

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 584**

21 Número de solicitud: 201631221

51 Int. Cl.:

A61K 9/52

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.09.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.04.2018

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070617

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**ALONSO FERNANDEZ, Maria Josefa;
NIU, Zhigao y
SANTANDER ORTEGA, Manuel Jesus**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASANCHEZ, Susana

54 Título: **NANOPARTICULAS CON INTERIORES PROTEGIDOS, Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS**

57 Resumen:

Nanopartículas con interiores protegidos, y métodos de uso de las mismas. La presente invención se refiere en general a partículas, incluyendo nanopartículas, por ejemplo, para la administración de fármacos u otras aplicaciones. Ciertos aspectos de la presente invención se dirigen generalmente a partículas, tales como nanopartículas, que comprende una parte interior y un recubrimiento. La parte interior puede contener insulina u otras moléculas terapéuticas para la administración a un ser vivo. En algunos casos, las moléculas pueden estar electrostáticamente complejadas con un péptido de carga opuesta, tal como un oligoarginina, u otras especies. Las especies típicamente están cargadas positivamente, por ejemplo, para moléculas terapéuticas ionizadas negativamente a pH neutro. Las moléculas terapéuticas pueden ser también solubles en agua. En algunos casos, el péptido puede conjugarse con una porción hidrófoba, tales como colesterol, ácido láurico, o una cadena de ácido graso.

ES 2 664 584 A1

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas con interiores protegidos, y métodos de uso de las mismas

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se refiere en general a partículas, incluyendo nanopartículas, por ejemplo, para la administración de fármacos u otras aplicaciones.

ANTECEDENTES

El acceso de los fármacos a diferentes zonas del organismo es un gran reto. Por ejemplo, las barreras asociadas a la modalidad de administración oral hacen que muchos fármacos no se puedan administrar por vía oral.. Estas barreras incluyen la degradación mediada por pH y por enzimas a través de todo el tracto gastrointestinal (GIT), así como el transporte muy limitado a través de la mucosa intestinal. Por lo tanto, en la actualidad, la administración de fármacos, por ejemplo, por vía oral sigue siendo un gran reto.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a partículas, incluyendo nanopartículas, por ejemplo, para la administración oral de fármacos u otras aplicaciones. La materia objeto de la presente invención implica, en algunos casos, productos relacionados entre sí, soluciones alternativas a un problema particular, y/ o una pluralidad de diferentes usos de uno o más sistemas.

En un aspecto, la presente invención se dirige en general a una composición. De acuerdo con un conjunto de realizaciones, la composición incluye una partícula que comprende una porción interior rodeada por un recubrimiento. En algunos casos, la parte interior comprende un complejo de una molécula cargada negativamente, y un péptido cargado positivamente que comprende al menos 3 residuos de arginina y unido a una porción hidrófoba. En ciertos casos, el recubrimiento comprende un poliácido y / o un polialcohol.

En otro conjunto de realizaciones, la composición comprende una nanopartícula que comprende una porción interior rodeada por una cubierta, donde la parte interior comprende un complejo de insulina y una molécula que comprende una porción de octaarginina. En algunas realizaciones, el recubrimiento comprende un copolímero de ácido poliglutámico y poli (etilenglicol).

La composición, en otro conjunto de realizaciones, está dirigida a una partícula que comprende una porción interior rodeada por un recubrimiento. En algunos casos, la porción interior comprende un complejo de un péptido con carga negativa y una molécula que comprende una porción de octaarginina vinculada a una parte hidrófoba. En ciertas realizaciones, el recubrimiento comprende ácido poliglutámico y poli(etilenglicol).

En otro conjunto de realizaciones, la composición comprende una partícula que comprende una porción interior rodeada por un recubrimiento. En algunas realizaciones, la porción interior comprende un complejo de un péptido cargado negativamente y un péptido cargado positivamente que comprende al menos 3 residuos de arginina. En ciertos casos, el recubrimiento comprende poli (etilenglicol).

En el presente documento se dan a conocer varios métodos para la administración a un ser vivo de un compuesto para la prevención o tratamiento de una afección particular. Debe entenderse que en cada uno de los aspectos de la invención, la invención incluye específicamente, también, el compuesto para uso en el tratamiento o prevención de una afección particular, así como el uso del compuesto para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de aquella condición particular.

En otro aspecto, la presente invención abarca métodos de fabricación de una o más de las realizaciones descritas en el presente documento, por ejemplo, una nanopartícula. En otro aspecto adicional, la presente invención abarca métodos de uso de una o más de las realizaciones descritas en el presente documento, por ejemplo, una nanopartícula.

Otras ventajas y características novedosas de la presente invención se presentan en la descripción de diversas realizaciones no limitantes de la invención que se detallan a continuación, así como en las figuras adjuntas. En los casos en que la presente memoria y un documento incorporado por referencia incluyen una descripción en conflicto y/ o inconsistente, la presente memoria es la que se debe de tener en cuenta. Si dos o más documentos incorporados por referencia incluyen una descripción en conflicto y / o incoherente con respecto a la otra, entonces el documento que tenga la fecha de vigencia posterior es el que se tendrá en cuenta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Realizaciones no limitantes de la presente invención se describirán a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas, que son esquemáticas y no están destinadas a ser dibujos a

escala. En las figuras, cada componente idéntico o casi idéntico ilustrado se representa típicamente por un solo número. Por motivos de claridad, no todos los componentes de cada realización se detallan en cada figura, ni cada componente de cada realización de la invención cuando la ilustración no es necesaria para permitir que los expertos en la técnica comprendan la invención. En las figuras:

Las Figuras 1A-1D ilustran ciertas propiedades de las partículas producidas en diversas realizaciones de la invención;

Figuras 2A-2B ilustran la estructura de ciertos polímeros de acuerdo con algunas realizaciones de la invención;

10 Figuras 3A-3C ilustran la asociación de péptidos, en algunas realizaciones de la invención;
Figura 4 ilustra la preparación de una partícula en una forma de realización de la invención;

Figuras 5A-5C ilustran tamaños de partículas de acuerdo con algunas realizaciones de la invención;

15 Figuras 6A-6B ilustran la estabilidad coloidal, de acuerdo a ciertas realizaciones de la invención;

Figura 7 ilustra la estabilidad frente a la proteólisis, en otra realización de la invención;

Figura 8 ilustra la viabilidad celular, en otra realización de la invención;

Figuras 9A-9B ilustran el transporte de insulina, en otras realizaciones de la invención;

20 Figuras 10A-10C ilustran la respuesta de forskolina en determinadas formas de realización de la invención;

Figuras 11A-11B ilustran el transporte a través de modelos epiteliales de acuerdo con algunas realizaciones de la invención;

Figura 12 ilustra una partícula de acuerdo con otra realización adicional de la invención;

25 Figura 13 ilustra gel de agarosa de ciertos complejos de otra realización de la invención;

Figuras 14A-14B ilustran la estabilidad de ENCPs tras la incubación en SIF a 37°C; (a) Tamaño y PDI; (b) media de la tasa de recuento (dCR).

Las figuras 15A-15B muestran la interacción de los nanocomplejos de octarginina-insulina recubiertos de poli(ácido glutámico-polietilenglicol) (color verde) con el tejido intestinal

humano (criosección observada mediante microscopía laser; vista ortogonal). El tejido humano fue colocado en una cámara “Ussing” sobre la que se incorporó la suspensión de nanocomplejos en los que la insulina se marcó con el isotiocianato de fluoresceína (FITC) (color verde). Los núcleos de las células aparecen en color azul (imagen mostrada con
5 permiso P. Artursson and P. Lundsquik, UU, Suecia).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere en general a partículas, incluyendo nanopartículas, por ejemplo, para la administración de fármacos u otras aplicaciones. Ciertos aspectos de la
10 presente invención se dirigen generalmente a partículas, tales como nanopartículas, que comprende una porción interior y un recubrimiento. La porción interior puede contener insulina u otras moléculas terapéuticas para la administración a un ser vivo. En algunos casos, las moléculas pueden estar complejadas electrostáticamente con un péptido de carga opuesta, tal como una oligoarginina, u otras especies. Las moléculas terapéuticas pueden
15 ser solubles en agua. En algunos casos, el péptido puede conjugarse con una porción hidrófoba, tal como colesterol, ácido láurico, o una cadena de ácido graso. Esta modificación hidrófoba puede no sólo facilitar la formación de complejos con la molécula terapéutica, sino también la estabilidad del complejo resultante. El complejo está típicamente rodeado por un recubrimiento, que lo puede proteger. Por ejemplo, el
20 recubrimiento puede incluir polímeros tales como ácido poliglutámico y poli (etilenglicol). En algunos casos, el complejo recubierto puede facilitar el transporte al interior de células, por ejemplo, del epitelio de la mucosa intestinal. Otros aspectos de la invención están generalmente dirigidos a métodos para la fabricación o el uso de tales composiciones, kits que incluyen tales composiciones, o similares.

Un aspecto de la presente invención se describe en la Fig. 12. En esta figura, se muestra la
25 partícula 10. En algunos casos, la partícula 10 es una nanopartícula, por ejemplo, con un diámetro medio de menos de aproximadamente 1 micrómetro (por ejemplo, menos de aproximadamente 200 nm, u otros diámetros como se discute en el presente documento). En esta figura, la partícula 10 está idealizada generalmente como esférica, aunque en otras
30 realizaciones, la partícula también puede ser no esférica.

La partícula 10 incluye una porción interior 20 y una parte exterior o recubrimiento 30, que puede rodear regular o irregularmente la porción interior 20. El recubrimiento 30 puede proteger la parte interior 20, por ejemplo, del entorno externo. En algunos casos, el recubrimiento 30 puede servir para facilitar la orientación de las partículas 10 a una ubicación deseada, por ejemplo, a ciertas células en el tracto gastrointestinal.

La parte interior 20 de la partícula 10 puede contener la insulina 25, y / o otros péptidos adecuados o moléculas, por ejemplo, aquellos para ser administrados a un ser vivo. Se debe entender que la insulina se utiliza aquí a modo de modelo de fármaco peptídico; otras moléculas activas adecuadas para la administración se discuten con más detalle a continuación. La insulina 25, en este ejemplo, se compleja con una especie con carga opuesta 27. Por ejemplo, la especie de carga opuesta 27 puede ser un péptido, tal como octaarginine (R8), que tiene múltiples residuos de aminoácidos que son capaces de interactuar electrostáticamente con la insulina 25 debido a su carga opuesta.

Las especies 27 pueden estar modificadas con un residuo hidrofóbico. Por ejemplo, como se muestra en la Fig. 12 es la parte hidrófoba 29 la que está unida covalentemente a las especies 27. Por ejemplo, la parte hidrófoba 29 puede ser colesterol, ácido láurico, o una cadena de ácido graso; otros ejemplos se discuten en más detalle a continuación. Sin desear una limitación por ninguna teoría, se cree que la combinación de la insulina 25, las especies opuestamente cargadas 27, y la porción hidrófoba 29 sirve para crear un complejo sorprendentemente estable que se mantiene unido por fuerzas hidrofóbicas y / o electrostáticas dentro de la porción interior 20. Por ejemplo, dichas porciones hidrófobas pueden facilitar la interacción de diferentes porciones hidrófobas de diferentes moléculas entre sí y / o con insulina 25, promoviendo así la estabilidad. Por el contrario, los complejos similares que carecen de tales porciones hidrófobas típicamente resultan en complejos grandes, más heterogéneos y que son más inestables, debido a la falta de interacciones hidrofóbicas que sirven para estabilizar el complejo.

En la Fig. 12, rodeando la parte interior 20 está el recubrimiento 30. En algunos casos, el recubrimiento 30 puede contener un polímero que protege la parte interior, por ejemplo, contra el entorno externo 40 que rodea la partícula 10. Por ejemplo, el entorno externo puede ser acuoso, o un entorno ácido en algunos casos. En algunas realizaciones, el recubrimiento puede incluir materiales biocompatibles y / o biodegradables. Además, en algunos casos, el recubrimiento 30 se puede seleccionar para facilitar el transporte a través

de las células, por ejemplo, a través de las células del epitelio intestinal, y / o el recubrimiento 30 contiene restos que facilitan el transporte a través de las células. Ejemplos de recubrimientos adecuados incluyen, pero no se limitan a, poliácidos y polialcoholes, tales como poli (etilenglicol), ácido poli glutámico, ácido (poli láctico), 5 ácido hialurónico, así como combinaciones de estos y / u otros materiales o polímeros. Otros ejemplos se discuten con más detalle a continuación.

El ejemplo anterior es un ejemplo no limitante de una realización de la presente invención generalmente dirigida a nanopartículas, por ejemplo, para la administración oral. Sin embargo, otras realizaciones son también posibles. De acuerdo con ello, de modo más 10 general, varios aspectos de la invención se dirigen a diversos sistemas y métodos de obtención de partículas para la administración oral, u otras aplicaciones.

Por ejemplo, se debe entender que el término "partículas", como se usa aquí, no se refiere necesariamente a partículas esféricas, ni tienen porqué ser totalmente sólidas. En algunos casos, por ejemplo, las partículas pueden estar compuestas de materiales relativamente más 15 blandos o deformables, o incluso geles, líquidos, etc., en algunas formas de realización. Las partículas, en algunas realizaciones, son nanopartículas, es decir, tienen un diámetro medio de menos de 1 micrómetro aproximadamente. En algunos casos, sin embargo, las partículas pueden ser más pequeñas, por ejemplo, con un diámetro medio de menos de 800 nm aproximadamente, menos de 600 nm aproximadamente, menos de 500 nm 20 aproximadamente, menos de 400 nm aproximadamente, menos de 300 nm aproximadamente, menos de 200 nm aproximadamente, o menos de 100 nm aproximadamente. La partícula puede ser no esférica; por ejemplo, la partícula puede ser elipsoide o de forma irregular. El "diámetro medio" (o "diámetro característico") de una partícula no esférica se puede tomar como el diámetro de una esfera perfecta que tiene el 25 mismo volumen que la partícula no esférica.

Además, en algunas realizaciones, más de una partícula o tipo de partícula está presente, y las partículas pueden tener cada una independientemente las mismas o diferentes composiciones, tamaños, formas, diámetros promedio, etc. El diámetro medio de una pluralidad de partículas puede ser tomado como el promedio numérico de los diámetros 30 medios de cada una de las partículas, y el diámetro medio de la pluralidad de partículas puede incluir los diámetros mencionados anteriormente. Un experto en la materia conocerá

las técnicas adecuadas para la determinación de tamaños de partículas, por ejemplo, usando técnicas de dispersión de luz láser o de microscopía.

Como se ha señalado, las partículas pueden incluir una porción interior y un recubrimiento. La porción interior puede estar simétricamente o asimétricamente situada dentro de la

5 partícula. A veces, más de una porción interior puede estar presente. La porción interior incluye típicamente un péptido u otra molécula terapéutica para ser liberada. En algunos casos, la porción interior puede ser, por ejemplo, insulina humana, insulina recombinante, insulina de cerdo, o similares. En algunos casos, los análogos de insulina se pueden utilizar en lugar de (o además de) insulina, tales como insulina lispro, asparat insulina, insulina

10 glulisina, detemir insulina, insulina degludec, insulina glargina, insulina NPH, etc. El péptido u otra molécula puede tener cualquier tipo de actividad, tales como anti-dolor, anti-obesidad, anti-inflamatorio, etc. Los ejemplos de otras moléculas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, proteínas y péptidos, tales como análogos de GLP-1 (por ejemplo, exenatida, liraglutida , lixisenatide, albiglutida, dulaglutida, taspoglutida,

15 semaglutida), análogos de GLP-2 (por ejemplo teduglutida), somatropina, anakinra, dornasa alfa, proteínas de suero de leche ácida, SPARC o proteínas osteonectina, proteína C, subfamilia queratina A, la hormona del crecimiento humano o somatotropina, gonadotropina, angiopoyetina, factores estimulantes de colonias (factor estimulante de colonia de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante

20 de colonias de macrófagos granulocito), factor de crecimiento epidérmico, eritropoyetina, factor de crecimiento de fibroblastos, la familia GDNF de ligandos, factor de crecimiento-9 de diferenciación, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de hepatoma derivados, los factores de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de migración estimulante, proteínas estimulantes de macrófagos,

25 neurotrofinas, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento derivado de plaquetas, trombopoyetina, factores de crecimiento transformantes, factores de crecimiento endotelial vascular, quimiocinas, interferones (por ejemplo, interferón alfa IIb, interferón alfacon-1, interferón alfa-n3, etc.), interleuquinas, linfoquinas, factores de necrosis tumoral (por ejemplo, factor de necrosis tumoral-alfa), proteínas de fusión de Fc, péptidos y

30 derivados contulakin-G, antiinflaminas, péptidos opioides, lipopéptidos (por ejemplo surotomycin), antígenos, como el tétanos y la difteria toxoide, hepatitis B y anticuerpos monoclonales, como elotuzumab, panitumumab, anticuerpos anti-TNF alfa, etc.

