

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 951 918**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/00** (2006.01)  
**A61K 31/166** (2006.01)  
**A61K 31/198** (2006.01)  
**A61K 31/375** (2006.01)  
**A61K 31/522** (2006.01)  
**A61K 31/555** (2006.01)  
**A61K 33/24** (2009.01)  
**A61K 33/32** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2018** **PCT/IB2018/057209**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2019** **WO19058273**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2018** **E 18849471 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2023** **EP 3509573**

54 Título: **Composición farmacéutica para suministro de un péptido**

30 Prioridad:

**21.09.2017 IN 201711033555**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.10.2023**

73 Titular/es:

**ANYA BIOPHARM INC. (100.0%)**  
**6F. No. 378 Changchun Rd.**  
**Taipei 10487, TW**

72 Inventor/es:

**GSCHLIESSER, SIEGFRIED y**  
**DESAI, BHUSHAN DHRUVKUMAR**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 951 918 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para suministro de un péptido

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere generalmente al campo de los agentes farmacéuticos. Más específicamente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un péptido en combinación con una sal/complejo metálico y un agente reductor para brindar protección, al menos en parte, al péptido frente a la degradación proteolítica tras la ingestión del mismo.

**Antecedentes**

La descripción de los antecedentes incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención. No se admite que la información proporcionada en el presente documento sea técnica anterior o relevante para la invención reivindicada actualmente, o que cualquier publicación a la que se haga referencia de forma específica o implícita sea técnica anterior.

Las proteínas y los polipéptidos se usan como uno o más agentes terapéuticos, uno o más agentes de diagnóstico y similares desde hace mucho tiempo, e incluso hoy en día su número crece rápidamente. Sin embargo, todavía no se ha descubierto todo su potencial, ya que su aplicación se limita únicamente a la inyección parenteral.

La vía oral es una vía sencilla, conveniente y la más preferida para la administración de un agente terapéutico. Sin embargo, la degradación de los péptidos en el tubo gastrointestinal impide su absorción como una entidad intacta. Por lo tanto, la degradación enzimática en el tubo gastrointestinal y la escasa permeabilidad a través de las células epiteliales son las principales razones de su baja biodisponibilidad oral.

Se han propuesto diferentes enfoques durante un período de tiempo para mejorar la biodisponibilidad oral de dichas proteínas y polipéptidos, tales como el uso de una miríada de potenciadores de la absorción e inhibidores de proteasa como el inhibidor de tripsina de soja, aprotinina, inhibidor de Bowman-Birk, bacitracina, mesilato de camostat y amastatina (Renukuntla J *et al.*, *Int J Pharm.* 2013, 447, 75-93 y Solicitud de EE.UU. US20070087957A1). Sin embargo, ninguno de estos inhibidores de proteasa tuvo éxito como aditivo en la aplicación del suministro de fármacos polipeptídicos a escala comercial, ya que son tóxicos y pueden presentar varios efectos secundarios.

Algunos ejemplos de inhibidores de proteasa utilizados para el suministro de péptidos son los siguientes: a) Soja (inhibidor de tripsina): es uno de los alérgenos ampliamente aceptados y el número de personas que padecen por la soja ha aumentado constantemente desde la década de 1980, lo que limita su utilización (Moroz LA *et al.*, *N Engl J Med.* 1980, 302, 1126-8; Foucard T *et al.*, *Allergy*, 1999, 54, 261-5; Ramesh S, *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008, 34, 217-30). Provoca reacciones alérgicas inmediatas tales como tos, estornudos, secreción nasal, urticaria, diarrea, hinchazón facial, dificultad para respirar, lengua hinchada, dificultad para tragar, presión arterial baja, transpiración excesiva, desmayos, choque anafiláctico e incluso la muerte, b) Bowman (inhibidor de Birk): Es un derivado de la soja con alta biodisponibilidad oral incluso en ausencia de un potenciador de la absorción, sin embargo, se informa que ejerce una inhibición sistémica de la proteasa no deseada (inhibición sistémica de las serina proteasas tales como plasmina, lo que puede aumentar el riesgo de trombosis) después de la ingesta oral. Además, Bowman también puede dar como resultado la formación de anticuerpos contra sí mismo (Wan XS *et al.*, *Nutr Cancer*, 2002, 43, 167-73), c) Aprotinina: Se sabe que causa anafilaxia a razón de 1:200 en su primer uso (Mahdy AM *et al.*, 2004, 93, 842-58), y también se informa que está asociado con un riesgo de insuficiencia renal aguda, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, accidente cerebrovascular y encefalopatía en un paciente que padezca un trastorno cardíaco/cirugía (Mangano DT *et al.*, *N Engl J Med*, 2006, 354, 353-65).

Dado que estos inhibidores de proteasa están asociados con riesgos potenciales para la salud, se acepta comúnmente que debe evitarse la utilización de estos inhibidores de proteasa. Además de enfrentar estas limitaciones, están asociados con un alto coste de fabricación, heterogeneidad, obstáculos reguladores, desafíos para lograr la inhibición selectiva y el requisito de altas dosis para una actividad eficaz (Renukuntla J *et al.*, *Int J Pharm.* 2013, 447) haciendo inviable su utilización. Otros inhibidores de la proteasa tales como bacitracina (actividad antibiótica), mesilato de camostat (eficaz en el tratamiento de la pancreatitis) o amastatina (actividad antibacteriana) también se asocian con efectos secundarios similares (Renukuntla J *et al.*, *Int J Pharm* 2013, 447, 75-93 y publicación de EE.UU. US20070087957A1).

La patente europea EP3006045B1 desvela una combinación de elementos traza tales como cobre o cinc con un agente reductor farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en combinación con un potenciador de la absorción mucosal que da como resultado una biodisponibilidad oral sorprendentemente alta y ventajosa de diferentes fármacos peptídicos o proteicos. Sin embargo, el cobre y el cinc están asociados con muchas rutas metabólicas en los mamíferos y, por lo tanto, la utilización de los mismos para una terapia a largo plazo puede dar lugar a interacciones negativas.

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de desarrollar composiciones farmacéuticas sencillas, seguras, eficientes

y rentables que puedan suministrar un péptido mientras brindan protección, al menos en parte, a los péptidos frente a la degradación proteolítica tras la ingestión de los mismos. La presente divulgación satisface las necesidades existentes, así como otras, y alivia las deficiencias de las composiciones farmacéuticas y técnicas de suministro tradicionales.

- 5 El documento CN 103861086 describe un método de preparación para un compuesto de arabinosa peptídica de calabaza amarga que consiste en los siguientes componentes en partes en peso: 8-15 partes de polipéptidos de calabaza amarga, 15-25 partes de L-arabinosa, 0,1-0,3 partes de levadura enriquecida con cromo, 25-35 partes de inulina, 5-15 partes de fitosterol, 10-15 partes de D-manitol, 10-20 partes de celulosa microcristalina, 0,5-1 partes de estearato de magnesio y 2-5 partes de hidroxipropilmetilcelulosa.
- 10 El documento US 2006/252686 describe composiciones y métodos para usar las mismas para el tratamiento de la diabetes y otros trastornos del metabolismo de la glucosa. Dichas composiciones pueden incluir un agente antidiabético y una o más fuentes biodisponibles de cromo y vanadio.
- 15 El documento WO 2016/055550 describe una composición farmacéutica que comprende: un fármaco peptídico o proteico que tiene un peso molecular igual o inferior a aproximadamente 50 kDa; una sal/complejo de cobre farmacéuticamente aceptable y/o una sal/complejo de cinc farmacéuticamente aceptable; y un agente reductor farmacéuticamente aceptable.
- El documento EP 1800675 describe composiciones nutraceuticas y farmacéuticas que pueden mejorar la composición de la membrana y el funcionamiento de las células y, a través de esto, el funcionamiento celular general.

## 20 **Objetos de la invención**

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica que pueda superar las deficiencias asociadas con las composiciones informadas de la técnica anterior.

- 25 Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica para el suministro eficaz de un péptido.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica para el suministro oral de un péptido.

- 30 Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica que proporcione protección, al menos en parte, al péptido que se va a ingerir frente a la degradación proteolítica.

- 35 Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica que aumente la biodisponibilidad oral del péptido.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica que sea segura.

- 40 Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica que sea rentable de fabricar.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica que sea fácil de preparar.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica que presente una larga vida útil.

## 45 **Sumario**

- La presente divulgación se refiere generalmente al campo de los agentes farmacéuticos. Más específicamente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un péptido en combinación con una sal/complejo metálico y un agente reductor para brindar protección, al menos en parte, al péptido frente a la degradación proteolítica tras la ingestión del mismo.

- La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un péptido; y una cantidad farmacéuticamente aceptable de una combinación de: (a) al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo; y (b) al menos un agente reductor, en donde, el al menos un metal se selecciona de cualquiera de, o una combinación de: óxido de vanadio (V), vanadato de sodio, sulfato de vanadio, sulfato de vanadilo, biguanida de vanadio, bis(maltolato) de oxovanadio (IV), acetato de vanadio, picolinato de vanadilo, citrato de vanadilo, picolinato de cromo, polinicotinato de cromo, nicotinato de cromo, cloruro de cromo, acetato de cromo, gluconato de manganeso, sulfato de manganeso, permanganato de potasio y cloruro de manganeso. Dicha combinación de (a) al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal y un complejo y (b) al menos un agente reductor proporciona protección, al menos en parte, al menos a un péptido frente a la degradación proteolítica tras la ingestión del mismo.

- En una realización, el al menos un metal es vanadio y en donde la composición farmacéutica incluye cualquiera o una combinación de la sal de vanadio y el complejo de vanadio en una cantidad que varía de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 15 mg por dosis unitaria. En una realización, cualquiera de la sal de vanadio y el complejo de vanadio se selecciona independientemente de un grupo que incluye: óxido de vanadio (V), vanadato de sodio, sulfato

de vanadio, sulfato de vanadilo, biguanida de vanadio, bis(maltolato) de oxovanadio (IV), acetato de vanadio, picolinato de vanadilo y citrato de vanadilo. En una realización, el al menos un metal es cromo y en donde la composición farmacéutica incluye cualquiera o una combinación de la sal de cromo y el complejo de cromo en una cantidad que varía de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 0,5 mg por dosis unitaria. En una realización, cualquiera de la sal de cromo y el complejo de cromo se selecciona independientemente de un grupo que incluye: picolinato de cromo, polinicotinato de cromo, nicotinato de cromo, cloruro de cromo y acetato de cromo. En una realización, el al menos un metal es manganeso y en donde la composición farmacéutica incluye cualquiera o una combinación de la sal de manganeso y el complejo de manganeso en una cantidad que varía de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg por dosis unitaria. En una realización, cualquiera de la sal de manganeso y el complejo de manganeso se selecciona independientemente de un grupo que incluye: gluconato de manganeso, sulfato de manganeso, permanganato de potasio y cloruro de manganeso.

En una realización, el al menos un péptido tiene un peso molecular igual o inferior a 60 kDa. En una realización, el al menos un péptido se selecciona de un grupo que incluye: insulina, un análogo de insulina, insulina lispro, insulina PEGlispro, insulina aspart, insulina glulisina, insulina glargina, insulina detemir, insulina NPH, insulina degludec, insulina humana B29K(N(ε)hexadecanodioil-γ-L-Glu) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)octadecanodioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) desB30, insulina humana B29K(N(ε)octadecanodioil-γ-L-Glu) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)eicosanodioil-γ-L-Glu) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)octadecanodioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)eicosanedioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)eicosanedioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) A14E B16H B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)hexadecanodioil-γ-L-Glu) A14E B16H B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)eicosanedioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) A14E B16H B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)octadecanodioil) A14E B25H desB30, GLP-1, un análogo de GLP-1, un análogo de GLP-1 acilado, un análogo de GLP-1 diacilado, semaglutida, liraglutida, exenatida, lixizenatida, un agonista dual del receptor GLP-1 y el receptor de glucagón, amilina, un análogo de amilina, pramlintida, un análogo de somatostatina, octreotida, lanreotida, pasireotida, goserrelina, busserrelina, leptina, un análogo de leptina, metreleptina, péptido YY, un análogo del péptido YY, glatiramer, leuprolida, teriparatida, abaloparatida, tetracosactida, corticorelina, etelcalcetida, elcatonina, desmopresina, hormona del crecimiento humano, un análogo de la hormona del crecimiento humano, un antibiótico glucopeptídico, un antibiótico peptídico no ribosómico cíclico o policíclico glucosilado, vancomicina, teicoplanina, telavancina, bleomicina, ramoplanina, decaplanina, bortezomib, cosintropina, gonadotropina coriónica, menotropina, sermorelina, hormona liberadora de hormona luteinizante, somatropina, calcitonina, calcitonina de salmón, pentagastrina, oxitocina, neseritida, anakinra, enfuvirtida, pegvisomant, dornasa alfa, lepirudina, anidulafungina, eptifibatida, interferón alfacon-1, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta-1a, interferón beta-1 b, interferón gamma-1 b, peginterferón alfa-2a, peginterferón alfa-2b, peginterferón beta-1a, fibrinolisisina, vasopresina, aldesleucina, epoyetina alfa, darbepoyetina alfa, epoyetina beta, epoyetina delta, epoyetina omega, epoyetina zeta, filgrastim, interleucina-11, ciclosporina, glucagón, urocina, viomocina, hormona liberadora de tirotropina, leucina-encefalina, metionina-encefalina, sustancia P, hormona adrenocorticotrópica, hormona paratiroidea y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización, el al menos un péptido y el al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo están presentes en una forma físicamente separada en la composición farmacéutica. En una realización, el al menos un péptido y el al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo están presentes en compartimentos separados. En una realización, la composición farmacéutica está presente en forma de cualquiera de cápsula en cápsula y comprimido en cápsula.

En una realización, el al menos un agente reductor se selecciona de cualquiera o una combinación de ácido ascórbico, glutatión reducido, cisteína, ácido úrico, azúcar reductor, gliceraldehído, α-tocoferol, vitamina A, ácido α-lipoico, ácido dihidro-α-lipoico, glucosa, galactosa, lactosa, maltosa, compuesto que contiene tiol, un tiómero y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En una realización, la composición farmacéutica incluye al menos un agente reductor en una cantidad que varía de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por dosis unitaria.

En una realización, la composición farmacéutica incluye además al menos un potenciador de la absorción o la permeación y en donde al menos un potenciador de la absorción o la permeación está presente en una cantidad que varía de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg por dosis unitaria. En una realización, la composición farmacéutica se formula como una forma farmacéutica oral sólida y una forma farmacéutica oral líquida, con la condición de que cuando dicha composición farmacéutica se formule como una forma farmacéutica oral líquida, la composición farmacéutica incluya agua en una cantidad inferior a aproximadamente el 5 % v/v.

Diversos objetos, características, aspectos y ventajas de la materia objeto de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas, junto con las figuras de los dibujos adjuntos en las que números iguales representan componentes similares.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra un gráfico que representa el perfil de conc. frente al tiempo de la insulina glargina (mU/l) de diferentes

formulaciones, de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

### Descripción detallada

5 La siguiente es una descripción detallada de realizaciones de la divulgación representada en los dibujos adjuntos. Las realizaciones son tan detalladas como para comunicar claramente la divulgación. Sin embargo, la cantidad de detalles ofrecidos no pretende limitar las variaciones esperadas de realizaciones; por el contrario, la intención es cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que están dentro del espíritu y alcance de la presente divulgación como se define en las reivindicaciones adjuntas.

10 Cada una de las reivindicaciones adjuntas define una invención diferente, que a efectos de infracción se reconoce que incluye equivalentes a los diversos elementos o limitaciones especificados en las reivindicaciones. Dependiendo del contexto, todas las referencias a continuación a la "invención" pueden referirse, en algunos casos, únicamente a determinadas realizaciones específicas. En otros casos, se reconocerá que las referencias a la "invención" se referirán a la materia objeto mencionada en una o más, pero no necesariamente todas, las reivindicaciones.

15 Como se usa en la descripción del presente documento y en todas las reivindicaciones a continuación, el significado de "un", "una" y "el/la" incluye una referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, como se usa en la descripción del presente documento, el significado de "en" incluye "en" y "sobre" a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

20 Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o un lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento con respecto a determinadas realizaciones, está destinado meramente a ilustrar mejor la invención y no tienen ninguna limitación sobre el alcance de la invención por lo demás reivindicada. Ninguna expresión en la memoria descriptiva ha de interpretarse como una indicación de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

30 A continuación se muestran diversos términos como se usan en el presente documento. En la medida en que un término usado en una reivindicación no se defina a continuación, se le debe dar la definición más amplia que las personas en la técnica pertinente hayan dado a ese término tal como se refleja en las publicaciones impresas y las patentes concedidas en el momento de la presentación.

35 La presente divulgación se refiere generalmente al campo de los agentes farmacéuticos. Más específicamente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un péptido en combinación con una sal/complejo metálico y un agente reductor para brindar protección, al menos en parte, al péptido frente a la degradación proteolítica tras la ingestión del mismo.

40 Las serina proteasas se encuentran de forma ubicua en eucariotas y escinden enlaces peptídicos en los que la tríada catalítica principal es serina, histidina y ácido aspártico. Las serina proteasas especificadas en la presente invención incluyen tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa B y aminopeptidasa M, que son responsables de las funciones fisiológicas corporales, específicamente la digestión (degradación proteolítica), es decir, la hidrólisis de enlaces peptídicos y aminoácidos. La presente divulgación tiene como objetivo proporcionar una o más composiciones farmacéuticas que incluyan un péptido en combinación con una sal/complejo metálico y un agente reductor para brindar protección, al menos en parte, al péptido frente a la degradación proteolítica tras la ingestión del mismo.

45 Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que incluye: una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un péptido; y una cantidad farmacéuticamente aceptable de una combinación de: (a) al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo; y (b) al menos un agente reductor, en donde, el al menos un metal se selecciona de cualquiera o una combinación de: óxido de vanadio (V), vanadato de sodio, sulfato de vanadio, sulfato de vanadilo, biguanida de vanadio, bis(maltolato) de oxovanadio (IV), acetato de vanadio, picolinato de vanadilo, citrato de vanadilo, picolinato de cromo, polinicotinato de cromo, nicotinato de cromo, cloruro de cromo, acetato de cromo, gluconato de manganeso, sulfato de manganeso, permanganato de potasio y cloruro de manganeso, y en donde la combinación de (a) al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal y un complejo y (b) al menos un agente reductor brinda protección, al menos en parte, al menos a un péptido frente a la degradación proteolítica tras la ingestión del mismo.

50 En una realización, el al menos un metal es vanadio y en donde la composición farmacéutica incluye cualquiera o una combinación de la sal de vanadio y el complejo de vanadio en una cantidad que varía de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 5 mg por dosis unitaria. En una realización, cualquiera de la sal de vanadio y el complejo de vanadio se selecciona independientemente de un grupo que incluye: óxido de vanadio (V), vanadato de sodio, sulfato de vanadio, sulfato de vanadilo, biguanida de vanadio, bis(maltolato) de oxovanadio (IV), acetato de vanadio, picolinato de vanadilo y citrato de vanadilo. En una realización, el al menos un metal es cromo y en donde la composición farmacéutica incluye cualquiera o una combinación de la sal de cromo y el complejo de cromo en una cantidad que varía de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 0,5 mg por dosis unitaria. En una realización, cualquiera de

la sal de cromo y el complejo de cromo se selecciona independientemente de un grupo que incluye: picolinato de cromo, polinicotinato de cromo, nicotinato de cromo, cloruro de cromo y acetato de cromo. En una realización, el al menos un metal es manganeso y en donde la composición farmacéutica incluye cualquiera o una combinación de la sal de manganeso y el complejo de manganeso en una cantidad que varía de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg por dosis unitaria. En una realización, cualquiera de la sal de manganeso y el complejo de manganeso se selecciona independientemente de un grupo que incluye: gluconato de manganeso, sulfato de manganeso, permanganato de potasio y cloruro de manganeso.

En una realización, el al menos un péptido tiene un peso molecular igual o inferior a 60 kDa. En una realización, el al menos un péptido se selecciona de un grupo que incluye: insulina, un análogo de insulina, insulina lispro, insulina PEGlispro, insulina aspart, insulina glulisina, insulina glargina, insulina detemir, insulina NPH, insulina degludec, insulina humana B29K(N(ε)hexadecanodioil-γ-L-Glu) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)octadecanodioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) desB30, insulina humana B29K(N(ε)octadecanodioil-γ-L-Glu) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)eicosanodioil-γ-L-Glu) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)octadecanodioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)eicosanodioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)eicosanodioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) A14E B16H B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)hexadecanodioil-γ-L-Glu) A14E B16H B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)eicosanodioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) A14E B16H B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)octadecanodioil) A14E B25H desB30, GLP-1, un análogo de GLP-1, un análogo de GLP-1 acilado, un análogo de GLP-1 diacilado, semaglutida, liraglutida, exenatida, lixizenatida, un agonista dual del receptor GLP-1 y el receptor de glucagón, amilina, un análogo de amilina, pramlintida, un análogo de somatostatina, octreotida, lanreotida, pasireotida, goserrelina, buserrelina, leptina, un análogo de leptina, metreleptina, péptido YY, un análogo del péptido YY, glatiramer, leuprolida, teriparatida, abaloparatida, tetracosactida, corticorelina, etelcalcetida, elcatonina, desmopresina, hormona del crecimiento humano, un análogo de la hormona del crecimiento humano, un antibiótico glucopeptídico, un antibiótico peptídico no ribosómico cíclico o policíclico glucosilado, vancomicina, teicoplanina, telavancina, bleomicina, ramoplanina, decaplanina, bortezomib, cosintropina, gonadotropina coriónica, menotropina, sermorelina, hormona liberadora de hormona luteinizante, somatropina, calcitonina, calcitonina de salmón, pentagastrina, oxitocina, neseritida, anakinra, enfuvirtida, pegvisomant, dornasa alfa, lepirudina, anidulafungina, eptifibatida, interferón alfa-1, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta-1a, interferón beta-1 b, interferón gamma-1 b, peginterferón alfa-2a, peginterferón alfa-2b, peginterferón beta-1a, fibrinolisisina, vasopresina, aldesleucina, epoyetina alfa, darbepoyetina alfa, epoyetina beta, epoyetina delta, epoyetina omega, epoyetina zeta, filgrastim, interleucina-11, ciclosporina, glucagón, urocina, viomicina, hormona liberadora de tirotropina, leucina-encefalina, metionina-encefalina, sustancia P, hormona adrenocorticotrópica, hormona paratiroidea y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización, el al menos un péptido y el al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo están presentes en una forma físicamente separada en la composición farmacéutica. En una realización, el al menos un péptido y el al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo están presentes en compartimentos separados. En una realización, la composición farmacéutica está presente en forma de cualquiera de cápsula en cápsula y comprimido en cápsula.

