placebo) que contenían Tween 80 20 mg/ml. Un estudio farmacocinético *in vivo* demostró que el contenido creciente de Tween 80 hasta 20 mg/ml podía ayudar a aumentar la biodisponibilidad, pero también se sabe que las micelas de Tween 80 interaccionan con conservantes (específicamente con parabenos). Además, el estudio de EAM 7 se llevó a cabo para determinar el nivel óptimo de propilenglicol necesario para usar con el metilparabeno sódico y propilparabeno sódico. Se evaluaron los niveles mayores de metilparabeno sódico y propilparabeno sódico con un nivel constante de propilenglicol para determinar si aumentando su contenido en la formulación aumentaba la eficacia antimicrobiana. Finalmente, también se evaluó el etanol como un potencial conservante. Las formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 7 se listan en la tabla 41.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 41

Formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 7												
n°	Insulina (UI/ml)	Me-β-CD (mg/ml)	DDPC (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)	Arginina (mM)	EtOH (%)	MP (mg/ml)	PP (mg/ml)	PG (mg/ml)	NaCl (mg/ml)	pH
1	0	45	1	1	20	10	0	0,33	0,17	25	0	7,0
2	0	45	1	1	20	10	0	0	0	25	0	7,0
3	0	45	1	1	20	10	0	0,33	0,17	15	0	7,0
4	0	45	1	1	20	10	0	0,33	0,17	10	0	7,0
5	0	45	1	1	20	10	0	0,33	0,17	5	2	7,0
6	0	45	1	1	20	10	0	0,33	0,17	2,5	3	7,0
7	0	45	1	1	20	10	0	0,33	0,17	1	4	7,0
8	0	45	1	1	20	10	0	0,495	0,255	5	2	7,0
9	0	45	1	1	20	10	0	0,66	0,34	5	2	7,0
10	0	45	1	1	20	10	0	1,65	0,85	5	2	7,0
11	0	45	1	1	20	10	1	0	0	0	0	7,0
12	0	45	1	1	20	10	2	0	0	0	0	7,0
13	Control negativo - PBS solo											
14	Control positivo - PBS con cloruro de benzalconio 5 mg/ml											
Abreviaturas: Me-β-CD = metil-β-ciclodextrina; DDPC = didecanoil-L-α-fosfatidilcolina; EDTA = edetato disódico; EtOH = Etanol; MP = metilparabeno sódico; PP = propilparabeno sódico; PG = propilenglicol; NaCl = cloruro sódico												

ES 2 345 509 T3

Los procedimientos usados para el estudio de EAM 7 se llevaron a cabo como se ha descrito para el estudio de EAM 1. Los resultados del estudio de EAM 7 mostraron que aumentando el contenido de Tween 80 de 10 mg/ml a 20 mg/ml, se reducía la actividad antimicrobiana, incluso cuando se añadía el nivel más alto de propilenglicol (es decir, 25 mg/ml). El etanol no era un conservante eficaz (al 1%) cuando se usaba en combinación con Tween 80 20 mg/ml.

Estudio de EAM 8

El estudio de EAM 8 se llevó a cabo para ensayar la eficacia antimicrobiana (EAM) de las formulaciones de pulverización de insulina (activas) con formulaciones que contenían niveles de propilenglicol de 1, 5, 10 y 25 mg/ml. Además, se ensayaron las 3 concentraciones de pulverización nasal de insulina: 250, 500 y 1000 U/ml. Las formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 8 se listan en la tabla 42.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 42

Formulaciones evaluadas en el estudio de EAM 8											
n°	Insulina (U/ml)	Me-β-CD (mg/ml)	DDPC (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)	Arginina (mM)	MP (mg/ml)	PP (mg/ml)	PG (mg/ml)	NaCl (mg/ml)	pH
1	250	45	1	1	10	10	0,33	0,17	25	0	7,0
2	500	45	1	1	10	10	0,33	0,17	25	0	7,0
3	1000	45	1	1	10	10	0,33	0,17	25	0	7,0
4	250	45	1	1	10	10	0,33	0,17	1	4	7,0
5	500	45	1	1	10	10	0,33	0,17	1	4	7,0
6	1000	45	1	1	10	10	0,33	0,17	1	3,5	7,0
7	500	45	1	1	10	10	0,33	0,17	10	0	7,0
8	500	45	1	1	10	10	3,33	0,17	5	2	7,0
9	Control negativo - PBS solo										
10	Control positivo - PBS con cloruro de benzalconio 5 mg/ml										
Abreviaturas: Me-β-CD = metil-β-ciclodextrina; DDPC = didecanoil-L-α-fosfatidilcolina; EDTA = edetato disódico; MP = metilparabeno sódico; PP = propilparabeno sódico; PG = propilenglicol; NaCl = cloruro sódico											

Los procedimientos usados para el análisis son como los descritos para el estudio de EAM 1. Los resultados del estudio de EAM 8 mostraron que la adición de insulina a las formulaciones mejoraba el rendimiento de la EAM. Además, cuando el nivel de propilenglicol era alto (es decir, 25 mg/ml o 10 mg/ml), las formulaciones que contenían insulina con metilparabeno sódico y propilparabeno sódico pasaban los requisitos de EAM de la USP. Sin embargo no cumplían los requisitos de la EP.

Resumen de los estudios de EAM 1 a 8

Los datos de los estudios 1-8 mostraron que con respecto a la EAM, la combinación de metilparabeno sódico, propilparabeno sódico y el humectante propilenglicol, daba como resultado mayor eficacia de conservación comparado con el metilparabeno sódico y propilparabeno sódico solos. Además, se evaluaron varios otros conservantes a lo largo de estos estudios, tales como el cloruro de benzalconio, benzoato sódico, alcohol bencílico, etanol, EDTA aumentado, cloruro de bencetonio y meta-cresol; sin embargo, los mejores resultados se lograron con metilparabeno sódico/propilparabeno sódico/propilenglicol. Cada uno de los otros conservantes o era incompatible con la insulina (como es el caso del cloruro de benzalconio, que producía la precipitación de la insulina) o se convertían en ineficaces debido a las interacciones con la metil- β -ciclodextrina y/o el polisorbato 80. Aunque el metilparabeno sódico y propilparabeno sódico también interaccionaban con la metil- β -ciclodextrina y/o el polisorbato 80, la adición del humectante propilenglicol, interfiere con esta interacción, haciendo así que los parabenes están más disponibles para la actividad antimicrobiana. Los resultados mostraron que la adición de humectante 10 mg/ml a las formulaciones de propilparabeno sódico 0,17 mg/ml y metilparabeno sódico 0,33 mg/ml, producían una buena actividad antibacteriana.