En algunas realizaciones, la molécula para ser liberada incluye una molécula cargada (por ejemplo, tiene una carga negativa predominante a pH 7). Estas moléculas se pueden complejar con una especie con carga opuesta. Tales complejos a menudo se mantienen juntos o estabilizados a través de interacciones no covalentes entre moléculas, tales como

5 interacciones iónicas, fuerzas mediadas por fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, o similares. Por ejemplo, la insulina, que está cargada negativamente a pH neutro, puede interactuar electrostáticamente con especies cargadas positivamente. Además, la insulina y / o otras moléculas terapéuticas pueden interactuar con la región hidrófoba ligada a especies de carga opuesta, cuando la formación de complejos se

10 produce a un pH cerca del punto isoeléctrico de la insulina u otra molécula, por ejemplo, cuando hay un equilibrio de cargas positivas y negativas y su solubilidad disminuye. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la porción interior puede incluir una especie cargada positivamente complejada con la insulina (u otra molécula). Una especie con carga positiva puede incluir un péptido que tiene uno o más residuos cargados positivamente, tales como

15 arginina, lisina, o histidina. Las cargas formales de una molécula pueden ser determinadas a pH neutro.

Como ejemplo no limitante, en un conjunto de realizaciones, los complejos de insulina con un péptido de carga opuesta comprenden 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más residuos de arginina. En algunos casos, el péptido puede ser un péptido homoarginina, es decir, que

20 contiene sólo residuos de arginina, aunque en otros casos, el péptido también puede incluir otros residuos. En algunas realizaciones, el péptido tiene entre 3 y 12, o entre 6 y 10 residuos. Los ejemplos no limitantes de péptidos adecuados incluyen triarginine (R_3 o RRR), hexaarginina (R_6 o RRRRRR), octaarginine (R_8 o RRRRRRRR), o decaarginine (R_{10} o RRRRRRRRRR). Como se discutió anteriormente, estos péptidos son solamente a

25 modo de ejemplo; otros péptidos cargados positivamente incluyen, pero no se limitan a, péptidos de homolisina (por ejemplo, K6, K8, K10, etc.), péptidos homohistidina (por ejemplo, H6, H8, H10, etc.), péptidos que comprenden una o más arginina, lisina, o histidina, y similares. Para los péptidos de este tipo, los residuos dentro de los péptidos pueden ser todos isómeros D, isómeros L, o cualquier combinación adecuada de isómeros

30 D- y L-. Cuando no se especifica ningún isómero en un péptido, se debe entender que cualquier isómero puede estar independientemente presente en cada residuo en diversas

realizaciones. En una realización, todos los isómeros que están presentes son los isómeros de origen natural (L-).

En algunos casos, el péptido puede ser relativamente rico en lisina (por ejemplo, al menos 10% de los residuos de aminoácidos son lisina), tales como MPG, Pep-1, o similares. En algunos casos, el péptido puede ser relativamente rico en arginina (por ejemplo, al menos 10% de los residuos de aminoácidos son arginina), tales como TAT (47-57) YGRKKRRQRRR; VIH-1 Tat (48-60) GRKKRRQRRRPPQ; Penetratin RQIKIYFQNRMRMKWKK, y derivados tales como PenArg, Penlys; VP22 (267-301) DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE; recubrimiento viral “flockhouse”(35-49) RRRRNRTNRNRRRVR (FHV); rico en histidina nona-arginina (HR9) C-5H-R9-5H-C; pas nona-arginina (PR9) FFLIPKG-R9; CADY * péptidos Ac-GLWRALWRLLRSLWRLWRA-cisteamida; o similar.

Debe entenderse, sin embargo, que la invención no se limita solamente a péptidos cargados. Otras moléculas cargadas también se pueden utilizar en algunas realizaciones de la invención, por ejemplo, en adición a y/ o en lugar de los péptidos cargados. Por ejemplo, en un conjunto de realizaciones, puede ser utilizado un polinucleótido de carga negativa. Ejemplos de tales polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, homopolímeros de nucleótidos (por ejemplo, poliadenosina, poliguanosina, policitidina, o politimidina, etc.), o polinucleótidos que comprenden más de una base. Otros ejemplos no limitantes de polinucleótidos adecuados incluyen ADN, antisentido, oligonucleótidos de “splice-switching”, siRNA, miRNA, aptámeros, oligonucleótidos inmunoestimuladores, dsRNA, etc. En diversas realizaciones los polinucleótidos pueden ser de cualquier longitud adecuada, por ejemplo, al menos 3, al menos 5, al menos 10, al menos 30, al menos 50, al menos 100, al menos 500, o al menos 1000 nucleótidos. Los polinucleótidos pueden incluir sólo nucleótidos de origen natural, o en algunos casos, los polinucleótidos pueden incluir nucleótidos de origen no natural. Por ejemplo, en un ejemplo, el polinucleótido puede incluir poli (I:C), que es un ARN de doble cadena no coincidente con una hebra que es un polímero de ácido inosínico, y el otro un polímero de ácido citidílico.

Además, en ciertas realizaciones, la especie puede incluir una molécula hidrófoba. Por ejemplo, la especie puede ser un péptido ligado a una molécula hidrófoba adecuada. Sin desear que esté ligado a ninguna teoría, se cree que la parte hidrófoba puede promover la formación y la estabilidad de los complejos. Por ejemplo, debido a su naturaleza hidrófoba,

diversas porciones hidrófobas de diferentes moléculas pueden interactuar unos con otros dentro de la parte interior, promoviendo así la estabilización del complejo. En algunos casos, la insulina u otras moléculas a administrar también pueden contener una o más regiones hidrófobas, que pueden interactuar con dichas porciones hidrófobas, por lo tanto también promueven la estabilidad. En algunos casos, las porciones hidrófobas pueden ser porciones que se repelen en el agua cuando están en forma aislada.

Los ejemplos no limitantes de porciones hidrófobas incluyen esteroides tales como colesterol o ácidos grasos tales como ácido láurico (ácido n-dodecanoico, C₁₂). En algunas realizaciones, la porción hidrófoba puede estar vinculada, por ejemplo, covalentemente, a las especies de carga opuesta y / o a la molécula que va a ser liberada. Por ejemplo, si la especie es un péptido, tal como triarginina, hexaarginina, octaarginine u otros péptidos discutidos en este documento, una porción hidrófoba se puede unir covalentemente al extremo C-terminal y / o al extremo N-terminal del péptido. La especie también puede ser un polinucleótido, u otras moléculas cargadas tales como las discutidas en el presente documento.

Ejemplos de los esteroides que se pueden utilizar, además de (o en lugar de) colesterol incluyen, pero no se limitan a, lanosterol, desmosteroldihidrolanosetrol, dihidrocolesterol, estigmasterol, sitosterol, campesterol, brasicasterol, zimosterol, ergosterol, o similares. Otros ácidos grasos que pueden utilizarse en determinadas realizaciones incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos ramificados o no ramificados, o ácidos grasos saturados o insaturados, tales como ácido n-decanoico, ácido n-undecanoico, ácido n-tridecanoico ácido, o ácido n-tetradecanoico. Ejemplos adicionales no limitantes de ácidos grasos insaturados adecuados incluyen ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido eláidico, ácido vaccénico, ácido linoleico, ácido linoeláidico, ácido alfa-linolénico (ALA), ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, erúcico ácido, ácido docosahexaenoico, etc. Ejemplos adicionales no limitantes de ácidos grasos saturados adecuados incluyen ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido cerótico, o similares. Aún otros ejemplos de ácidos grasos incluyen ácidos grasos de cadena corta (por ejemplo, menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, o 3 carbonos en la porción de ácido graso), tales como ácido butírico y ácido isobutírico, ácidos valérico y isovalérico, o similares. Un experto en la materia tendrá en cuenta las técnicas para unir o vincular una

porción hidrófoba adecuada a una especie con carga opuesta y/ o a una molécula para ser administrada. Por ejemplo, las reacciones de acoplamiento o reacciones de protección con Fmoc se pueden usar en algunas formas de realización para unir la porción hidrófoba al péptido de carga opuesta.

- 5 Ejemplos adicionales no limitativos de porciones hidrófobas incluyen cicloalcanos (por ejemplo, ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano, etc.), sales biliares, terpenoides, terpenos, restos de derivados de terpeno, y vitaminas lipofílicas como las vitaminas A, D, E, K , y derivados de los mismos. Ejemplos no limitantes de sales biliares incluyen sales biliares no derivatizadas tales como colato, desoxicolato, 10 quenodesoxicolato, y ursodesoxicolato, etc. Ejemplos no limitantes de sales biliares derivatizadas incluyen taurocolato, taurodesoxicolato, tauroursodesoxicolato, tauroquenodeoxicolato, glicolato, glicodesoxicolato, glycoursodeoxicolato, glicoquenodeoxicolato , taurolitocolato, y glicolitocolato, etc.

- La porción interior está típicamente rodeada por un recubrimiento, que puede rodear 15 regular o irregularmente la porción interna de la partícula. En algunos casos, el recubrimiento está sustancialmente libre de los materiales que forman la parte interior, por ejemplo, especies cargadas tales como el péptido u otra molécula para ser cedida (por ejemplo, insulina) y/ o una especie con carga opuesta (por ejemplo, R_8 u otros péptidos como se discutió anteriormente). Por ejemplo, menos de 80%, menos de 85%, menos de 20 90%, menos de 95%, menos de 97%, o menos del 99% de los materiales de las porciones internas (en masa) puede estar presente en el recubrimiento de la partícula. El recubrimiento se puede formar simultáneamente con la porción interior, o en ciertas realizaciones, el recubrimiento se puede añadir después de la formación de la parte interior (o complejos que forman la parte interior).

- 25 En algunas realizaciones, el recubrimiento incluye uno o más polímeros, y los polímeros pueden ser biocompatibles y/ o biodegradables en algunos casos, por ejemplo, el polímero se puede disociar o degradar por exposición a agua (por ejemplo, tiene una constante de tiempo de degradación de menos de 1 o 2 años). En algunas realizaciones, el recubrimiento comprende poliacidos y/o polialcoholes. En algunas realizaciones el recubrimiento se 30 selecciona de entre poli(etilenglicol), ácido poliglutámico, ácido (poli láctico), ácido hialurónico, y combinaciones de los mismos. Los polímeros pueden, por ejemplo, proteger la parte interior contra la exposición o la degradación, por ejemplo, con el medio ambiente

externo a la partícula. Por ejemplo, el recubrimiento puede proteger la parte interior de la exposición a oxígeno, el agua, o el ácido en el medio externo. Como ejemplo no limitativo, las partículas pueden estar contenidas en un entorno que tiene un pH de menos de aproximadamente 7,4, menos de aproximadamente 7, menos de aproximadamente 6, menos de aproximadamente 5, menos de aproximadamente 4, menos de aproximadamente 3, o menos de aproximadamente 2. Ejemplos de polímeros adecuados para el recubrimiento incluyen, pero no se limitan a, polialcoholes tales como poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), alcohol polivinílico, poliácidos tales como ácido poliglutámico, ácido poliláctico, ácido hialurónico, etc., y alginato, así como combinaciones de estos y / u otros materiales o polímeros. Por ejemplo, el polímero puede ser un copolímero de cualquiera de éstos y / u otros polímeros, por ejemplo, un copolímero de poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol). En algunos casos, los polímeros se pueden utilizar en un rango de composiciones y / o pesos moleculares. Ejemplos adicionales de polialcoholes incluyen, pero no se limitan a, alcohol de polivinilo, poli(vinilpirrolidona), manitol, sorbitol, glicerol, polisorbatos, ésteres de sorbitán, poloxámeros, o similares.

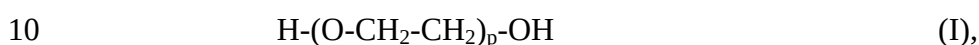
Además, en ciertos casos el recubrimiento se puede seleccionar para facilitar la orientación de las partículas, por ejemplo a un determinado objetivo. Por ejemplo, en un conjunto de realizaciones, el revestimiento puede facilitar el transporte en o a través de las células, por ejemplo, en el tracto gastrointestinal. En algunos casos, las partículas pueden incluir ligandos de direccionamiento, tales como anticuerpos o péptidos, para facilitar el transporte al interior o a través de una célula.

Como otro ejemplo, el revestimiento puede incluir un polímero de ácido poliglutámico y / o poli(etilenglicol), que puede mejorar la estabilidad de las partículas, por ejemplo, en fluidos biológicos, y / o facilitar la difusión de partículas, por ejemplo, a través de las superficies mucosas. Ejemplos no limitantes de polímeros de ácido poliglutámico y / o poli(etilenglicol) incluyen los descritos en Ep. Pat.. Apl. Pub. No. EP 2 664 324, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad. En algunos casos, el ácido poliglutámico (PGA) puede incluir sales solubles en agua de PGA, tales como la sal de amonio de PGA, o sales metálicas tales como la sal de litio, sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio, etc.

En una realización particular, la forma de PGA puede incluir uno o más ácido poli-D-glutámico, ácido poli-L-glutámico, ácido poli-D, L-glutámico, ácido poli-alfa-glutámico,

ácido poli-alfa-D-glutámico, ácido poli-alfa-L-glutámico, ácido poli-alfa-D,L-glutámico, ácido poli-gamma-glutámico, ácido poli-gamma-D-glutámico, ácido poli-gamma-L-glutámico y ácido poli-gamma-D,L-glutámico, y mezclas de los mismos. Por ejemplo, el PGA puede ser ácido poli-L-glutámico, la sal sódica del ácido poli-L-glutámico, ácido poli-alfa-glutámico, y/o la sal sódica del ácido poli-alfa-glutámico.

En algunos casos, el recubrimiento incluye poli(etilenglicol) ("PEG"), por ejemplo, separadamente, y/o incorporado a ácido poliglutámico, por ejemplo, en un copolímero, como por ejemplo, un copolímero ramificado o dibloque. Poli(etilenglicol), en su forma común es un polímero de fórmula (I):



donde p es un número entero que representa el grado de polimerización de PEG. Por ejemplo, p puede ser inferior a aproximadamente 1000, inferior a aproximadamente 700, inferior a aproximadamente 500, inferior a aproximadamente 300, inferior a aproximadamente 100, inferior a aproximadamente 70, inferior a aproximadamente 50, inferior a aproximadamente 30, inferior a aproximadamente 10, inferior a aproximadamente 7, inferior a aproximadamente 5, o inferior a aproximadamente 3. En algunos casos, PEG puede proporcionar mayor estabilidad y/o incrementar el tiempo de residencia, facilitando la llegada al objetivo, por ejemplo células dentro del tracto gastrointestinal.