En una realización, el al menos un agente reductor se selecciona de cualquiera o una combinación de ácido ascórbico, glutatión reducido, cisteína, ácido úrico, azúcar reductor, gliceraldehído, α-tocoferol, vitamina A, ácido α-lipoico, ácido dihidro-α-lipoico, glucosa, galactosa, lactosa, maltosa, compuesto que contiene tiol, un tiómero y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En una realización, la composición farmacéutica incluye al menos un agente reductor en una cantidad que varía de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por dosis unitaria.

En una realización, la composición farmacéutica incluye además al menos un potenciador de la absorción o la permeación y en donde al menos un potenciador de la absorción o la permeación está presente en una cantidad que varía de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg por dosis unitaria. En una realización, la composición farmacéutica se formula como una forma farmacéutica oral sólida y una forma farmacéutica oral líquida, con la condición de que cuando dicha composición farmacéutica se formule como una forma farmacéutica oral líquida, la composición farmacéutica incluya agua en una cantidad inferior a aproximadamente el 5 % v/v.

En una realización, el péptido es cualquier péptido o proteína que sea adecuado para usarse como agente terapéutico o de diagnóstico. En una realización, el péptido es un péptido lineal o un péptido cíclico. En una realización, el péptido es un péptido modificado o derivatizado, tal como un péptido PEGilado o un péptido acilado de ácido graso o un péptido acilado de diácido graso y similares. Los péptidos pueden estar libres de residuos de histidina y/o libres de residuos de cisteína. Generalmente, se prefiere que el péptido sea soluble en agua, particularmente a pH neutro (es decir, aproximadamente a pH 7) y tenga al menos un sitio de escisión de serina proteasa, es decir, el péptido comprende uno o más residuos de aminoácidos susceptibles o propensos a la escisión por una serina proteasa (particularmente una serina proteasa intestinal, tal como tripsina, quimotripsina, aminopeptidasa, carboxipeptidasa, elastasa y/o dipeptidil-4-peptidasa) y similares.

En una realización, el péptido se selecciona de cualquiera o una combinación de insulina (preferentemente insulina

humana), un análogo de insulina tal como, pero sin limitación, un análogo de insulina basal de acción prolongada, un análogo de insulina basal de acción prolongada estabilizado con proteasa, insulina lispro, insulina PEGlispro, el derivado de insulina como A14E, B25H, B29K(N(eps)octadecanodioil-gGlu-OEG-OEG), insulina humana desB30, insulina aspart, insulina glulisina, insulina glargina, insulina detemir, insulina NPH, insulina degludec, y los  
 5 análogos/derivados de insulina descritos en la solicitud de EE.UU. número US20140056953A1, GLP-1, un análogo de GLP-1 (análogo de GLP-1 acilado o un análogo de GLP-1 diacilado), semaglutida, liraglutida, exenatida, lixizenatida, un agonista dual del receptor GLP-1 y el receptor de glucagón, amilina, un análogo de amilina, pramlintida, un análogo de somatostatina (octreotida, lanreotida o pasireotida), goserrelina (acetato de goserrelina), buserrelina, leptina, un análogo de leptina (metreleptina), péptido YY (PYY), un análogo de PYY, glatiramer (acetato de glatiramer), leuprolida,  
 10 teriparatida, abaloparatida, tetracosactida, corticorelina, etelcalcetida, elcatonina, desmopresina, hormona de crecimiento humano (hGH), un análogo de la hormona del crecimiento humano, un antibiótico glucopeptídico (péptido no ribosómico glucosilado cíclico o policíclico tal como vancomicina, teicoplanina, telavancina, bleomicina, ramoplanina o decaplanina), borteomib, cosintropina, gonadotropina coriónica, menotropina, sermorelina, hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH, también conocida como hormona liberadora de gonadotropina),  
 15 somatropina, calcitonina (calcitonina-salmón), pentagastrina, oxitocina, neseritida, anakinra, enfuvirtida, pegvisomant, dornasa alfa, lepirudina, anidulafungina, eptifibatida, interferón alfa-1, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta-1a, interferón beta-1b, interferón gamma-1b, peginterferón alfa-2a (interferón pegilado alfa-2a), peginterferón alfa-2b (interferón pegilado alfa-2b), peginterferón beta-1a (interferón pegilado beta-1a), fibrinolisisina, vasopresina, aldesleucina, epoyetina alfa, darbepoyetina alfa, epoyetina beta, epoyetina delta, epoyetina omega,  
 20 epoyetina zeta, filgrastim, interleucina-11, ciclosporina, glucagón, urocina, viomina, hormona liberadora de tirotropina (TRH), leucina-enkefalina, metionina-enkefalina, sustancia P (CAS n.º 33507-63-0), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona paratiroidea (PTH) y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Sin embargo, cualquier otra molécula peptídica, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la  
 25 presente invención.

En una realización, para un sujeto humano, el péptido se selecciona de cualquiera o una combinación de péptidos endógenos tales como insulina o glucagón y similares. En una realización preferida, se usa una isoforma humana del péptido correspondiente que se expresa de forma recombinante o se sintetiza químicamente. Sin embargo, cualquier  
 30 otro péptido de isoforma humana, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.

En una realización, el péptido es un análogo de insulina. En una realización, el análogo de insulina se selecciona de cualquiera o una combinación de insulina Detemir, insulina glargina, insulina degludec y otros análogos de insulina procedentes de seres humanos, cerdos, peces. Sin embargo, cualquier otro análogo/derivado de insulina, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.

En una realización, se puede usar una mezcla de dos o más péptidos. En una realización, se usa una mezcla de insulina humana y un agonista de GLP-1 (por ejemplo, liraglutida, semaglutida, exenatida o lixizenatida). Sin embargo, la mezcla de dos o más péptidos cualesquiera (incluidos los péptidos analizados anteriormente), como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.

En una realización, el al menos un péptido presenta un peso molecular igual o inferior a 60 kDa. En una realización, el al menos un péptido presenta un peso molecular igual o inferior a 40 kDa. En una realización, el al menos un péptido presenta un peso molecular igual o inferior a 30 kDa. En una realización, el al menos un péptido presenta un peso molecular igual o inferior a 20 kDa. En una realización, el al menos un péptido presenta un peso molecular igual o inferior a 10 kDa. En una realización, el al menos un péptido presenta un peso molecular que varía de aproximadamente igual o superior a 300 Da a aproximadamente igual o inferior a 50 kDa. Sin embargo, el péptido con cualquier intervalo de peso molecular, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.

En una realización, el peso molecular del al menos un péptido se puede determinar mediante cualquier método tal como espectrometría de masas (espectrometría de masas de ionización por electronebulización (ESI-MS) o espectrometría de masas de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS)), electroforesis en gel (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)), métodos hidrodinámicos (cromatografía de filtración en gel o sedimentación en gradiente) o dispersión de luz estática (por ejemplo, dispersión de luz multiángulo (MALS)), conocidos o apreciados por un experto en la técnica, para cumplir su fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.

En una realización preferida, la sal y el complejo de vanadio es vanadio (V). Resulta ventajoso usar sales y complejos de vanadio (V) debido a su buena solubilidad acuosa y mejor estabilidad del estado de oxidación en comparación con las sales y complejos de vanadio (IV). En una realización, las sales y complejos de vanadio son sal y/o complejo de

vanadio (IV), en donde el vanadio forma parte de un anión como vanadato, o parte de un catión como vanadilo.

En una realización, la composición farmacéutica incluye cualquiera o una combinación de la sal de vanadio y el complejo de vanadio en una cantidad que varía de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 15,0 mg por dosis unitaria.

En una realización, la sal de cromo y el complejo de cromo se seleccionan preferentemente de sal y/o complejo de cromo (III). En una realización, la sal de cromo y el complejo de cromo se seleccionan de picolinato de cromo, polinicotinato de cromo, nicotinato de cromo, cloruro de cromo y acetato de cromo.

En una realización, la composición farmacéutica incluye cualquiera o una combinación de la sal de cromo y el complejo de cromo en una cantidad que varía de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 50 mg por dosis unitaria, preferentemente de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 0,5 mg por unidad de dosis.

En una realización, la sal de manganeso y el complejo de manganeso se seleccionan más preferentemente de la sal y/o el complejo de manganeso (III). En una realización, las sales y/o complejos de manganeso (III) se seleccionan de cualquiera o una combinación de gluconato de manganeso, sulfato de manganeso y cloruro de manganeso

En una realización, la composición farmacéutica incluye cualquiera o una combinación de la sal de manganeso y el complejo de manganeso en una cantidad que varía de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 50 mg por dosis unitaria, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg por unidad de dosis.

En una realización, las sales y los complejos de vanadio se prefieren a las sales y los complejos de cromo y manganeso ya que las sales y los complejos de vanadio mejoran significativamente la biodisponibilidad oral de los péptidos. En una realización, las sales y los complejos de cromo se prefieren a las sales y los complejos de manganeso. En una realización, el uso de las sales y los complejos de cromo también son ventajosos ya que son menos tóxicos. En una realización, el uso de las sales y los complejos de manganeso es ventajoso sobre las sales de vanadio y cromo ya que las sales y los complejos de manganeso son seguros para los seres humanos incluso en dosis altas.

En una realización, el agente reductor se selecciona de cualquiera o una combinación de ácido ascórbico (preferentemente un ascorbato tal como ascorbato de sodio), glutatión reducido (GSH), cisteína, ácido úrico, un azúcar reductor (un monosacárido reductor, tal como glucosa, gliceraldehído o galactosa, o un disacárido reductor, tal como lactosa o maltosa), manitol,  $\alpha$ -tocoferol, vitamina A, ácido  $\alpha$ -lipoico, ácido dihidro- $\alpha$ -lipoico (DHLLA), un compuesto que contiene tiol, un tiómero (incluye tiómeros Laffleur F *et al.*, Future Med Chem, 2012, 4, 2205-16) y similares. En una realización, se pueden usar mezclas de dos o más agentes reductores, preferentemente, ascorbato y glutatión reducido. Sin embargo, cualquiera o una combinación de uno o más agentes reductores, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.

En una realización, la composición farmacéutica incluye un agente reductor en una cantidad que varía de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 1000 mg por dosis unitaria, preferentemente de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg por unidad de dosis.

En una realización, la composición farmacéutica incluye además al menos un potenciador de la absorción (o potenciador de la permeación). Debe apreciarse que las expresiones "potenciador de la absorción" y "potenciador de la permeación", como se usan en el presente documento de manera intercambiable y sinónima a lo largo de la presente divulgación, abarcan dentro de su significado, potenciadores de la absorción y potenciadores de la permeación, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica pertinente. En una realización, la administración de al menos un potenciador de la absorción o la permeación mejora o facilita la absorción mucosal del péptido en el tubo gastrointestinal, especialmente, si el péptido tiene un tamaño grande. En una realización, el al menos un potenciador de la absorción o la permeación se selecciona de cualquiera o una combinación de potenciador de la absorción zwitteriónico o un potenciador de la absorción no iónico. En una realización, el al menos un potenciador de la absorción se selecciona de cualquiera o una combinación de alcanoil carnitina C8-20 (preferentemente lauroil carnitina, miristoilcarnitina o palmitoil carnitina; por ejemplo, cloruro de lauroil carnitina, cloruro de miristoil carnitina o cloruro de palmitoil carnitina), ácido salicílico (preferentemente un salicilato, por ejemplo, salicilato de sodio), un derivado de ácido salicílico (tal como ácido 3-metoxisalicílico, ácido 5-metoxisalicílico o ácido homovanílico, un ácido alcanoil C8-20 (preferentemente un alcanoil C8-20, más preferentemente un caprato, un caprilato, un miristato, un palmitato o un estearato, tal como caprato de sodio, caprilato de sodio, miristato de sodio, palmitato de sodio o estearato de sodio), ácido cítrico (preferentemente un citrato tal como citrato de sodio), un aminoácido acilado de ácido graso (cualquiera de los aminoácidos acilados de ácidos grasos desvelados en la solicitud de patente de EE.UU. US20140056953A1, sin limitarse a los mismos, lauroil alaninato de sodio, N-dodecanoil-L-alanina, lauroil asparaginato de sodio, N-dodecanoil-L-asparagina, ácido lauroil aspártico de sodio, ácido N-dodecanoil-L-aspártico, lauroil cistenato de sódico, N-dodecanoil-L-cisteína, ácido lauroil glutámico de sodio, ácido N-dodecanoil-L-glutámico, lauroil glutaminato de sodio, N-dodecanoil-L-glutamina, lauroil glicinato de sodio, N-dodecanoil-L-glicina, lauroil histidinato de sodio, N-dodecanoil-L-histidina, lauroil isoleucinato de sodio, N-dodecanoil-L-isoleucina, lauroil leucinato de sodio, N-dodecanoil-L-leucina, lauroil metioninato de sodio, N-dodecanoil-L-metionina, lauroil fenilalaninato de sodio, N-

- dodecanoil-L-fenilalanina, lauroil prolinato de sodio, N-dodecanoil-L-prolina, lauroil serinato de sodio, N-dodecanoil-L-serina, lauroil treonato de sodio, N-dodecanoil-L-treonina, lauroil triptofanato de sodio, N-dodecanoil-L-triptófano, lauroil tirosinato de sodio, N-dodecanoil-L-tirosina, lauroil valinato de sodio, N-dodecanoil-L-valina, lauroil sarcosinato de sodio, N-dodecanoil-L-sarcosina, alaninato cáprico de sodio, N-decanoil-L-alanina, asparaginato cáprico de sodio, N-decanoil-L-asparagina, ácido aspártico cáprico de sodio, ácido N-decanoil-L-aspártico, cisteinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-cisteína, ácido glutámico cáprico de sodio, ácido N-decanoil-L-glutámico, glutaminato cáprico de sodio, N-decanoil-L-glutamina, glicinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-glicina, histidinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-histidina, isoleucinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-isoleucina, leucinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-leucina, metioninato cáprico de sodio, N-decanoil-L-metionina, fenilalaninato cáprico de sodio, N-decanoil-L-fenilalanina, prolinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-prolina, serinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-serina, treonato cáprico de sodio, N-decanoil-L-treonina, triptofanato cáprico de sodio, N-decanoil-L-triptófano, tirosinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-tirosina, valinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-valina, sarcosinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-sarcosina, oleoil sarcosinato de sodio, N-decil leucina de sodio, estearoil glutamato de sodio (Amisoft HS-11 P), miristoil glutamato de sodio (Amisoft MS-11), lauroil glutamato de sodio (Amisoft LS-11), cocoil glutamato de sodio (Amisoft CS-11), cocoil glicinato de sodio (Amilite GCS-11), N-decil leucina de sodio, cocoil glicina de sodio, cocoil glutamato de sodio, lauroil alaninato de sodio, N-dodecanoil-L-alanina, lauroil asparaginato de sodio, N-dodecanoil-L-asparagina, ácido lauroil aspártico de sodio, ácido N-dodecanoil-L-aspártico, lauroil cisteinato de sodio, N-dodecanoil-L-cisteína, ácido lauroil glutámico de sodio, ácido N-dodecanoil-L-glutámico, lauroil glutaminato de sodio, N-dodecanoil-L-glutamina, lauroil glicinato de sodio, N-dodecanoil-L-glicina, lauroil histidinato de sodio, N-dodecanoil-L-histidina, lauroil isoleucinato de sodio, N-dodecanoil-L-isoleucina, lauroil leucinato de sodio, N-dodecanoil-L-leucina, lauroil metioninato de sodio, N-dodecanoil-L-metionina, lauroil fenilalaninato de sodio, N-dodecanoil-L-fenilalanina, lauroil prolinato de sodio, N-dodecanoil-L-prolina, lauroil serinato de sodio, N-dodecanoil-L-serina, lauroil treonato de sodio, N-dodecanoil-L-treonina, lauroil triptofanato de sodio, N-dodecanoil-L-triptófano, lauroil tirosinato de sodio, N-dodecanoil-L-tirosina, lauroil valinato de sodio, N-dodecanoil-L-valina, N-dodecanoil-L-sarcosina, alaninato cáprico de sodio, N-decanoil-L-alanina, asparaginato cáprico de sodio, N-decanoil-L-asparagina, ácido aspártico cáprico de sodio, ácido N-decanoil-L-aspártico, cisteinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-cisteína, ácido glutámico cáprico de sodio, ácido N-decanoil-L-glutámico, glutaminato cáprico de sodio, N-decanoil-L-glutamina, glicinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-glicina, histidinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-histidina, cáprico isoleucinato de sodio, N-decanoil-L-isoleucina, leucinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-leucina, metioninato cáprico de sodio, N-decanoil-L-metionina, fenilalaninato cáprico de sodio, N-decanoil-L-fenilalanina, prolinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-prolina, serinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-serina, treoninato cáprico de sodio, N-decanoil-L-treonina, triptofanato cáprico de sodio, N-decanoil-L-triptófano, tirosinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-tirosina, valinato cáprico de sodio, N-decanoil-L-valina, sarcosinato cáprico de sodio, oleoil sarcosinato de sodio y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente tales como sarcosinato alcanoilo C<sub>8-20</sub> (un sarcosinato de lauroilo, tal como lauroil sarcosinato de sodio) o uno de los 20  $\alpha$ -aminoácidos proteinogénicos estándar que está acilado con un ácido alcanoico C<sub>8-20</sub>, un sacárido de alquilo (alquilsacárido C<sub>1-20</sub> tal como un alquilpolisacárido C<sub>8-10</sub> como Multitrope™ 1620-LQ-(MV), o n-octil-beta-D-glucopiranosido o n-decil-beta-D-maltósido), una ciclodextrina ( $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina, metil- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina o sulfobutiléter  $\beta$ -ciclodextrina), N-[8-(2-hidroxibenzoil)amino]caprilato de sodio (SNAC), un tiómero (incluye los tiómeros que se desvelan en Laffleur F *et al.*, Future Med Chem. 2012, 4, 2205-16), un compuesto quelante de calcio (ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), citrato de sodio o ácido poliacrílico), cremophor EL (Kolliphor EL; CAS n.º 61791-12-6), quitosano, N,N,N-trimetilquitosano, cloruro de benzalconio, bestatina, cloruro de cetilpiridinio, bromuro de cetiltrimetilamonio, un alcohol C<sub>2-20</sub> (por ejemplo, etanol, decanol, alcohol laurílico, alcohol miristílico o alcohol palmítico), un alcohol C<sub>8-20</sub> (por ejemplo, alcohol oleílico), un ácido alquenoico C<sub>8-20</sub> (por ejemplo, ácido oleico), sulfato de dextrano, dietilenglicol monoetil éter (transcutol), 1-dodecilazaciclo-heptan-2-ona (Azone®), caprilato de etilo, monolaurato de glicerilo, lisofosfatidilcolina, mentol, una alquilamina C<sub>8-20</sub>, una alquencilamina C<sub>8-20</sub> (por ejemplo, oleilamina), fosfatidilcolina, un poloxámero, monolaurato de polietilenglicol, polioxietileno, monolaurato de polipropilenglicol, un polisorbato (polisorbato 80), un desoxicolato (desoxicolato de sodio), glicocolato de sodio, glicodesoxicolato de sodio, lauril sulfato de sodio (SDS), un taurocolato (por ejemplo, taurocolato de sodio), un taurodesoxicolato (taurodesoxicolato de sodio), laurato de sacarosa, un sulfóxido (un (alquil C<sub>1-10</sub>)-(alquil C<sub>1-10</sub>)-sulfóxido, tal como, decilmetilsulfóxido o dimetilsulfóxido), ciclopentadecalactona, ácido 8-(N-2-hidroxi-5-cloro-benzoil)-amino-caprílico (5-CNAC), propionato de dodecil-2-N,N-dimetilamino (DDAIP), succinato de D- $\alpha$ -tocoferil polietilenglicol-1000 (TPGS), y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos mencionados anteriormente y similares. En una realización, se puede usar una mezcla de cualquiera de dos o más potenciadores de la absorción, incluyendo los potenciadores de la absorción descritos anteriormente. Sin embargo, cualquiera o una combinación de uno o más potenciadores de la absorción, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.
- En una realización, la composición farmacéutica incluye opcionalmente un potenciador de la absorción o la permeación en una cantidad que varía de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg por dosis unitaria, preferentemente de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg por unidad de dosis.
- En una realización, la composición farmacéutica está constituida de tal manera que, si la composición farmacéutica se añade a diez mililitros de una solución al 5 % de HCl, neutralizaría el ácido y generaría un pH superior a aproximadamente 6. En una realización, la composición farmacéutica está constituida de tal manera que, si la

composición farmacéutica se añade a diez mililitros de una solución acuosa, generaría intervalos de pH de 6 a 9.

En una realización, la composición farmacéutica incluye: una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un péptido que presenta un peso molecular igual o inferior a 50 kDa, al menos cualquiera o una combinación de la sal de vanadio y el complejo de vanadio, al menos un agente reductor, y opcionalmente un potenciador de la absorción se administra por vía oral para brindar protección, al menos en parte, al menos a un péptido frente a la degradación proteolítica tras la ingestión.

En una realización, la composición farmacéutica incluye: una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un péptido que presenta un peso molecular igual o inferior a 50 kDa, al menos cualquiera o una combinación de la sal de cromo y el complejo de cromo, al menos un agente reductor, y opcionalmente un potenciador de la absorción se administra por vía oral para brindar protección, al menos en parte, al menos a un péptido frente a la degradación proteolítica tras la ingestión.

En una realización, la composición farmacéutica incluye: una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un péptido que presenta un peso molecular igual o inferior a 50 kDa, al menos cualquiera o una combinación de la sal de manganeso y el complejo de manganeso, al menos un agente reductor, y opcionalmente un potenciador de la absorción se administra por vía oral para brindar protección, al menos en parte, al menos a un péptido frente a la degradación proteolítica tras la ingestión.

En una realización, la composición farmacéutica incluye además opcionalmente cualquiera o una combinación de uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como, pero sin limitación, portadores, diluyentes, cargas, disgregantes, agentes lubricantes, aglutinantes, colorantes, pigmentos, estabilizantes, conservantes, antioxidantes y/o potenciadores de la solubilidad. En una realización, la composición farmacéutica, opcionalmente, incluye además uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables tales como vitamina E, histidina, celulosa microcristalina (MCC), manitol, almidón, sorbitol y/o lactosa. En una realización, las composiciones farmacéuticas se pueden formular mediante cualquier técnica conocida o apreciada por un experto en la técnica, para cumplir su fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.