Un aspecto de la invención en el presente documento consiste en la combinación de un conservante para usar en las formulaciones de pulverización nasal de insulina que proporcione efecto bacteriostático cuando se considera para los ensayos de eficacia antimicrobiana (EAM) de la Farmacopea de EE.UU. y la Farmacopea Europea.

La formulación con mejor comportamiento de EAM contenía agua, solubilizante(s), agente(s) tensioactivo(s), tampón, quelante, tonificante y conservante. El solubilizador preferido era Me- β -CD. Los agentes tensioactivos preferidos eran una combinación de DDPC y un polisorbato (tal como Tween 80) o polisorbato solo. El quelante preferido era EDTA. El tonificante preferido era cloruro sódico. Los conservantes preferidos eran metilparabeno sódico y propilparabeno sódico. La formulación también contenía un humectante tal como propilenglicol, que proporcionaba un comportamiento de EAM óptimo.

Ejemplo 14

Estabilidad de la formulación de insulina

Se ensayó la estabilidad para las formulaciones de insulina intranasales a 5°C/humedad ambiente (almacenamiento rutinario), 25°C/HR de 60% (almacenamiento acelerado), almacenamiento acelerado con agitación y almacenamiento rutinario o acelerado en combinación con aerolización tres veces al día (TIR) (para imitar el uso del paciente). Después de 3 meses (84 días) de almacenamiento, los resultados de HPLC no mostraron un cambio significativo en el contenido de insulina a 5°C/humedad ambiente (recuperación de insulina de 99,2%) y se observó una pérdida mínima de contenido de insulina a 25°C/HR de 60% (recuperación de insulina de 96,3%). No había pérdida de insulina significativa tras la aerolización tres veces al día durante tiempos de incubación cortos (11 días) con formulaciones que contenían 250 U/ml, 500 U/ml o 1000 U/ml. No se observó una disminución significativa en la estabilidad después de agitación a 100 rpm durante 24 h a temperatura acelerada, a diferencia de un producto de insulina comercializado que mostró una reducción de al menos 20% del contenido de insulina en las mismas condiciones.

Ejemplo 15

Estudio clínico PD humano

Se completó un estudio humano para medir los datos farmacodinámicos (PD) después de administración nasal de formulaciones de insulina con potenciadores, comparado con la administración de productos farmacéuticos reguladores de glucosa actualmente en el mercado, NovoLog y Exubera. Se usó un glucómetro para medir los niveles de glucosa. En la tabla 43 se muestra un resumen del porcentaje de reducción de glucosa para cada grupo de tratamiento. La incidencia de 30%, 20% y 10% de reducción del porcentaje de glucosa para cada tratamiento se muestra en la tabla 44.

ES 2 345 509 T3

TABLA 43

Reducción del porcentaje de glucosa por grupo de tratamiento					
Grupo de tratamiento	n° de sujetos	Media (DT)	Mediana	Intervalo	CV (%)
Placebo Nasal	12	10 (6,3)	9	0-25	63,0
NovoLog (SC)	12	44,3 (12,36)	44	25-62	27,9
Nasal 25 UI	11	17,7 (9,53)	20	0-30	54,0
Nasal 50 UI	11	22 (12,31)	24	0-42	56,0
Nasal 100 UI	11	28,5 (19,67)	19	11-69	69,0
Exubera 3 mg	6	23,8 (11,9)	21	13-44	50,0

TABLA 44

Incidencia de sujetos humanos con reducción de glucosa de 30%, 20% y 10%				
		Sujetos con reducción del % de glucosa		
Grupo de tratamiento	n° de sujetos	GE 30% N (%)	GE 20% N (%)	GE 10% N (%)
Placebo Nasal	12	0 (0%)	1 (8,3%)	4 (33%)
NovoLog (SC)	12	10 (83,3%)	12 (100%)	12 (100%)
Nasal 25 UI	11	0 (0%)	5(45,5%)	8 (72,7%)
Nasal 50 UI	11	4 (36,4%)	6 (54,5%)	9(81,8%)
Nasal 100 UI	11	3 (27,3%)	4 (36,4%)	11 (100%)
Exubera 3 mg	6	2 (33,3%)	4 (66,7%)	6 (100%)

Los resultados de este estudio PD inicial muestran que la administración intranasal de insulina es eficaz para reducir el porcentaje de glucosa en un paciente. La administración nasal de 50 UI y 100 UI dio como resultado una reducción de glucosa similar a la Exubera, un producto farmacéutico regulador de glucosa actualmente en el mercado.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 6737045 B [0011]
- US 4292299 A [0142]
- US 6506724 B [0015]
- US 4715369 A [0142]
- US 20030036504 A1 [0015]
- US 4876092 A [0142]
- EP 1083924 B1 [0015]
- US 4855142 A [0142]

ES 2 345 509 T3

- WO 9830231 A1 [0015]
- WO 0073331 A2 [0015]
- EP 1031347 A [0016] [0017]
- US 2003211972 A [0016] [0018]
- WO 9422461 A [0016] [0018]
- US 4839343 A [0029]
- US 6190894 B [0080]
- US 5908825 A [0088]
- US 6004583 A [0103]
- US 5681811 A [0128] [0129]
- US 3972995 A [0142]
- US 4259314 A [0142]
- US 4680323 A [0142]
- US 4740365 A [0142]
- US 4573996 A [0142]
- US 4250163 A [0142]
- US 4226848 A [0142]
- US 4948580 A [0142]
- US 33093 A [0142]
- US 4235871 A [0155]
- US 4501728 A [0155]
- US 4837028 A [0155]
- US 4179337 A [0161]
- US 4511069 A [0166][0179]
- US 4652441 A [0178]
- US 4917893 A [0178]
- US 4677191 A [0178]
- US 4728721 A [0178]
- US 4675189 A [0178]
- US 233239 A [0223]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

• **ZHANG Y** *et al.* ZHONGUA YAOLI XUEBAO - ACTA PHARMACOLOGICA SINICA, November 2001, vol. 22 (11), 1051-1056

- US. *Pharmacopeia National Formulary*, 1990, 1857-1859 [0033]
- **Laursen** *et al.* *Eur. J Endocrinology*, 1996, vol. 135, 309-315 [0040]
- **Lagowski**. *Macmillan Encyclopedia of Chemistry. Simon & Schuster*, 1997, vol. 1, 273-4 [0054]
- **Dawson**. *Data for Biochemical Research. Oxford Science Publications*, 1986, 419 [0055]
- **Lide**. *CRC Handbook of Chemistry and Physics. Taylor & Francis Group*, 2005, 2-41 [0055]
- **Ugwoke** *et al.* *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, vol. 29, 1656-57 [0079]
- **Fasano** *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 1991, vol. 8, 5242-5246 [0088]