20 En ciertas realizaciones, se emplea un PEG modificado en el cual uno o ambos grupos hidroxilo terminales están modificados para unir el PEG a ácido poliglutámico. Estas incluyen, pero no se limitan a, aquellas de fórmula (II):



donde X^1 es hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo bloqueando la función OH a siguientes reacciones. p puede ser cualquier número de los descritos anteriormente. Los grupos protectores de radicales hidroxilo son conocidos por el experto en la materia; ejemplos no limitantes representativos de grupos protectores (incluyendo ya el oxígeno para ser protegido) son éteres de sililo tales como trimetilsilil éter, trietilsilil éter, tercbutildimetilsilil éter, tercbutildifenilsilil éter, triisopropilsilil éter, dietilisopropilsilil éter, texildimetilsilil éter, trifenilsilil éter, di-terc-butylmetilsilil éter, alquil éteres tales como metil éter, terc-butil éter, bencil éter, p-metoxibencil éter, 3,4-dimetoxibencil éter, tritil éter, alil éter; alcoximetil éteres tales como metoximetil éter, 2-metoxietoximetil,

benciloximetil éter, p-metoxibenciloximetil éter, 2-(trimetilsilil) etoximetil éter, tetrahidropiranyl éter y éteres relacionados; metiltiometil éter; ésteres tales como acetato, benzoato, pivalato, metoxiacetato, cloroacetato, levulinato, carbonatos tales como bencil carbonato, p-nitrobencil carbonato, terc-butil carbonato, 2,2,2-tricloroetil carbonato, 2-(trimetilsilil) etil, alil carbonato. En una realización, el grupo protector es un éter de alquilo, tal como metil éter. X^2 puede ser un grupo puente que permite el anclaje de grupos ácido poliglutámico y a grupos derivados del mismo. En algunos casos, X^1 puede ser un grupo que permite el anclaje con otros PGA y derivados del mismo.

En ciertas realizaciones, los PEGs están unidos a PGA y/o derivados del mismo vía grupos amino y/o ácidos carboxílicos del último. La PEGilación de los polímeros se puede llevar a cabo usando cualquier método disponible en el estado de la técnica.

En un grupo de realizaciones, el polímero del recubrimiento puede incluir derivados solubles en agua de PGA o PGA-PEG, donde PGA está sustituido en una o más posiciones disponibles, por ejemplo, grupos amino y/o ácidos carboxílicos, con uno o más grupos apropiados. Derivados adecuados de PGA y derivados PGA-PEG incluyen, pero no están limitados a, poli(alquilglutamina) y derivados de PEG poli(alquilglutamina) tales como poli(N-2-(2'-hidroxietoxi)etil-L-glutamina) (PEEG), PEG-PEEG, poli(N-3-(hidroxipropil)-L-glutamina) (PHPG), PEG-PHPG, poli(N-2-(hidroxi)etil-L-glutamina) (PHEG) PEG-PHEG, poli(gamma-bencil-L-glutamato) (pBG), PEG-pBG, poli(gamma-tricloroetil-L-glutamato) (pTCEG), pTCEG-PEG, poli(dimetilaminoetil-L-glutamina) (pDMAEG), PEGp-DMAEG, poli(piridinoetil-L-glutamina) (pPyAEG), PEG-pPyAEG, poli(aminoetil-L-glutamina) (pAEG), PEG-pAEG, poli(histamina-L-glutamina) (pHisG), PEG-pHisG, poli(agmatina-L-glutamina) (pAgmG), PEG-pAgmG, PEG estearato, y/o mezclas del mismo.

Polímeros tales como cualquiera de los discutidos anteriormente están disponibles en una variedad de pesos moleculares. Así, como ejemplos no limitantes, pesos moleculares adecuados (pesos medios) de PGA en PGA y PGA-PEG pueden ser entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 80 kDa, entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 50 kDa, por ejemplo, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 30 kDa o aproximadamente 35 kDa, etc.

Además, se debe de entender que el PGA que está presente puede tener un único peso molecular, o un rango de pesos moleculares.

El peso molecular de PEG en polímeros PGA-PEG y derivados solubles en agua de los mismos puede ser entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 50 kDa, entre
 5 aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 40 kDa, entre aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 30 kDa, y aproximadamente 4 kDa; como ejemplos no limitantes, PEG puede tener un peso molecular de aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 6 kDa, aproximadamente 7 kDa, aproximadamente 8 kDa, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 21 kDa,
 10 aproximadamente 22 kDa, aproximadamente 23 kDa, aproximadamente 24 kDa, aproximadamente 25 kDa y aproximadamente 30 kDa. Además, se debería de entender que el PEG que está presente puede tener un único peso molecular, o un rango de pesos moleculares.

En algunos casos, los polímeros PGA-PEGy derivados solubles en agua de los mismos
 15 están disponibles en una variedad de grados de PEGilación. Estos grados dePEGilaciónestán definidos como un porcentaje de grupos funcionales o grupos funcionales PGA o derivados de PGA que están funcionalizados con PEG. Grados de PEGilaciónadecuados en polímeros PGA-PEG y derivados solubles en agua de los mismos pueden estar entre aproximadamente 0.1% y aproximadamente 10%, aproximadamente
 20 0.2% y aproximadamente 5%, entre aproximadamente 0.5% y aproximadamente 2%, aproximadamente 0.5%, aproximadamente 0.6%, aproximadamente 0.7%, aproximadamente 0.8%, aproximadamente 0.9%, aproximadamente 1%, aproximadamente 1.1%, aproximadamente 1.2%, aproximadamente 1.3%, aproximadamente 1.4%, aproximadamente 1.5%, aproximadamente 1.6%, aproximadamente 1.7%,
 25 aproximadamente 1.8%, aproximadamente 1.9%, o aproximadamente 2%, etc.

En algunos casos, la porción de PEG en los polímeros PEG-PGA y derivados solubles en agua de los mismos pueden estar entre aproximadamente 10% y 90% (p/p) con respecto al peso total del polímero, por ejemplo, entre aproximadamente 15% y 80%, entre
 aproximadamente 20% y 70%, aproximadamente 20%, aproximadamente 22%,
 30 aproximadamente 24%, aproximadamente 26%, aproximadamente 28%, aproximadamente 30%, aproximadamente 32%, aproximadamente 34%, aproximadamente 36%, aproximadamente 38%, aproximadamente 40%, aproximadamente 42%, aproximadamente 44%, aproximadamente 46%, aproximadamente 48%, aproximadamente 50%,

aproximadamente 52%, aproximadamente 54%, aproximadamente 56%, aproximadamente 58%, o aproximadamente 60%. Como se indicó arriba, PEG puede tener un único peso molecular o un rango de pesos moleculares.

- 5 En algunas realizaciones, el recubrimiento puede estar funcionalizado con un ligando diana. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, péptidos, proteínas, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, aptámeros, o similares.

Adicionalmente, en algunas realizaciones, el entorno puede incluir uno o más carbohidratos para facilitar la liofilización o preservación de las partículas, por ejemplo, en
10 estado seco. Ejemplos de carbohidratos adecuados incluyen, pero no se limitan a, trealosa o sucrosa.

Otro aspecto proporciona un método de administración de cualquier composición discutida aquí a un ser vivo. Cuando se administran, las composiciones de la invención se aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz, farmacéuticamente aceptable como una formulación
15 farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" se le da su significado común. Composiciones farmacéuticamente aceptables son aquéllas que son generalmente compatibles con otros materiales de la formulación y no son generalmente perjudiciales para el ser vivo. Cualquiera de las composiciones de la presente invención se pueden administrar al ser vivo en una dosis terapéuticamente eficaz.

20 "Terapéuticamente eficaz" o "eficaz" como se usa en la presente memoria significa la cantidad necesaria para retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, detener del todo la aparición o progresión de, el diagnóstico de una condición particular que está siendo tratada, o de otra manera lograr un resultado médicamente deseable. Los términos "tratar", "tratado" y similares, se refieren en general a la administración de las composiciones de la
25 invención a un ser vivo. Cuando se administra a un ser vivo, las cantidades eficaces dependerán de la condición particular a tratar y el resultado deseado. Una dosis terapéuticamente eficaz puede ser determinada por los expertos en la técnica, por ejemplo, empleando factores tales como los descritos más adelante y usando únicamente experimentación de rutina. Por ejemplo, en una realización, las composiciones se usan en
30 el presente documento para el tratamiento de diabetes, por ejemplo, mediante la administración de insulina al ser vivo, por ejemplo, por vía oral.

Una realización de la invención refiere al uso de la composición según se describió anteriormente para la preparación de un medicamento.

Otra realización particular se refiere a las composiciones de la invención para su uso como medicamento. Otra realización particular se refiere a las composiciones de la invención para su uso para el tratamiento de diabetes.

Para la administración a un ser vivo de las composiciones de la invención, las dosis, el programa de dosificación, la vía y condiciones de administración pueden ser seleccionados con el fin de lograr la actividad deseada para las citadas composiciones. Las dosis se pueden estimar sobre la base de los resultados de los modelos experimentales, opcionalmente en combinación con los resultados de los ensayos de las composiciones de la presente invención. La dosificación puede ajustarse apropiadamente para lograr los niveles de fármaco deseado, local o sistémico, dependiendo del modo de administración. Las dosis se pueden administrar en una o varias administraciones por día.

La dosis de la composición para el ser vivo puede ser tal que una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición alcanza el sitio activo de la composición dentro del ser vivo. La dosis se puede administrar en algunos casos a la cantidad máxima, evitando o minimizando los efectos secundarios potencialmente perjudiciales en el ser vivo. La dosificación de la composición que se administra en realidad depende de factores tales como la concentración final deseada en el sitio activo, el método de administración al sujeto, la eficacia de la composición, la longevidad de la composición dentro del sujeto, el momento de administración, el efecto de los tratamientos concurrentes (por ejemplo, como en un cóctel), etc. La dosis administrada puede depender también de las condiciones del ser vivo al que se administra, y puede variar de ser vivo a ser vivo en algunos casos. Por ejemplo, la edad, el sexo, el peso, el tamaño, el entorno, las condiciones físicas, o el estado actual de la salud del sujeto también pueden influir en la dosis requerida y/ o la concentración de la composición en el lugar de acción. Las variaciones en la dosificación pueden ocurrir entre diferentes individuos o incluso dentro de un mismo individuo en diferentes días. En algunos casos, una dosis máxima se puede utilizar, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo a juicio médico. En algunos casos, la forma de dosificación es tal que no afecta sustancialmente de manera perjudicial al ser vivo.

En ciertas realizaciones, una composición de la invención se administra a un ser vivo que tiene diabetes, o a un ser vivo que tiene una predisposición genética a la diabetes. La

administración de una composición de la invención puede llevarse a cabo por cualquier método médicamente aceptable, que permite que la composición alcance su objetivo. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, de factores tales como los anteriormente descritos, por ejemplo, la composición particular, la gravedad del estado del ser vivo a tratar, la dosificación requerida para la eficacia terapéutica, etc. En la presente memoria, un modo de tratamiento "médicamente aceptable" es un modo capaz de producir niveles eficaces de la composición en el sujeto sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables.

Cualquier método médicamente aceptable se puede usar para administrar la composición a un ser vivo. La administración puede ser localizada (es decir, a una región particular, sistema fisiológico, tejido, órgano o tipo de célula) o sistémica, dependiendo de la condición a tratar. Por ejemplo, la composición puede administrarse por vía oral, o por medio de otras técnicas, como por vía vaginal, rectal, bucal, pulmonar, tópica, nasal, transdérmica, a través de inyección parenteral o implantación, a través de la administración quirúrgica, o cualquier otro método de administración donde la composición de la invención consigue el acceso al objetivo. La administración oral se utiliza en algunas realizaciones debido a la comodidad para el ser vivo. Las composiciones adecuadas para la administración oral pueden presentarse en forma de cápsulas duras o blandas, píldoras, polvos, comprimidos, , conteniendo cada uno una cantidad determinada del compuesto activo. Otras composiciones orales adecuadas para uso con la invención incluyen soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos tales como un jarabe, un elixir, o una emulsión. En otro conjunto de realizaciones, la composición se puede utilizar para fortificar un alimento o una bebida. La administración rectal puede ser utilizada en algunas formas de realización, por ejemplo, en forma de un enema, supositorio o espuma.

En ciertas realizaciones de la invención, la administración de una composición de la invención puede estar diseñada de manera que dé lugar a exposiciones secuenciales a una composición durante un cierto período de tiempo, por ejemplo, horas, días, semanas, meses o años. Esto puede conseguirse, por ejemplo, por las repetidas administraciones de una composición de la invención por uno de los métodos descritos anteriormente. La administración de una composición puede ser sola, o en combinación con otros agentes terapéuticos y / o composiciones.

En ciertas realizaciones de la invención, una composición se puede combinar con un vehículo adecuado farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, incorporado en un liposoma, incorporado en un sistema de liberación de polímero, o suspendido en un líquido, por ejemplo, en una forma disuelta o forma coloidal. En general, los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para uso en la invención son bien conocidos por los expertos en la técnica. Como se usa en este documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que no interfiere significativamente con la eficacia de la actividad biológica del compuesto(s) activo a administrar, pero se utiliza como un ingrediente de formulación, por ejemplo, para estabilizar o proteger el compuesto activo (s) dentro de la composición antes de su uso. El término "vehículo" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, que puede ser natural o sintético, con el que se combinan uno o más compuestos activos de la invención para facilitar la aplicación de una composición como se discute aquí. El vehículo puede ser mezclado o de otra manera se mezcla con una o más composiciones de la presente invención, y entre sí, de tal manera que no hay interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada. El vehículo puede ser soluble o insoluble, dependiendo de la aplicación. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasa, celulosa natural y modificada, poliacrilamida, agarosa y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble. Los expertos en la técnica conocerán otros vehículos adecuados, o serán capaces de determinarlos, usando sólo experimentación de rutina.

En algunas realizaciones, una composición de la invención puede incluir vehículos farmacéuticamente aceptables con ingredientes de formulación tales como sales, agentes tamponantes, emulsionantes, diluyentes, excipientes, agentes quelantes, rellenos, agentes de secado, antioxidantes, antimicrobianos, conservantes, agentes de unión, agentes de volumen, sílices, solubilizantes, o estabilizadores que pueden utilizarse con el compuesto activo. Por ejemplo, si la formulación es un líquido, el vehículo puede ser un disolvente, un disolvente parcial o no disolvente, y puede ser acuosa o de base orgánica. Ejemplos de ingredientes de formulación adecuados incluyen diluyentes tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, caolín, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y como almidón de maíz o ácido algínico; agentes tales como almidón, gelatina o acacia vinculante; agentes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico,

- talco o lubricante; materiales de acción retardada tal como monoestearato de glicerol o diestearato de glicerol; agentes tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona de suspensión; agentes de dispersión o como la lecitina u otros fosfátidos naturales; agentes espesantes tales como
- 5 alcohol cetílico o cera de abejas; agentes tampón tales como ácido acético y sus sales, ácido cítrico y sales de los mismos, ácido bórico y sales de los mismos, o el ácido fosfórico y sales de los mismos; o conservantes tales como cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenos, o timerosal. Concentraciones de vehículos adecuados pueden ser determinadas por los expertos en la técnica, usando únicamente experimentación de rutina. Una
- 10 composición como se discute en este documento puede formularse en preparaciones en forma sólida, semi-sólida, líquida o formas gaseosas tales como comprimidos, cápsulas, elixires, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, depositarios, inhalantes o inyectables. Los expertos en la técnica conocerán otros ingredientes de formulación adecuados, o serán capaces de determinarlos, usando sólo experimentación de rutina.
- 15 Las preparaciones incluyen soluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones, que pueden ser isotónicas con la sangre del ser vivo en ciertas realizaciones. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de cacahuete, aceite mineral, ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo, o otros
- 20 aceites incluyendo mono o di- glicéridos sintéticos. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas / acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, 1,3-butanodiol, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o determinados aceites. Los vehículos intravenosos incluyen fluidos y nutrientes, electrolitos
- 25 (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. Conservantes y otros aditivos pueden también estar presentes tal como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los diversos parámetros para la preparación y formulación de una composición como se discute en el presente documento sin recurrir a experimentación indebida.
- 30 La presente invención también proporciona cualquiera de las composiciones antes mencionadas en kits, opcionalmente incluyendo instrucciones para uso de la composición para el tratamiento de diabetes u otras enfermedades. Las instrucciones también se pueden

proporcionar para la administración de una composición mediante cualquier técnica adecuada tal como se describe anteriormente, por ejemplo, por vía oral.