En una realización, el al menos un potenciador de la solubilidad se selecciona de cualquiera o una combinación de polietilenglicol, incluyendo poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 200 a aproximadamente 5.000 Da, etilenglicol, propilenglicol, tensioactivos no iónicos, tiloxapol, polisorbato 80, macrogol-15-hidroxiestearato, fosfolípidos, lecitina, dimiristoil fosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilcolina, fosfatidilcolina de diestearoil, ciclodextrinas,  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina, hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxietil- $\gamma$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina, dihidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina, sulfobutiléter- $\gamma$ -ciclodextrina, glucosil- $\alpha$ -ciclodextrina, glucosil- $\beta$ -ciclodextrina, diglucosil- $\beta$ -ciclodextrina, maltosil- $\alpha$ -ciclodextrina, maltosil- $\beta$ -ciclodextrina, maltosil- $\gamma$ -ciclodextrina, maltotriosil- $\beta$ -ciclodextrina, maltotriosil- $\gamma$ -ciclodextrina, dimaltosil- $\beta$ -ciclodextrina, metil- $\beta$ -ciclodextrina, tioéteres de carboxialquilo, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, copolímeros de acetato de vinilo, vinilpirrolidona, laurilsulfato de sodio, sulfosuccinato de dioctilo y sodio y similares. Sin embargo, cualquiera o una combinación de uno o más potenciadores de la solubilidad, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.

En una realización, la composición farmacéutica se formula como una forma farmacéutica para administración oral, preferentemente, administración peroral. En una realización, al menos un péptido, al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo, al menos un agente reductor y el potenciador de absorción opcional se administran por vía oral.

En una realización, una forma farmacéutica oral se selecciona de cualquiera o una combinación de comprimidos (comprimidos recubiertos o no recubiertos), cápsulas (cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, cápsulas de HPMC o cápsulas de HPMCP), una cápsula en cápsula, un comprimido en cápsula, pastillas para chupar, trociscos, óvulos, soluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes, elixires, polvos y gránulos para reconstitución, polvos dispersables y gránulos, gomas medicinales, comprimidos para masticar, comprimidos efervescentes, formas farmacéuticas multiparticuladas y similares. Sin embargo, cualquiera o una combinación de una o más formas farmacéuticas orales, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.

En una realización, los comprimidos pueden incluir cualquiera o una combinación de excipientes tales como, pero sin limitación, celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico, glicina, disgregantes tales como almidón (preferentemente maíz, patata o almidón de tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y determinados silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina, goma arábiga, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco. Sin embargo, cualquiera o una combinación de uno o más excipientes, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.

- En una realización, la cápsula puede incluir cualquiera o una combinación de excipientes tales como, pero sin limitación, lactosa, almidón, una celulosa o polietilenglicoles de alto peso molecular. Sin embargo, cualquiera o una combinación de uno o más excipientes, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.
- En una realización, las suspensiones acuosas y/o elixires pueden incluir cualquiera o una combinación de excipientes tales como, pero sin limitación, agentes edulcorantes o saporíferos, colorantes o tintes, agentes emulsionantes y/o de suspensión y diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina. Sin embargo, cualquiera o una combinación de uno o más excipientes, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.
- En una realización, la composición farmacéutica se formula como una forma farmacéutica oral sólida y una forma farmacéutica oral líquida, con la condición de que cuando la composición farmacéutica se formule como una forma farmacéutica oral líquida, la composición farmacéutica incluya agua en una cantidad inferior a aproximadamente el 5 % v/v, preferentemente inferior a aproximadamente el 3 % v/v, más preferentemente inferior a aproximadamente el 1 % v/v, incluso más preferentemente inferior a aproximadamente el 0,5 % v/v, aún más preferentemente inferior a aproximadamente el 0,1 % v/v, y aún más preferentemente esté libre de agua. En una realización, dicha forma farmacéutica oral líquida es particularmente ventajosa ya que proporciona una mejor estabilidad en almacenamiento. En una realización alternativa, dicha forma farmacéutica oral líquida se puede preparar poco antes de la administración y se deben evitar los periodos de almacenamiento prolongados.
- La cantidad de vanadio, cromo y/o manganeso, utilizada de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, está muy por debajo de los niveles de ingesta diaria recomendada de estos elementos traza y, por lo tanto, puede considerarse segura. Además, el vanadio, el cromo y/o el manganeso en combinación con un agente reductor ejercen un efecto inhibidor sobre las serina proteasas en el tubo gastrointestinal pero no muestran un efecto sistémico, lo que proporciona una mejora adicional en la seguridad en comparación con los inhibidores de proteasa analizados anteriormente. Además, el vanadio, el cromo o el manganeso, así como los agentes reductores, tales como ascorbato o glutatión reducido, se pueden proporcionar a costes de fabricación considerablemente más bajos que los inhibidores de proteasa analizados anteriormente que se han sugerido previamente para el suministro oral de fármacos peptídicos o proteicos.
- Típicamente, un médico determinará la dosis real que será más adecuada para un sujeto individual. El nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier sujeto individual en particular pueden variar y dependerán de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del fármaco peptídico o proteico específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el modo y el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y el sujeto individual que se somete a la terapia. La dosis precisa será en última instancia a discreción del médico o veterinario a cargo. El sujeto o paciente a tratar, tal como el sujeto que necesita tratamiento o prevención, puede ser un animal (por ejemplo, un animal no humano), un animal vertebrado, un mamífero, un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murino (por ejemplo, un ratón), un canino (por ejemplo, un perro), un felino (por ejemplo, un gato), un porcino (por ejemplo, un cerdo), un equino (por ejemplo, un caballo), un primate, un simio (por ejemplo, un mono o un homínido), un mono (por ejemplo, un tití, un babuino), un homínido (por ejemplo, un gorila, chimpancé, orangután, gibón) o un ser humano. En el contexto de la presente invención, también está previsto que se traten animales importantes desde el punto de vista económico o agronómico. Los ejemplos no limitantes de animales agronómicamente importantes son ovejas, bovinos y porcinos, mientras que, por ejemplo, los gatos y los perros pueden considerarse animales económicamente importantes. Preferentemente, el sujeto/paciente es un mamífero; más preferentemente, el sujeto/paciente es un ser humano o un mamífero no humano (tal como, por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón, un conejo, un perro, un gato, un caballo, un mono, un homínido, un tití, un babuino, un gorila, un chimpancé, un orangután, un gibón, una oveja, ganado bovino o un cerdo); mucho más preferentemente, el sujeto/paciente es un ser humano.
- En una realización, al menos un péptido, al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo, al menos un agente reductor y el potenciador de la absorción opcional se pueden administrar de manera simultánea/concomitante o secuencial. En una realización, en la administración secuencial, el al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo, al menos un agente reductor se pueden administrar en primer lugar, seguido de la administración del péptido y el potenciador de la absorción opcional (por ejemplo, al menos aproximadamente 5 min después de la primera administración, preferentemente de aproximadamente 5 min a aproximadamente 3 horas después de la primera administración, más preferentemente de aproximadamente 10 min a aproximadamente 1 hora después de la primera administración), lo que es particularmente ventajoso, si el péptido es insulina (insulina humana). En una realización, al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo, al menos un agente reductor y el potenciador de absorción opcional se pueden administrar en primer lugar, seguido de la administración del péptido (por ejemplo, en menos aproximadamente 5 min después de la primera administración, preferentemente de

aproximadamente 5 min a aproximadamente 3 horas después de la primera administración, más preferentemente de aproximadamente 10 min a aproximadamente 1 hora después de la primera administración), lo que también es ventajoso, si el péptido es insulina (insulina humana). En una realización, el al menos un metal se selecciona de cualquiera o una combinación de: vanadio, cromo y manganeso.

En una realización, en la administración simultánea, el al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo, al menos un agente reductor se pueden administrar en primer lugar, seguido de la administración del péptido, y el potenciador de la absorción opcional se administra en la misma composición farmacéutica, o en dos o más composiciones farmacéuticas diferentes/separadas, o en dos o más compartimentos diferentes/separados de la misma forma farmacéutica.

En una realización, el al menos un péptido y el al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo están presentes en una forma físicamente separada en la composición farmacéutica.

En una realización, una forma farmacéutica incluye al menos dos compartimentos separados que están separados físicamente entre sí (por ejemplo, a través de una capa de separación física). En una realización, la forma farmacéutica incluye una capa de separación física entre el al menos un péptido, el al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo. En una realización, el al menos un péptido está presente solo en un primer compartimento, y el al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo está/están presentes solo en un segundo compartimento de la forma farmacéutica. En una realización, el agente reductor está presente en el primer compartimento, o en el segundo compartimento, o tanto en el primero como en el segundo compartimento, o en un tercer compartimento de la forma farmacéutica. En una realización, el menos un metal se selecciona de cualquiera o una combinación de: vanadio, cromo y manganeso.

En una realización, la composición farmacéutica está presente en forma de cualquier forma farmacéutica de cápsula en cápsula y de comprimido en cápsula, incluyendo la composición farmacéutica: al menos un péptido que tiene un peso molecular igual o inferior a aproximadamente 50 kDa, que está presente en un primer compartimento de la forma farmacéutica; el al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo que está/están presentes en un segundo compartimento de la forma farmacéutica; y un agente reductor, que está presente en el primer compartimento y/o en el segundo compartimento de la forma farmacéutica.

En una realización, la invención proporciona una forma farmacéutica (por ejemplo, una forma farmacéutica multiparticulada) que comprende: al menos un péptido que tiene un peso molecular igual o inferior a aproximadamente 60 kDa, que está presente en un primer compartimento de la forma farmacéutica; un agente reductor, que está presente en un segundo compartimento de la forma farmacéutica; y el al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo, que está/están presentes en un tercer compartimento de la forma farmacéutica. En una realización, la forma farmacéutica es una forma farmacéutica de cápsula en cápsula o multiparticulada. En una realización, en una forma farmacéutica de cápsula en cápsula, la cápsula exterior más grande (cuyo contenido se liberará primero) contiene el al menos un metal en forma de cualquiera o una combinación de una sal del mismo y un complejo del mismo y el agente reductor, y la cápsula interna más pequeña (cuyo contenido se liberará más adelante) contiene el péptido. En una realización, la forma farmacéutica se selecciona de cualquiera o una combinación de formas farmacéuticas de liberación modificada (tal como una forma farmacéutica (una cápsula, multiparticulada o comprimido) que tiene un recubrimiento entérico), una forma farmacéutica (una cápsula, multiparticulada o comprimido) recubierta con Eudragit L30D55 o Eudragit FS30D, una cápsula resistente a los ácidos tal como las cápsulas HPMCP (comercialmente conocidas como AR Caps®) y similares. Sin embargo, cualquier otra forma farmacéutica, como se conoce o se aprecia por un experto en la técnica, puede utilizarse para cumplir el fin previsto, como se establece en la presente divulgación, sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención.

### Ejemplo

Las serina proteasas, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa B y aminopeptidasa M, que son responsables de la degradación proteolítica de los enlaces peptídicos y los aminoácidos, se ensayaron específicamente para determinar su inactivación oxidativa mediante la combinación de uno o más iones metálicos y uno o más agentes reductores.

**Ensayo de la actividad enzimática:** El ensayo de la actividad enzimática de cada enzima en presencia de su sustrato específico se realizó a una longitud de onda particular usando un espectrofotómetro UV y sirvió como control negativo. La actividad enzimática se calculó como:

$$\text{Unidades/mg de sólido} = \frac{\text{Unidades/ml enzima}}{\text{mg sólido/mg enzima}}$$

**Ensayo de la inhibición enzimática:** La incubación se realizó con un inhibidor de cada enzima, que sirvió como control positivo.

**Incubación con uno o más iones metálicos y uno o más agentes reductores:** La incubación de enzimas con una combinación de una o más sales metálicas y uno o más agentes reductores en una placa de microvaloración de 96 pocillos se realizó durante un período de tiempo específico en presencia de sustratos para examinar su inactivación oxidativa. La inactivación de la enzima en presencia de uno o más iones metálicos y uno o más agentes reductores se comparó con la actividad enzimática original en presencia de sustrato como control negativo y en presencia de inhibidor como control positivo.

**Medición del pH:** El cambio en el pH de las enzimas después de la incubación con una o más sales metálicas y un uno o más agentes reductores se controló mediante un electrodo combinado de pH de Hanna.

**Zimograma:** Las enzimas tratadas se sometieron a zimografía, que es una técnica electroforética para la detección de enzimas hidrolíticas basada en el repertorio de sustrato de la enzima, es decir, el sustrato para la enzima se incrustó en el gel de resolución durante la preparación del gel de acrilamida, después de lo cual se controló la digestión del sustrato por la enzima.

**Ensayo por kits:** Se realizaron ensayos mediante un kit de detección de fluorescencia de proteasa y un kit de ensayo de actividad de tripsina para autenticar la inactivación.

#### **Materiales**

La Tabla 1A a continuación proporciona materiales utilizados para evaluar la eficacia de diversas sales metálicas y complejos metálicos, opcionalmente, en combinación con uno o más agentes reductores para efectuar la inhibición de una o más enzimas serina proteasa.

Tabla 1A: Materiales usados

| N.º de serie | Enzimas                          | Sustratos                                                                                                                                                            | Inhibidores                                                                                                                                                                                         | Salas metálicas (ensayadas)                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Agentes reductores (ensayados)                                                                                     | Kits de ensayo                                                                       | Actividad del pH                   |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| 1            | <b>Tripsina humana</b>           | Éster etílico de N $\alpha$ -benzoyl-L-arginina (BAEE)<br>Clorhidrato de N $\alpha$ -benzoyl-L-arginina-7-amido-4-metilumarina<br>Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilumarina | Fluoruro clorhidrato de 4-amidinofenilmetanosulfonilo (Serina proteasa (inhibidor para tripsina/quimotripsina)<br>3,4-dicloroisocumarina (inhibidor de serina proteasa para tripsina/quimotripsina) | Cloruro de cobre<br>Carbonato de cobre<br>Sulfato de cobre<br>Sulfato de cinc<br>Cloruro de cinc<br>Acetato de cinc<br>Sulfato de vanadio (IV)<br>Óxido de vanadio (V)<br>Vanadato de sodio<br>Permanganato de potasio<br>Glicerofosfato de manganeso<br>Gluconato de manganeso<br>Cloruro de cromo<br>Picolinato de cromo | Ascorbato de sodio<br>Glutión reducido<br>Ácido úrico<br>Manitol<br>Ácido benzohidroxámico<br>Cisteína<br>Piperina | Kit de ensayo de fluorescencia de proteasa<br>Kit de ensayo de actividad de tripsina | Electrodo de pH combinado de Hanna |
| 2.           | <b>Quimotripsina humana</b>      | Sal de sodio del ácido N-benzoyl-L-tirosina<br>amidobenzoico<br>Hipurilo-Lys                                                                                         | Fluoruro clorhidrato de 4-amidinofenilmetanosulfonilo (Serina proteasa (inhibidor para tripsina/quimotripsina)<br>3,4-dicloroisocumarina (inhibidor de serina proteasa para tripsina/quimotripsina) |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                    | Kit de ensayo de fluorescencia de proteasa                                           |                                    |
| 3.           | <b>Carboxipeptidasa B humana</b> | Ácido N-benzoyl-L-tirosina<br>amidobenzoico<br>L-leucina-p-nitroanilida                                                                                              | Sal de disodio del ácido etilendiaminotetraacético dihidrato<br>4.1 L-leucinetiol, diclorhidrato oxidado                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                    |                                                                                      |                                    |
| 4.           | <b>Aminopeptidasa M porcina</b>  | N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amido-4-metilumarina                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                    |                                                                                      |                                    |

La Tabla 1B a continuación proporciona combinaciones de sales metálicas/complejos metálicos con uno o más agentes reductores evaluados para realizar la inhibición de una o más enzimas serina proteasa.

**Tabla 1B: Combinación de sales y complejos metálicos con agentes reductores evaluados para la inactivación de enzimas**

| N.º de serie | Agente reductor (5 µM) | Sal metálica (1 mM/l)                              |
|--------------|------------------------|----------------------------------------------------|
| 1            | Ascorbato de sodio     | Cloruro de cobre/ascorbato de sodio                |
|              |                        | Sulfato de cobre/ascorbato de sodio                |
|              |                        | Sulfato de cinc/ascorbato de sodio                 |
|              |                        | Sulfato de vanadio (IV)/ascorbato de sodio         |
|              |                        | Óxido de vanadio (V)                               |
|              |                        | Vanadato de sodio                                  |
|              |                        | Permanganato de potasio/ascorbato de sodio         |
|              |                        | Gluconato de manganeso/ascorbato de sodio          |
|              |                        | Picolinato de cromo/ascorbato de sodio             |
| 2            | Glutación reducido     | Cloruro de cobre/glutación reducido                |
|              |                        | Sulfato de vanadio (IV)/glutación reducido         |
|              |                        | Óxido de vanadio (V)/glutación reducido            |
|              |                        | Vanadato de sodio/glutación reducido               |
|              |                        | Glicerofosfato de manganeso/glutación reducido     |
|              |                        | Cloruro de cromo/glutación reducido                |
| 3.           | Ácido úrico            | Sulfato de cobre/ácido úrico                       |
|              |                        | Vanadato de sodio/ácido úrico                      |
|              |                        | Gluconato de manganeso/ácido úrico                 |
|              |                        | Picolinato de cromo/ácido úrico                    |
|              |                        | Piperina/ninguno                                   |
| 4.           | Manitol                | Sulfato de vanadio (IV)/manitol                    |
|              |                        | Sulfato de cinc/manitol                            |
|              |                        | Sulfato de vanadio (IV)/manitol                    |
|              |                        | Glicerofosfato de manganeso/manitol                |
|              |                        | Picolinato de cromo/manitol                        |
| 5.           | Ácido benzohidroxámico | Sulfato de cobre/ácido benzohidroxámico            |
|              |                        | Sulfato de vanadio (IV)/ácido benzohidroxámico     |
|              |                        | Óxido de vanadio (V)/ácido benzohidroxámico        |
|              |                        | Vanadato de sodio/ácido benzohidroxámico           |
|              |                        | Glicerofosfato de manganeso/ácido benzohidroxámico |

#### Ensayo de la actividad enzimática de tripsina usando éster etílico de N $\alpha$ -benzoil-L-arginina (BAEE)

Se prepararon por separado 200 unidades/ml de una solución de tripsina en una solución fría de HCl y una solución de sustrato BAEE 0,25 mM y se incubaron. Las soluciones preparadas anteriormente se mezclaron por inversión para formar una mezcla de reacción y se registró el aumento de la absorbancia a A<sub>253</sub> (se dará el uso de un mínimo de 4 puntos de datos en un período de tiempo de 1 minuto) para la solución en blanco (sin enzima) y la solución de prueba (mezcla de reacción). La A<sub>253</sub>/minuto se obtendrá usando la tasa lineal máxima tanto para la solución en blanco como para la de prueba.

Cálculo de tripsina en el ensayo de 3 ml:

$$\text{BAEE unidades/ml de enzima} = \frac{(\Delta A_{253}/\text{minuto Prueba} - \Delta A_{253}/\text{minuto Blanco}) \times (df) \times (3)}{0,1 \times 0,808}$$

Donde df = factor de dilución, 3 = volumen total de ensayo para tripsina (en ml), 0,1 = volumen total de enzima (en ml),

0,808 = coeficiente de extinción de Na Benzoil L Arginina a 253 nm.

**Determinación de la inactivación de la tripsina en presencia de inhibidores:** Se incubó tripsina (1 mM/l) con inhibidores específicos (conocidos) (proporcionados en la Tabla 1A) y una combinación de sales metálicas/agentes reductores (proporcionados en la Tabla 2 a continuación) por separado. La inactivación por inhibidores sirvió como control positivo.

**Tabla 2: Combinaciones de sales/complejos metálicos con agentes reductores para la inactivación de enzimas proteolíticas**

| N.º de serie | Agentes reductores     |       | Sales metálicas         |       |
|--------------|------------------------|-------|-------------------------|-------|
|              | Nombre                 | Conc. | Nombre                  | Conc. |
| 1            | Ascorbato de sodio     | 1 mM  | Cloruro de cobre        | 5 µM  |
| 2            | Ascorbato de sodio     | 1 mM  | Sulfato de cobre        | 5 µM  |
| 3            | Ascorbato de sodio     | 1 mM  | Sulfato de cinc         | 5 µM  |
| 4            | Ascorbato de sodio     | 1 mM  | Sulfato de vanadio      | 5 µM  |
| 5            | Ascorbato de sodio     | 1 mM  | Óxido de vanadio        | 5 µM  |
| 6            | Ascorbato de sodio     | 1 mM  | Vanadato de sodio       | 5 µM  |
| 7            | Ascorbato de sodio     | 1 mM  | Permanganato de potasio | 5 µM  |
| 8            | Ascorbato de sodio     | 1 mM  | Gluconato de manganeso  | 5 µM  |
| 9            | Glutación reducido     | 1 mM  | Picolinato de cromo     | 5 µM  |
| 10           | Glutación reducido     | 1 mM  | Cloruro de cobre        | 5 µM  |
| 11           | Glutación reducido     | 1 mM  | Sulfato de vanadio      | 5 µM  |
| 12           | Glutación reducido     | 1 mM  | Óxido de vanadio        | 5 µM  |
| 13           | Glutación reducido     | 1 mM  | Vanadato de sodio       | 5 µM  |
| 14           | Glutación reducido     | 1 mM  | Cloruro de cromo        | 5 µM  |
| 15           | Ácido úrico            | 1 mM  | Sulfato de cobre        | 5 µM  |
| 16           | Ácido úrico            | 1 mM  | Vanadato de sodio       | 5 µM  |
| 17           | Ácido úrico            | 1 mM  | Gluconato de manganeso  | 5 µM  |
| 18           | Ácido úrico            | 1 mM  | Picolinato de cromo     | 5 µM  |
| 19           | Manitol                | 1 mM  | Sulfato de cinc         | 5 µM  |
| 20           | Manitol                | 1 mM  | Sulfato de vanadio      | 5 µM  |
| 21           | Manitol                | 1 mM  | Picolinato de cromo     | 5 µM  |
| 22           | Ácido benzohidroxámico | 1 mM  | Sulfato de cobre        | 5 µM  |
| 23           | Ácido benzohidroxámico | 1 mM  | Sulfato de vanadio      | 5 µM  |
| 24           | Ácido benzohidroxámico | 1 mM  | Óxido de vanadio        | 5 µM  |
| 25           | Ácido benzohidroxámico | 1 mM  | Vanadato de sodio       | 5 µM  |
| 26           | Ácido benzohidroxámico | 1 mM  | Cloruro de cromo        | 5 µM  |
| 27           | Cisteína               | 1 mM  | Cloruro de cobre        | 5 µM  |
| 28           | Cisteína               | 1 mM  | Óxido de vanadio        | 5 µM  |
| 29           | Cisteína               | 1 mM  | Gluconato de manganeso  | 5 µM  |
| 30           | Cisteína               | 1 mM  | Picolinato de cromo     | 5 µM  |
| 31           | Piperina               | 1 mM  | Piperina/Ninguno        | 5 µM  |
| 32           | Inhibidores (control)  | 1 mM  |                         |       |

**Determinación de la inactivación oxidativa (actividad y pH) de la tripsina en presencia de una combinación de iones metálicos y agentes reductores.**

Para una mezcla de reacción de 200 µl, se incubaron aproximadamente 10 µl de tripsina en tampón con la combinación de sales metálicas y agentes reductores (proporcionados en la Tabla 2 con el número de serie 1 a 31) a la concentración respectiva a 37 °C en placas de microvaloración de 96 pocillos (la Tabla 3 a continuación proporciona detalles sobre la utilización de una combinación particular de las proporcionadas con el número de serie 1 a 31 en la Tabla 2) durante 5 min, 15 min y 30 min seguido de la adición de 90 µl de sustrato respectivo (proporcionado en la

Tabla 1A). La actividad enzimática se midió por espectrofotometría en un lector de microplacas y se comparó con el ensayo de actividad original. El pH se midió con un electrodo de pH combinado de Hanna (la reacción con la enzima se realizó por triplicado). La Tabla 4 a continuación proporciona la actividad enzimática de la tripsina después del transcurso de períodos de tiempo específicos después del tratamiento con la combinación de sal/complejo metálico y agente reductor en evaluación.