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica para el suministro intranasal de insulina a un paciente, que comprende una mezcla acuosa de una insulina monomérica, una metil- β -ciclodextrina y un polisorbato.
2. La formulación de la reivindicación 1, en la que la insulina es una insulina humana.
3. La formulación de la reivindicación 1, en la que la insulina es una insulina humana de acción rápida.
4. La formulación de la reivindicación 1, en la que la insulina se selecciona del grupo que consiste en insulina humana natural, insulina humana (LysB3, GluB29), insulina humana (LysB3, IleB28), insulina humana (GlyA21, HisB31, HisB32), insulina humana (AspB28), insulina humana (AspB10), insulina humana (LysB28, ProB29), y mezclas de las mismas.
5. La formulación de la reivindicación 4, en la que la insulina es una insulina humana (AspB28).
6. La formulación de la reivindicación 1, en la que el polisorbato se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 80 y polisorbato 20 y una mezcla de los mismos.
7. La formulación de la reivindicación 6, en la que el agente tensioactivo es polisorbato 80.
8. La formulación de la reivindicación 1, que además comprende un agente quelante seleccionado del grupo que consiste en ácido etilendiaminetetraacético, ácido etilenglicoltetraacético, y mezclas de los mismos.
9. La formulación de la reivindicación 1, que además comprende uno o más polioles, preferiblemente en la que el poliol se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, manitol, sorbitol, lactosa, L-arabinosa, D-eritrosa, D-ribosa, D-xilosa, D-manosa, trehalosa, D-galactosa, lactulosa, celobiosa, gentibiosa, glicerina, polietilenglicol, y mezclas de los mismos; más preferiblemente en la que los polioles son lactosa y sorbitol.
10. La formulación de la reivindicación 1, que además comprende un conservante; preferiblemente en la que el conservante se selecciona del grupo que consiste en clorobutanol, metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, benzoato sódico, ácido ascórbico, fenol, ortocresol, metacresol, paracresol y mezclas de los mismos; más preferiblemente en la que el conservante es metilparabeno y propilparabeno.
11. La formulación de la reivindicación 1, que además comprende un aerosol de gotitas que tienen diámetros de 1 a 700 micrómetros de tamaño.
12. La formulación de la reivindicación 1, que además comprende un humectante, preferiblemente en la que el humectante se selecciona del grupo que consiste en propilenglicol, glicerina, triacetato de glicerilo, un poliol, un poliol polímero, ácido láctico, urea, y mezclas de los mismos; más preferiblemente en la que el humectante es propilenglicol.
13. La formulación de la reivindicación 1, que además comprende un tampón, preferiblemente en la que el tampón se selecciona del grupo que consiste en glutamato, acetato, glicina, histidina, arginina, lisina, metionina, lactato, formiato, glicolato, y mezclas de los mismos; más preferiblemente en la que el tampón es arginina.
14. La formulación de la reivindicación 13, en la que el tampón tiene un pK_a de 5 a 9, preferiblemente en la que el tampón tiene un pK_a de 6 a 8.
15. La formulación de la reivindicación 1, que además comprende un agente potenciador de la viscosidad, preferiblemente en el que el agente potenciador de la viscosidad se selecciona del grupo que consiste en gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, carbomer, carboximetilcelulosa, y mezclas de los mismos; más preferiblemente en la que el agente potenciador de la viscosidad es carbomer, carboximetilcelulosa o gelatina.
16. La formulación de la reivindicación 1, que tiene un pH de $7,0 \pm 0,5$.
17. La formulación de la reivindicación 1, que además comprende un tonificante.
18. La formulación de la reivindicación 1, que tiene una osmolaridad de 50 a 350 mOsm/l.
19. La formulación de la reivindicación 1, **caracterizada** por una biodisponibilidad mayor de aproximadamente 15%.
20. Un uso de la formulación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para la fabricación de un medicamento para tratar signos y síntomas de una enfermedad o afección en un ser humano, incluyendo la diabetes mellitus, hiperglucemia, dislipidemia, inducción de saciedad en un individuo, promoción de pérdida de peso en un individuo, obesidad, cáncer, cáncer de colon y cáncer de próstata.

ES 2 345 509 T3

21. Una formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, para usar en el tratamiento de signos y síntomas de una enfermedad o afección en un ser humano, incluyendo la diabetes mellitus, hiperglucemia, dislipidemia, inducción de saciedad en un individuo, promoción de pérdida de peso en un individuo, obesidad, cáncer, cáncer de colon y cáncer de próstata.

5

22. El uso de la reivindicación 20 o reivindicación 21, en el que el medicamento eleva el nivel de insulina en la sangre en un ser humano durante al menos aproximadamente 6 horas después de la administración.

10

23. El uso de la reivindicación 20 o reivindicación 21, en el que el medicamento reduce el porcentaje de glucosa en un ser humano en más de aproximadamente 10%.

24. El uso de la reivindicación 20 o reivindicación 21, en el que el medicamento se administra en forma de un aerosol de gotitas que tienen diámetros de 1 a 700 micrómetros de tamaño.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