La invención implica también, en otro aspecto, la posibilidad de promover el tratamiento de la diabetes u otras enfermedades de acuerdo con cualquiera de las técnicas y las composiciones y combinaciones de composición que se describen en este documento. En algunas realizaciones, una o más composiciones de la invención pueden ser utilizadas para promover el tratamiento de diabetes o incluye instrucciones para el tratamiento de la diabetes como se mencionó anteriormente. Tal como se usa en este documento, "promover" incluye todos los métodos de hacer negocios incluidos los métodos de la educación, hospital y otra instrucción clínica, la actividad de la industria farmacéutica que incluye ventas de productos farmacéuticos, y cualquier publicidad u otra actividad promocional que incluya la comunicación escrita, oral y electrónica de cualquier forma, asociados con composiciones de la invención en relación con el tratamiento de una enfermedad. "Instrucciones" pueden definir un componente de promoción, y típicamente implican instrucciones escritas en o asociada con el empaquetado de las composiciones de la invención. Las instrucciones también pueden incluir todas las instrucciones orales o electrónicos proporcionados en cualquier forma. El kit define típicamente un paquete que incluye cualquier composición o combinación de composiciones de la invención y las instrucciones, que puede ser de cualquier forma que se proporciona en relación con la composición de tal manera que un profesional clínico reconocerán claramente que las instrucciones han de estar asociados con la composición específica.

Los kits descritos en este documento también pueden contener uno o más recipientes, que pueden contener la composición de la invención y otros ingredientes como se describe anteriormente. Los kits pueden contener también instrucciones para mezclar, diluir y / o administrar una composición de la invención en algunos casos. Los kits también pueden incluir otros recipientes con uno o más disolventes, tensoactivos, conservantes y / o diluyentes (por ejemplo, solución salina normal (0,9% NaCl), o 5% de dextrosa), así como recipientes para mezclar, diluir o administrar la composición en una de la muestra o a un ser vivo en necesidad de tal tratamiento.

Las composiciones del kit se pueden presentarse en cualquier forma adecuada, por ejemplo, como soluciones líquidas o como polvos secos. Cuando una composición dada es un polvo seco, la composición puede ser reconstituida mediante la adición de un disolvente

adecuado, que también puede ser proporcionado. En realizaciones en las que se utilizan las formas líquidas de una composición, la forma líquida puede estar concentrada o lista para usar. El disolvente dependerá de una composición y el modo de uso o administración. Los disolventes adecuados para composiciones de fármacos son bien conocidos, por ejemplo como se describe anteriormente, y están disponibles en la literatura. El disolvente puede depender de la composición y el modo de uso o administración.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar ciertas realizaciones de la presente invención, pero no ejemplifican el alcance completo de la invención.

Ejemplo 1

Determinados péptidos con capacidad de penetración en las células (CPP), por ejemplo, octaarginina (R8), pueden ser útiles para mejorar el transporte de insulina a través del epitelio intestinal. Los siguientes ejemplos ilustran el diseño y la ingeniería de un nanotransportador de péptidos basado en R8 dotado de la capacidad de prevenir la degradación de la insulina, y facilitar su transporte al interior del epitelio intestinal. Para lograr este objetivo, R8 se conjugó químicamente con colesterol (Chol) o ácido láurico (C12) y, subsiguientemente, se estudiaron las condiciones idóneas para formar un complejo con insulina. Estos nanocomplejos (NCP) se recubrieron con ácido poliglutámico-poli(etilenglicol) (PGA-PEG) a fin de preservar su estabilidad en el medio intestinal y facilitar su difusión a través de la mucosa intestinal. El NCP recubierto con el polímero (PGA-PEG) se muestra en la Fig. 4 con el nombre ENCP (nanocomplejo recubierto). La envoltura o recubrimiento del NCP C12-R8-insulina con un polímero hidrofílico, como por ejemplo PGA-PEG, resultó en un tamaño medio de partícula de 200 nm, una distribución de tamaños estrecha (PDI 0,1), un valor negativo (-44 +/- 1 mV) o neutro (2 +/- 2 mV) de potencial zeta, dependiendo del polímero de recubrimiento, y una eficacia de asociación (AE) de la insulina del 100% (Figuras 3A, B y C). Las características de las partículas fueron muy similares cuando el polímero de recubrimiento fue el ácido hialurónico en lugar del ácido poliglutámico.

Sin embargo, estas características fueron muy distintas de las obtenidas para los complejos iónicos formados a partir de R8 no modificado con un residuo hidrofóbico e insulina en ausencia del polímero de recubrimiento. Estos complejos considerados como formulación control mostraron un tamaño variable, difícil de reproducir y, con frecuencia, en el intervalo de micrómetros. Como era de esperar a partir de su diseño, ENCPs mostraron

buena estabilidad coloidal, así como también la capacidad para proteger eficazmente la insulina de la proteólisis en fluido intestinal simulado (SIF), en presencia de pancreatina (Figura 6A y 6B y Figura 7). Por el contrario, los complejos de R8-insulina mostraron una deficiente estabilidad en dicho medio. Por otro lado, los estudios realizados en células

5 Caco-2 indicaron que los ENCPs permiten la captación celular de un 47,59% de la insulina administrada y el transporte de un 2,11% de insulina administrada al compartimento basolateral de la monocapa celular. Por el contrario la mezcla de R8 con insulina dio lugar a un transporte de insulina insignificante (Figura 9A y 9B). Finalmente, los estudios de permeabilidad a través de intestino humano también mostraron que ENCPs eran capaces de

10 penetrar la capa de moco que cubre las células intestinales y acceder a su interior (Figura 15, incluida con el permiso del Prof. Arturson y Lundquist). En general, estos datos mostraron que la combinación de potenciadores de la penetración anfifílicos derivados de CPP en combinación con polímeros protectores de PEGilación puede representar una estrategia útil para hacer factible la administración oral de péptidos y su acumulación a

15 nivel del tejido intestinal.

El diseño del nanotransportador de insulina en estos ejemplos, además de R8, incluyó elementos adicionales para hacer frente a las múltiples barreras biológicas. En primer lugar, con el fin de aumentar la estabilidad del complejo insulina-CPP, derivados hidrófobos específicos R8 se utilizaron para asociar la insulina fuertemente no solamente

20 por interacción electrostática, sino también con fuerzas hidrofóbicas. Por otra parte, estos complejos de tamaño nanométrico y estables fueron recubiertos además con un polímero que pudiera impedir la interacción con los enzimas intestinales, por ejemplo, pancreatina, lo que podría conducir a la degradación de la insulina asociada a la nanoestructura. Para esto, se utilizó ácido poliglutámico-PEG (PGA-PEG), teniendo en cuenta que la cadena

25 acídica podría interactuar con el complejo catiónico insulina-R8, proyectando de este modo la molécula de PEG hacia la fase externa. Este recubrimiento PEG, además, facilitó la difusión a través de la mucosa intestinal. En los presentes ejemplos, se determinaron las características fisicoquímicas y AE de las NCPs y ENCPs; se evaluó la estabilidad coloidal en mediotestinal simulado y en condiciones de almacenamiento; se comprobó el efecto

30 de protección del fármaco frente a la proteólisis; se realizaron estudios de perfil de liberación in vitro, citotoxicidad, captación celular y de transporte en modelos Caco-2 y la

toxicidad y la permeabilidad de la formulación fueron finalmente corregidas o confirmadas en tejido de yeyuno humano.

El monómero de insulina recombinante humana (Apidra[®], Mw 5823 Da) fue suministrada amablemente por Sanofi (Paris, Francia). Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH se compró a Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Alemania). La sal sódica del ácido ([PGA]₁₀₀-m[PEG]₆ poli(L-glutámico gamma-(omega-metoxihepta (etilenglicol))) ramificado, con un 10-20 mol% de sustitución demPEG, MW=22.8k-24.7 kDa, 14-27% PEG) se compró a Polypeptide Therapeutic Solutions (PTS, Valencia, España). La sal sódica del copolímero dibloque (m[PEG]₄₅₅-b-[PGA]₁₀, metoxi-poli(etilenglicol)ácido poli(L-glutámico), MW=22 kDa, 20 kDa PEG y 2kDa PGA) se compró a Alamanda Polymers (Huntsville, USA). El ácido láurico, el colesteril cloroformiato, la pancreatina (8xUSP), el fosfato potásico monobásico, el ácido maleico, el cloruro sódico, y el hidróxido sódico se compraron a Sigma Aldrich (St. Louis, USA). El taurocolato sódico se compró a New Zealand Pharmaceuticals (Palmerston North, Nueva Zelanda). La lecitina de soja se compró a Archer Daniels Midland (Chicago, USA). Células Caco-2 de colorectal adenocarcinoma humano (ATCC[®] HTB37TM) se compraron a American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). el medio MEM modificado por Dulbecco con alto contenido en glucosa (DMEM) y la disolución de aminoácidos no esenciales (NEAA) se compraron a Sigma Aldrich (St. Louis, USA), mientras que el suero bovino fetal (FBS), la disolución de penicilina-estreptomicina, la L-glutamina, el tampón fosfato salino (PBS) y el tampón fosfato salino con calcio y magnesio de Dulbecco (DPBS) se compraron a Lonza (Basel, Suiza). El agua ultrapurificada se obtuvo del Sistema de purificación de agua Millipore Milli-Q Plus (Darmstadt, Alemania). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

Los compuestos C12-R8 y Colesterol-R8 se sintetizaron mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), siguiendo una estrategia Fmoc / tBu. La resina Fmoc-Rink amida ChemMatrix[®] se utilizó para obtener un grupo amida en el C-terminal de ambos péptidos. Tetrafluoroborato de N, N, N', N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)uronio (TBTU) y diisopropiletilamina (DIEA) fueron utilizados como reactivos de acoplamiento para cada incorporación de aminoácidos (todos los aminoácidos estaban en la forma D). La desprotección de Fmoc se llevó a cabo mediante la adición de 20% de piperidina en dimethylformamide (DMF). El ácido láurico y cloroformiato de colesterilo se acoplaron al N-terminal utilizando la misma estrategia. La escisión completa de ambos péptidos de la

- resina y la eliminación de la cadena lateral de los grupos protectores se consiguió utilizando el siguiente cóctel de escisión: TFA / H₂O / TIS (95% / 2,5% / 2,5%). Para el marcaje de C12-R8 con FITC, se introdujo una D-lisina, protegida ortogonalmente, al C-terminal de los péptidos permitiendo la incorporación de 5(6)-carboxifluoresceína (CF) a la
- 5 secuencia del péptido. Una vez sintetizado el péptido, C12 se acopló al N-terminal. Después, un grupo protector Alloc se eliminó selectivamente de la cadena lateral de D-lisina por tratamiento con paladio (0) tetraquis (trifenilfosfina) seguido de la incorporación de CF usando condiciones de acoplamiento de aminoácidos estándar. Ambos péptidos se purificaron por RP-HPLC a escala semi-preparativa y se caracterizaron mediante HPLC
- 10 (Waters Alliance 2695, detector de fotodiodos 2998 Waters, columna Sunfire C₁₈ (100 x 4,6 mm x 3,5 micrómetros, 1 mL / min acetonitrilo (0.036% de TFA) y H₂O (0,045% de TFA). Se utilizaron gradientes lineales de 8 min en todos los casos y la espectrometría de MALDI (MALDI-TOF Applied Biosystem 4700). Todos los péptidos se obtuvieron con una pureza superior al 90%.
- 15 Preparación de NCPs no recubiertas. NCPs de C12-R8-insulina y Chol-R8-insulina se desarrollaron sobre la base de interacciones hidrófobas e iónicas. Brevemente, C12-R8 o Chol-R8 se disolvieron en agua a una concentración de 1 mg/mL. La insulina se disolvió a una concentración de 1 mg/ml a varios pHs, a fin de estudiar la influencia del pH, y por tanto del grado de la insulinen la formación de complejos con R8 modificado ú. A partir de
- 20 estos estudios, se seleccionó NaOH 0,01 N (pH ~ 11.8), medio en el que la insulina se encuentra altamente ionizada de forma negativa. Los complejos se formaron instantáneamente al mezclar las soluciones bajo agitación magnética a diferentes proporciones de R8:insulina (1:1 a 8:1). Al mismo tiempo, se prepararon los controles basados en la adición de solución de NaOH 0,01 N a C12-R8 o solución Chol-R8
- 25 para confirmar que, en ausencia de insulina, no hubo formación de nanopartículas o micelas. Además, se utilizó una solución de R8 no hidrofobizado en lugar de C12-R8 o Chol-R8 con el fin de formar un complejo de insulina. Las características de este complejo se compararon con los prototipos basados en C12-R8 o Chol-R8. El pH de todas las NCPs finalmente se ajustó a 7 con HCl después de la finalización del proceso de complejación.
- 30 Preparación de NCPs recubiertas de PGA-PEG (ENCPs). Las NCPs que resultaron del procedimiento de complejación tenían una carga positiva, lo que facilitó su recubrimiento con PGA-PEG dibloque o ramificado, dotado de una carga negativay con diferente

longitud de PEG, dando lugar a la formación de ENCPs. El procedimiento de recubrimiento se basó en la formación de una película de PGA-PEG mediante evaporación en el rotavapor, que fue posteriormente hidratada mediante la adicción de la suspensión de NCPs. Dicho procedimiento permitió un buen recubrimiento de la NCP, sin comprometer la AE de la insulina. Los polímeros PGA-PEG se disolvieron en agua a una concentración de 1 mg/ml y la fase acuosa se evaporó en un matraz redondo a presión reducida a 37°C, lo que condujo a la formación de una película delgada. A continuación, las NCPs se transfirieron al mismo matraz y se mantuvieron durante 10 min bajo rotación. Tras el recubrimiento de las NCPs con la película, el pH de la suspensión final de ENCPs se ajustó a 7 con HCl.

Caracterización físico-química. El tamaño de partícula y PDI de ambos NCPs y ENCPs se determinó mediante dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando Malvern Zeta-Sizer (NanoZS, ZEN 3600, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) equipado con un haz de luz láser rojo (longitud de onda 632,8 nm). El potencia-Z se calculó a partir de los valores de movilidad electroforética media determinada por láser Doppler Anemometría (LDA) utilizando el mismo dispositivo. Para la medición de tamaño y PDI, se transfirieron 50 microlitros de las formulaciones directamente en una cubeta para medir el tamaño de partícula, sin ninguna dilución. En las mediciones de potencial-Z, se diluyeron 400 microlitros de la muestra con 400 microlitros de solución 1 mM de KCl. Se analizó una cantidad mínima de tres lotes de cada formulación y cada lote se analizó por triplicado. El análisis morfológico de las NCPs y ENCPs se llevó a cabo con microscopía electrónica de transmisión (TEM, CM12, Philips, Países Bajos). Las muestras se tiñeron con solución de ácido fosfotúngstico (2%, w / v) y se colocaron en rejillas cupper con Formvard® para observación TEM.