5

**Tabla 3: Distribución de la combinación de sal/complejo metálico y agente reductor que se está evaluando en placas de microvaloración de 96 pocillos**

|          |         |         |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----------|---------|---------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| <b>A</b> | Control | Control | Control | 1  |    | 1  | 2  | 2  | 2  | 3  | 3  | 3  |
| <b>B</b> | 4       | 4       | 4       | 5  | 5  | 5  | 6  | 6  | 6  | 7  | 7  | 7  |
| <b>C</b> | 8       | 8       | 8       | 9  | 9  | 9  | 10 | 10 | 10 | 11 | 11 | 11 |
| <b>D</b> | 12      | 12      | 12      | 13 | 13 | 13 | 14 | 14 | 14 | 15 | 15 | 15 |
| <b>E</b> | 16      | 16      | 16      | 17 | 17 | 17 | 18 | 18 | 18 | 19 | 19 | 19 |
| <b>F</b> | 20      | 20      | 20      | 21 | 21 | 21 | 22 | 22 | 22 | 23 | 23 | 23 |
| <b>G</b> | 24      | 24      | 24      | 25 | 25 | 25 | 26 | 26 | 26 | 27 | 27 | 27 |
| <b>H</b> | 28      | 28      | 28      | 29 | 29 | 29 | 30 | 30 | 30 | 31 | 31 | 31 |

10

**Tabla 4: Actividad enzimática de la tripsina**

| Agentes reductores y sales metálicas       | Tiempo      |             |             |
|--------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                                            | 5 min       | 15 min      | 30 min      |
| Ascorbato de sodio:Cloruro de cobre        | 89,65517241 | 66,66666667 | 45,71428571 |
| Ascorbato de sodio:Sulfato de cobre        | 89,65517241 | 40,25       | 40          |
| Ascorbato de sodio:Sulfato de cinc         | 55,17241379 | 54,16666667 | 57,14285714 |
| Ascorbato de sodio:Óxido de vanadio        | 41,37931034 | 31,25       | 17,14285714 |
| Ascorbato de sodio:Sulfato de vanadio      | 82,75862069 | 20,83333333 | 14,28571429 |
| Ascorbato de sodio:Vanadato de sodio       | 27,5862069  | 54,16666667 | 31,42857143 |
| Ascorbato de sodio:Permanganato de potasio | 165,5172414 | 20,83333333 | 76          |
| Ascorbato de sodio:Gluconato de manganeso  | 27,5862069  | 29,16666667 | 17,14285714 |
| Glutación reducido:Picolinato de cromo     | 55,17241379 | 45,83333333 | 71,42857143 |
| Glutación reducido:Cobre                   | 158,6206897 | 83,33333333 | 80,57142857 |
| Glutación reducido:Sulfato de vanadio      | 188,2758621 | 41,66666667 | 37,14285714 |
| Glutación reducido:Óxido de vanadio        | 20,68965517 | 95,83333333 | 48,57142857 |
| Glutación reducido:Vanadato de sodio       | 108,0482759 | 58,33333333 | 20          |
| Glutación reducido:Cromo                   | 48,27586207 | 16,91666667 | 5,714285714 |
| Ácido úrico:Sulfato de cobre               | 179,3103448 | 12,5        | 5,714285714 |
| Ácido úrico: Vanadato de sodio             | 68,96551724 | 29,16666667 | 26,74285714 |
| Ácido úrico:Gluconato de manganeso         | 55,17241379 | 37,5        | 37,14285714 |
| Ácido úrico:Picolinato de cromo            | 103,4482759 | 33,33333333 | 22,85714286 |
| Manitol:Sulfato de cinc                    | 158,6206897 | 70,83333333 | 62,85714286 |
| Manitol:Sulfato de vanadio                 | 103,4482759 | 95,83333333 | 80          |
| Manitol:Picolinato de cromo                | 89,65517241 | 83,33333333 | 37,14285714 |
| Ácido benzohidroxámico:Sulfato de cobre    | 110,3448276 | 4,166666667 | 57,14285714 |
| Ácido benzohidroxámico:Sulfato de vanadio  | 43,2137931  | 29,16666667 | 28,57142857 |
| Ácido benzohidroxámico:Óxido de vanadio    | 158,6206897 | 87,5        | 45,71428571 |
| Ácido benzohidroxámico:Vanadato de sodio   | 131,0344828 | 66,66666667 | 2,857142857 |
| Ácido benzohidroxámico:Cloruro de cromo    | 68,96551724 | 66,66666667 | 20          |
| Cisteína:Cloruro de cobre                  | 117,2413793 | 50          | 40          |
| Cisteína:Óxido de vanadio                  | 186,2068966 | 16,66666667 | 14,28571429 |

(continuación)

| Agentes reductores y sales metálicas | Tiempo      |             |             |
|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                                      | 5 min       | 15 min      | 30 min      |
| Cisteína:Gluconato de manganeso      | 55,17241379 | 58,33333333 | 11,42857143 |
| Cisteína:Picolinato de cromo         | 186,2068966 | 25          | 20          |
| Piperina                             | 172,4137931 | 66,66666667 | 45,71428571 |

Las Tablas 5A a 5C proporcionadas a continuación en el presente documento representan la medición del pH para la tripsina en diversos intervalos de tiempo, es decir, 5 minutos, 15 minutos y 30 minutos.

5

**Tabla 5A: Medición del pH para tripsina a un intervalo de 5 min**

|          | 1   | 2   | 3   | 4   | 5    | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|----------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>A</b> | 3,5 | 3,4 | 3,5 | 2,5 | 2,45 | 1,7 | 2,5 | 2,4 | 2,5 | 2,6 | 2,5 | 2,7 |
| <b>B</b> | 2,5 | 2,6 | 2,3 | 2,2 | 2,5  | 2,8 | 2,2 | 2,3 | 2,6 | 2,4 | 2,2 | 2,2 |
| <b>C</b> | 2,5 | 2,2 | 2,5 | 2,5 | 2,5  | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,8 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| <b>D</b> | 2,6 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5  | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,8 | 2,4 | 2,5 | 2,5 |
| <b>E</b> | 2,5 | 2,5 | 2,6 | 2,5 | 2,6  | 2,5 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 |
| <b>F</b> | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6  | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 |
| <b>G</b> | 2,4 | 2,4 | 2,5 | 2,2 | 2,2  | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2   | 2   | 2,8 |
| <b>H</b> | 2,5 | 2,2 | 2,2 | 2   | 2    | 2   | 2   | 2   | 2   | 2,2 | 2,2 | 2,2 |

**Tabla 5B: Medición del pH para tripsina a un intervalo de 15 min**

|          | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>A</b> | 3,5 | 3,4 | 3,5 | 2,8 | 1,6 | 2,3 | 2,4 | 2,4 | 2,5 | 2,6 | 2,5 | 2,7 |
| <b>B</b> | 2,5 | 2,6 | 2,3 | 2,2 | 2,5 | 2,8 | 2,2 | 2,3 | 2,6 | 2,4 | 2,2 | 2,2 |
| <b>C</b> | 2,5 | 2,2 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,8 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| <b>D</b> | 2,6 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,8 | 2,4 | 2,5 | 2,5 |
| <b>E</b> | 2,5 | 2,5 | 2,6 | 2,5 | 2,6 | 2,5 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 |
| <b>F</b> | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 |
| <b>G</b> | 2,4 | 2,4 | 2,5 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2   | 2   | 2,8 |
| <b>H</b> | 2,5 | 2,2 | 2,2 | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2,2 | 2,2 | 2,2 |

10

**Tabla 5C: Medición del pH para tripsina a un intervalo de 30 min**

|          | 1   | 2    | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|----------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>A</b> | 3,5 | 3,45 | 3,5 | 2,5 | 1,6 | 2,3 | 2,4 | 2,4 | 2,5 | 2,6 | 2,9 | 2,7 |
| <b>B</b> | 2,6 | 2,6  | 2,3 | 2,2 | 2,5 | 2,8 | 2,2 | 2,3 | 2,6 | 2,4 | 2,2 | 2,7 |
| <b>C</b> | 2,7 | 2,2  | 2,5 | 2,1 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,8 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| <b>D</b> | 2,1 | 2,4  | 2,6 | 2,1 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,8 | 2,4 | 2,5 | 2,5 |
| <b>E</b> | 2,5 | 2,52 | 2,6 | 2,5 | 2,6 | 2,5 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 |
| <b>F</b> | 2,6 | 2,6  | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,6 |
| <b>G</b> | 2,4 | 2,4  | 2,5 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2   | 2   | 2,8 |
| <b>H</b> | 2,5 | 2,2  | 2,2 | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2,2 | 2,2 | 2,2 |

**Ensayo de la actividad enzimática de quimotripsina usando Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilcumarina**

Se prepararon por separado aproximadamente 2 unidades de una solución en HCl frío de quimotripsina, una solución de sustrato 1,18 mM, una solución de cloruro de calcio 2 M, una solución tampón Tris HCl 80 mM. En una solución tampón de 3 ml, se añadieron una solución de sustrato y una solución de cloruro de calcio y se mezclaron por inversión a aproximadamente 25 grados Celsius para formar una mezcla de reacción en blanco y una mezcla de reacción de prueba (**Tabla 6**). Además, se añadió solución de HCl en la mezcla de reacción en blanco y la solución enzimática en la mezcla de reacción de prueba, se mezcló inmediatamente por inversión y se registró el aumento de absorbancia a  $A_{256}$  durante 3 a 5 min. La  $A_{256}/\text{min}$  se obtendrá tanto para la reacción en blanco como para las reacciones de prueba

usando la tasa lineal máxima durante un intervalo de un minuto usando al menos 4 valores de datos.

**Tabla 6: Esquema para la preparación de la solución en blanco y de prueba**

| Reactivos                                                   | Blanco (ml) | Prueba (ml) |
|-------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| Tampón                                                      | 1,42        | 1,42        |
| Solución del sustrato                                       | 1,40        | 1,40        |
| Solución de CaCl <sub>2</sub>                               | 0,08        | 0,08        |
| Mezclada por inversión y la temperatura se ajustará a 25 °C |             |             |
| Solución de HCl                                             | 0,10        | --          |
| Solución enzimática                                         | --          | 0,10        |

5 Cálculo (para el sustrato Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilcumarina):

$$\text{Unidades/ml de enzima} = \frac{(\Delta\Delta_{256}/\text{minuto Prueba} - \Delta\Delta_{256}/\text{minuto Blanco}) \times (3) \times (\text{df})}{(83,4) \times (0,10)}$$

10 en donde, 3 = volumen (ml) de mezcla de reacción; df = factor de dilución; 83,4 = coeficiente de extinción milimolar del sustrato a 256 nm; 0,10 = volumen (ml) de la muestra de prueba usada en el ensayo.

15 **Determinación de la inactivación de la quimiotripsina en presencia de inhibidores:** Se incubó quimiotripsina (1 mM/l) con inhibidores específicos conocidos (proporcionados en la Tabla 1A anteriormente en el presente documento) y una combinación de sales metálicas/agentes reductores (proporcionados en la Tabla 2 anteriormente en el presente documento) por separado. La inactivación por inhibidores sirvió como control positivo.

**Determinación de la inactivación oxidativa (actividad y pH) de la quimiotripsina en presencia de una combinación de iones metálicos y agentes reductores.**

20 Para una mezcla de reacción de 200 µl, se incubaron aproximadamente 10 µl de quimiotripsina en tampón con la combinación de sales metálicas y agentes reductores (proporcionados en la Tabla 2 con el número de serie 1 a 31) a la concentración respectiva a 37 °C en placas de microvaloración de 96 pocillos (la Tabla 3 anteriormente en el presente documento proporciona detalles sobre la utilización de una combinación particular de las proporcionadas con el número de serie 1 a 31 en la Tabla 2) durante 5 min, 15 min y 30 min seguido de la adición de 90 µl de sustrato  
25 respectivo (proporcionado en la Tabla 1A). La actividad se midió por espectrofotometría en un lector de microplacas y se comparó con el ensayo de actividad original. El pH se midió con un electrodo de pH combinado de Hanna (la reacción con la enzima se realizó por triplicado). La Tabla 7 a continuación proporciona la actividad enzimática de la quimiotripsina después del transcurso de períodos de tiempo específicos después del tratamiento con la combinación de sal/complejo metálico y agente reductor en evaluación.

30

**Tabla 7: Actividad enzimática de la quimiotripsina**

| Agente reductor y sales metálicas          | Tiempo      |        |             |
|--------------------------------------------|-------------|--------|-------------|
|                                            | 5 min       | 15 min | 30 min      |
| Ascorbato de sodio:Cloruro de cobre        | 36,84210526 | 30     | 25,80645161 |
| Ascorbato de sodio:Sulfato de cobre        | 168,4210526 | 85     | 106,4516129 |
| Ascorbato de sodio:Sulfato de cinc         | 47,36842105 | 55     | 25,80645161 |
| Ascorbato de sodio:Óxido de vanadio        | 78,94736842 | 70     | 38,70967742 |
| Ascorbato de sodio:Sulfato de vanadio      | 89,47368421 | 65     | 51,61290323 |
| Ascorbato de sodio: Vanadato de sodio      | 100         | 95     | 16,12903226 |
| Ascorbato de sodio:Permanganato de potasio | 163,1578947 | 130    | 9,677419355 |
| Ascorbato de sodio:Gluconato de manganeso  | 78,94736842 | 70     | 9,677419355 |
| Glutatión reducido: Picolinato de cromo    | 21,05263158 | 30     | 25,80645161 |
| Glutatión reducido:Cloruro de cobre        | 47,36842105 | 45     | 45,16129032 |
| Glutatión reducido: Sulfato de vanadio     | 115,7894737 | 85     | 25,80645161 |
| Glutatión reducido: Óxido de vanadio       | 105,2631579 | 65     | 45,16129032 |
| Glutatión reducido: Vanadato de sodio      | 105,2631579 | 55     | 16,12903226 |
| Glutatión reducido: Cloruro de cromo       | 105,2631579 | 40     | 41,93548387 |

(continuación)

| Agente reductor y sales metálicas          | Tiempo      |        |             |
|--------------------------------------------|-------------|--------|-------------|
|                                            | 5 min       | 15 min | 30 min      |
| Ácido úrico:Sulfato de cobre               | 68,42105263 | 20     | 25,80645161 |
| Ácido úrico: Vanadato de sodio             | 63,15789474 | 20     | 9,677419355 |
| Ácido úrico:Gluconato de manganeso         | 89,47368421 | 85     | 67,74193548 |
| Ácido úrico:Picolinato de cromo            | 68,42105263 | 65     | 9,677419355 |
| Manitol:Sulfato de cinc                    | 100         | 80     | 51,61290323 |
| Manitol: Sulfato de vanadio                | 68,42105263 | 35     | 54,83870968 |
| Manitol: Picolinato de cromo               | 115,7894737 | 40     | 19,35483871 |
| Ácido benzohidroxámico:Sulfato de cobre    | 152,6315789 | 80     | 35,48387097 |
| Ácido benzohidroxámico: Sulfato de vanadio | 142,1052632 | 110    | 32,25806452 |
| Ácido benzohidroxámico:Óxido de vanadio    | 100         | 80     | 56,77419355 |
| Ácido benzohidroxámico: Vanadato de sodio  | 115,7894737 | 45     | 12,90322581 |
| Ácido benzohidroxámico:Cloruro de cromo    | 89,47368421 | 55     | 58,06451613 |
| Cisteína:Cloruro de cobre                  | 89,47368421 | 85     | 70,96774194 |
| Cisteína:Óxido de vanadio                  | 115,7894737 | 140    | 32,25806452 |
| Cisteína:Gluconato de manganeso            | 63,15789474 | 65     | 29,03225806 |
| Cisteína:Picolinato de cromo               | 84,21052632 | 70     | 22,58064516 |
| Piperina                                   | 84,21052632 | 80     | 35,48387097 |

Las Tablas 8A a 8C proporcionadas a continuación representan la medición del pH para la quimiotripsina en diversos intervalos de tiempo, concretamente, en 5 minutos, 15 minutos y 30 minutos.

5

**Tabla 8A: Medición del pH para quimotripsina a un intervalo de 5 min**

|          | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 1    | 11   | 12   |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>A</b> | 1,68 | 1,66 | 1,65 | 1,7  | 1,75 | 1,76 | 1,7  | 1,72 | 1,69 | 1,78 | 1,77 | 1,65 |
| <b>B</b> | 1,65 | 1,77 | 1,7  | 1,76 | 1,75 | 1,78 | 1,75 | 1,7  | 1,67 | 1,7  | 1,69 | 1,7  |
| <b>C</b> | 1,7  | 1,7  | 1,68 | 1,7  | 1,69 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,78 | 1,7  | 1,68 | 1,67 |
| <b>D</b> | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,78 | 1,7  | 1,7  | 1,7  |
| <b>E</b> | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  |
| <b>F</b> | 1,67 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,7  |
| <b>G</b> | 1,66 | 1,66 | 1,66 | 1,66 | 1,6  | 1,67 | 1,65 | 1,68 | 1,65 | 1,67 | 1,65 | 1,68 |
| <b>H</b> | 1,65 | 1,67 | 1,67 | 1,65 | 1,67 | 1,68 | 1,68 | 1,69 | 1,69 | 1,67 | 1,65 | 1,63 |

**Tabla 8B: Medición del pH para quimotripsina a un intervalo de 15 min**

|          | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>A</b> | 1,68 | 1,66 | 1,65 | 1,68 | 1,65 | 1,68 | 1,7  | 1,77 | 1,65 | 1,75 | 1,65 | 1,65 |
| <b>B</b> | 1,65 | 1,69 | 1,7  | 1,7  | 1,68 | 1,78 | 1,75 | 1,7  | 1,67 | 1,7  | 1,69 | 1,7  |
| <b>C</b> | 1,7  | 1,7  | 1,68 | 1,7  | 1,69 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,78 | 1,7  | 1,68 | 1,67 |
| <b>D</b> | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,68 | 1,69 | 1,7  | 1,7  | 1,7  |
| <b>E</b> | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  |
| <b>F</b> | 1,67 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,7  |
| <b>G</b> | 1,66 | 1,66 | 1,66 | 1,66 | 1,6  | 1,67 | 1,65 | 1,68 | 1,69 | 1,67 | 1,65 | 1,68 |
| <b>H</b> | 1,65 | 1,67 | 1,67 | 1,65 | 1,67 | 1,68 | 1,68 | 1,69 | 1,69 | 1,67 | 1,65 | 1,63 |

**Tabla 8C: Medición del pH para quimotripsina a un intervalo de 30 min**

|          | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>A</b> | 1,68 | 1,66 | 1,65 | 1,69 | 1,65 | 1,7  | 1,77 | 1,77 | 1,69 | 1,68 | 1,68 | 1,66 |
| <b>B</b> | 1,65 | 1,69 | 1,7  | 1,7  | 1,68 | 1,78 | 1,75 | 1,7  | 1,67 | 1,7  | 1,69 | 1,7  |
| <b>C</b> | 1,7  | 1,7  | 1,68 | 1,7  | 1,69 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,78 | 1,7  | 1,68 | 1,67 |
| <b>D</b> | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,68 | 1,69 | 1,7  | 1,7  | 1,7  |
| <b>E</b> | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  |
| <b>F</b> | 1,67 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,67 | 1,67 | 1,67 | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,7  |
| <b>G</b> | 1,66 | 1,66 | 1,66 | 1,66 | 1,6  | 1,67 | 1,65 | 1,68 | 1,69 | 1,67 | 1,65 | 1,68 |
| <b>H</b> | 1,65 | 1,67 | 1,67 | 1,65 | 1,67 | 1,68 | 1,68 | 1,69 | 1,69 | 1,67 | 1,65 | 1,63 |

**Ensayo de la actividad enzimática de la carboxipeptidasa B utilizando hipuril-arginina**

- 5 Se prepararon 4 unidades de carboxipeptidasa B en agua desionizada fría, una solución de hipuril-**arginina** 1 mm en solución tampón Tris 25 mM que contenía cloruro de sodio 100 mM (pH 7,65), por separado a aproximadamente 25 °C. Se prepararon mezclas de reacción de 3 ml (ensayo y blanco) usando las soluciones preparadas anteriormente de acuerdo con la **Tabla 9** a 25 °C.

Cálculos:

10

$$\text{Unidades/ml de enzima} = \frac{(\Delta\Delta_{254}/\text{min Prueba} - \Delta\Delta_{254}/\text{min Blanco})(3)(df)}{(0,36)(0,1)}$$

donde, 3 = volumen (ml) de mezcla de reacción; df = factor de dilución; 0,36 = coeficiente de extinción milimolar del sustrato a 254 nm; 0,10 = volumen (ml) de la muestra de prueba usada en el ensayo

15

**Tabla 9: Esquema para la preparación de la solución de prueba y en blanco**

| Reactivos                                                                                   | Prueba (ml) | Blanco (ml) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| (Solución de hipuril- <b>arginina</b> en solución tampón Tris que contiene cloruro de sodio | 2,90        | 2,90        |
| Agua desionizada                                                                            | ----        | 0,10        |
| Solución de carboxipeptidasa B                                                              | 0,10        | ----        |

**Determinación de la inactivación de la carboxipeptidasa en presencia de inhibidores:** Se incubó carboxipeptidasa (1 mM/l) con un inhibidor específico conocido (proporcionado en la Tabla 1A anteriormente en el presente documento) y una combinación de sales metálicas/agentes reductores (proporcionados en la Tabla 2 anteriormente en el presente documento) por separado. La inactivación por inhibidores sirvió como control positivo.