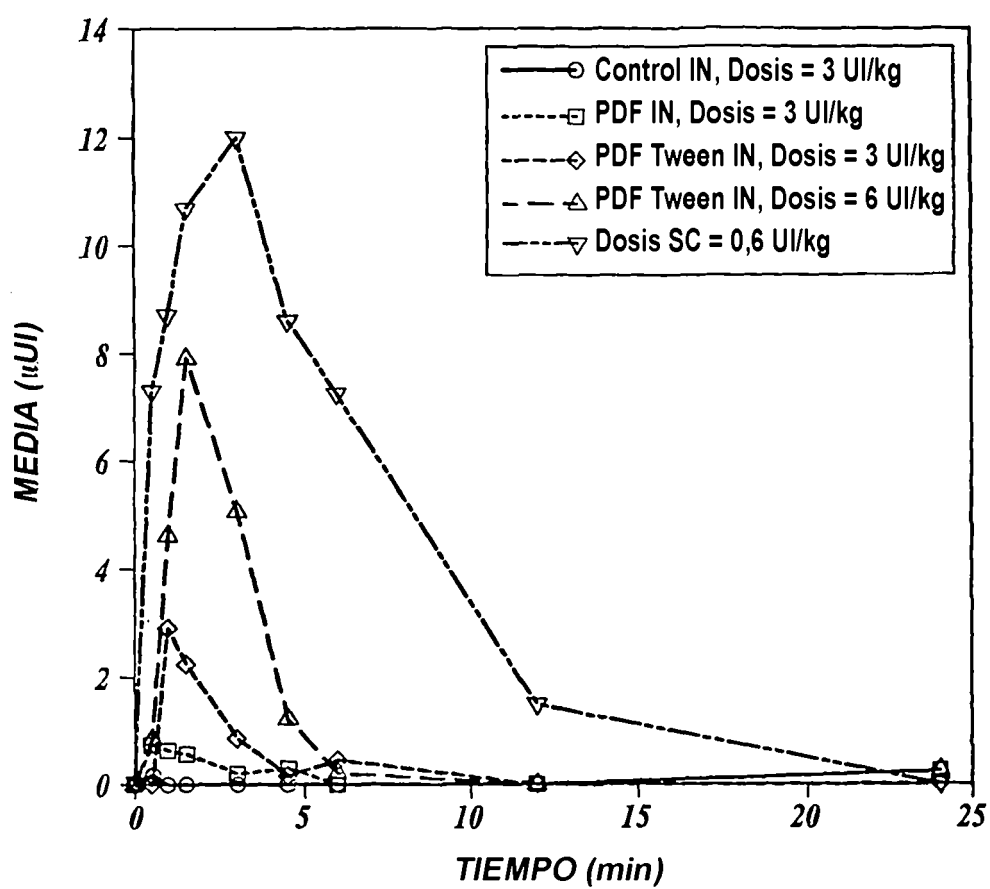


FIG.1

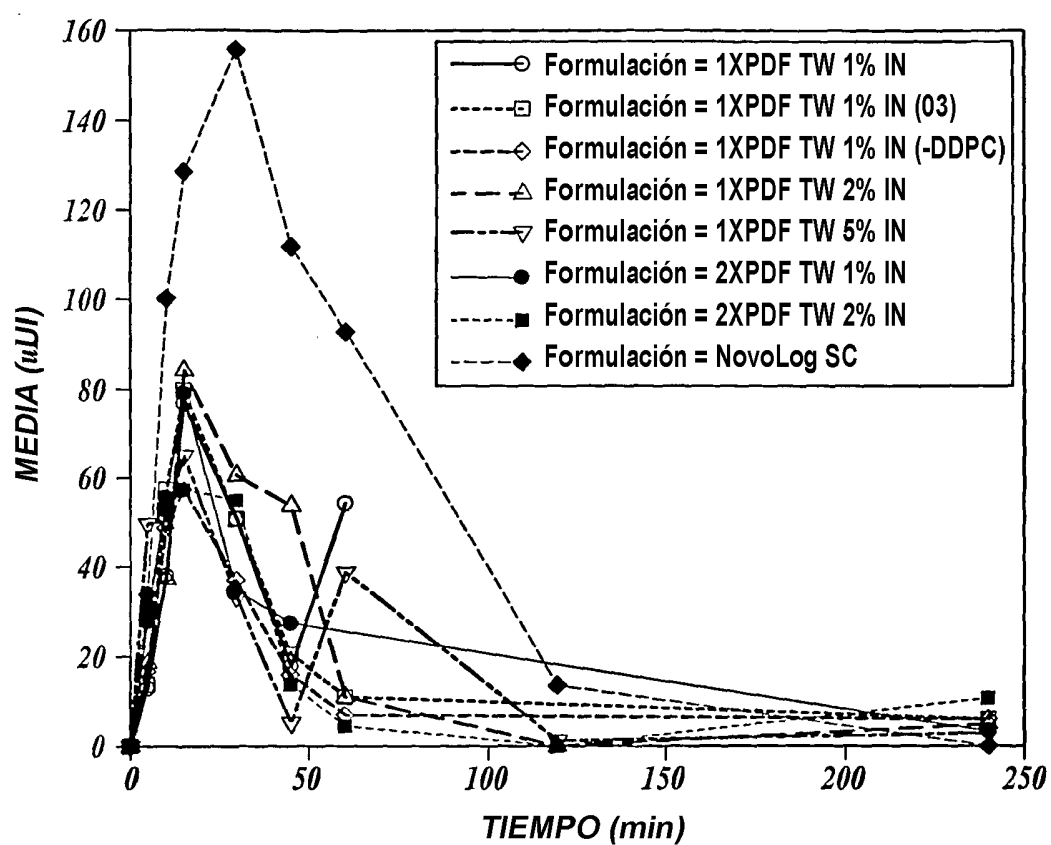