La eficacia de asociación y la carga de la insulina. El rendimiento de asociación de insulina (AE) a las NCPs y ENCPs se determinó después de la separación de los complejos de insulina del medio acuoso y midiendo la insulina libre en los medios de suspensión, así como la insulina asociada a las ENCPs. Para la separación de ambas fases (ENCPs y medio de suspensión), formulación fue sometida a un proceso de centrifugación (Hettich, Universal 32R, Alemania) a 15.000 g durante 15 minutos a 15°C. La cantidad de insulina libre en el medio de suspensión se determinó mediante el método de HPLC de fase inversa (Agilent, 1100 Series, EE.UU.), utilizando una columna C18 (Superspher® 18 RP-

terminalmente protegido) como fase estacionaria, y el tampón de ácido fosfórico y perclorato de sodio se mezcla con acetonitrilo a diferente relación de volumen como fases móviles (93:7 como fase A y 43:57 como fase B). El AE de la insulina en la formulación se calcula según la ecuación:

$$AE(\%) = \frac{Insulina\ Total - Insulina\ Libre}{Insulina\ Total} \times 100$$

- 5 donde la Insulina Total es la cantidad de insulina teórica implicada en la formulación, y la Insulina Libre es la cantidad de insulina determinada por HPLC.

Para lograr la cuantificación directa de la insulina presente en las ENCPs, se añadieron sucesivamente 200 microlitros de 0.1N NaOH (pH~12.8) y 100 microlitros de DMSO al sedimento procedente de la centrifugación, conteniendo las ENCPs, a 3000 rpm usando un
10 Vortex (VELP Scientifica, Italia). La solución se inyectó en HPLC y la AE se calculó dividiendo la cantidad de insulina determinada en el sedimento de ENCPs entre la cantidad total de insulina en la formulación.

La carga final se calculó dividiendo la cantidad de insulina asociada (AE x insulina total en la formulación) entre la cantidad teórica de todos los materiales implicados en la
15 formulación.

Estudio de estabilidad coloidal en medios intestinales simulados. La estabilidad coloidal de las NCPs y ENCPs se evaluaron mediante su incubación en medio intestinal simulado (SIF, pH 6,8, Farmacopea Británica) y también en fluido intestinal simulado correspondiente al estado de ayuno (FaSSIF-V2, pH 6,5) durante un máximo de 6 horas a
20 37 °C. FaSSIF-V2 es una versión actualizada de FaSSIF descrita en farmacopea, que permite imitar mejor las condiciones intestinales in vivo. La composición de SIF estándar y medios FaSSIF-V2 se muestran en la Tabla 1. Para cada estudio, 200 microlitros de las suspensiones de nanopartículas se diluyeron en 200 microlitros de los medios correspondientes (0,06%, w / v), y luego se colocó en una incubadora a 37°C (Heidolph
25 Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Alemania) con una agitación horizontal a 300 rpm. En diferentes momentos (0 h, 0,5 h, 1 h, 3 h, y 6 h), muestras de 50 microlitros del medio de incubación se retiraron para el análisis del tamaño de partícula, PDI y tasa de recuento derivada (dCR) con Malvern Zeta-Sizer. El dCR fue utilizado como un indicador de la concentración de las partículas analizadas. Se analizaron al menos tres lotes de las
30 diferentes formulaciones y cada análisis se realizó por triplicado.

Tabla 1

Composición	SIF	FaSSIF-V2
Hidróxido sódico	15.4 mM	34.8 mM
Fosfato potásico monobásico	50 mM	-----
Taurocolato sódico	-----	3 mM
Lecitina	-----	0.2 mM
Ácido maleico	-----	19.12 mM
Cloruro sódico	-----	68.62 mM
pH	6.8	6.5

Estabilidad durante el almacenamiento. Para la determinación de la estabilidad coloidal en condiciones de almacenamiento, las suspensiones de nanopartículas fueron almacenadas a diferentes temperaturas: a 4°C, a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) y 37°C hasta 2 meses. Las mediciones del tamaño de partícula, Pdl y dCR se realizaron de la misma manera como se describió anteriormente.

Además, se realizó un estudio de la liofilización de las ENCPs para evaluar la posibilidad de procesar la suspensión de nanopartículas en forma de polvo. Para ello, sacarosa o trehalosa (2%, w / v) se añadió a la suspensión de nanopartículas (0,12%, w / v) antes del secado por congelación (~ 50 horas círculo) con el fin de facilitar la re-suspensión posterior. También se analizó la estabilidad de las ENCPs liofilizadas almacenadas a temperatura ambiente durante 2 meses en un desecador, mediante la medición de su tamaño de partícula tras la reconstitución del sistema de secado por congelación. Las mediciones de tamaño, Pdl y dCR se realizaron de la misma manera como se describió anteriormente.

Estudio de liberación in vitro. El estudio de liberación in vitro de las NCPs (C12-R8-insulina y Chol-R8-insulina) y las ENCPs correspondientes se llevó a cabo tanto en medios SIF como FaSSIF-V2. Brevemente, la suspensión de ENCPs cargados con insulina se diluyó en 10 mL de SIF o FaSSIF-V2 (concentración de insulina en 0,17 mg/ml y 0,05 mg/ml). Inmediatamente después de la dispersión de la formulación en SIF o FaSSIF-V2, una parte alícuota de 500 microlitros se retiró y se centrifugó a 15.000 g y 15°C durante 15

min. Se añadió el mismo volumen para reponer el medio de liberación. El sobrenadante se recogió cuidadosamente para determinar la concentración de insulina liberada por análisis de HPLC. La concentración de insulina en este punto se consideró el valor del tiempo 0 horas. El resto de la muestra se colocó en una incubadora a 37 °C con agitación horizontal 300 rpm durante 24 horas, y durante este tiempo, se tomaron muestras de 500 microlitros a las 0,5, 1, 2, 6 y 24 horas para determinar la insulina liberada en cada uno de estos puntos de tiempo. El medio se repuso en cada punto de tiempo y la concentración total de insulina se calculó teniendo en cuenta la dilución de las muestras para cada intervalo de tiempo. Otros estudios de liberación fueron realizados usando tampón de acetato 100 mM pH 4,0 o 5,0 ó agua acidificada pH 2,5 con el fin de comprender si la interacción iónica entre la insulina y C12-R8 es el factor dominante para prevenir la liberación de la insulina desde las ENCPs.

Estudio de la proteólisis. Para detectar la capacidad de los ENCPs para proteger la insulina de la degradación enzimática, se realizó un estudio de proteólisis basado en la incubación de los ENCPs en SIF, en presencia de 1% (w/v) pancreatina. Un volumen de 250 microlitros de la suspensión que contenía el ENCPs (PGA-PEG dibloque recubriendo C12-R8-insulina) se incubó en 250 microlitros del medio de proteólisis a 37°C con agitación horizontal 300 rpm. Al cabo de diferentes tiempos, las muestras se transfirieron a tubos fríos que contenían 300 microlitros de HCl 0,1 N, con el fin de inactivar la proteólisis enzimática y el contenido de insulina se cuantificó mediante LC-MS (Shimadzu HPLC sistema LC 20AD, Thermo triple cuadrupolo espectrómetro de masas Quantum Ultra). El estudio se realizó en 3 réplicas (a partir de tres lotes diferentes de nanopartículas). Una solución de insulina en lugar de las ENCPs se trató con el mismo medio de proteólisis como grupo de control. Para excluir la interferencia de la pancreatina en el análisis de LC-MS, el medio de proteólisis se estableció como otro control.

Cultivo de células Caco-2. Las células Caco-2 fueron cultivadas en DMEM de alto contenido en glucosa con L-glutamina suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 1% de penicilina (100 U / ml), estreptomicina (100 microgramos / ml), y la solución de NEAA 1%. Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador humidificado con atmósfera de 5% de CO₂/95% aire.

Estudio de citotoxicidad en células Caco-2. La citotoxicidad se determinó usando un ensayo MTS como un indicador de la viabilidad celular. La viabilidad celular se evaluó

después de la co-incubación de 10.000 células Caco-2 / pocillo en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos (Costar® Corning®) con las formulaciones mencionadas anteriormente en dispersión en medio de cultivo DMEM suplementado con 4 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 microgramos/ml de estreptomycin y 20 de suero bovino fetal inactivado por calor. Las microplacas fueron transferidas a un incubador humidificado a 37 °C con 5% de CO₂ durante 2 h o 24 h. Después de 2 h o 24 h de incubación, se retiró el sobrenadante de cada pocillo, y las células se incubaron con 100 microlitros de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) 2H-tetrazolio (MTS) reactivo a 37 °C durante 2 h y 30 min en una atmósfera de CO₂ humidificada al 5%. El valor de EC₅₀ para las diferentes formulaciones se calculó a partir del conjunto de datos por análisis de regresión no lineal usando el programa GraphPad Prism.

Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Monocapas de células Caco-2 fueron cultivadas sobre membrana PET especialmente tratada para cultivo tisular (diámetro 1 micrómetro, área de crecimiento 1,1 cm²) en Millipore Transwell® 12 pocillos/placa y se utilizaron para experimentos de transporte 21 días después de la siembra. La evaluación de ENCPs basadas en R8 y C12-R8 se investigó en monocapas de células de Caco-2. La TEER se midió con un sistema de Millicell-Resistencia Eléctrica (Endohm-12, Millipore Corp). Se utilizaron monocapas con valores de TEER en el rango de 800 hasta 1.500 Ohm-cm². Simultáneamente, se recogieron muestras (500 microlitros) del compartimiento receptor y el compartimiento apical 2 h después de la exposición de monocapa de células a ENCP o al control C12-R8, y las concentraciones de insulina se midieron usando LC/MS. La monocapa de células se lavó intensamente en 0,9% de NaCl y se congeló a -80 °C para la cuantificación de insulina dentro de las células.

Estudios de captación celular cuantitativo y de transporte. Para la cuantificación de la insulina se utilizó cromatografía líquida (HPLC sistema Shimadzu LC 20AD) con un columna de HPLC C8 (Interchim) 150 x 2,1 mm - 5 micrómetros- 300 Angstrom. La fase móvil fue A/B, donde el disolvente A fue H₂O con 0,1% de ácido fórmico y el disolvente B fue acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 0,1%; la velocidad de flujo fue de 0,6 mL / min para evitar un aumento de presión. Una alícuota (100 microlitros) de la muestra se trató con 200 microlitros de cloroformo / metanol / agua en una proporción de 1/1/0,3 y 100 microlitros de NaOH 0,1 M, y 40 microlitros de la muestra resultante de analito se

inyectó en la columna colocada en un horno a 60 °C. El tiempo total de análisis fue de 13 min. La detección se realizó mediante espectrometría de masas en tándem (Quantum Ultra) en el modo de electrospray positivo. El límite de detección fue de 0,005 microgramos insulina. El procesamiento de los datos obtenidos se llevó a cabo utilizando el software

5 Mass Lynx versión 4.1. El voltaje de pulverización fue de 3,0 kV, y las presiones de la vaina y el gas auxiliar fueron de 50 y 15 (unidades arbitrarias), respectivamente. La energía CID en-fuente se fijó en 12 V, y la temperatura del capilar fue de 350 °C. Los valores lente del tubo y de la energía de colisión se optimizaron para la insulina. La monitorización de reacción múltiple se utilizó para la detección de las transiciones de iones. Las transiciones

10 de monitorización de reacción múltiple para analitos fueron los siguientes: m / z insulina 890,56> 984,55, m / z insulina bovina 1284,73> 1104,60. Los analitos fueron cuantificados por medio de curvas de calibrado utilizando insulina bovina como estándar interno. Las curvas estándar mostraron linealidad de insulina en un rango de 0,025 a 10 microgramos mL⁻¹. La metodología para este ensayo implica la reducción con ditioltreitol 45 mM y

15 alquilación con 100 mM de yodoacetamida 100 mM de insulina intacta para la medición de la cadena B libre.

Toxicidad y permeabilidad en tejido intestinal humano. Muestras de tejido del yeyuno se obtuvieron de los pacientes sometidos a laparoscopia Roux-en-Y bypass gástrico. Los pacientes dieron su consentimiento pleno e informado. El estudio fue revisado y aprobado

20 por un comité de revisión ética regional. Las muestras de tejido se transfirieron inmediatamente en un recipiente que contenía tampón de Krebs-Ringer frío y oxigenado y rápidamente se transportaron al laboratorio. Seguidamente, el epitelio se diseccionó para eliminar los tejidos sub-epiteliales y se montó orientado tanto en horizontal como en vertical en cámaras Ussing con aberturas de 9 mm entre las dos cámaras. La cámara

25 basolateral se llenó con glucosa que contenía tampón de Krebs-Ringer, mientras que la glucosa en la cámara apical fue sustituida con manitol. Esto es para evitar la apertura de las uniones íntimas inducida por SGLT. Las cámaras se mantuvieron a 37 °C y se burbujeó con 95% O₂/ 5% de CO₂ durante la duración del experimento. La electrofisiología del tejido se monitorizó durante todo el experimento para asegurar la viabilidad del tejido

30 continuo. Después del montaje, los tejidos se dejaron equilibrar durante 40 minutos con dos medios de intercambio. Las nanopartículas se añadieron a la cámara apical. Seguidamente, se tomaron muestras de de las cámaras donante y receptor sa intervalos

regulares durante la duración del experimento (120 minutos). Al final del experimento, se testó la viabilidad de los tejidos mediante la adición de la forskolina cAMP-agonista. Este test se basa en que el tejido viable formará cAMP, debido al metabolismo oxidativo, en respuesta a forskolina, conduciendo así a una apertura de los canales CFTR Cl. La respuesta se monitorizó registrando los cambios en la diferencia de potencial y la corriente de cortocircuito en el epitelio. La permeabilidad de las nanopartículas marcadas con fluorescencia se analizó en un lector de placas y se calculó la constante de velocidad de permeabilidad aparente (Papp).

Ejemplo 2

Como se indicó en la introducción, un objetivo de estos ejemplos era ilustrar un nanotransportador capaz de ayudar a péptidos a superar las barreras biológicas, entre otras las asociadas a la modalidad de administración oral. La octarginina, R8, es un oligopéptido conocido por su capacidad para promover la penetración intracelular de fármacos. En estos ejemplos, R8 fue modificado con una cadena hidrofóbica y, posteriormente utilizado para la formación de complejos de tamaño nanométrico con insulina. Además, se usaron polímeros PEGilados para mejorar su estabilidad en un medio GIT rico en enzima, así como para optimizar su interacción con las barreras biológicas.

Desarrollo y caracterización físico-química de las NCPs. Para la formación de NCPs, se utilizaron dos derivados hidrófobos diferentes de R8 en estos ejemplos: colesterol-R8 y ácido esteárico-R8. Se analizó la influencia del pH de la solución de insulina y también la relación molar R8:insulina en las características de los complejos resultantes. En cuanto a la influencia de pH de la solución de insulina, se observó que un pH de 11,8 (NaOH 0,01 N), conduce a la asociación más elevada de insulina. Esto puede ser debido al hecho de que, a ese pH, la insulina está altamente cargada negativamente y, de este modo, se maximiza su interacción con R8. Por otro lado, como se muestra en la Fig. 1, la relación molar de R8:insulina tuvo una influencia significativa en el tamaño y el potencial zeta de las NCPs. La tendencia observada para las NCPs fue la misma, con independencia de la cola hidrofóbica asociada a R8. Sin embargo, el tamaño de partícula y dCR (indicador de la concentración de partículas) fue diferente en función de la modificación de R8 con la molécula hidrofóbica. Para la relación molar de 1: 1, se obtuvieron nanopartículas con una carga superficial de -23,5 mV y -25 mV para C12-R8-insulina y Chol-R8-insulina NCPs respectivamente. Esa carga negativa prevalente fue considerada como una indicación de

que la cantidad de insulina estaba en exceso (Fig 1A.). De hecho, la eficacia de asociación (AE) de la insulina observado en estas condiciones fue del 60 a 70%, debido al exceso de insulina. En el caso de los complejos control R8-insulina (R8 no modificado), la eficacia de asociación fue solo del 10% (Fig. 1C). Además, el bajo dCR asociado a estas formulaciones, fue indicativo del escaso rendimiento en el proceso de complejación, resultando en un bajo número de nanopartículas (como se muestra en la baja tasa de recuento derivada, dCR) (Fig. 1D). Al elevar la relación molar R8:insulina, el potencial Z aumenta gradualmente junto con el tamaño de partícula y la AE, lo que implica que existe más insulina asociada a R8 modificado. Cuando el potencial Z de los complejos alcanzó 0 mV (relación molar entre 2: 1 a 3: 1 para R8 modificado y entre 3: 1 a 4: 1 para R8 no modificado), se observó que la totalidad de la insulina se asoció al R8 modificado (AE de la insulina del 100%). Sin embargo, como consecuencia de esa carga neutra se produjo una agregación de los NCP debido a la falta de repulsión electrostática entre ellos, resultando en la formación de partículas más de una micra. Posteriormente, después de superar la relación molar R8 modificado:insulina 4:1, la carga superficial positiva de los complejos era suficientemente fuerte para evitar la agregación y, por lo tanto, para mantener el tamaño nanométrico, mientras que la insulina AE se mantuvo 100%. Sin embargo, en estas condiciones, los complejos formados con R8 no modificado resultaron de tamaño micrométrico.