20

**Determinación de la inactivación oxidativa (actividad y pH) de la carboxipeptidasa en presencia de una combinación de iones metálicos y agentes reductores.**

25

Para una mezcla de reacción de 200 µl, se incubaron aproximadamente 10 µl de carboxipeptidasa en tampón con la combinación de sales metálicas y agentes reductores (proporcionados en la Tabla 2 con el número de serie 1 a 31) a la concentración respectiva a 37 °C en placas de microvaloración de 96 pocillos (la Tabla 3 anteriormente en el presente documento proporciona detalles sobre la utilización de una combinación particular de las proporcionadas con el número de serie 1 a 31 en la Tabla 2) durante 5 min, 15 min y 30 min seguido de la adición de 90 µl de sustrato respectivo (proporcionado en la Tabla 1A). La actividad enzimática se midió por espectrofotometría en un lector de microplacas y se comparó con el ensayo de actividad original. El pH se midió con un electrodo de pH combinado de Hanna (la reacción con la enzima se realizó por triplicado). La Tabla 10 a continuación proporciona la actividad enzimática de la carboxipeptidasa después del transcurso de períodos de tiempo específicos después del tratamiento con la combinación de sal/complejo metálico y agente reductor en evaluación.

35

**Tabla 10: Actividad enzimática de la carboxipeptidasa**

| Agente reductor y sales metálicas   | Tiempo      |             |             |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                                     | 5 min       | 15 min      | 30 min      |
| Ascorbato de sodio:Cloruro de cobre | 43,01886792 | 21,58490566 | 58,11320755 |
| Ascorbato de sodio:Sulfato de cobre | 79,24528302 | 87,54716981 | 41,50943396 |

(continuación)

| Agente reductor y sales metálicas          | Tiempo      |             |             |
|--------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                                            | 5 min       | 15 min      | 30 min      |
| Ascorbato de sodio:Sulfato de cinc         | 120,0113208 | 33,20754717 | 33,20754717 |
| Ascorbato de sodio:Óxido de vanadio        | 34,67169811 | 29,05660377 | 0           |
| Ascorbato de sodio:Sulfato de vanadio      | 89,13962264 | 66,41509434 | 66,41509434 |
| Ascorbato de sodio:Vanadato de sodio       | 61,01886792 | 58,11320755 | 58,49056604 |
| Ascorbato de sodio:Permanganato de potasio | 83,39622642 | 58,11320755 | 41,50943396 |
| Ascorbato de sodio:Gluconato de manganeso  | 49,81132075 | 62,26415094 | 66,41509434 |
| Glutación reducido: Picolinato de cromo    | 65,09433962 | 29,05660377 | 20,75471698 |
| Glutación reducido:Cloruro de cobre        | 100         | 58,11320755 | 75,09433962 |
| Glutación reducido:Sulfato de vanadio      | 91,69811321 | 33,20754717 | 0           |
| Glutación reducido:Óxido de vanadio        | 79,24528302 | 45,66037736 | 20,75471698 |
| Glutación reducido:Vanadato de sodio       | 49,43396226 | 41,50943396 | 37,35849057 |
| Glutación reducido:Cloruro de cromo        | 79,24528302 | 4,150943396 | 58,49056604 |
| Ácido úrico:Sulfato de cobre               | 100         | 62,26415094 | 49,81132075 |
| Ácido úrico: Vanadato de sodio             | 83,77358491 | 53,96226415 | 29,05660377 |
| Ácido úrico:Gluconato de manganeso         | 95,8490566  | 45,66037736 | 45,66037736 |
| Ácido úrico:Picolinato de cromo            | 62,26415094 | 50,18867925 | 45,66037736 |
| Manitol:Sulfato de cinc                    | 74,71698113 | 62,26415094 | 41,50943396 |
| Manitol:Sulfato de vanadio                 | 56,22641509 | 37,35849057 | 37,35849057 |
| Manitol:Picolinato de cromo                | 79,24528302 | 58,11320755 | 58,11320755 |
| Ácido benzohidroxámico:Sulfato de cobre    | 91,32075472 |             | 83,39622642 |
| Ácido benzohidroxámico:Sulfato de vanadio  | 45,66037736 | 24,90566038 | 16,60377358 |
| Ácido benzohidroxámico:Óxido de vanadio    | 79,24528302 | 79,24528302 | 49,81132075 |
| Ácido benzohidroxámico:Vanadato de sodio   | 41,50943396 | 33,20754717 | 24,90566038 |
| Ácido benzohidroxámico:Cloruro de cromo    | 54,33962264 | 24,90566038 | 12,45283019 |
| Cisteína:Cloruro de cobre                  | 87,54716981 | 41,50943396 | 16,60377358 |
| Cisteína:Óxido de vanadio                  | 33,20754717 | 25,94339623 | 25,94339623 |
| Cisteína:Gluconato de manganeso            | 49,81132075 | 74,71698113 | 62,26415094 |
| Cisteína: Picolinato de cromo              | 70,94339623 | 41,50943396 | 6,918238994 |
| Piperina                                   | 104,5283019 | 91,69811321 | 62,26415094 |

Las Tablas 11A a 11C representan la medición del pH para la carboxipeptidasa en diversos intervalos de tiempo, concretamente, en 5 minutos, 15 minutos y 30 minutos.

5

**Tabla 11A: Medición del pH para la carboxipeptidasa a un intervalo de 5 min**

|          | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>A</b> | 7,77 | 7,78 | 7,76 | 7,76 | 7,65 | 7,77 | 7,77 | 7,78 | 7,76 | 7,65 | 7,78 | 7,7  |
| <b>B</b> | 7,78 | 7,8  | 7,67 | 7,78 | 7,79 | 7,69 | 7,72 | 7,67 | 7,74 | 7,75 | 7,76 | 7,78 |
| <b>C</b> | 7,79 | 7,76 | 7,75 | 7,76 | 7,78 | 7,7  | 7,6  | 7,8  | 7,7  | 7,5  | 7,67 | 7,7  |
| <b>D</b> | 7,8  | 7,76 | 7,7  | 7,6  | 7,72 | 7,6  | 7,9  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,8  | 7,8  |
| <b>E</b> | 7,76 | 7,6  | 7,78 | 7,7  | 7,6  | 7,6  | 7,8  | 7,6  | 7,7  | 7,76 | 7,8  | 7,7  |
| <b>F</b> | 7,7  | 7,8  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,8  | 7,8  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  |
| <b>G</b> | 7,7  | 7,8  | 7,71 | 7,75 | 7,8  | 7,8  | 7,7  | 7,78 | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  |
| <b>H</b> | 7,67 | 7,6  | 7,6  | 7,76 | 7,8  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  |

**Tabla 11B: Medición del pH para la carboxipeptidasa a un intervalo de 15 min**

|          | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>A</b> | 7,77 | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,75 | 7,77 | 7,77 | 7,78 | 7,76 | 7,65 | 7,78 | 7,7  |
| <b>B</b> | 7,78 | 7,8  | 7,67 | 7,78 | 7,79 | 7,69 | 7,72 | 7,67 | 7,74 | 7,75 | 7,76 | 7,78 |
| <b>C</b> | 7,79 | 7,76 | 7,75 | 7,76 | 7,78 | 7,7  | 7,6  | 7,8  | 7,7  | 7,5  | 7,67 | 7,7  |
| <b>D</b> | 7,8  | 7,76 | 7,7  | 7,6  | 7,72 | 7,6  | 7,9  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  |
| <b>E</b> | 7,76 | 7,6  | 7,78 | 7,7  | 7,6  | 7,6  | 7,8  | 7,6  | 7,7  | 7,76 | 7,8  | 7,7  |
| <b>F</b> | 7,7  | 7,8  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,8  | 7,8  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  |
| <b>G</b> | 7,7  | 7,8  | 7,71 | 7,75 | 7,8  | 7,8  | 7,7  | 7,78 | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  |
| <b>H</b> | 7,67 | 7,6  | 7,6  | 7,76 | 7,8  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  |

**Tabla 11C: Medición del pH para la carboxipeptidasa a un intervalo de 30 min**

|          | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>A</b> | 7,77 | 7,7  | 7,7  | 7,8  | 7,75 | 7,77 | 7,77 | 7,78 | 7,76 | 7,65 | 7,78 | 7,7  |
| <b>B</b> | 7,78 | 7,9  | 7,67 | 7,78 | 7,79 | 7,69 | 7,72 | 7,67 | 7,74 | 7,75 | 7,76 | 7,78 |
| <b>C</b> | 7,79 | 7,8  | 7,75 | 7,76 | 7,78 | 7,7  | 7,6  | 7,8  | 7,7  | 7,5  | 7,67 | 7,7  |
| <b>D</b> | 7,8  | 7,76 | 7,7  | 7,6  | 7,72 | 7,6  | 7,9  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,8  | 7,6  |
| <b>E</b> | 7,76 | 7,6  | 7,78 | 7,7  | 7,6  | 7,6  | 7,8  | 7,6  | 7,7  | 7,76 | 7,8  | 7,7  |
| <b>F</b> | 7,7  | 7,8  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,8  | 7,8  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  |
| <b>G</b> | 7,7  | 7,8  | 7,71 | 7,75 | 7,8  | 7,8  | 7,7  | 7,78 | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  |
| <b>H</b> | 7,67 | 7,6  | 7,6  | 7,76 | 7,8  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  | 7,7  |

## 5 Para ensayar la actividad enzimática de la aminopeptidasa M usando L-Leucina-p-nitroanilida

Se prepararon una solución de tricina 1 mM (preparada en 100 ml de agua desionizada, Reactivo A) y una solución de L-leucina-p-nitroanilida 50 mM en metanol absoluto (Reactivo B), por separado. Se preparó una solución de L-leucina-p-nitroanilida de aproximadamente 10 mM (Leu-Na, Reactivo C) añadiendo 0,1 ml de Reactivo B en 4,9 ml de Reactivo A. Se prepararon tampón de tricina 200 mM en agua desionizada (Reactivo D) y tampón de tricina 200 mM con BSA al 0,05 % (p/v) a pH 8,0 a 25 °C (Reactivo E), por separado. Se prepararon 0,04 unidades/ml de aminopeptidasa en el Reactivo E (solución enzimática, Reactivo F). Se añadieron por pipeteo el Reactivo C (Leu-NA, 2,0 ml), el Reactivo D (tampón de tricina 200 mM, 1,0 ml) y agua desionizada (7,0 ml) y se mezclaron en un recipiente mediante agitación para dar un cóctel de reacción (Reactivo G). El Reactivo G, el Reactivo E y el Reactivo F se mezclaron inmediatamente por inversión para preparar la solución de prueba y en blanco como se indica en la Tabla 12, y se registró el aumento de  $\Delta A_{405 \text{ nm}}$  durante aproximadamente 5 minutos. Se obtuvo  $\Delta A_{405 \text{ nm}}/\text{minuto}$  usando la tasa lineal máxima tanto para la solución de prueba como en blanco.

Cálculos:

$$\text{Unidades/ml de enzima} = \frac{(\Delta A_{405 \text{ nm}}/\text{min Prueba} - \Delta A_{405 \text{ nm}}/\text{min Blanco})(1)(df)}{(0,36)(0,1)}$$

donde, 1 = Volumen total (ml) de ensayo; df = Factor de dilución; 10,8 = coeficiente de extinción milimolar 1 de p-nitroanilina a  $A_{405 \text{ nm}}$ ; 0,1 = Volumen (en mililitros) de enzima usada.

**Tabla 12 Esquema para la preparación de la solución de prueba y en blanco**

| Reactivos                        | Prueba (ml) | Blanco (ml) |
|----------------------------------|-------------|-------------|
| Cóctel de reacción (Reactivo G)  | 0,90        | 0,90        |
| Reactivo F (solución enzimática) | 0,10        | -----       |
| Reactivo E                       | -----       | 0,10        |

**Determinación de la inactivación de aminopeptidasa en presencia de inhibidores:** Se incubó aminopeptidasa (1 mM/l) con un inhibidor específico (proporcionado en la Tabla 1A anteriormente en el presente documento) y una combinación de sales metálicas/agentes reductores (proporcionados en la Tabla 2 anteriormente en el presente documento) por separado. La inactivación por inhibidores sirvió como control positivo.

**Determinación de la inactivación oxidativa (actividad y pH) de la aminopeptidasa en presencia de una combinación de iones metálicos y agentes reductores.**

Para una mezcla de reacción de 200 µl, se incubaron aproximadamente 10 µl de aminopeptidasa en tampón con la combinación de sales metálicas y agentes reductores (proporcionados en la Tabla 2 con el número de serie 1 a 31) a la concentración respectiva a 37 °C en placas de microvaloración de 96 pocillos (la Tabla 3 anteriormente en el presente documento proporciona detalles sobre la utilización de una combinación particular de las proporcionadas con el número de serie 1 a 31 en la Tabla 2) durante 5 min, 15 min y 30 min seguido de la adición de 90 µl de sustrato respectivo (proporcionado en la Tabla 1A). La actividad enzimática se midió por espectrofotometría en un lector de microplacas y se comparó con el ensayo de actividad original. El pH se midió con un electrodo de pH combinado de Hanna (la reacción con la enzima se realizó por triplicado). La Tabla 13 a continuación proporciona la actividad enzimática de la aminopeptidasa después del transcurso de períodos de tiempo específicos después del tratamiento con la combinación de sal/complejo metálico y agente reductor en evaluación.

**Tabla 13: Actividad enzimática de la aminopeptidasa**

| Agente reductor y sales metálicas          | Tiempo      |             |             |
|--------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                                            | 5 min       | 15 min      | 30 min      |
| Ascorbato de sodio:Cloruro de cobre        | 100         | 98,06034483 | 91,31455399 |
| Ascorbato de sodio:Sulfato de cobre        | 92,57142857 | 81,89655172 | 91,07981221 |
| Ascorbato de sodio:Sulfato de cinc         | 109,1428571 | 105,1724138 | 101,6431925 |
| Ascorbato de sodio:Óxido de vanadio        | 113,4285714 | 109,9137931 | 80,51643192 |
| Ascorbato de sodio:Sulfato de vanadio      | 99,42857143 | 99,13793103 | 99,06103286 |
| Ascorbato de sodio: Vanadato de sodio      | 101,7142857 | 90,94827586 | 73,94366197 |
| Ascorbato de sodio:Permanganato de potasio | 100         | 99,56896552 | 88,2629108  |
| Ascorbato de sodio:Gluconato de manganeso  | 104,8571429 | 100,4310345 | 100,4694836 |
| Glutatión reducido: Picolinato de cromo    | 92,57142857 | 87,5        | 79,10798122 |
| Glutatión reducido:Cloruro de cobre        | 96          | 94,39655172 | 88,96713615 |
| Glutatión reducido:Sulfato de vanadio      | 96          | 86,42241379 | 83,09859155 |
| Glutatión reducido: Óxido de vanadio       | 102         | 98,27586207 | 100,4694836 |
| Glutatión reducido: Vanadato de sodio      | 96          | 95,04310345 | 84,50704225 |
| Glutatión reducido:Cloruro de cromo        | 108,2857143 | 95,68965517 | 89,20187793 |
| Ácido úrico:Sulfato de cobre               | 94,51428571 | 93,53448276 | 97,18309859 |
| Ácido úrico: Vanadato de sodio             | 102,8571429 | 101,7241379 | 99,29577465 |
| Ácido úrico:Gluconato de manganeso         | 98,57142857 | 95,68965517 | 93,42723005 |
| Ácido úrico:Picolinato de cromo            | 93,42857143 | 93,53448276 | 86,61971831 |
| Manitol:Sulfato de cinc                    | 105,1428571 | 90,0862069  | 96,24413146 |
| Manitol:Sulfato de vanadio                 | 106,5714286 | 101,7241379 | 99,06103286 |
| Manitol:Picolinato de cromo                | 94          | 87,71551724 | 101,8779343 |
| Ácido benzohidroxámico:Sulfato de cobre    | 89,71428571 | 75,86206897 | 74,64788732 |
| Ácido benzohidroxámico:Sulfato de vanadio  | 84          | 70,68965517 | 75,11737089 |
| Ácido benzohidroxámico:Óxido de vanadio    | 87,42857143 | 85,12931034 | 77,9342723  |
| Ácido benzohidroxámico: Vanadato de sodio  | 64,51428571 | 88,36206897 | 79,81220657 |
| Ácido benzohidroxámico:Cloruro de cromo    | 96,85714286 | 67,88793103 | 78,16901408 |
| Cisteína:Cloruro de cobre                  | 110         | 113,362069  | 114,5539906 |
| Cisteína: Óxido de vanadio                 | 93,71428571 | 88,57758621 | 88,2629108  |
| Cisteína:Gluconato de manganeso            | 88          | 88,36206897 | 88,73239437 |
| Cisteína:Picolinato de cromo               | 105,4285714 | 90,94827586 | 64,31924883 |
| Piperina                                   | 108         | 100,4310345 | 80,51643192 |

Las Tablas 14A a 14C que se proporcionan a continuación representan la medición del pH para la aminopeptidasa en diversos intervalos de tiempo, concretamente, en 5 minutos, 15 minutos y 30 minutos.

**Tabla 14A: Medición del pH para la aminopeptidasa a un intervalo de 5 min**

|          | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>A</b> | 8,11 | 8,15 | 8,16 | 8,16 | 8,13 | 8,13 | 8,11 | 8,13 | 8,13 | 8,13 | 8,11 | 8,13 |
| <b>B</b> | 8,13 | 8,1  | 8,11 | 8,12 | 8,09 | 8,09 | 8,1  | 8,1  | 8,09 | 8,11 | 8,1  | 8,12 |
| <b>C</b> | 8,11 | 8,12 | 8,09 | 8,1  | 8,11 | 8,12 | 8,09 | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,09 | 8,11 |
| <b>D</b> | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,12 | 8,11 | 8,11 | 8,1  | 8,11 | 8,1  | 8,12 | 8,12 | 8,12 |
| <b>E</b> | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,1  | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,11 | 8,09 | 8,11 | 8,1  | 8,11 |
| <b>F</b> | 8,12 | 8,12 | 8,12 | 8,11 | 8,12 | 8,09 | 8,11 | 8,1  | 8,1  | 8,1  | 8,1  | 8,1  |
| <b>G</b> | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,11 | 8,11 | 8,1  | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,1  | 8,1  | 8,1  |
| <b>H</b> | 8,1  | 8,1  | 8,1  | 8,1  | 8,12 | 8,12 | 8,1  | 8,1  | 8,12 | 8,12 | 8,12 | 8,12 |

**Tabla 14B: Medición del pH para la aminopeptidasa a un intervalo de 15 min**

|          | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>A</b> | 8,11 | 8,15 | 8,16 | 8,16 | 8,13 | 8,13 | 8,11 | 8,13 | 8,13 | 8,13 | 8,11 | 8,13 |
| <b>B</b> | 8,13 | 8,1  | 8,11 | 8,12 | 8,13 | 8,14 | 8,1  | 8,1  | 8,11 | 8,11 | 8,1  | 8,12 |
| <b>C</b> | 8,11 | 8,12 | 8,12 | 8,1  | 8,11 | 8,12 | 8,13 | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,15 | 8,11 |
| <b>D</b> | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,12 | 8,11 | 8,11 | 8,1  | 8,11 | 8,1  | 8,12 | 8,12 | 8,12 |
| <b>E</b> | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,1  | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,11 | 8,14 | 8,11 | 8,1  | 8,11 |
| <b>F</b> | 8,12 | 8,12 | 8,12 | 8,11 | 8,12 | 8,14 | 8,11 | 8,1  | 8,1  | 8,1  | 8,1  | 8,1  |
| <b>G</b> | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,11 | 8,11 | 8,1  | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,1  | 8,1  | 8,1  |
| <b>H</b> | 8,1  | 8,1  | 8,1  | 8,1  | 8,12 | 8,12 | 8,1  | 8,1  | 8,12 | 8,12 | 8,12 | 8,12 |

5

**Tabla 14C: Medición del pH para la aminopeptidasa a un intervalo de 30 min**

|          | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>A</b> | 8,11 | 8,15 | 8,16 | 8,16 | 8,13 | 8,13 | 8,11 | 8,13 | 8,13 | 8,13 | 8,11 | 8,13 |
| <b>B</b> | 8,13 | 8,1  | 8,11 | 8,12 | 8,15 | 8,12 | 8,1  | 8,1  | 8,09 | 8,11 | 8,1  | 8,12 |
| <b>C</b> | 8,11 | 8,12 | 8,15 | 8,1  | 8,11 | 8,12 | 8,09 | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,09 | 8,11 |
| <b>D</b> | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,12 | 8,11 | 8,11 | 8,1  | 8,11 | 8,1  | 8,12 | 8,12 | 8,12 |
| <b>E</b> | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,1  | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,11 | 8,09 | 8,11 | 8,1  | 8,11 |
| <b>F</b> | 8,12 | 8,12 | 8,12 | 8,11 | 8,12 | 8,09 | 8,11 | 8,1  | 8,1  | 8,1  | 8,1  | 8,1  |
| <b>G</b> | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,11 | 8,11 | 8,1  | 8,11 | 8,11 | 8,12 | 8,1  | 8,1  | 8,1  |
| <b>H</b> | 8,1  | 8,1  | 8,1  | 8,1  | 8,12 | 8,12 | 8,1  | 8,1  | 8,12 | 8,12 | 8,12 | 8,12 |

Basándose en los experimentos realizados y como se ha proporcionado anteriormente, se pudo concluir que el nivel más alto de inhibición de la actividad enzimática (degradación proteolítica) se observó mediante la utilización de las siguientes combinaciones de agentes reductores y sales metálicas: Ascorbato de sodio-Óxido de vanadio; Ácido benzohidroxámico-Sulfato de vanadio; Manitol-Sulfato de vanadio; Ácido úrico-Gluconato de manganeso; Glutatión reducido-Cloruro de cromo y Glutatión reducido-Óxido de vanadio.

## ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD

Para brindar protección frente al pH ácido del entorno gástrico y la degradación por enzimas proteolíticas, se prepararon formulaciones de cápsula en cápsula, en donde la cápsula con recubrimiento entérico puede proteger el péptido del entorno gástrico, los gránulos de MIRA presentes en la cápsula externa pueden inactivar las enzimas proteolíticas y los potenciadores de la permeación pueden acelerar/aumentar la absorción del péptido a través de la membrana epitelial intestinal.

### Preparación de formulaciones de cápsula en cápsula

#### Preparación de gránulos que contienen uno o más agentes reductores y una o más sales metálicas

Las Tablas 15A a 15F a continuación presentan diversas formulaciones de gránulos que contienen uno o más agentes reductores y una o más sales metálicas (denominadas en el presente documento gránulos MIRA), preparadas para la evaluación de las biodisponibilidades.