FIG.2

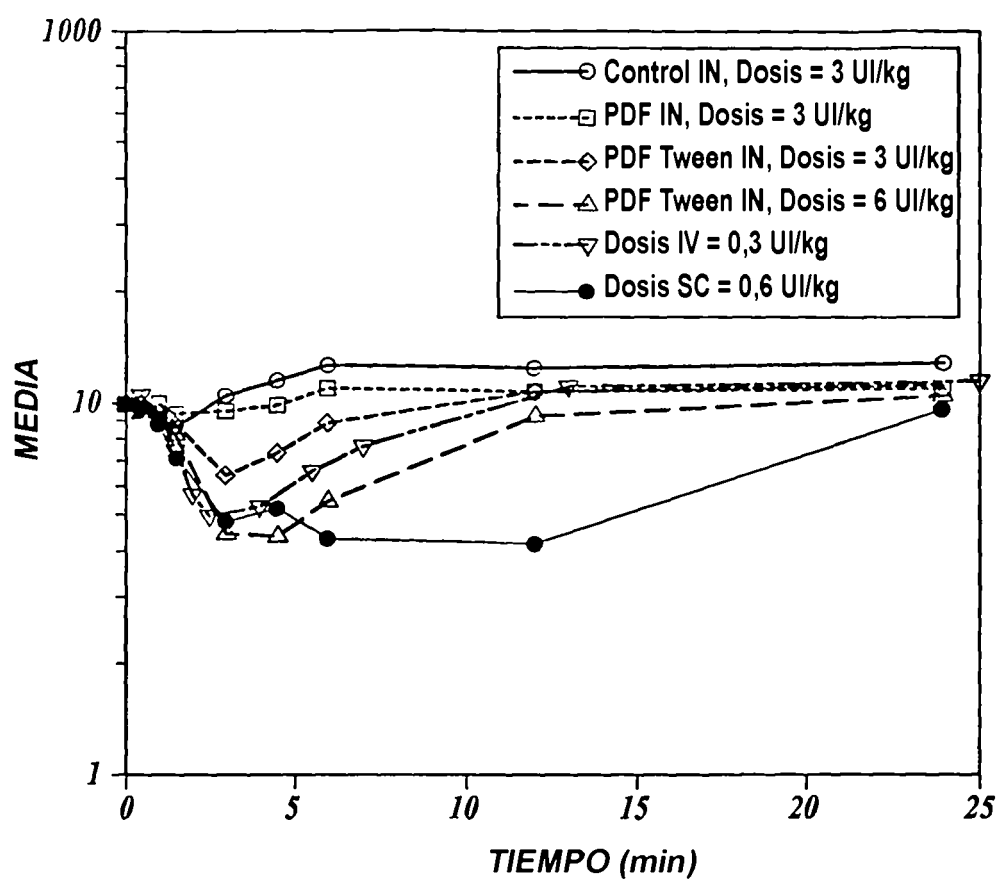


FIG.3

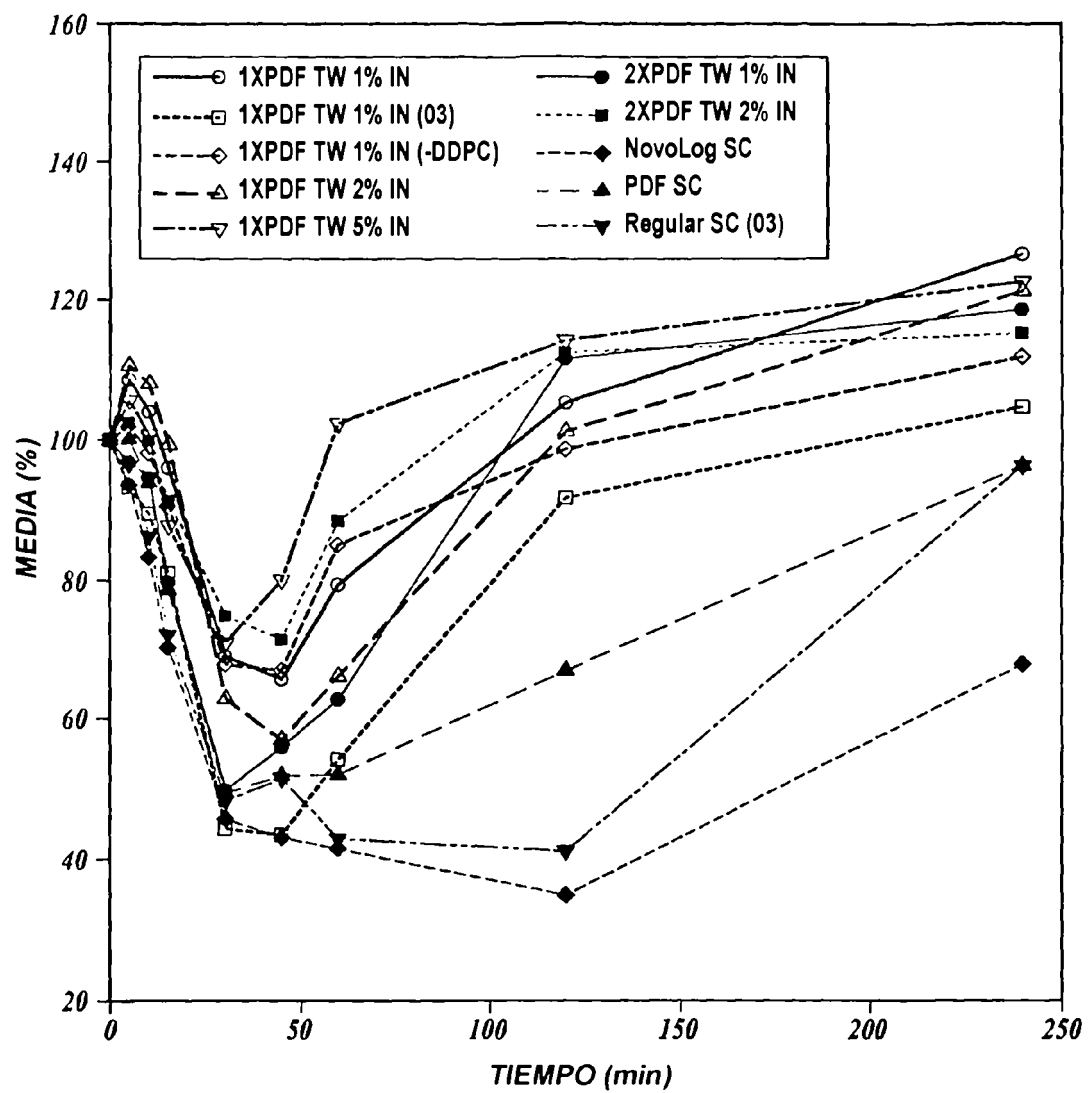