La Fig 1 muestra (Fig. 1A) potencial-Z, (Fig. 1B) tamaño de partícula, (Fig. 1C), eficacia de asociación, y (Fig. 1D) tasa de recuento derivada de los complejos de C12-R8-insulina no recubiertos, los complejos Chol-R8-insulina y controles R8-insulinaa una relación molar R8:insulina desde 1:1 a 8:1. Los datos están expresados como media +/- SD, n=3.

En general, estas figuras muestran que se pueden obtener complejos nanométricos estables entre la insulina modificada hidrófobamente y R8; sin embargo, el mismo tipo de complejos no pudo formarse usando R8 no modificado. Esto sugiere que la interacción iónica no es la única fuerza impulsora para la formación de complejos y las interacciones hidrofóbicas entre la cadena de C12 o Chol y la insulina también juegan un papel importante. Estos resultados ponen de relieve las ventajas potenciales de los ENCPs frente a los complejos regulares R8-insulina. Las características físico-químicas, AE y la carga de fármaco se muestran en la Tabla 2.

La Tabla 2 muestra las propiedades fisicoquímicas, AE y la carga de fármaco de C12-R8-insulina no recubierto y NCPs Chol-R8-insulina en una relación molar óptima de R8:insulina. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD, $n > 10$ para NCPs C12-R8-insulina; $n = 3$ para NCPs Chol-R8-insulina. La carga final representa la cantidad de insulina en mg presente en la formulación por 100 mg de formulación, dicho de otro modo, el % de peso de la formulación atribuido a la insulina.

Tabla 2

Formulación	Tamaño (nm)	PdI	Z-pot (mV)	AE (%)	Carga Final (%)
C12-R8-insulina 8:1	176 $\pm$ 16	0.1	+20 $\pm$ 1	100%	33.3
Chol-R8-insulina 5:1	171 $\pm$ 26	0.1	+29 $\pm$ 4	100%	40.8
Chol-R8-insulina 6:1	170 $\pm$ 24	0.1	+30 $\pm$ 3	100%	36.5

10 Ejemplo 3

Desarrollo y caracterización fisicoquímica de ENCPs recubiertas. Este ejemplo ilustra la NCP recubierta con derivados de PEG a fin de preservar su estabilidad al entrar en contacto con los fluidos intestinales, y facilitar su difusión a través de la mucosa. En particular, se estudió un polianión PEGilado como PGA-PEG. Se seleccionaron dos polímeros diferentes, PGA-PEG en estructura dibloque o ramificada (Fig. 2), para estudiar su capacidad para formar una película de recubrimiento de los núcleos de C12-R8 modificado-insulina utilizando diferentes métodos de recubrimiento, ya sea por adición de una solución del polímero de recubrimiento a través de la hidratación de una película formada por un polímero de recubrimiento. Los resultados obtenidos con el método de adición de una solución del polímero de recubrimiento indicaron que la eficiencia de asociación (AE) se mantuvo cuando el material de recubrimiento fue el dibloque de PGA-PEG, sin embargo, la AE se vio comprometida (de 100% a 15%) cuando se utilizó polímero ramificado PGA-PEG (Fig. 3). Esto se atribuyó a la diferente forma en que los polímeros de recubrimiento pueden interactuar con el núcleo R8-insulina. El copolímero

ramificado tiene una importante carga negativa atribuida al elevado número de unidades de ácido glutámico de la cadena de PGA (100 unidades de monómero) y el bajo peso molecular de las cadenas colgantes de PEG 0,3 kDa, mientras que el copolímero dibloque tiene sólo 10 unidades de PGA, conectadas en forma de dibloques a cadenas largas de PEG 20 kDa. Por lo tanto, la hipótesis establecida indica que el polímero ramificado y con una alta carga negativa podría tener una tendencia a desplazar a la insulina asociada al C12-R8 tras su adición al complejo. Por el contrario, el método de hidratación de una película del polímero de recubrimiento (Fig. 4) permitió el alojamiento eficiente de ambos tipos de PGA-PEG sobre la superficie de los núcleos NCP catiónicos sin perjudicar la AE de la insulina. La eficiencia del proceso de recubrimiento también se analizó midiendo el potencial-Z, el tamaño de partícula y la AE de insulina a las ENCPs (Fig. 3, Tabla 3). Cuando se utiliza el método de hidratación de la película de recubrimiento, la carga superficial de las NCP cambió de positivo a valores neutros o negativos debido a la unión de PGA-PEG ramificado o dibloque, respectivamente. Sin embargo, se observó sólo una ligera disminución en el potencial-Z cuando se utilizó el método de adición de una solución de ambos tipos de PGA-PEG. Esto podría explicarse por el hecho de que el medio de hidratación de la película de recubrimiento permite una interacción gradual y más eficaz de las moléculas de PGA-PEG con los nanocomplexes, sin alterar la asociación de la insulina a la R8 modificada.

Esta observación fue corroborada por los cambios en el tamaño de las partículas: la disminución de tamaño observado cuando se utilizó PGA-PEG ramificado podría ser atribuido a la formación de una nueva población de nanoestructuras, probablemente debido a la interacción competitiva de PGA-PEG y la insulina con C12 -R8, que resultó en la separación de insulina de la NCP (Fig. 2A). Por el contrario, el método de hidratación de la película facilitó el proceso de recubrimiento, pero no influyó en la asociación de la insulina en las moléculas de C12-R8, incluso utilizando el PGA-PEG ramificado. Esto es posiblemente debido a que la interacción iónica entre PGA-PEG ramificado y la NCP tiene lugar de un modo más gradual cuando se aplica el método de hidratación de la película.

Figs. 3A-3C muestran la eficiencia de asociación del péptido, potencial-Z, y el tamaño de las partículas de las NCPs C12-R8-insulina no recubiertas y las ENCPs recubiertas por polímeros PGA-PEG ramificados y dibloque con diferentes métodos. Los datos se

expresan como la media $\pm$ SD, $n > 10$ para ENCPs PGA-PEG dibloque, y $n = 3$ para el resto.

La Tabla 3 muestra las propiedades físico-químicas, AE y la carga de fármaco de C12-R8-insulina y ENCPs Chol-R8-insulina recubiertas por polímeros PEG-PGA dibloque o ramificado. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD, $n > 10$ para ENCPs C12-R8-insulina recubiertas por dibloque, y $n = 3$ para el resto.

Fig. 4 muestra la preparación de las NCP no recubiertas por interacción iónica hidrófoba y la subsiguiente formación de PGA-PEG recubrió ENCPs por el método de la hidratación de la película.

Tabla 3

PGA-PEG, tipo R8 modificado y relación molar R8:insulina	Tamaño (nm)	PdI	Z-pot (mV)	AE (%)	Carga Final (%)
Ramificado, C12-R8, 8:1	220 $\pm$ 19	0.1	-44 $\pm$ 1	91 $\pm$ 6	18.2 $\pm$ 1.2
Dibloque, C12-R8, 8:1	236 $\pm$ 27	0.1	+2 $\pm$ 2	> 99	> 25.7
Ramificado, Chol-R8, 5:1	202 $\pm$ 28	0.2	-43 $\pm$ 1	81 $\pm$ 4	18.2 $\pm$ 0.9
Dibloque, Chol-R8, 6:1	225 $\pm$ 10	0.2	+2 $\pm$ 3	92 $\pm$ 9	26.8 $\pm$ 2.6

Como una manera de corroborar que el proceso de recubrimiento no alteró el tamaño de partícula y la morfología de las partículas, tanto NCPs y ENCPs fueron observadas por TEM. El tamaño y la apariencia de los nanocomplejos con recubrimientos o no fueron muy similares, lo que es coherente con los datos obtenidos por DLS. Por último, para evaluar además la eficiencia del proceso de recubrimiento, se evaluó la estabilidad de las ENCPs como veremos a continuación.

20 Ejemplo 4

Mejora de la estabilidad de ENCPs en medios intestinales simulados. La estabilidad coloidal de las ENCPs en medio intestinal simulado se puso a prueba en este ejemplo. Aparte del tamaño de partícula, se utilizó el parámetro denominado “dCR” como parámetro estimativo de la concentración de partículas. Como se ha señalado

anteriormente, las NCPs no recubiertas se agregaron inmediatamente tras su incubación en SIF resultando en un tamaño de partícula de hasta varias micras. Una vez recubierto con cualquiera de los dos PGA-PEG dibloque o ramificado, la estabilidad coloidal en SIF se mejoró en gran medida durante al menos 4 h (Fig. 5). Las ENCPs recubiertas por el dibloque PGA-PEG mostraron una estabilidad más prolongada en el tiempo y, por lo tanto, fueron seleccionadas para ser probadas en el medio intestinal más complejo. Cuando se incubaron en medio FaSSIF-V2, las ENCPs recubiertas por el copolímero dibloque PGA-PEG permanecieron coloidalmente estables durante al menos 6 horas (Fig. 6). El tamaño de partícula medio y la polidispersión de la población (siempre por debajo de 0,2), así como dCR se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo, poniendo de manifiesto la estabilidad de las partículas gracias a la protección proporcionada por PEG. Sobre la base de estos datos, las ENCPs C12-R8-insulina recubiertas por el dibloque PGA-PEG se utilizaron para experimentos posteriores.

La Fig. 5 muestra el tamaño de partícula de las NCP C12-R8-insulina sin recubrimiento en SIF a las 0 horas (Fig. 5A), de las NCP recubiertas por PGA-PEG ramificado en SIF a las 4 horas (Fig. 5B), y de las NCP recubiertas por PGA-PEG dibloque en SIF a las 4 horas (Fig. 5C).

Fig. 6 muestra la estabilidad coloidal de ENCPs Chol-R8-insulina y C12-R8-insulina recubiertas por PGA-PEG dibloque en SIF y FaSSIF-V2. Fig. 6A y Fig. 6B muestran el tamaño de partícula y dCR de las ENCPs, respectivamente. El Pdl permanece por debajo de 0,2. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD, $n = 3$.

Estabilidad de las ENCPs durante el almacenamiento y desarrollo de una formulación liofilizada. Las ENCPs recubiertas por el dibloque PGA-PEG, tanto C12-R8-insulina y Chol-R8-insulina, se almacenaron a 4°C, a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$), y a 37°C hasta 60 días. El tamaño de partícula y dCR se monitorizaron con el tiempo. Las ENCPs C12-R8-insulina conservaron las mismas características después de 2 meses de almacenamiento a 4°C, 20°C y 37°C, mientras que se observó una disminución en dCR de las ENCPs Chol-R8-insulina, lo que indica un descenso de población debido a un potencial proceso de degradación o precipitación. En base a estos resultados las ENCPs C12-R8-glulisina recubiertas por el copolímero dibloque PGA-PEG se seleccionaron como el prototipo óptimo para experimentos posteriores. Además, el ensayo de la liofilización mostró que

este prototipo mantiene sus propiedades físico-químicas tras su almacenamiento como producto liofilizado durante 2 meses a temperatura ambiente en un desecador.

Liberación in vitro de insulina de ENCPs en medios intestinales simulados. El estudio de liberación in vitro de las ENCPs constituidas por el dibloque de PGA-PEG/C12-R8-insulina, así como de su control sin recubrimiento se realizó en SIF y medios FaSSIF-V2, a una concentración de insulina 0,17 mg / ml y 0,05 mg / mL. Las formulaciones ensayadas mostraron que no se produjo liberación en ambos medios hasta 6 horas (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la interacción electrostática / hidrofóbica entre el R8-derivado y la insulina en el núcleo C12-R8-insulina es muy fuerte y dificulta el proceso de liberación. Se obtuvieron datos similares cuando las NCPs y ENCPs se incubaron en tampones acetato 100 mM pH 4,0 y 5,0, así como en agua acidificada (pH 2,5). Esto indicaría que cambios menores en la fuerza iónica o en el pH no afectan a la liberación de insulina. Esta ausencia de liberación puede ser considerada positivamente en el sentido en que no va a producirse la liberación de la insulina en el medio intestinal sino una vez que las partículas han entrado en la célula y se produzca la degradación del vehículo.

Ejemplo 5

Prevención de la degradación proteolítica de la insulina asociada a ENCPs. Se supone que nanoportadores de péptidos deben proteger al fármaco asociado frente a la degradación enzimática. Con el fin de investigar la capacidad de ENCPs para proteger la insulina frente a la degradación enzimática en el tracto intestinal, se llevó a cabo un estudio de la proteólisis de las ENCPs C12-R8-insulina recubiertas por el dibloque de PGA-PEG en SIF complementado con (w / v) pancreatina al 1%. Como se muestra en la Fig. 7, los resultados revelaron que después de 15 min de incubación en el citado medio, la insulina libre se encontraba totalmente degradada, mientras que en el caso de la insulina asociada a las NCPs, su degradación se redujo drásticamente (75,6 +/- 8,8%). Teniendo en cuenta que la pancreatina está presente principalmente en la región del duodeno y que las ENCPs se supone que viajan y son retenidas a lo largo de todo el intestino, estos resultados sugieren que la insulina puede sobrevivir en el ambiente intestinal severo cuando se incorpora en las ENCPs C12-R8-insulina recubiertas por el dibloque de PGA-PEG.

La Fig. 7 muestra un estudio de la proteólisis de las ENCPs C12-R8-insulina recubiertas por el dibloque de PGA-PEG y de una solución de insulina libre tras su incubación en SIF

suplementado con pancreatina al 1% (w / v). Los datos se expresan como la media +/- SD, n = 3.

Ejemplo 6

Citotoxicidad de ENCPs en células Caco-2. La citotoxicidad de las NCP, ENCPs y los
 5 controles se evaluó en el modelo Caco-2, usando el ensayo de MTS. Después de un
 período de incubación de 2 horas, se observó un perfil de citotoxicidad dependiente de la
 concentración para todas las formulaciones ensayadas. Los resultados en la Fig. 8
 indicaron que las NCPs exhibieron una toxicidad a concentraciones por encima de 50 a 100
 microgramos/mL, y que su toxicidad se redujo drásticamente sobre el recubrimiento con
 10 PGA-PEG. La citotoxicidad de las NCPs se asoció tanto al resto R8 como al ligando
 hidrófobo siendo colesterol-R8, la que muestra la más alta citotoxicidad. En resumen, la
 citotoxicidad de los diferentes productos ensayados siguió la secuencia: Chol-R8> C12-
 R8> ENCPs>PGA-PEG dibloque o ramificado. En conclusión, estos resultados muestran
 la contribución positiva del proceso de recubrimiento en términos de reducción de la
 15 toxicidad inherente de CPP como potenciadores de la penetración.

La Fig. 8 muestra la viabilidad celular de la línea celular Caco-2 después de 2h de
 incubación con C12-R8-insulina recubierta de dibloque de PGA-PEG, C12-R8, colesterol-
 R8, dibloque copolímero de PGA-PEG y copolímero de PGA-PEG ramificado (Media +/-
 S.D., n = 9).