**Tabla 15A: Fórmula para gránulos MIRA 1 (estudios en ratas)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Glutación reducido           | 12 mg                |
| 2            | Picolinato de cromo          | 0,03 mg              |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 12 mg                |
| 4            | Croscarmelosa de sodio       | 1,5 mg               |
| 5            | Manitol                      | 4,47 mg              |
| 6            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>30 mg</b>         |

**Tabla 15B: Fórmula para gránulos MIRA 2 (estudios en ratas)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Ascorbato de sodio           | 30 mg                |
| 2            | Óxido de vanadio             | 0,03 mg              |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 12 mg                |
| 4            | Manitol                      | 5,47 mg              |
| 5            | Croscarmelosa de sodio       | 2,5 mg               |
| 6            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>50 mg</b>         |

5

**Tabla 15C: Fórmula para gránulos MIRA 3 (estudios en ratas)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Ácido úrico                  | 3 mg                 |
| 2            | Vanadato de sodio            | 0,03 mg              |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 12 mg                |
| 4            | Manitol                      | 3,97 mg              |
| 5            | Croscarmelosa de sodio       | 1 mg                 |
| 6            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>20 mg</b>         |

**Tabla 15D: Fórmula para gránulos MIRA 4 (estudios en ratas)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Ascorbato de sodio           | 30 mg                |
| 2            | Gluconato de manganeso       | 0,03 mg              |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 12 mg                |
| 4            | Manitol                      | 5,47 mg              |
| 5            | Croscarmelosa de sodio       | 1,5 mg               |
| 6            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>50 mg</b>         |

10

**Tabla 15E: Fórmula para gránulos MIRA 5 (estudios en perros)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Ascorbato de sodio           | 100 mg               |
| 2            | Sulfato de vanadio           | 0,1 mg               |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 50 mg                |
| 4            | Croscarmelosa de sodio       | 10 mg                |
| 5            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>160,1 mg</b>      |

**Tabla 15F: Fórmula para gránulos MIRA 2 (estudios en perros)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Ascorbato de sodio           | 100 mg               |
| 2            | Óxido de vanadio             | 0,1 mg               |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 50 mg                |
| 4            | Croscarmelosa de sodio       | 10 mg                |
| 5            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>160,1 mg</b>      |

**Preparación de gránulos MIRA:**

Los gránulos MIRA se prepararon según el procedimiento mencionado a continuación.

A) Preparación de la solución aglutinante: Se preparó una solución de HPMC E-5 al 0,3 % p/v disolviendo 75,0 mg de HPMC E-5 en 25,0 ml de agua desionizada (D.I.). B) Preparación de la mezcla en polvo: Todos los ingredientes se añadieron uno por uno a un recipiente adecuado y a continuación se mezclaron completamente usando una bolsa de plástico Polybag para asegurar la uniformidad de la mezcla. C) Preparación de gránulos: Se empleó granulación manual para formular gránulos mediante la adición gota a gota de 2,0 ml de solución aglutinante. (Se requieren 2 ml para granular 2,5 g de mezcla en polvo) D) Secado de los gránulos: Los gránulos preparados se secaron a 40 °C durante aproximadamente 12 horas en un horno de aire caliente. E) Tamizado de los gránulos: Los gránulos secos se pasaron a través de una malla de acero inoxidable 40#, se recogieron en un recipiente de vidrio adecuado y se almacenaron a temperatura ambiente. (Se observaron una temperatura de 23 °C y una humedad del 39 % de HR durante todo el procedimiento de granulación)

**Preparación de gránulos que contienen uno o más péptidos**

Las Tablas 16A a 16I a continuación presentan diversas formulaciones de gránulos que contienen uno o más péptidos (denominados en el presente documento gránulos PA), preparadas para la evaluación de las biodisponibilidades.

**Tabla 16A: Fórmula de gránulos de insulina glargina PA 1 (estudios en ratas)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Ácido quenodesoxicólico      | 30 mg                |
| 2            | Insulina glargina            | 0,06 mg              |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 15 mg                |
| 4            | Manitol                      | 2,44 mg              |
| 5            | Croscarmelosa de sodio       | 2,5 mg               |
| 6            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>50 mg</b>         |

**Tabla 16B: Fórmula de gránulos de insulina glargina PA 2 (estudios en ratas)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Labrasol ALF                 | 5 mg                 |
| 2            | Insulina glargina            | 0,06 mg              |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 35 mg                |
| 4            | Manitol                      | 7,44 mg              |
| 5            | Croscarmelosa de sodio       | 2,5 mg               |
| 6            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>50 mg</b>         |

**Tabla 16C: Fórmula para gránulos de acetato de octreotida PA 1 (estudios en ratas)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Ácido quenodesoxicólico      | 30 mg                |
| 2            | Acetato de octreotida        | 0,3 mg               |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 15 mg                |
| 4            | Manitol                      | 2,2 mg               |
| 5            | Croscarmelosa de sodio       | 2,5 mg               |
| 6            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>50 mg</b>         |

**Tabla 16D: Fórmula para gránulos de teriparatida PA 1 (estudios en ratas)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Ácido quenodesoxicólico      | 30 mg                |
| 2            | Teriparatida                 | 0,12 mg              |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 15 mg                |
| 4            | Manitol                      | 2,38 mg              |
| 5            | Croscarmelosa de sodio       | 2,5 mg               |
| 6            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>50 mg</b>         |

5

**Tabla 16E: Fórmula para gránulos de teriparatida PA 3 (estudios en ratas)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Piperina                     | 3 mg                 |
| 2            | Teriparatida                 | 0,12 mg              |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 20 mg                |
| 4            | Manitol                      | 5,38 mg              |
| 5            | Croscarmelosa de sodio       | 1,5 mg               |
| 6            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>30 mg</b>         |

**Tabla 16F: Fórmula para gránulos de liraglutida de sodio PA 2 (estudios en perros)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Liraglutida de sodio         | 12 mg                |
| 2            | Labrasol ALF                 | 40 mg                |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 100 mg               |
| 4            | Croscarmelosa de sodio       | 10 mg                |
| 5            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>162 mg</b>        |

**Tabla 16G: Fórmula para gránulos de liraglutida de sodio PA 3+4 (estudios en perros)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Liraglutida de sodio         | 12 mg                |
| 2            | Piperina                     | 10 mg                |
| 3            | Solutol HS 15                | 25 mg                |
| 4            | Celulosa microcristalina 101 | 100 mg               |
| 5            | Croscarmelosa de sodio       | 10 mg                |
| 6            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>157 mg</b>        |

10

**Tabla 16H: Fórmula para gránulos de acetato de leuprorelina PA 2 (estudios en perros)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Acetato de leuprolida        | 1,25 mg              |
| 2            | Labrasol ALF                 | 40 mg                |
| 3            | Celulosa microcristalina 101 | 88,75 mg             |
| 4            | Croscarmelosa de sodio       | 10 mg                |
| 5            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>140 mg</b>        |

**Tabla 16I: Fórmula para gránulos de acetato de leuprorelina PA 2+3 (estudios en perros)**

| N.º de serie | Ingredientes                 | Cantidad por cápsula |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1            | Acetato de leuprolida        | 1,25 mg              |
| 2            | Labrasol ALF                 | 30 mg                |
| 3            | Piperina                     | 10 mg                |
| 4            | Celulosa microcristalina 101 | 88,75 mg             |
| 5            | Croscarmelosa de sodio       | 10 mg                |
| 6            | HPMC-E-5                     | c.s.                 |
| <b>Total</b> |                              | <b>140 mg</b>        |

**5 Procedimiento de granulación para gránulos de péptidos**

- A. Preparación de la solución aglutinante: Se preparó una solución de HPMC E-5 al 0,3 % p/v disolviendo 75,0 mg de HPMC E-5 en 25,0 ml de agua desionizada (D.I.). B. Preparación de la mezcla en polvo: Todos los ingredientes, excepto los excipientes líquidos, se pesaron con precisión y se mezclaron en una bolsa de plástico Polybag durante 5,0 minutos. C. Adición de aglutinante: Se añadió una cantidad pesada de excipientes líquidos junto con el péptido en una solución aglutinante de HPMC E-5 (0,03 %). La mezcla resultante se añadió gota a gota para realizar la granulación en húmedo. D. Secado de los gránulos: Los gránulos se secaron en un desecador de vacío sobre lecho de sílice durante una noche. E. Tamizado de los gránulos: Los gránulos secos se pasaron a través de una malla de acero inoxidable 40#, se recogieron en un recipiente de vidrio adecuado y se almacenaron a temperatura ambiente. (Se observaron una temperatura de 22 °C y una humedad del 35 % de HR durante todo el procedimiento de granulación)

**Llenado de cápsulas**

- Los gránulos MIRA y de péptidos se llenaron en cápsulas manualmente usando una balanza de pesaje. Las Tablas 17A y 17B a continuación proporcionan el tamaño de las cápsulas usadas para el llenado de cápsulas para estudios en ratas y estudios en perros, respectivamente.

**Tabla 17A: Tamaño de cápsula usado para el llenado de cápsulas para estudios en ratas**

| N.º de serie | Gránulos                                        | Tamaño |
|--------------|-------------------------------------------------|--------|
| 1            | Insulina glargina + Ácido quenodesoxicólico     | 3      |
| 2            | Insulina glargina + Labrasol                    | 3      |
| 3            | Acetato de octreotida + Ácido quenodesoxicólico | 3      |
| 4            | Glutación reducido + Picolinato de cromo        | 1      |
| 5            | Ascorbato de sodio + Óxido de vanadio           | 0      |
| 6            | Ácido úrico + Vanadato de sodio                 | 4      |
| 7            | Teriparatida + Piperina                         | 3      |
| 8            | Teriparatida + Ácido quenodesoxicólico          | 3      |
| 9            | Ascorbato de sodio + Gluconato de manganeso     | 0      |

**Tabla 17B: Tamaño de cápsula usado para el llenado de cápsulas para estudios en perros**

| N.º de serie | Gránulos                                    | Tamaño        |
|--------------|---------------------------------------------|---------------|
| 1            | Ascorbato de sodio + Sulfato de vanadio     | 00 (entérico) |
| 2            | Ascorbato de sodio + Óxido de vanadio       | 00 (entérico) |
| 3            | Liraglutida de sodio + Solutol + Piperina   | 3             |
| 4            | Liraglutida de sodio + Labrasol             | 3             |
| 5            | Acetato de leuprolida + Labrasol            | 3             |
| 6            | Acetato de leuprolida + Labrasol + Piperina | 3             |

**Envasado y almacenamiento de cápsulas**

- 5 Las cápsulas se envasaron en bolsas de plástico Polybag y se transfirieron a recipientes de HDPE (polietileno de alta densidad) con bolsas de sílice para el control de la humedad.

**Preparación de lotes de gránulos de placebo**

- 10 Se preparó un lote de placebo usando color amarillo oca y azul para comprender la desintegración y liberación de gránulos de las cápsulas (visualmente). Los gránulos secos se cargaron en cápsulas de tamaño 3 y el tiempo de desintegración se determinó en un evaluador de desintegración (Electrolab) usando discos guiados. Se encontró que el tiempo de desintegración era de  $3 \pm 1$  min en agua y en tampón de fosfato (pH 6,8) a  $37 \pm 0,2$  °C.

**15 Estudio de liberación de gránulos de placebo (cápsula en cápsula)**

Cápsula exterior: tamaño 0: gránulos de color amarillo

Cápsula interior: Tamaño 4: Gránulos de color azul

- 20 El estudio de liberación se realizó en un aparato de desintegración (Electrolab Mumbai) a  $37 \pm 0,5$  °C en 900 ml de HCl 0,1 N (durante 2 h) y tampón de fosfato a pH 6,8.

- 25 Se podría concluir a partir de la observación visual que las cápsulas con recubrimiento entérico exterior permanecen intactas en HCl 0,1 N (estables en medios gástricos) mientras que comenzaron a desintegrarse en tampón de fosfato a pH 6,8 en 3 minutos.

- 30 Las cápsulas interiores comenzaron a desintegrarse a los 8 min y se disolvieron completamente en 13 minutos. De manera similar, la liberación de los gránulos MIRA puede tener lugar 3 min después de la exposición al pH alcalino, seguida de la liberación completa del péptido en 13 minutos.

**Evaluación de las cápsulas**

- 35 **Procedimiento de ensayo insulina glargina, acetato de octreotida y teriparatida para estudios en ratas:** Se pesaron con precisión 50 mg/30 mg de gránulos (retirados de una cápsula) y se disolvieron en la fase móvil. La dispersión se sometió a sonicación durante 5 min en un baño ultrasónico, se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm y se inyectó en HPLC. La curva de calibración para todos los API se representó usando múltiples diluciones en sus respectivas fases móviles sugeridas por USP 2017. Se realizaron ensayos y se calculó el porcentaje de contenido de fármaco usando curvas de calibración.

40

**Tabla 18: Resultados del ensayo para cada formulación (estudios en ratas)**

| N.º de serie | Código | Formulación                                     | Área (mAU*S) | Ensayo (%) |
|--------------|--------|-------------------------------------------------|--------------|------------|
| 1            | PA1    | Insulina glargina + ácido quenodesoxicólico     | 1664         | 105,2      |
| 2            | PA2    | Insulina glargina + labrasol                    | 1860         | 115,8      |
| 3            | PA1    | Acetato de octreotida + ácido quenodesoxicólico | 1638         | 24,5       |
| 4            | PA1    | Teriparatida + ácido quenodesoxicólico          | 2203         | 98,02      |
| 5            | PA3    | Teriparatida + piperina                         | 2385         | 106,1      |

**Estudios de estabilidad de las cápsulas de insulina glargina**

45

**Tabla 19: Composición de los gránulos de insulina glargina**

| N.º de serie | Ingrediente              | Cantidad por cápsula Lote I | Cantidad por cápsulas Lote II |
|--------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1            | Insulina glargina        | 0,12 mg                     | 0,12 mg                       |
| 2            | Ácido quenodesoxicólico  | 30 mg                       | --                            |
| 3            | Labrasol                 | --                          | 30 mg                         |
| 4            | Celulosa microcristalina | 15 mg                       | 20 mg                         |
| 5            | Croscarmelosa de sodio   | 2,5 mg                      | 1,5 mg                        |
| 6            | Manitol                  | 2,38 mg                     | 5,38 mg                       |
| 7            | Aglutinante (HPMCE-5)    | c.s.                        | c.s.                          |
| Peso total   |                          | 50 mg                       | 50 mg                         |

**Llenado de cápsulas:** Modo: Llenado manual; Tamaño de la cápsula: 2; Peso de los gránulos llenos: según la fórmula anterior

- 5 **Almacenamiento de cápsulas y gránulos:** Temperatura:  $25 \pm 3$  °C; Humedad:  $35 \pm 5$  % de HR; Recipiente: HDPE 60 cc para cápsulas/vial de vidrio transparente con cierre de caucho para gránulos.

10 **Observación:** A partir de la ecuación ( $y = 30,977x - 292,26$  obtenida a partir de datos de HPLC), se encontró que el contenido de insulina glargina presente en la formulación era del 105,2 % y del 115,8 % para el lote I y el lote II, respectivamente.

**Estudios de estabilidad (75 días):** Ambos lotes se almacenaron a temperatura ambiente a 25 °C durante 85 días y se repitieron los ensayos.

- 15 **Observación:** A partir de la ecuación ( $y = 30,977x - 292,26$  obtenida a partir de datos de HPLC), se encontró que el contenido de insulina glargina presente en la formulación era del 97,25 % y del 91,63 % para el lote I y el lote II, respectivamente, como puede verse en la Tabla 20 a continuación.

**Tabla 20: Análisis comparativo de estudios de estabilidad**

| Formulación                                          | Área (0 días) | Ensayo (0 días) | Área (85 días) | Ensayo (85 días) |
|------------------------------------------------------|---------------|-----------------|----------------|------------------|
| Insulina glargina + Ácido quenodesoxicólico (Lote I) | 1664 mAU*s    | 105,2 %         | 1515,3 mAU*s   | 97,25 %          |
| Insulina glargina + Labrasol (Lote II)               | 1860 mAU*s    | 115,8 %         | 1410,9 mAU*s   | 91,63 %          |

20

**Estudios de estabilidad de teriparatida**

**Tabla 21: Composición de los gránulos de teriparatida**

| N.º de serie | Ingrediente              | Cantidad por cápsula Lote I | Cantidad por cápsulas Lote II |
|--------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1            | Teriparatida             | 0,12 mg                     | 0,12 mg                       |
| 2            | Ácido quenodesoxicólico  | 30 mg                       | --                            |
| 3            | Piperina                 | --                          | 3 mg                          |
| 4            | Celulosa microcristalina | 15 mg                       | 20 mg                         |
| 5            | Croscarmelosa de sodio   | 2,5 mg                      | 1,5 mg                        |
| 6            | Manitol                  | 2,38 mg                     | 5,38 mg                       |
| 7            | Aglutinante (HPMCE-5)    | c.s.                        | c.s.                          |
| Peso total   |                          | 50 mg                       | 30 mg                         |

- 25 **Llenado de cápsulas:** Modo: Llenado manual; Tamaño de la cápsula: 2; Peso de los gránulos llenos: según la fórmula anterior

**Almacenamiento de cápsulas y gránulos:** Temperatura:  $25 \pm 3$  °C; Humedad:  $35 \pm 5$  % de HR; Recipiente: HDPE 60 cc para cápsulas/vial de vidrio transparente con cierre de caucho para gránulos

30

**Observación:** A partir de la ecuación ( $y = 18,924x - 22,539$  obtenida a partir de datos de HPLC), se encontró que el contenido de acetato de teriparatida presente en la formulación era del 98,02 % y del 106 % para el lote I y el lote II,

respectivamente.

**Estudios de estabilidad (75 días):** Ambos lotes se almacenaron a temperatura ambiente a 25 °C durante 75 días y se repitieron los ensayos.

**Observación:** A partir de la ecuación ( $y = 18,924x - 22,539$  obtenida a partir de datos de HPLC), se encontró que el contenido de acetato de teriparatida presente en la formulación era del 92,88 % y del 89,76 % para el lote I y el lote II, respectivamente.

**Tabla 22: Análisis comparativo de estudios de estabilidad**

| Formulación                                        | Área<br>(0 días) | Ensayo<br>(0 días) | Área<br>(75 días) | Ensayo<br>(75 días) |
|----------------------------------------------------|------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| Teriparatida + Ácido quenodesoxicólico<br>(Lote I) | 2203 mAU*s       | 98,02 %            | 2087 mAU*s        | 92,88 %             |
| Teriparatida + Piperina (Lote II)                  | 2385 mAU*s       | 106,0 %            | 2016 mAU*s        | 89,76 %             |

**Procedimiento de ensayo: Acetato de leuprolida para estudios en ratas**

La curva de calibración del acetato de leuporelina se preparó usando HPLC: Se pesaron con precisión aproximadamente 112 mg y 104 mg de gránulos (equivalentes a 100 µg) y se diluyeron con 1 ml de fase móvil; esto da una dispersión con una concentración teórica de 100 µg/ml para acetato de leuprolida; la dispersión se agitó vorticialmente durante 2 minutos y a continuación se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm; a continuación, se inyectaron 20,0 µl de esta solución filtrada en el sistema de HPLC para determinar el contenido de péptido.

**Observación:** A partir de la ecuación,  $y = 42,67x - 76,447$  obtenida de los estudios de HPLC para el péptido, se encontró que el % de contenido de péptido para acetato de leuprolida era (A) gránulos de acetato de leuprolida + Labrasol ALF (PA 2): 97,45 %; y (B) gránulos de acetato de leuprolida + Labrasol ALF + piperina (PA 2+3): 105,11 %.

**Estudio de disolución de cápsulas de leuprolida**

**Se seleccionó una formulación que contenía Labrasol ALF con leuprolida (PA 2) para el estudio de disolución (según los resultados del ensayo)**

**Configuración 1: Uso de membrana de diálisis:** Medio: Tampón de fosfato a pH 6,80; volumen: 10 ml; volumen de extracción: 400 µl; velocidad de agitación: 100 RPM; gránulos llenos: 140 mg (equivalente a 1 cápsula); especificación de la membrana de diálisis: HIMEDIA LM395-30MT; tamaño de poro: 25 nm; anchura plana promedio: 29,31 mm; diámetro promedio: 17,5 mm

**Tabla 23: Estudio de liberación de leuprolida usando una membrana de diálisis**

| Tiempo | Área | % de liberación                                            |
|--------|------|------------------------------------------------------------|
| 5      | 0    | Leuprolida no liberada a través de la membrana de diálisis |
| 10     | 0    |                                                            |
| 15     | 0    |                                                            |
| 20     | 0    |                                                            |
| 25     | 0    |                                                            |

**Configuración 2: usando cesta giratoria (USP TIPO 1):** Medio: Tampón de fosfato a pH 6,80; volumen: 25 ml; volumen de extracción: 400 µl; velocidad de agitación: 100 RPM; gránulos llenos: 140 mg en cápsula de gelatina.

**Tabla 24: Datos de liberación *in vitro* para la configuración 2**

| Tiempo (min) | Área    | conc. (µg/ml) | conc. µg/0,5 ml) | Error     | conc. ug/25 ml) | CDR         | % de CDR |
|--------------|---------|---------------|------------------|-----------|-----------------|-------------|----------|
| 0            | 0       | 0             | 0                | 0         | 0               | 0           | 0        |
| 5            | 214,9   | 6,8279118 82  | 3,4139559 41     | 3,4139559 | 170,69779 7     | 174,11175 3 | 13,92894 |
| 10           | 400,7 6 | 11,183665 34  | 5,5918326 69     | 5,5918327 | 279,59163 35    | 285,18346 6 | 22,81468 |
| 15           | 279,5 9 | 8,3439653 15  | 4,1719826 58     | 13,177771 | 208,59913 29    | 221,77690 4 | 17,74215 |
| 20           | 366,3 7 | 10,377712 68  | 5,1888563 39     | 18,366628 | 259,44281 7     | 277,80944 5 | 22,22476 |
| 30           | 370,0 9 | 10,464893 37  | 5,2324466 84     | 23,599074 | 261,62233 42    | 285,22140 8 | 22,81771 |
| 45           | 330     | 9,5253573 94  | 4,7626786 97     | 28,361753 | 238,13393 48    | 266,49568 8 | 21,31966 |
| 60           | 456,8 6 | 12,498406 37  | 6,2492031 87     | 34,610956 | 312,46015 94    | 347,07111 6 | 27,76569 |
| 90           | 321,2 5 | 9,3202952 89  | 4,6601476 45     | 39,271104 | 233,00738 22    | 272,27848 6 | 21,78228 |

**Configuración 3: usando cesta giratoria (USP TIPO 1)**

Medio: Tampón de fosfato a pH 6,80; volumen: 30 ml; volumen de extracción: 400 µl; velocidad de agitación: 500 RPM; gránulos llenos: 140 mg en cápsula de gelatina.