FIG.4

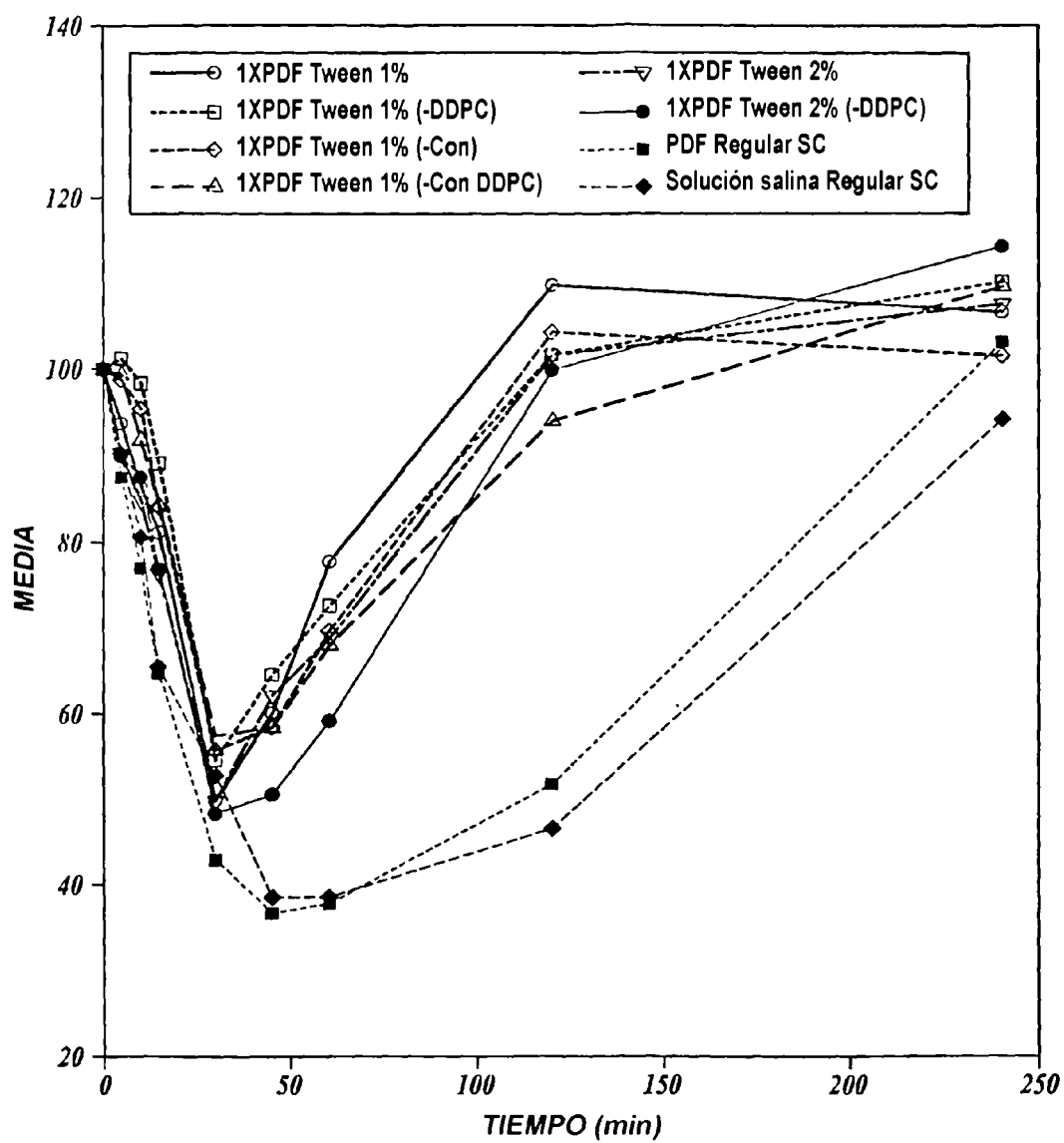
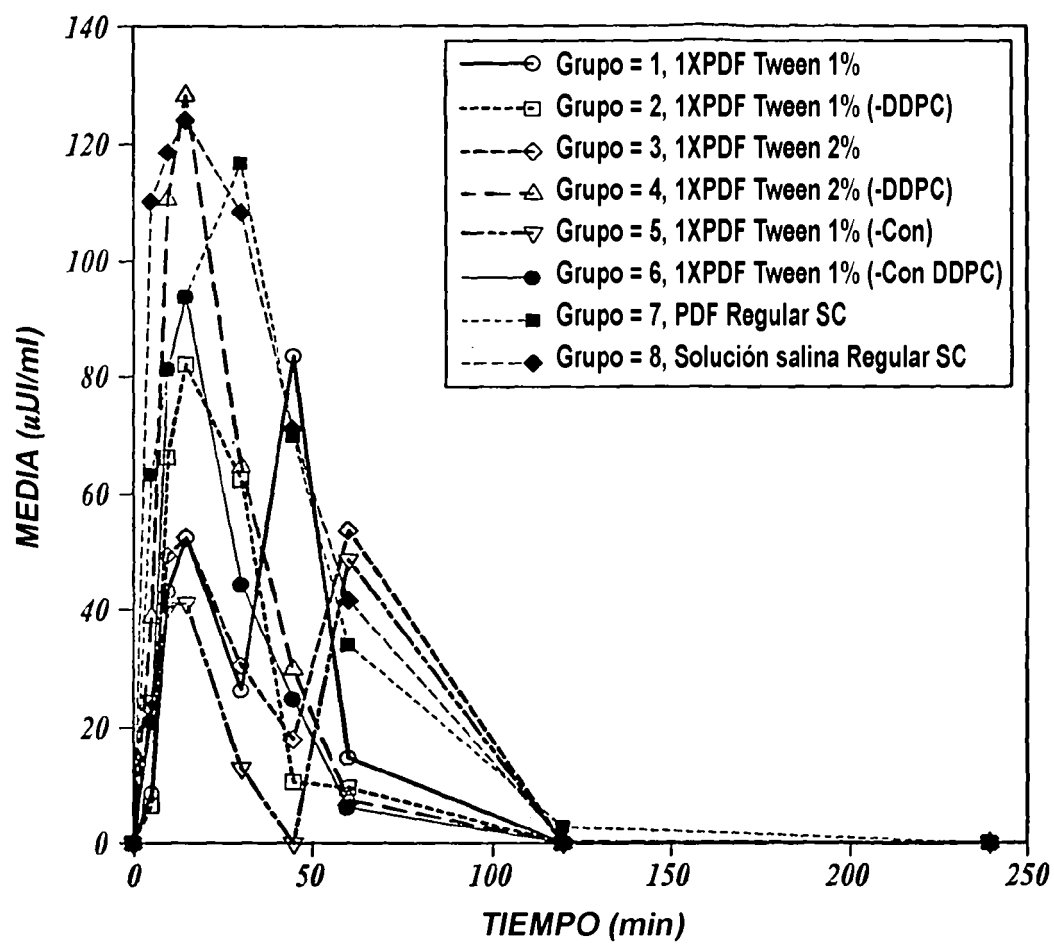