Ejemplo 7

Efecto de ENCPs sobre la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de células Caco-2. En
 este ejemplo, se realizó un estudio para explorar la capacidad de ENCPs para abrir la unión
 estrecha intercelular, contribuyendo así al transporte de fármacos por vía paracelular. Las
 células se incubaron a 37 °C durante 2 h con ENCPs (C12-R8-insulina recubiertas con
 25 PGA-PEG dibloque o ramificado), así como NCPs (C12-R8-insulina no recubiertas) en
 una concentración 0,01 mg / mL y 0,05 mg / mL no tóxica. Al mismo tiempo, las
 formulaciones se co-incubaron con amarillo Lucifer (LY) para visualizar el efecto del
 transporte paracelular.

Los resultados mostraron que los valores de TEER se vieron ligeramente afectados por las
 30 formulaciones ensayadas a las concentraciones señaladas . Sin embargo, no se observó un
 cambio significativo en los valores de permeabilidad aparente (P_{app}) de LY a través de la

monocapa de células Caco-2 (ver Fig. 3), lo que sugiere que no se produjo una apertura significativa de las uniones estrechas a las concentraciones ensayadas. En un segundo paso, el estudio TEER se realizó a la concentración de 0,2 mg / mL. Al igual que en los casos anteriores, esta concentración más elevada produjo solo un cambio insignificante en el valor de TEER (ver Fig. 4), excluyendo la posibilidad de transporte paracelular de la insulina en las concentraciones ensayadas.

Captación celular cuantitativa y transporte de insulina asociada a ENCPs. Para evaluar la capacidad de ENCPs para transportar la insulina cargada a través de los enterocitos, la cantidad de insulina internalizada por las células, al igual que la cantidad de insulina transportada a través de la monocapa, se analizó cuantitativamente por LC / MS/MS. Las ENCPs y los correspondientes controles (NCPs y la mezcla física de R8 e insulina) se ensayaron a concentraciones de ENCP de 0,2 mg / mL (los controles se ensayaron a la misma concentración de insulina y R8). Los resultados mostrados en la Fig. 9, indican que a una concentración de 0,2 mg / mL, la insulina se interioriza de manera muy eficiente en las células Caco-2, cuando se presenta asociada a NCP (79,37 +/- 3,41%) o a ENCPs (PGA-PEG dibloque)(47.59 +/- 5,79%). Por el contrario, la internalización de la insulina asociada a ENCPs recubiertas con PGA-PEG ramificado se redujo (3,31 +/- 0,39%) y la observada para la mezcla física de R8 y la insulina fue insignificante (0,16 +/- 0,04%). Por otro lado, los resultados presentados en la Fig. 7 indican que una cantidad significativa de la insulina fue transportada al lado basolateral de las monocapas de Caco-2 en el caso de ENCPs (C12-R8-insulina recubiertas con PGA-PEG dibloque) (2,11 +/- 0,33%), mientras que el caso de las ENCPs recubiertas con PGA-PEG ramificado, así como en el caso de las NCP si recubrimiento y de la mezcla física de R8 e insulina, el transporte de insulina a través de la monocapa Caco-2 fue mucho menor.

La diferencia en la internalización y transporte de la insulina a través de la monocapa Caco-2 podría explicarse sobre la base de las características y la composición de las diferentes nanoestructuras. En primer lugar, las diferencias en la carga superficial de ENCPs PGA-PEG dibloque (neutro), PGA-PEG ramificado (carga negativa) y NCPs no recubiertas (carga positiva), presumiblemente, jugaron un papel clave en este proceso. Al entrar en contacto con las células, se cree que las NCPs con carga positiva presentan una interacción más fuerte con la membrana celular que las ENCPs neutras y dotadas de un recubrimiento pegilado. La falta de internalización observada para la insulina asociada a

ENCs recubiertas con PGA-PEG ramificado podría ser debido a la repulsión electrostática entre estos vehículos negativos y la membrana celular dotada igualmente de una carga negativa. Por otra parte, el mayor transporte de insulina observado para las ENCs neutras, en comparación con las NCP catiónicas, podría estar asociado al diferente tránsito intracelular de ambos nanovehículos.

Por otra parte, los resultados muestran que el tamaño de partícula nanométrico de las ENCs y NCP desempeña un papel fundamental en la captación celular. De hecho, la internalización de insulina en forma de mezcla física con R8 se ve drásticamente reducida y ello podría atribuirse a su tamaño micrométrico y descontrolado.

La Fig. 9 muestra el transporte de la insulina a través de la monocapa de células Caco-2 Transwell crecido bajo 37 ° C, 2h de incubación con el NCPs, ENCs o mezcla física de R8 e insulina, n = 3. La relevancia de las diferencias en los valores medios de los diferentes grupos se evaluó usando ANOVA entre grupos de tratamiento seguido de comparación múltiple de Tuke prueba *post-hoc* (SigmaPlot Systat Software Inc, San Joes, CA) y los datos se expresan como media +/- SD. Los cambios se consideraron estadísticamente significativos valores a p <0,05: * p <0,05 en comparación con ENCs recubiertas con PGA-PEG ramificado y mezcla de R8 + insulina; *** p <0,05 en comparación con todos los otros grupos.

En resumen, estos estudios de transporte *in vitro* mostraron que las ENCs recubiertas con PGA-PEG dibloque fueron más eficientes que las NCP C12-R8-insulina para el transporte de insulina a través de la Caco-2 monocapa, y que la mezcla física de R8-insulina fue ineficiente a este respecto. Se cree que este rendimiento puede mejorarse aún más en el caso de las ENCs.

Ejemplo 8

Toxicidad y permeabilidad en tejido intestinal humano. En el ejemplo 7 se describió la capacidad de las ENCs neutras para transportar eficazmente la insulina a través de una monocapa Caco-2. En general, las condiciones simplificadas y controladas del entorno de cultivo celular hacen de este ensayo un buen primer modelo de screening rápido. Este ejemplo muestra los resultados de los estudios de toxicidad y de permeabilidad realizadas en tejido intestinal humano (yeyuno) montado en una cámara Ussing. La primera observación fue que la adición de las ENCs (0,2 mg / mL) sobre el tejido no causó ningún

cambio en los parámetros de electrofisiología (Fig. 10). En cuanto el perfil de toxicidad, la respuesta de forskolina se utilizó como un control adicional para estimar la función fisiológica del tejido. Tras la adición de este agonista de cAMP, el tejido viable normalmente responde con un proceso de metabolismo oxidativo formando cAMP, evocando una mayor corriente de cortocircuito (Isc). Los resultados en la Fig. 10 no mostraron ningún cambio evidente en respuesta forskolina en el tejido incubado con ENCPs, NCPs no recubiertas o C12-R8. En general, teniendo en cuenta la ausencia de alteración en la electrofisiología de tejido, se puede concluir que, en estas condiciones más realistas, ninguna de las muestras analizadas mostró efecto de toxicidad en el tejido intestinal humano.

La Fig. 10 muestra la respuesta de forskolina de tejido intestinal humano después de 3 horas de incubación con ENCPs recubiertas con PGA-PEG dibloque, NCPs y compuesto C12-R8 correspondientes a la misma concentración que en los estudios de citotoxicidad en células Caco-2 monocapa. NP: Además de las muestras analizadas; F: adición de forskolina. n = 3.

Para explorar la permeabilidad de estas ENCPs sobre el tejido intestinal humano, estas ENCPs se marcaron con el colorante fluorescente FITC. La cantidad de ENCPs que difundió a través del tejido se cuantificó por la acumulación de fluorescencia en la cámara basolateral. Como se muestra en la Fig. 11, la permeabilidad observada para las partículas fue despreciable, observando un flujo de 0,05-0,5% de la fluorescencia asociada a las ENCPs cruzó el tejido yeyuno al cabo de 2 h. En consonancia con esta limitada permeabilidad, no fue posible detectar la presencia de insulina en la cámara basolateral. Por otro lado, el análisis del transporte de las partículas mediante microscopía confocal de fluorescencia reveló la capacidad de las nanopartículas para penetrar la mucosa intestinal de un modo uniforme y con una gran intensidad.

La figura 11 muestra el transporte de la fluorescencia asociada a las ENCPs (PGA-PEG dibloque) través del tejido intestinal humano, haciendo uso de cámaras Ussing verticales y horizontales, al cabo de 2 horas de exposición; n = 3.

Estos ejemplos ilustran el comportamiento de un vehículo para la administración oral de insulina. Los vehículos se diseñaron teniendo en cuenta una serie de componentes básicos: un novedoso promotor de penetración (octaarginina hidrofobizada), y un recubrimiento hidrófilo hecho de ácido poliglutámico-PEG, que fue pensado para mejorar la estabilidad

de la nanotransportador en medios intestinales y su penetración a través de la capa de moco que recubre el epitelio intestinal. Los nanoportadores estudiados tenían un tamaño de aproximadamente 200 nm, 100% asociación de insulina y una carga final de hasta el 25,7%. Además, el nanotransportador exhibió un número de características biológicas prometedoras. El recubrimiento con PGA-PEG permitió hacer que el nanotransportador fuese estable en medios intestinales complejos que contienen enzimas y sales biliares. Esta estabilidad coloidal del nanotransportador llevó, así, a una protección de la insulina asociada frente a la degradación por enzimas. Por otra parte, la presencia de R8 modificado condujo a una notable mejora del transporte de insulina a través de la monocapa Caco-2, mientras que no se observó transporte para una mezcla física de la insulina y R8. La permeabilidad de los nanovehículos también se validó en el tejido intestinal humano montado en cámaras Ussing.

Ejemplo 9

Este ejemplo muestra que nanocomplejos r8-insulina hidrófobamente modificados son más estables que los nanocomplejos r8-insulina previamente descritos. En este ejemplo, se identificaron diferencias importantes en relación con la distribución del tamaño de partícula y la estabilidad de NCPs formados con R8 modificada o no modificada con moléculas hidrofóbicas. El tamaño de partícula de los complejos formados con R8 no modificado fue mucho más grande (más de 1 micrómetro) que el de los complejos de R8 modificado con insulina. Además, el número de partículas formadas (estimado a través del dCR) fue mucho más bajo para los complejos formados con R8 no modificado. En general, esto sugiere que el proceso de formación de los nanocomplejos de R8-insulina es menos controlado que el de los complejos C12-R8-insulina y complejos Chol-R8-insulina. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, esto puede ser debido al hecho de que la fuerza motriz para la asociación entre el péptido y el potenciador de la penetración es diferente. Por ejemplo, en el caso de los complejos no modificados R8-insulina la asociación puede ser impulsada por la interacción iónica entre las dos moléculas. Por el contrario, en el caso de R8 modificado hidrófobamente puede haber una tendencia a auto-ensamblarse e interactuar con péptidos, por ejemplo, ya sea mediante fuerzas hidrofóbicas o iónicas. En general, el resultado es una nanoestructura más estable y tamaño más controlado debido a las propiedades anfifílicas del potenciador de la penetración.

En apariencia, la suspensión del complejo de r8-insulina era más turbia, y el aspecto era menos uniforme que la del nanocomplejo C12-r8-insulina. Además, la turbidez del complejo r8-insulina aumentó con el tiempo, mientras que la apariencia de la suspensión C12-R8-insulina siguió siendo la misma. Después de 12 horas, el complejo r8-insulina precipitó en el fondo del vial de vidrio, y la suspensión se volvió transparente; mientras que el nanocomplejo C12-R8-insulina permaneció como un sistema coloidal sin ningún cambio en la apariencia.

Ejemplo 10

Este ejemplo ilustra que la posibilidad de formar un complejo entre C12-octarginina y un polinucleótido, y que el revestimiento de dicho complejo con un poliacídopermite mejorar la estabilidad del nanocomplejo. Este ejemplo ilustra la formación de complejos de C12-octarginina con polinucleótidos, usando poliinosínico: ácido policitidílico (poli (I: C)) como un polinucleótido modelo, y su recubrimiento con ácido poliglutámico-polietielenglicol (PGA-PEG). Este ejemplo también muestra que el recubrimiento PGA-PEG fue útil para la conservación de la estabilidad del nanocomplejo en fluidos biológicos.

Nanocomplejos (NCP) entre C12-r8 y poli(I: C), con una relación de 5: 1 y 2: 1 (p / p) se recubrieron con PGA-PEG, obteniendo una disminución de los valores del potencial inherente al nanocomplejo, que confirmó la formación de un recubrimiento. Como por ejemplo, la formación de ENCPs con el 2:1 (p/p) fue como sigue: 2 mL de una solución de C12-r8 (concentración de 1 mg / mL) se mezcló con 1 mL de poli(I: C) (1 mg / mL). Después de 30 segundos de agitación y 3 minutos de estabilización, se caracterizó el sistema. Para el recubrimiento con PGA-PEG, en primer lugar se procedió a la formación de una película a partir de una solución de PGA-PEG 1 mg/mL haciendo uso de un rotavapor. Seguidamente, , para la hidratación de película, se añadieron 3 mL de la suspensión de NCPs al matraz y se rotaron a 200 rpm durante 10 minutos. La Tabla 2 resume las propiedades físico-químicas de estos prototipos, tanto para las NCPs y los nanocomplejos recubiertos con PGA-PEG (ENCPs), que tiene una relación C12r8:pIC de 2:1 (p / p) (n = 3).

Tabla 2

	Tamaño (nm)	PdI	ζ- Potencial
--	------------------------	------------	-------------------------

			(mV)
NCPs	153 +/- 20	0.08	+ 19 +/- 1
ENCPs	165 +/- 19	0.04	+ 12 +/- 1

Con el fin de confirmar que el poli(I: C) se asoció, se realizó un ensayo en gel de agarosa. Los resultados en la Fig. 13 indican que en todas las formulaciones el poli(I: C) se asoció a las ENCPs. Cuando la incubación de los nanocomplejos con altas cantidades de heparina, se observó un desplazamiento parcial de poli(I: C).

Fig. 13 muestra un ensayo en gel de agarosa sobre las asociación de poli (I: C) a ENCPs; El Carril 1 es el marcador en escalera de ADN (DNA Ladder); los Carriles 2 y 6 corresponden a los ENCPs; los Carriles 3 y 7 corresponden a los sobrenadantes de los ENCPs; los Carriles 4 y 8 corresponden al sedimento que constituyen los ENCPs tras la centrifugación; el Carril 5 corresponde al Poly(I:C) ; y los Carriles 9 y 10 corresponden a los ENCPs incubados con heparina durante 2 h a 37°C (proporción en masa pIC/heparina fue de 1/20).

La estabilidad de ambas formulaciones, NCPs y ENCPs, se estudió en medio intestinal simulado (SIF). Para este ensayo, se diluyeron los nanocomplejos en SIF 1:2 y se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas. Los resultados en la Fig. 14A y 14B muestran que el tamaño y el “dCR” de los ENCPs se conservaron durante al menos 4 horas de incubación en SIF a 37°C.

Fig. 14A muestra la evolución de los valores de tamaño y PDI con el tiempo, y la Fig. 14B de la media del “dCR”.

Aunque se han descrito e ilustrado aquí varias realizaciones de la presente invención, los expertos en la técnica fácilmente imaginarán una variedad de otros medios y/o estructuras para realizar las funciones y/u obtener los resultados y/o una o más de las ventajas descritas en el presente documento. Además cada una de tales variaciones y/o modificaciones se considera que están dentro del alcance de la presente invención. En general, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que todos los parámetros, dimensiones, materiales y configuraciones descritos en este documento están destinados a ser ejemplos y que los parámetros reales, dimensiones, materiales, y / o configuraciones dependerá de la aplicación o aplicaciones específicas para los que hace/ se utilizan las

enseñanzas de la presente invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando solamente experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención aquí descrita. Por lo tanto, debe entenderse que las realizaciones anteriores se presentan a modo de ejemplo solamente y que, dentro
5 del alcance de las reivindicaciones y equivalentes de las mismas adjuntas, la invención puede ponerse en práctica de otro modo que como se describe específicamente y reivindica. La presente invención se dirige a cada característica, sistema, artículo, material, kit, y / o método individual descrita en este documento. Además, cualquier combinación de dos o más de tales características, sistemas, artículos, materiales, equipos, y / o métodos, si
10 tales características, sistemas, artículos, materiales, equipos, y / o métodos no son mutuamente incompatibles, se incluye dentro de la alcance de la presente invención.