5

**Tabla 25: Datos de liberación *in vitro* para la configuración 3**

| Tiempo (min) | Área     | conc. (µg/ml) | conc. µg/0,4 ml) | Error     | conc. ug/30 ml) | CDR         | % de CDR |
|--------------|----------|---------------|------------------|-----------|-----------------|-------------|----------|
| 0            | 0        | 0             | 0                | 0         | 0               | 0           | 0        |
| 5            | 229,95   | 7,1806187 02  | 2,8722474 81     | 2,8722475 | 215,41856 1     | 218,29080 9 | 17,46326 |
| 10           | 215,20 6 | 6,8350831 97  | 2,7340332 79     | 2,7340333 | 205,05249 59    | 207,78652 9 | 16,62292 |
| 20           | 258,02 8 | 7,8386454 18  | 3,1354581 67     | 8,7417389 | 235,15936 25    | 243,90110 1 | 19,51209 |
| 30           | 218,98   | 6,9235294 12  | 2,7694117 65     | 11,511151 | 207,70588 24    | 219,21703 3 | 17,53736 |
| 45           | 236,02   | 7,3228732 13  | 2,9291492 85     | 14,4403   | 219,68619 64    | 234,12649 6 | 18,73012 |
| 60           | 337,56   | 9,7025310 52  | 3,8810124 21     | 18,321312 | 291,07593 16    | 309,39724 4 | 24,75178 |

**Configuración 4: usando cesta giratoria (USP TIPO 1)**

10 Medio: Tampón de fosfato a pH 6,80; volumen: 30 ml; volumen de extracción: 400 µl; velocidad de agitación: 500 RPM; gránulos llenos: 140 mg en cápsula de hipromelosa (Tamaño 0).

**Tabla 26: Datos de liberación *in vitro* para la configuración 4**

| Tiempo (min) | Área    | conc. (µg/ml) | conc. (µg/0,4 ml) | Error      | conc. (ug/30 ml) | CDR        | % de CDR  |
|--------------|---------|---------------|-------------------|------------|------------------|------------|-----------|
| 0            | 0       | 0             | 0                 | 0          | 0                | 0          | 0         |
| 5            | 0       | 1,79158659 5  | 0,71663463 8      | 0,716634 6 | 53,7475978 4     | 54,4642325 | 4,357 139 |
| 15           | 343,5   | 9,84173892 7  | 3,93669557 1      | 3,936695 6 | 295,252167 8     | 299,188863 | 23,93 511 |
| 30           | 416,6 3 | 11,5555894 1  | 4,62223576 3      | 9,275566   | 346,667682 2     | 355,943248 | 28,47 546 |
| 45           | 527,5 5 | 14,1550738 2  | 5,66202952 9      | 14,93759 6 | 424,652214 7     | 439,58981  | 35,16 718 |
| 90           | 428,4 6 | 11,8328333 7  | 4,73313334 9      | 19,67072 9 | 354,985001 2     | 374,65573  | 29,97 246 |

**Configuración 5: usando cesta giratoria (USP TIPO 1)**

Medio: Tampón de fosfato a pH 6,80; volumen: 30 ml; volumen de extracción: 500 µl; velocidad de agitación: 100 RPM; gránulos llenos: 140 mg sin cápsulas directamente en la cesta.

20

**Tabla 27: Datos de liberación *in vitro* para la configuración 5**

| Tiempo (min) | Área     | conc. (µg/ml) | conc. µg/0,5 ml) | Error      | Conc. (ug/30 ml) | CDR         | % de CDR |
|--------------|----------|---------------|------------------|------------|------------------|-------------|----------|
| 0            | 0        | 0             | 0                | 0          | 0                | 0           | 0        |
| 5            | 1491,9 7 | 36,756901 8   | 18,378450 9      | 18,37845 1 | 1102,7070 54     | 1121,0855 1 | 89,68684 |
| 10           | 1550,8 9 | 38,137731 43  | 19,068865 71     | 19,06886 6 | 1144,1319 43     | 1163,2008 1 | 93,05606 |
| 15           | 1280,8   | 31,807991 56  | 15,903995 78     | 53,35131 2 | 954,23974 69     | 1007,5910 6 | 80,60728 |
| 20           | 1422     | 35,117108 04  | 17,558554 02     | 70,90986 6 | 1053,5132 41     | 1124,4231 1 | 89,95385 |

**Configuración 6: usando un agitador magnético**

Medio: Tampón de fosfato a pH 6,80; volumen: 30 ml; volumen de extracción: 500 µl; velocidad de agitación: 200 RPM; gránulos llenos: 140 mg en cápsula de gelatina, tamaño 2.

25

**Tabla 28: Datos de liberación *in vitro* para la configuración 6**

| Tiempo (min) | Área   | conc. (µg/ml) | conc. µg/0,5 ml) | Error     | conc. (ug/30 ml) | CDR         | % de CDR |
|--------------|--------|---------------|------------------|-----------|------------------|-------------|----------|
| 0            | 0      | 0             | 0                | 0         | 0                | 0           | 0        |
| 5            | 1761,8 | 43,080548 39  | 21,540274 2      | 21,540274 | 1292,4164 52     | 1313,9567 3 | 105,1165 |
| 10           | 1771,8 | 43,314905 09  | 21,657452 54     | 21,657453 | 1299,4471 53     | 1321,1046 1 | 105,6884 |
| 15           | 1750   | 42,804007 5   | 21,402003 75     | 64,59973  | 1284,1202 25     | 1348,7199 6 | 107,8976 |
| 20           | 1736,9 | 42,497000 23  | 21,248500 12     | 85,848231 | 1274,9100 07     | 1360,7582 4 | 108,8607 |

**Configuración 7: usando un agitador magnético**

Medio: Tampón de fosfato a pH 6,80; volumen: 30 ml; volumen de extracción: 500 µl; velocidad de agitación: 200 RPM; gránulos llenos: 140 mg en cápsula de gelatina, tamaño 2.

5

**Tabla 29: Datos de liberación *in vitro* para la configuración 7**

| Tiempo (min) | Área    | conc. (µg/ml) | conc. µg/0,5 ml) | Error     | conc. (ug/30 ml) | CDR         | % de CDR |
|--------------|---------|---------------|------------------|-----------|------------------|-------------|----------|
| 0            | 0       | 0             | 0                | 0         | 0                | 0           | 0        |
| 2,5          | 1440. 6 | 35,553011 48  | 17,776505 74     | 17,776506 | 1066,5903 45     | 1084,3668 5 | 86,74935 |
| 5            | 1670. 9 | 40,950246 07  | 20,475123 04     | 20,475123 | 1228,5073 82     | 1248,9825 1 | 99,9186  |
| 10           | 1603    | 39,358964 14  | 19,679482 07     | 57,931111 | 1180,7689 24     | 1238,7000 4 | 99,096   |
| 15           | 1638. 4 | 40,188586 83  | 20,094293 41     | 78,025404 | 1205,6576 05     | 1283,6830 1 | 102,6946 |

Basándose en los datos proporcionados en las Tablas 24 a 29, se puede observar que la leuprolida no se liberó de los gránulos a través de la membrana de diálisis (Configuración 1); se usó una cesta giratoria (USP TIPO 1) para la configuración 2 y la rotación de la cesta no pudo producir suficiente movimiento giratorio para mover/girar el material en el medio y, por lo tanto, el material junto con la gelatina se asentaron, lo que finalmente afectó a la liberación; la configuración 3 se realizó aumentando las RPM de la cesta (de 100 a 500), pero incluso después de aumentar las rpm de la cesta, se encontró que el % de CDR era del 24,75 %; la configuración 4 se realizó con un aumento de RPM y reemplazando la cápsula de gelatina por una cápsula de hipromelosa, en donde se encontró que el % de CDR era del 29,97 %; la configuración 5 se realizó en una cesta giratoria sin cápsula, se encontró que el % de CDR era del 90 %, lo que confirma que el material (gelatina/hipromelosa) puede aumentar la viscosidad y retardar la liberación de leuprolida de los gránulos; las configuraciones 6 y 7 se realizaron usando un agitador magnético para generar un giro adecuado de los medios a lo largo del análisis y se encontró que el % de CDR era del 108,8 % y del 102,6 %, respectivamente; todos los conjuntos de experimentos se realizaron a 37 °C y el cambio de temperatura afecta a la desintegración de la cápsula, El tiempo de desintegración a 25 °C fue de 12 min y el tiempo de desintegración a 37 °C fue inferior a 2 min.

**Ensayo de liraglutida de sodio usando HPLC**

**Ensayo 1:** Procedimiento: Se diluyeron aproximadamente 10,0 mg de gránulos tanto de PA 2 (Tabla 16F) como de PA 3+4 (Tabla 16G) con 10,0 ml de diluyente de HPLC (ACN al 10 % en agua D.I). Esto da una dispersión con una concentración teórica de 74 µg/ml para la liraglutida de sodio. La dispersión se sometió a sonicación durante 5,0 minutos en un baño ultrasónico y a continuación se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm. a continuación, se inyectaron 20,0 µl de esta solución filtrada en el sistema de HPLC para determinar el contenido de péptido.

**Observación:** A partir de la ecuación;  $y = 79,283x - 571,72$  obtenida de los estudios de HPLC para el péptido, se encontró que el contenido de la formulación de liraglutida de sodio con gránulos de Labrasol ALF (PA 2) era del 44,4 % y del 25,4 % para la formulación de liraglutida de sodio con piperina y Solutol HS-15 (PA 3+4). (a) Ensayo de la formulación de liraglutida de sodio con piperina y Solutol HS-15: 67,39 % en agitación vorticial durante 2 minutos; (b) Ensayo de la formulación de liraglutida de sodio con gránulos de Labrasol ALF: 80,43 % en agitación vorticial durante 2 minutos; (c) Ensayo de la formulación de liraglutida de sodio con piperina y Solutol HS-15: 95,66 % en agitación vorticial durante 5 minutos; y (d) Ensayo de la formulación de liraglutida de sodio con gránulos de Labrasol ALF: 96,99 % en agitación vorticial durante 5 minutos.

**Estudio de disolución de liraglutida**

Medio: Tampón de fosfato a pH 6,80; volumen: 30 ml; volumen de extracción: 500 µl; velocidad de agitación: 200 RPM.

**Tabla 30: Datos de liberación *in vitro* para liraglutida PA 2 (Tabla 16F)**

| Tiempo (min) | Área     | conc. (µg/ml) | conc. (µg/1 ml) | Error        | conc. (ug/100 ml) | CDR          | % de CDR     |
|--------------|----------|---------------|-----------------|--------------|-------------------|--------------|--------------|
| 0            | 0        | 0             | 0               | 0            | 0                 | 0            | 0            |
| 5            | 5050     | 70,9070040 2  | 35,4535020 1    | 35,4535020 1 | 7090,70040 2      | 7126,15390 4 | 59,3846158 7 |
| 7,5          | 5085,2 3 | 71,3513615 8  | 35,6756807 9    | 35,6756807 9 | 7135,13615 8      | 7170,81183 9 | 59,7567653 2 |
| 10           | 7804,2 1 | 105,645977 1  | 52,8229885 3    | 123,952171 3 | 10564,5977 1      | 10688,5498 8 | 89,0712489 9 |
| 15           | 9447,2 7 | 126,369965 8  | 63,1849829 1    | 187,137154 2 | 12636,9965 8      | 12824,1337 4 | 106,867781 1 |
| 20           | 9912,4 3 | 132,237049 6  | 66,1185247 8    | 253,255679   | 13223,7049 6      | 13476,9606 3 | 112,308005 3 |
| 30           | 9912,4 3 | 132,237049 6  | 66,1185247 8    | 319,374203 8 | 13223,7049 6      | 13543,0791 6 | 112,858993   |

**Tabla 31: Datos de liberación *in vitro* para liraglutida PA 3+4 (Tabla 16G)**

| Tiempo (min) | Área     | conc. (µg/ml) | conc. (µg/1 ml) | Error        | Conc. (ug/100 ml) | CDR          | % de CDR     |
|--------------|----------|---------------|-----------------|--------------|-------------------|--------------|--------------|
| 0            | 0        | 0             | 0               | 0            | 0                 | 0            | 0            |
| 5            | 0        | 0             | 0               | 0            | 0                 | 0            | 0            |
| 7,5          | 6823,8   | 93,280022 2   | 46,640011 1     | 46,640011 1  | 9328,0022 2       | 9374,6422 31 | 78,122018 59 |
| 10           | 7692,7 4 | 104,24000 1   | 52,120000 5     | 98,760011 6  | 10424,000 1       | 10522,760 11 | 87,689667 6  |
| 15           | 7778,6   | 105,32295 7   | 52,661478 5     | 151,42149 01 | 10532,295 7       | 10683,717 19 | 89,030976 59 |
| 20           | 7987,4 1 | 107,95668 68  | 53,978343 4     | 205,39983 35 | 10795,668 68      | 11001,068 51 | 91,675570 95 |
| 30           | 8131,5 3 | 109,77447 88  | 54,887239 38    | 260,28707 29 | 10977,447 88      | 11237,734 95 | 93,647791 25 |

**Observación:** Se encontró que el % de CDR era del 112,85 % y del 93,64 % para la liraglutida PA 2 y PA 3+4, respectivamente. Se encontró que más del 50 % de la liraglutida de sodio se liberaba entre 5-7 minutos.

## 5 CUANTIFICACIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA E INSULINA GLARGINA EN PLASMA DE RATA CON DIABETES INDUCIDA POR STZ

Los niveles de glucosa e insulina glargina en plasma se cuantificaron después de dosificar varias formulaciones de insulina glargina en el yeyuno medio en ratas S.D. con diabetes inducida por STZ.

Formulación de prueba I: Insulina glargina (Lantus®) - Aspecto: Solución para inyección en una pluma precargada; concentración: 100 UI/ml; condiciones de almacenamiento: 2-8 °C; dosis: 0,2 U/kg; vía: SC.

Formulación de prueba II: Formulación de insulina glargina - MIRA 1 (Glutión reducido/picolinato de cromo de la Tabla 15A) + Potenciador de la permeación 1 (PA 1 de la Tabla 16A) (solución oral en tampón TRIS) - Dosis: 1,7 U/animal; vía: yeyuno medio

Formulación de prueba III: Formulación de insulina glargina - PA 2 (de la Tabla 16B) y MIRA 2 (Ascorbato de sodio/óxido de vanadio de la Tabla 15B) (solución oral en tampón TRIS) - Dosis: 1,7 U/animal; vía: yeyuno medio.

**Observaciones:** No se observó mortalidad después de la administración subcutánea y en el yeyuno medio de insulina glargina. Los signos clínicos observados son normales. Con respecto a los puntos temporales de muestreo, durante la dosificación, los puntos temporales de extracción de sangre fueron 0, 20, 40, 60, 120 y 150 minutos después de la dosis. - Se extrajeron 100 µl de sangre en un eppendorf precargado con Na-EDTA, procedente de una punción del seno retroorbitario. La sangre se centrifugó a 5000 rpm, 5 min, a 4 °C para obtener plasma. La glucosa se midió inmediatamente después de la extracción de sangre usando un glucómetro.

**Tabla 32: Efecto de los tratamientos con diferentes formulaciones en ratas con diabetes inducida por STZ**

| Grupos                             | n | % de inhibición (min) |       |       |       |       |
|------------------------------------|---|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
|                                    |   | 20                    | 40    | 60    | 120   | 150   |
| <b>Vehículo</b>                    | 2 | 1,6                   | -1,6  | -2,2  | -1,5  | -1,8  |
| STZ + Insulina glargina (0,2 U/kg) | 3 | 22,9                  | 25,5  | 22    | 39    | 17,2  |
| STZ + Formulación de prueba II     | 3 | -23,2                 | -15,1 | -14,7 | -13,2 | -15,4 |
| STZ + Formulación de prueba III    | 3 | -3,5                  | -13,1 | 0,8   | 8,8   | 10    |

**Tabla 33: Biodisponibilidad de la insulina glargina**

| Grupos                             | n | AUC ± SEM    |
|------------------------------------|---|--------------|
| Vehículo                           | 2 | 67705 ± 2965 |
| STZ + Insulina glargina (0,2 U/kg) | 3 | 39408 ± 8561 |
| STZ + Formulación de prueba II     | 3 | 80133 ± 5168 |
| STZ + Formulación de prueba III    | 3 | 57315 ± 3474 |

## Estudio ELISA

Fuente: Invitron Ltd, Cat. N.º MBS495369

Principio: Este ELISA de glargina es un inmunoensayo de dos sitios, que emplea un anticuerpo monoclonal inmovilizado en pocillos de microvaloración y un anticuerpo soluble marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se incubó una muestra de plasma en el pocillo de microvaloración y, después de una etapa de lavado, se añade la solución de conjugado de anticuerpo-HRP. A una segunda incubación le sigue una etapa de lavado adicional para

eliminar el conjugado de anticuerpo-HRP no unido antes de la medición. Se añade un sustrato para la enzima a cada pocillo y, tras una breve incubación, se añade un reactivo adicional para terminar la reacción. La intensidad del color desarrollado en cada pocillo se cuantifica en un lector de placas de microvaloración configurado para registrar la luz transmitida a una longitud de onda de 450 nm (Protocolo del kit: Protocolo recomendado por el fabricante usado, Cat. N.º MBS495369)

Procedimiento: Llevar todos los componentes del kit y las muestras a temperatura ambiente antes de su uso. Ensamblar el número requerido de tiras recubiertas en el portaplacas. Las tiras que no se usen de inmediato se pueden almacenar dentro de una bolsa de polietileno sellada con desecante de gel de sílice. Asegurarse de llenar los espacios restantes en el portaplacas con tiras sin recubrimiento para garantizar una transferencia de calor uniforme durante la incubación. Añadir por pipeteo 100 µl de tampón de muestra en cada pocillo. Añadir por pipeteo 25 µl de estándar o muestra en los pocillos respectivos. Se recomienda que todos los estándares y muestras se analicen por duplicado. Colocar un sellador de placas e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente (18-22 °C). Retirar el sellador de placas y realizar 3 ciclos de lavado con tampón de lavado de fuerza de trabajo enfriado\* (300 µl cada ciclo) usando un lavador automático de placas. Añadir por pipeteo 100 µl de conjugado de anticuerpo de concentración de trabajo en cada pocillo. Colocar un sellador de placas e incubar durante 4 horas más a 4 °C (2-8 °C). Retirar el sellador de placas y realizar 3 ciclos de lavado con tampón de lavado de fuerza de trabajo enfriado\* usando un lavador automático de placas. Añadir 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-22 °C) en la oscuridad. Añadir 100 µl de solución de parada a cada pocillo. Medir la transmisión de luz en un lector de placas de microvaloración ajustado a 450 nm y, si está disponible, con una sustracción de fondo medida a una DO de 620/650 nm. La figura 1 ilustra un gráfico que representa el perfil de conc. frente al tiempo de la insulina glargina (mU/l) de diferentes formulaciones.

Se encontró que la formulación de prueba Insulina glargina - MIRA 1 (glutión reducido/picolinato de cromo) más potenciador de permeación 1 (PA 1) presentaba una biodisponibilidad relativa del 9,25 % y la formulación de prueba Insulina glargina - PA 2 y MIRA 2 (ascorbato de sodio/óxido de vanadio) presentaba una biodisponibilidad relativa del 28,86 %.

#### CUANTIFICACIÓN DEL NIVEL DE LEUPROLIDA EN PLASMA DE PERRO USANDO EL KIT ELISA

**Formulación de prueba de referencia: LUPRODEX (Depósito):** Concentración: Cada vial contiene 3,75 mg de acetato de leuprolida; fecha de fabricación: noviembre de 2017; fecha de caducidad: octubre de 2020; condiciones de almacenamiento: Conservar a temperatura ambiente (por debajo de 25 °C). No congelar; N.º de viales: 1 vial con diluyente.

**Formulación de prueba FB: MIRA 5 (Tabla 15E) + PA 2 (Tabla 16H):** Aspecto: Cápsula de gelatina dura con tapa blanca y cuerpo blanco; concentración: Cada cápsula de 300 mg contiene 1,25 mg de acetato de leuprolida; fecha de fabricación: 21 de abril de 2018; fecha de caducidad: ND; condiciones de almacenamiento: Conservar a temperatura ambiente (por debajo de 25 °C); N.º de cápsulas de elementos de prueba: 70 cápsulas (1 frasco).

**Formulación de prueba H: MIRA 2 (Tabla 15F) + PA 2+3 (Tabla 16I):** Aspecto: Cápsula de gelatina dura con tapa blanca y cuerpo blanco; concentración: Cada cápsula de 300 mg contiene 1,25 mg de acetato de leuprolida; fecha de fabricación: 19 de abril de 2018; fecha de caducidad: ND; condiciones de almacenamiento: Conservar a temperatura ambiente (por debajo de 25 °C); N.º de cápsulas de elementos de prueba: 70 cápsulas (1 frasco).

**Tabla 34: Diseño del estudio**

|         | N.º de animales | Vía de administración | Formulación             | Dosis                                                            |
|---------|-----------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Grupo 1 | 2               | Subcutánea            | Referencia              | Leuprorelina, como etiqueta (un implante al inicio del programa) |
| Grupo 2 | 2               | Oral                  | Formulación H (MIRA 2)  | Leuprorelina 1,25 mg, una vez al día una cápsula durante 30 días |
| Grupo 3 | 2               | Oral                  | Formulación FB (MIRA 5) | Leuprorelina 1,25 mg, una vez al día una cápsula durante 30 días |

Durante el período de administración de la dosis, los perros (*Canis familiaris*, raza: Beagle) se mantuvieron en ayunas (se permitió agua) durante una noche durante aprox. 12 horas antes y 4 horas después de la administración de la dosis. Después de la administración del fármaco, se observaron signos clínicos adversos en todos los animales hasta 720 horas después de la dosificación. El peso corporal de los perros usados en el estudio se registró antes de la dosificación.

#### Puntos temporales de muestreo

Se extrajeron aproximadamente 2 ml de muestra de sangre de cada perro para la dosificación subcutánea y oral en los siguientes puntos temporales: 0, 1, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 240, 312, 360, 480 y 720 h (15 puntos en total) de la vena yugular en tubos recubiertos con K2EDTA etiquetados.

**Detalles del estudio ELISA**

Fuente: Cat. N.º S-1174 (Des-Gly10, D-Leu6, Pro-NHEt9)-LHRH (Leuprolida); protocolo del kit: Protocolo recomendado por el fabricante usado (Cat. N.º S1174)

**Resultados:** Se encontró que la formulación de prueba FB presentaba una biodisponibilidad relativa del 56,53 % y la formulación de prueba H presentaba una biodisponibilidad relativa del 16 %.