FIG.5

*FIG. 6*

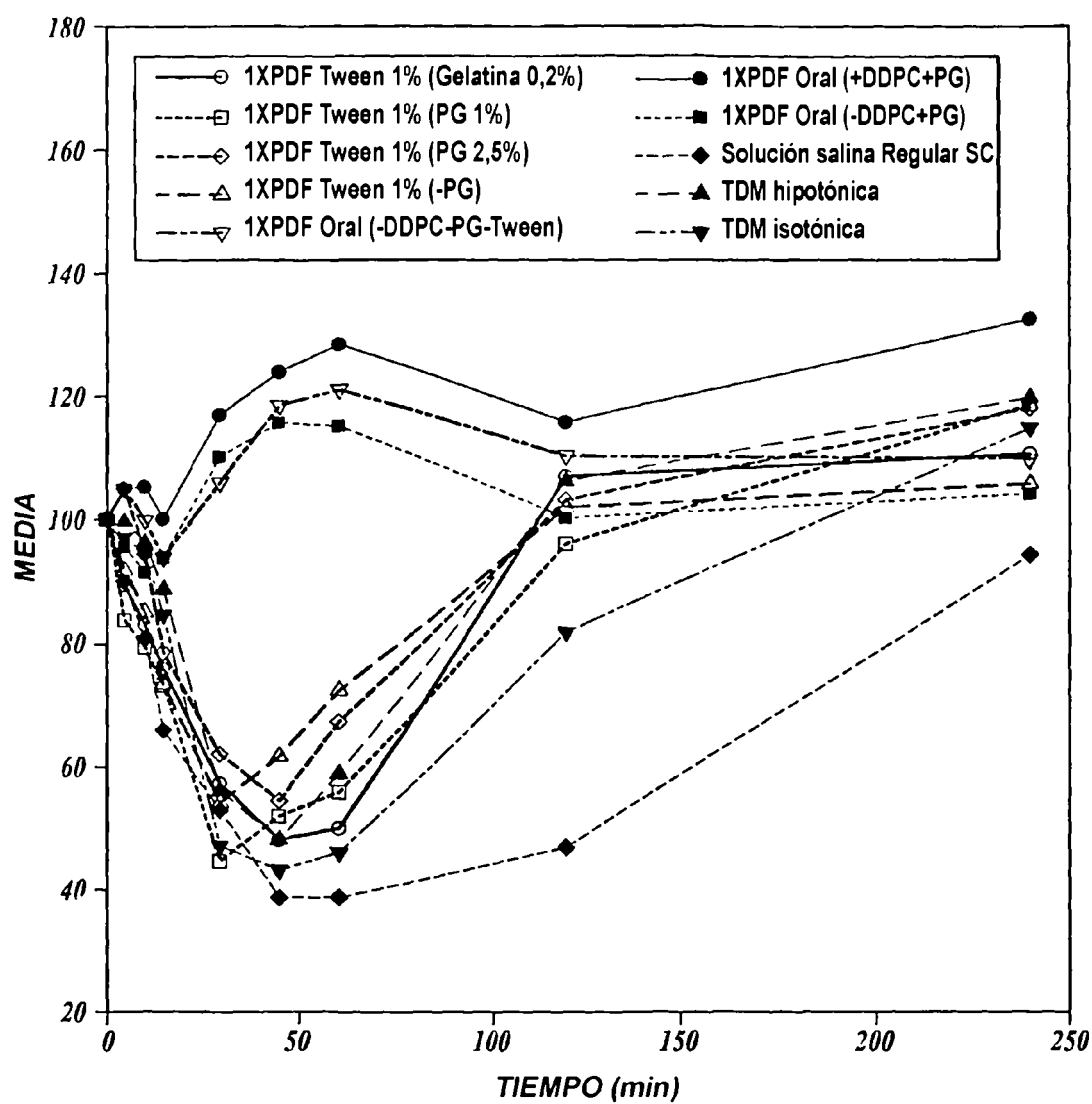


FIG. 7

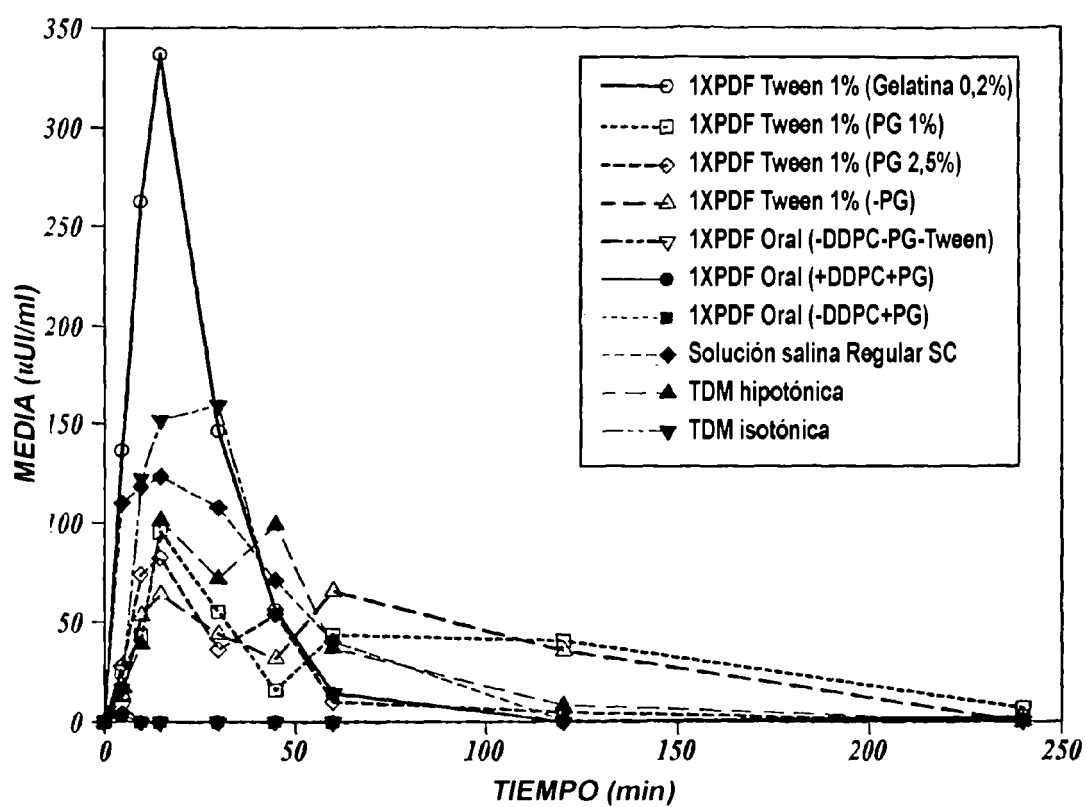


FIG. 8

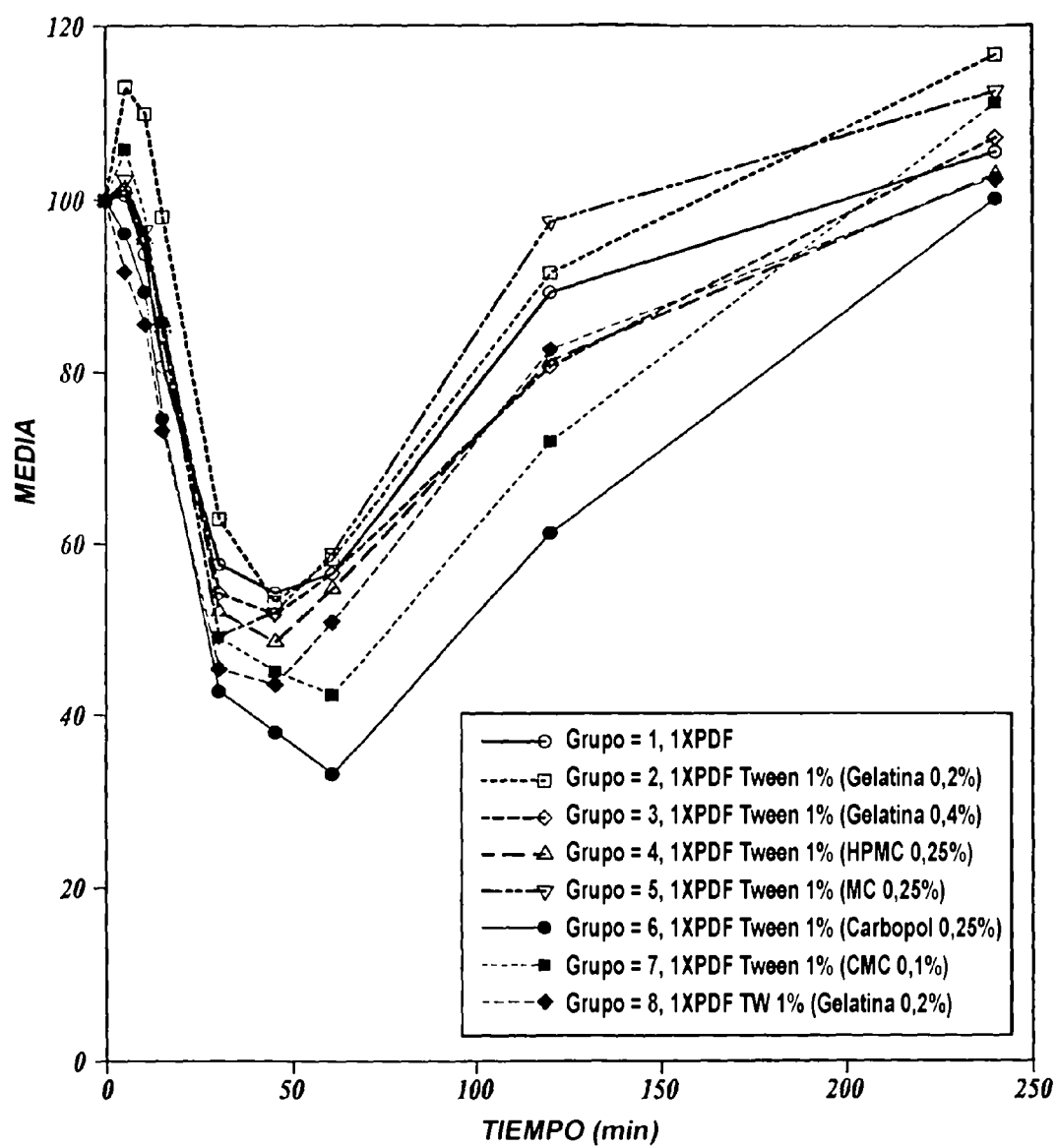


FIG.9

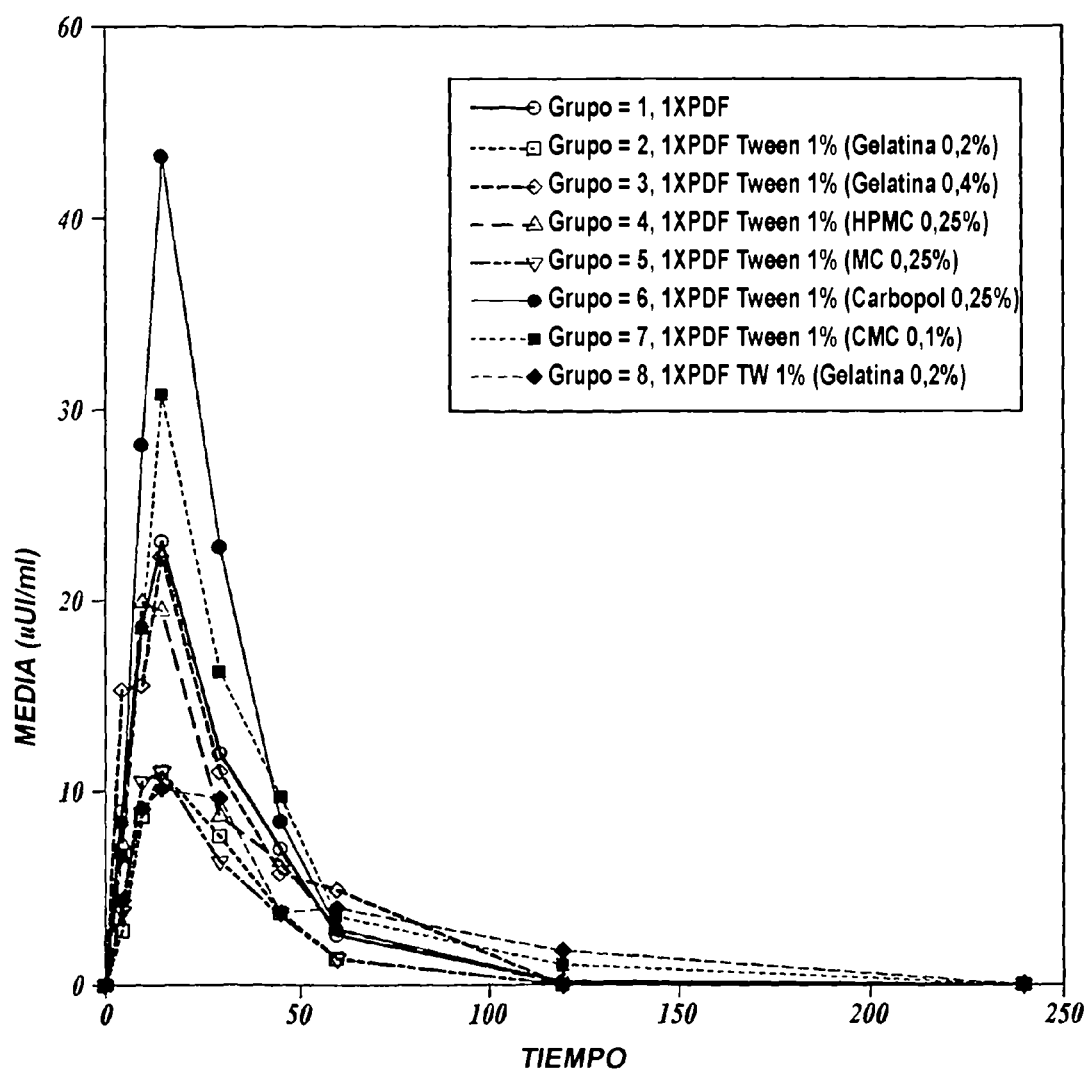


FIG.10