**CUANTIFICACIÓN DEL NIVEL DE LIRAGLUTIDA EN PLASMA DE PERRO USANDO EL KIT ELISA**

**Formulación de prueba I: Liraglutida:** Aspecto: Solución para inyección en una pluma precargada; concentración: 6 mg/ml; fecha de fabricación: 02/2017; fecha de caducidad: 07/2019; condiciones de almacenamiento: 2-8 °C; dosis: 0,6 mg/perro; vía: SC.

**Formulación de prueba II (FA): MIRA 5 (Tabla 15E) + PA 2 (Tabla 16F):** Dosis: 12 mg (una cápsula)/perro; vía: Oral.

**Formulación de prueba III (G): MIRA 5 (Tabla 15E) + PA 3+4 (Tabla 16G):** Dosis: 12 mg (una cápsula)/perro; vía: Oral

**Tabla 35: Diseño del estudio**

| Tabla 68. Diseño del estudio |                 |      |                       |                           |                           |
|------------------------------|-----------------|------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
|                              | N.º de animales |      | Vía de administración | Formulación               | Dosis                     |
| Período 1                    | 2               |      | Subcutánea            | Formulación I Liraglutida | 0,6 mg/perro              |
| 4-5 días de lavado           |                 |      |                       |                           |                           |
| Período 2                    | 2               | Oral | Formulación II FA     |                           | 12 mg (una cápsula)/perro |
| 4-5 días de lavado           |                 |      |                       |                           |                           |
| Período 3                    | 2               | Oral | Formulación III G     | 12 mg (una cápsula)/perro |                           |

No se observó mortalidad después de la administración subcutánea y oral de liraglutida. Los signos clínicos observados son normales. El peso corporal de los perros usados en el estudio se registró antes de la dosificación. Durante el período de administración de la dosis, los perros (*Canis lupus familiaris*, raza: Beagle) se mantuvieron en ayunas (se permitió agua) durante una noche durante aprox. 12 horas antes y 4 horas después de la administración de la dosis. Durante la dosificación, los puntos temporales de extracción de sangre fueron 0, 20, 30, 60, 120, 180, 240 y 480 minutos después de la dosis. Se extrajeron 2 ml de sangre de la vena yugular en tubos recubiertos con K2EDTA etiquetados. La glucosa se midió inmediatamente después de la extracción de sangre usando un glucómetro.

**Detalles del estudio ELISA**

Fuente: Krishgen BioSystems, Cat. N.º KBI5020 Ver 2.0

Protocolo del kit: Protocolo recomendado por el fabricante usado (Cat. N.º KBI5020) Ver. 2.0: (1) Determinar pocillos para el estándar diluido, el blanco y la muestra. Preparar 5 pocillos para puntos estándar, 1 pocillo para el blanco. Añadir 50 µl de cada una de las diluciones de estándar (léase Preparación de reactivos), blanco y muestras en los pocillos apropiados, respectivamente. Y a continuación añadir 50 µl de liraglutida-biotina a cada pocillo inmediatamente. Agitar la placa suavemente (se recomienda usar un agitador de microplacas). Cubrir con un sellador de placas. Incubar durante 1 hora a 37 °C. La liraglutida-biotina puede parecer turbia. Calentar a temperatura ambiente y mezclar suavemente hasta que la solución parezca uniforme. (2) Aspirar la solución y lavar con 350 µl de solución de lavado 1x en cada pocillo con una botella atomizadora, una pipeta multicanal, un dispensador múltiple o un autolavador, y dejar reposar durante 1-2 minutos. Retirar completamente el líquido restante de todos los pocillos colocando la placa sobre papel absorbente. Repetir 3 veces. Después del último lavado, eliminar cualquier resto de tampón de lavado por aspiración o decantación. Invertir la placa y secar con papel absorbente. (3) Añadir 100 µl de solución de trabajo de estreptavidina-HRP a cada pocillo. Incubar durante 30 minutos a 37 °C después de cubrirlo con el sellador de placas. (4) Repetir el proceso de aspiración/lavado un total de 5 veces como se realizó en la etapa 2. (5) Añadir 90 µl de solución de sustrato a cada pocillo. Cubrir con un nuevo sellador de placas. Incubar durante 10-20 minutos a 37 °C (no exceder de 30 minutos). Proteger de la luz. El líquido se volverá azul por la adición de la solución de sustrato. (6) Añadir 50 µl de solución de parada a cada pocillo. El líquido se volverá de color amarillo por la adición de la solución de parada. Mezclar el líquido golpeando ligeramente el lateral de la placa. Si el cambio de color no parece uniforme, golpear suavemente la placa para asegurar una mezcla completa. (7) Retirar cualquier gota de agua y huella digital de la parte inferior de la placa y confirmar que no haya burbujas en la superficie del líquido. A continuación, ejecutar el lector de microplacas y realizar la medición a 450 nm inmediatamente.

Se encontró que la formulación de prueba FA (Mira 5 más liraglutida + Labrasol) presentaba una biodisponibilidad relativa del 3,82 % y la formulación de prueba G (Mira 5 más liraglutida + Solutol + piperina) mostraba una

biodisponibilidad relativa del 3,57 %.

#### CUANTIFICACIÓN DE OCTREOTIDA EN PLASMA DE RATA USANDO EL KIT ELISA

- 5 **Formulación de prueba I: Octreotida:** Aspecto: Solución para inyección; concentración: 0,1 mg/ml; condiciones de almacenamiento: 2-8 °C; dosis: 10 µg/kg; vía: SC.

- 10 **Formulación de prueba II:** MIRA 3 (**Tabla 15C**) + PA 1 (**Tabla 16C**) a dosificar en el intestino delgado distal (íleon) a ratas S.D. anestesiadas; dosis: 144 µg/animal; vía: Intestino delgado distal (íleon). Durante el experimento, los animales no estuvieron en ayunas.

**Tabla 36: Diseño del estudio**

| Grupos        | n | Descripción de la dosis                         |
|---------------|---|-------------------------------------------------|
| Octreotida    | 3 | s.c.                                            |
| MIRA 3 + PA 1 | 3 | MIRA3 y PA1 mezcladas con tampón tris (2 ml/kg) |

- 15 No se observó mortalidad después de la administración subcutánea y en el intestino delgado distal (íleon) de octreotida. Los signos clínicos observados son normales. Durante la dosificación, los puntos temporales de extracción de sangre fueron 0, 7, 15, 30, 45, 60 y 90 min después de la dosis. - Se extrajeron 100 µl de sangre en un eppendorf precargado con Na-EDTA, procedente de una punción del seno retroorbitario. La sangre se centrifugó a 5000 rpm, 5 min, a 4 °C para obtener plasma.

#### 20 Detalles del estudio ELISA

**Fuente:** Peninsula Laboratories International, Inc, **Cat. N.º S-1341.0001**

- 25 **Protocolo de kit:** Protocolo recomendado por el fabricante usado (**Cat. N.º S-1341.0001**): En cada pocillo de la inmunoplate, añadir 25 µl de antisuero (en tampón EIA). Añadir 25 µl de tampón EIA a los pocillos en blanco; incubar a temperatura ambiente durante 1 hora; añadir 50 µl de estándar o muestra (en diluyente). No lavar la placa antes de la adición. Añadir 50 µl de diluyente a los pocillos en blanco; incubar a temperatura ambiente durante 2 horas. Las preincubaciones más cortas pueden dar como resultado una menor sensibilidad; rehidratar el trazador Bt (en tampón EIA) y añadir 25 µl/pocillo; incubar a 4 °C durante una noche. Para obtener los mejores resultados, volver a equilibrar a TA antes de continuar; lavar la inmunoplate 5 veces con 300 µl/pocillo de tampón EIA. Tener mucho cuidado con la contaminación cruzada entre los pocillos en el primer ciclo de lavado/dispensación. En cada ciclo de lavado, vaciar el contenido de la placa con un movimiento rápido de la muñeca, a continuación secar suavemente la parte superior del plato con toallas de papel. Dispensar 300 µl de tampón EIA en cada pocillo y agitar suavemente durante al menos unos segundos. El lavado a fondo es esencial. Añadir 100 µl/pocillo de estreptavidina-HRP. Golpear o centrifugar el vial de SAHRP para recoger todo el contenido líquido en el fondo del vial. Diluir 1/200 en tampón EIA (60 µl/12 ml) y agitar vorticialmente. Añadir 100 µl a todos los pocillos, incluyendo los blancos. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. Lavar la inmunoplate 5 veces (véase la etapa 7). Añadir 100 µl/pocillo de solución TMB. Añadir a todos los pocillos, incluyendo los blancos. Incubar a temperatura ambiente (normalmente de 30-60 minutos). Se puede leer el color azul en desarrollo a 650 nm y usar los datos para los cálculos. Terminar las reacciones añadiendo 100 µl de HCl 2 N por pocillo. Leer la absorbancia a 450 nm en diez minutos.

Se encontró que la formulación de prueba MIRA 3 (ácido úrico: vanadato de sodio) + PA 1 presentaba una biodisponibilidad relativa del 0,41 %.

#### 45 CUANTIFICACIÓN DE TERIPARATIDA EN PLASMA DE RATA USANDO EL KIT ELISA

**Formulación de prueba I:** Teriparatida; aspecto: Solución para inyección; concentración: 600 µg/2,4 ml; condiciones de almacenamiento: 2-8 °C; dosis: 10 µg/animal; vía: SC.

- 50 **Formulación de prueba II:** Se dosificó MIRA 4 (**Tabla 15D**) más PA1 (**Tabla 16D**) en el intestino delgado distal (íleon) a una dosis de 240 µg/animal en ratas anestesiadas; dosis: 240 µg/animal; vía: Intestino delgado distal (íleon).

**Formulación de prueba III:** Se dosificó MIRA 1 (**Tabla 15A**) más PA3 (**Tabla 16E**) en el intestino delgado distal (íleon) a una dosis de 240 µg/animal en ratas S.D. anestesiadas; dosis: 240 µg/animal; vía: Intestino delgado distal (íleon).

55

**Tabla 37: Diseño del estudio**

| Grupos        | n | Descripción de la dosis                         |
|---------------|---|-------------------------------------------------|
| Teriparatida  | 3 | s.c.                                            |
| MIRA 4 + PA 1 | 3 | MIRA4 y PA1 mezcladas con tampón tris (2 ml/kg) |
| MIRA 1 + PA 3 | 3 | MIRA1 y PA3 mezcladas con tampón tris (2 ml/kg) |

Durante el experimento, los animales no estuvieron en ayunas. No se observó mortalidad después de la administración subcutánea y en el intestino delgado distal (íleon) de teriparatida. Los signos clínicos observados son normales. Durante la dosificación, los puntos temporales de extracción de sangre fueron 0, 7, 15, 30, 45, 60 y 90 min después de la dosis. - Se extrajeron 100 µl de sangre en un eppendorf precargado con Na-EDTA, procedente de una punción del seno retroorbitario. La sangre se centrifugó a 5000 rpm, 5 min, a 4 °C de temperatura para obtener plasma.

#### Detalles del estudio ELISA

10 **Fuente:** Immutopics **Cat. N.º** 60-3900.

**Protocolo de kit:** Protocolo recomendado por el fabricante usado (**Cat. N.º** 60-3900): Colocar un número suficiente de tiras recubiertas de estreptavidina en un soporte para ejecutar estándares de PTH, controles y muestras desconocidas; añadir por pipeteo 150 µl de estándar, control o muestra en el pocillo designado o mapeado. Congelar los estándares y controles restantes tan pronto como sea posible después de su uso; añadir por pipeteo 50 µl de la solución de anticuerpo de trabajo que consiste en 1 parte de anticuerpo HRP y 1 parte de anticuerpo biotinilado en cada pocillo; cubrir la placa con un sellador de placas y a continuación cubrir con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz; incubar la placa a temperatura ambiente durante tres (3) horas en un rotador horizontal ajustado a 180-220 RPM; retirar el papel de aluminio y el sellador de placas. Con un lavador automático de placas de microvaloración, aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar cada pocillo cinco veces dispensando 350 µl de solución de lavado de trabajo en cada pocillo y a continuación aspirando completamente el contenido. También se puede usar un dispositivo de aspiración adecuado; añadir por pipeteo 200 µl de sustrato ELISA HRP en cada uno de los pocillos; volver a cubrir la placa con el sellador de placas y papel de aluminio. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un rotador horizontal ajustado a 180-220 RPM; retirar el papel de aluminio y el sellador de placas. Leer la absorbancia a 620 nm (véase la nota) en 5 minutos en un lector de placas de microvaloración frente a los pocillos estándar de 0 pg/ml como blanco; añadir por pipeteo inmediatamente 50 µl de solución de parada ELISA en cada uno de los pocillos. Mezclar en un rotador horizontal durante 1 minuto; leer la absorbancia a 450 nm en 10 minutos en un lector de placas de microvaloración frente a un blanco de reactivo de 200 µl de sustrato y 50 µl de solución de parada; si la corrección de longitud de onda dual está disponible, configurar la longitud de onda de medición en 450 nm y la longitud de onda de referencia con respecto a la absorbancia usada en la etapa n.º 9.

Se encontró que la formulación de prueba MIRA 4 (ascorbato de sodio: gluconato de manganeso) más PA 1 presentaba una biodisponibilidad relativa del 0,89 %. La formulación de prueba MIRA 1 (glutación reducido/picolinato de cromo) más PA3 mostró una biodisponibilidad relativa del 0,89 %.

#### Ventajas de la invención

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que puede superar las deficiencias asociadas con las composiciones informadas de la técnica anterior.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para el suministro eficaz de un péptido.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para el suministro oral de un péptido.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que proporciona protección, al menos en parte, al péptido frente a la degradación proteolítica tras la ingestión oral.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que aumenta la biodisponibilidad del péptido.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que es segura.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que es rentable, fácil de preparar y tiene una larga vida útil.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que proporciona protección, al menos en parte, al péptido frente a la degradación proteolítica tras la ingestión oral.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que aumenta la biodisponibilidad del péptido.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que es segura.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que es rentable, fácil de preparar y tiene una larga vida útil.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

- 5 una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un péptido; y  
una cantidad farmacéuticamente aceptable de una combinación de:
- (a) al menos un metal en forma de cualquiera de, o una combinación de, una sal del mismo y un complejo del mismo; y
- 10 (b) al menos un agente reductor,  
en donde, dicho al menos un metal se selecciona de cualquiera de, o una combinación de:  
óxido de vanadio (V), vanadato de sodio, sulfato de vanadio, sulfato de vanadilo, biguanida de vanadio, bis(maltolato) de oxovanadio (IV), acetato de vanadio, picolinato de vanadilo, citrato de vanadilo, picolinato de cromo, polinicotinato de cromo, nicotinato de cromo, cloruro de cromo, acetato de cromo, gluconato de
- 15 manganeso, sulfato de manganeso, permanganato de potasio y cloruro de manganeso.

2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicho al menos un metal se selecciona de cualquiera de, o una combinación de: óxido de vanadio (V), vanadato de sodio y sulfato de vanadio, y en donde la composición farmacéutica comprende dicho al menos un metal en una cantidad que varía de 0,01 mg a 15 mg por

20 dosis unitaria.

3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicho al menos un metal se selecciona de cualquiera de, o una combinación de: óxido de vanadio (V), vanadato de sodio y sulfato de vanadio.

25 4. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicho al menos un metal se selecciona de cualquiera de, o una combinación de: picolinato de cromo y cloruro de cromo, y en donde la composición farmacéutica comprende dicho al menos un metal en una cantidad que varía de 0,02 mg a 0,5 mg por dosis unitaria.

30 5. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicho al menos un metal se selecciona de cualquiera de, o una combinación de: picolinato de cromo y cloruro de cromo.

6. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicho al menos un metal se selecciona de cualquiera de, o una combinación de: permanganato de potasio y gluconato de manganeso, y en donde la composición farmacéutica comprende dicho al menos un metal en una cantidad que varía de 0,1 mg a 10 mg por dosis unitaria.

35

7. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicho al menos un metal se selecciona de cualquiera de, o una combinación de: gluconato de manganeso y permanganato de potasio.

40 8. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicho al menos un péptido presenta un peso molecular igual o inferior a 60 kDa.

9. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicho al menos un péptido se selecciona de un grupo que comprende: insulina, un análogo de insulina, insulina lispro, insulina PEGlispro, insulina aspart, insulina glulisina, insulina glargina, insulina detemir, insulina NPH, insulina degludec, insulina humana B29K(N(ε)hexadecanodioil-γ-L-Glu) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)octadecanodioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) desB30, insulina humana B29K(N(ε)octadecanodioil-γ-L-Glu) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)eicosanodioil-γ-L-Glu) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)octadecanodioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)eicosanodioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) A14E B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)eicosanodioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) A14E B16H B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)hexadecanodioil-γ-L-Glu) A14E B16H B25H desB30, insulina humana B29K(N(ε)eicosanodioil-γ-L-Glu-OEG-OEG) A14E B16H B25H desB30, GLP-1, un análogo de GLP-1, un análogo de GLP-1 acilado, un análogo de GLP-1 diacilado, semaglutida, liraglutida, exenatida, lixizenatida, un agonista dual del receptor GLP-1 y el receptor de glucagón, amilina, un análogo de amilina, pramlintida, un análogo de somatostatina, octreotida, lanreotida, pasireotida, goserrelina, busserrelina, leptina, un análogo de leptina, metreleptina, péptido YY, un análogo del péptido YY, glatiramer, leuprolida, teriparatida, desmopresina, hormona del crecimiento humano, un análogo de la hormona del crecimiento humano, un antibiótico glucopeptídico, un antibiótico peptídico no ribosómico cíclico o policíclico glucosilado, vancomicina, teicoplanina, telavancina, bleomicina, ramoplanina, decaplanina, bortezumib, cosintropina, gonadotropina coriónica, menotropina, sermorelina, hormona liberadora de hormona luteinizante, somatropina, calcitonina, calcitonina de salmón, pentagastrina, oxitocina, neresitida, anakinra, enfuvirtida, pegvisomant, dornasa alfa, lepirudina, anidulafungina, eptifibatida, interferón alfacon-1, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta-1a, interferón beta-1 b, interferón gamma-1 b, peginterferón alfa-2a, peginterferón alfa-2b, peginterferón beta-1a, fibrinolisisina, vasopresina, aldesleucina, epoyetina alfa, darbepoyetina alfa, epoyetina beta, epoyetina delta, epoyetina omega, epoyetina zeta, filgrastim, interleucina-11, ciclosporina, glucagón, urocina, viomicina, hormona liberadora de tirotropina, leucina-encefalina, metionina-encefalina, sustancia P, hormona adrenocorticotrópica, hormona paratiroidea y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

45

50

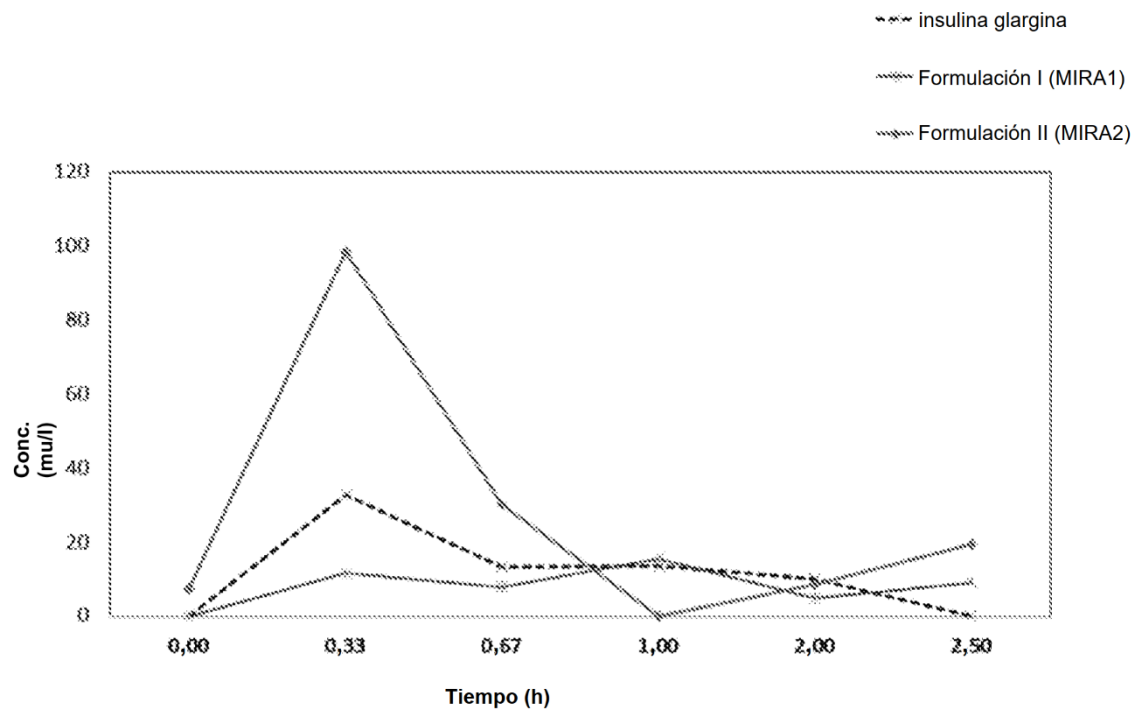
55

60

65

10. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicho al menos un péptido y dicho al menos un metal en forma de cualquiera de, o una combinación de, una sal del mismo y un complejo del mismo están presentes en forma físicamente separada en dicha composición farmacéutica.
- 5 11. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicho al menos un péptido y dicho al menos un metal en forma de cualquiera de, o una combinación de, una sal del mismo y un complejo del mismo están presentes en compartimentos separados.
- 10 12. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica está presente en forma de cualquiera de una cápsula en cápsula y un comprimido en cápsula.
13. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicho al menos un agente reductor se selecciona de cualquiera de, o una combinación de, ácido ascórbico, glutatión reducido, cisteína, ácido úrico, azúcar reductor, gliceraldehído,  $\alpha$ -tocoferol, vitamina A, ácido  $\alpha$ -lipoico, ácido dihidro- $\alpha$ -lipoico, glucosa, galactosa, lactosa, maltosa, compuesto que contiene tiol, un tiómero y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 15 14. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica comprende el al menos un agente reductor en una cantidad que varía de 1 mg a 1000 mg por dosis unitaria.
- 20 15. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica se formula como una forma farmacéutica oral sólida y una forma farmacéutica oral líquida, con la condición de que cuando dicha composición farmacéutica se formule como una forma farmacéutica oral líquida, la composición farmacéutica comprenda agua en una cantidad inferior al 5 % v/v.

**Tiempo frente a concentración de glargina (mU/l) en diferentes grupos**



**FIG. 1**