Todas las definiciones, tal como se expresan y se usan en este documento, deben entenderse que prevalecen sobre las definiciones del diccionario, las definiciones de los documentos incorporados como referencias, y / o significados corrientes de los términos
15 definidos.

Los artículos indefinidos "un" y "una", tal cual se utiliza aquí en la especificación y en las reivindicaciones, salvo que se indique claramente lo contrario, debe entenderse que significa "al menos uno".

La frase "y / o", tal cual se utiliza aquí en la especificación y en las reivindicaciones, debe
20 entenderse que significa "uno o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están presentes en conjunto en algunos casos y disyuntivamente presente en otros casos. Múltiples elementos que figuran con "y/o" deben interpretarse de la misma manera, es decir, "uno o más" de los elementos así unidos. Otros elementos pueden estar opcionalmente presentes en otros de los elementos identificados específicamente por la
25 cláusula "y / o", ya sean relacionados o no con los elementos identificados específicamente. Por lo tanto, como un ejemplo no limitativo, una referencia a "A y / o B", cuando se utiliza junto con el lenguaje de composición abierta tal como "que comprende" puede referirse, en una realización, a A solamente (que incluye opcionalmente elementos diferentes de B); en otra realización, a B solamente (que incluye opcionalmente elementos
30 distintos de A); y aún en otra realización, para ambos A y B (que incluye opcionalmente otros elementos); etcétera.

Tal como se utiliza aquí en la descripción y en las reivindicaciones, "o" debe entenderse que tiene el mismo significado que "y / o" como se definió anteriormente. Por ejemplo, cuando la separación de elementos de una lista, "o" o "y / o" deberá interpretarse como inclusivo, es decir, la inclusión de al menos uno, pero incluyendo también más de uno, de un número o una lista de elementos, y, opcionalmente, elementos no listados adicionales.

Tal como se utiliza en la descripción y en las reivindicaciones de esta invención, la frase "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, debe entenderse que significa al menos un elemento seleccionado de uno cualquiera o más de los elementos de la lista de elementos, pero no necesariamente que incluye al menos uno de cada uno y todos los elementos enumerados específicamente dentro de la lista de elementos y sin excluir cualquier combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que los elementos pueden estar opcionalmente presentes otros de los elementos identificados específicamente dentro de la lista de elementos a los que la frase "al menos uno" se refiere, sea pariente o no a los elementos identificados específicamente.

Por lo tanto, como un ejemplo no limitante, "al menos uno de A y B" (o, equivalentemente, "al menos uno de A o B", o, de manera equivalente "al menos uno de A y / o B") puede referirse, en una realización, a al menos una, incluyendo opcionalmente más de uno, A, sin B presente (y opcionalmente incluye elementos distintos de B); en otra realización, a al menos una, opcionalmente incluye más de uno, B, sin A presente (y opcionalmente incluyendo elementos distintos de A); en otra realización, al menos una, incluyendo opcionalmente más de uno, A, y al menos uno, opcionalmente incluye más de uno, B (y opcionalmente incluyendo otros elementos), etcétera.

Cuando la palabra "aproximadamente" se usa en el presente documento para referirse a un número, se ha de entender que aún otra realización de la invención incluye ese número no modificado por la presencia de la palabra "aproximadamente".

También debe entenderse que, salvo que se indique claramente lo contrario, en cualquiera de los métodos reivindicados en esta memoria que incluyen más de un paso o acto, el orden de las etapas o actos del método no se limita necesariamente al orden en el que los pasos o actos del método se describen.

REIVINDICACIONES

1. Una composición, que comprende:
una partícula que comprende una porción interior rodeada por un recubrimiento,
5 donde la porción interior comprende un complejo de una molécula cargada
negativamente, y un péptido cargado positivamente que comprende al menos 3
residuos de arginina y vinculados a una porción hidrófoba, donde el recubrimiento
comprende un poliácido y / o un polialcohol.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, donde la molécula cargada negativamente
comprende un péptido.
3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la molécula
cargada negativamente comprende insulina.
- 15 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la molécula
cargada negativamente comprende un ácido nucleico.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la molécula
20 cargada negativamente comprende ADN.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la molécula
cargada negativamente comprende ARN.
- 25 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la molécula
cargada negativamente comprende una proteína.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la molécula
cargada negativamente comprende un anticuerpo.
- 30 9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la molécula
cargada negativamente comprende un anticuerpo monoclonal.

10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el recubrimiento comprende poliácidos y/o polialcoholes.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el recubrimiento se selecciona de entre poli(etilenglicol), ácido poliglutámico, ácido (poli láctico),
5 ácido hialurónico, y combinaciones de los mismos.
12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el recubrimiento comprende ácido poliglutámico.
13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el recubrimiento
10 comprende poli(etilenglicol).
14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el recubrimiento comprende un copolímero de ácido poliglutámico y poli(etilenglicol).
- 15 15. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el recubrimiento comprende ácido (poli láctico).
16. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde el recubrimiento comprende ácido hialurónico.
20
17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde el recubrimiento está sustancialmente libre de péptidos cargados positivamente.
18. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde el recubrimiento
25 está covalentemente unido a un ligando diana.
19. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde el péptido cargado positivamente comprende al menos 3 residuos de arginina.
- 30 20. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, donde el péptido cargado positivamente comprende al menos 6 residuos de arginina.

21. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, donde el péptido cargado positivamente comprende al menos 8 residuos de arginina.
- 5 22. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, donde el péptido cargado positivamente comprende al menos 8 residuos de arginina consecutivos.
23. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, donde el péptido cargado positivamente consiste en RRRRRRRR.
- 10 24. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, donde la molécula hidrófoba está covalentemente unida al péptido cargado positivamente.
25. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, donde la molécula hidrófoba está unida al extremo N-terminal del péptido cargado positivamente.
- 15 26. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, donde la molécula hidrófoba está covalentemente unida al extremo N-terminal del péptido cargado positivamente.
- 20 27. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-26, donde la molécula hidrófoba comprende colesterol.
28. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-27, donde la molécula hidrófoba comprende ácido láurico.
- 25 29. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, donde las partículas tienen un tamaño medio de menos de 1 micrómetro.
30. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-29, donde las partículas tienen un tamaño medio de menos de 500 nm.
- 30 31. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-30, donde las partículas tienen un tamaño medio de menos de 200 nm.

32. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-31, donde la composición comprende además un entorno conteniendo la partícula, donde el entorno
5 comprende un carbohidrato.
33. La composición de la reivindicación 32, donde el carbohidrato comprende sucrosa y/o trealosa.
- 10 34. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-33 para la preparación de un medicamento.
35. Una composición, que comprende:
una nanopartícula que comprende una porción interna rodeada por un
15 recubrimiento, donde la porción interna comprende un complejo de insulina y una molécula que comprende una porción de octaarginina, y donde el recubrimiento comprende un copolímero de ácido poliglutámico y poli(etilenglicol).
36. La composición de la reivindicación 35, donde la porción de octaarginina está
20 unida a una molécula hidrófoba.
37. La composición de la reivindicación 36, donde l molécula hidrófoba está unida al extremo N-terminal de la porción de octaarginina.
- 25 38. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 36 o 37, donde la molécula hidrófoba está covalentemente unida al extremo N-terminal de la porción de octaarginina.
39. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 36-38, donde la molécula
30 hidrófoba comprende colesterol.
40. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 36-39, donde la molécula hidrófoba comprende ácido láurico.

41. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 35-40, donde el recubrimiento está sustancialmente libre de octaarginina.
- 5 42. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 35-41, donde el recubrimiento está covalentemente unido a un ligando dirigido a un órgano o célula diana.
43. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 35-42, donde la nanopartícula
10 tiene un tamaño medio de menos de 1 micrómetro.
44. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 35-43, donde la nanopartícula tiene un tamaño medio de menos de 500 nm.
- 15 45. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 35-44, donde la nanopartícula tiene un tamaño medio de menos de 200 nm.
46. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 35-45, donde la composición además comprende un entorno que contiene la nanopartícula, donde el entorno
20 comprende un carbohidrato.
47. La composición de la reivindicación 46, donde el carbohidrato comprende sucrosa y/o trealosa.
- 25 48. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 35-47, para la preparación de un medicamento.

Figura 1A

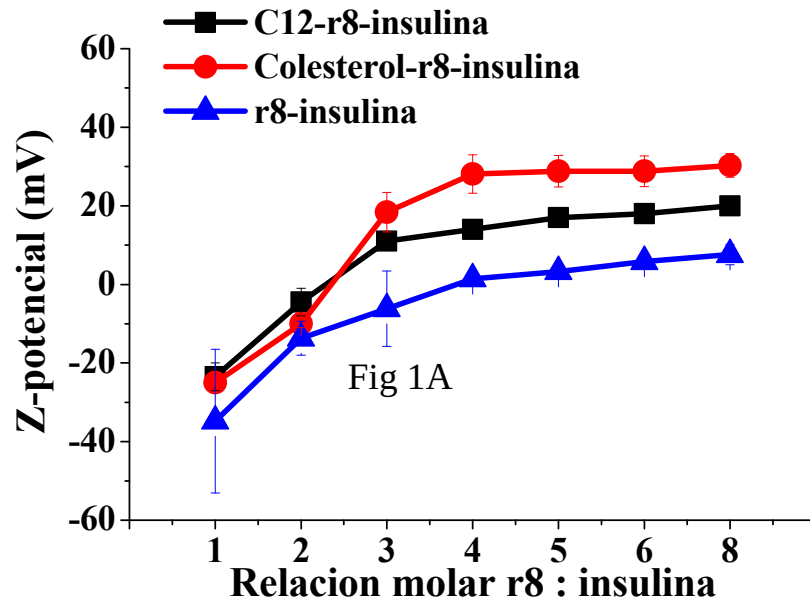


Figura 1B

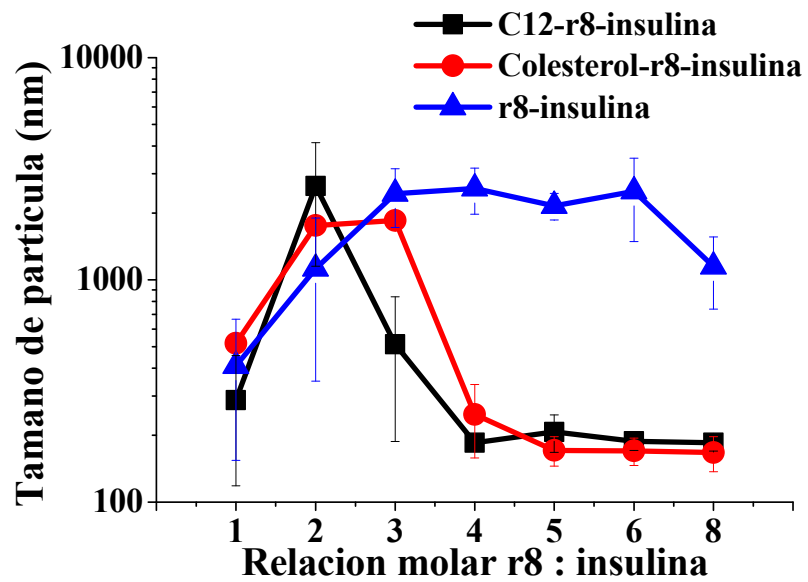


Figura 1C

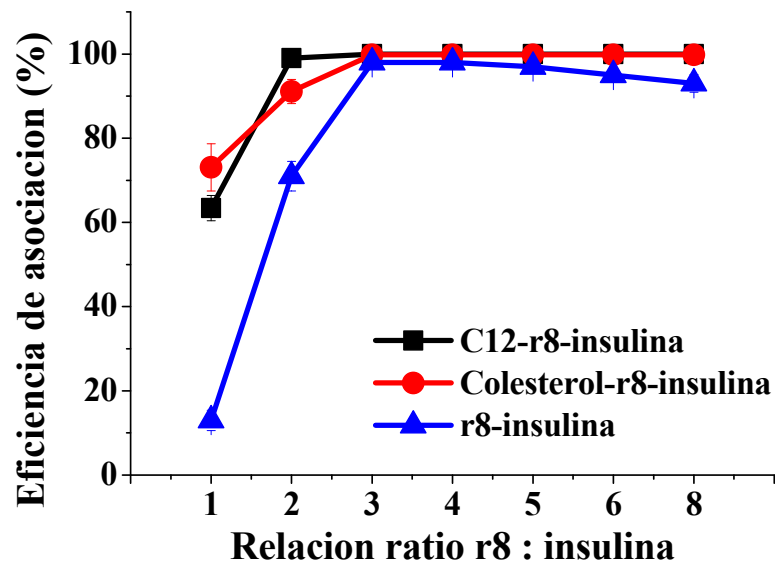


Figura 1 D

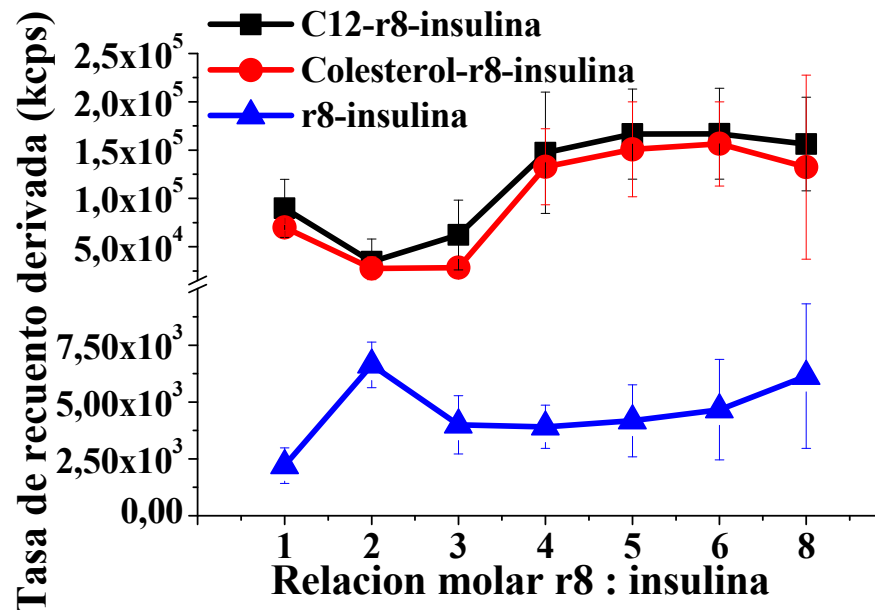


Figura 2A

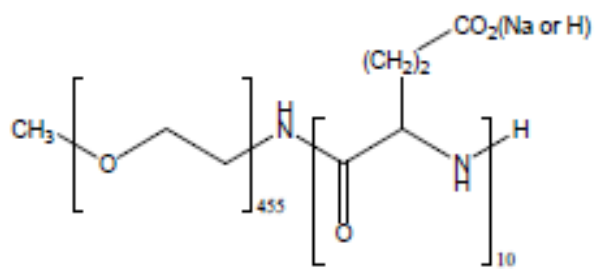


Figura 2B

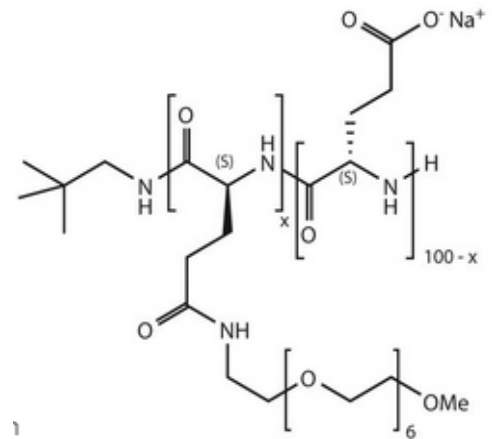


Figura 3A

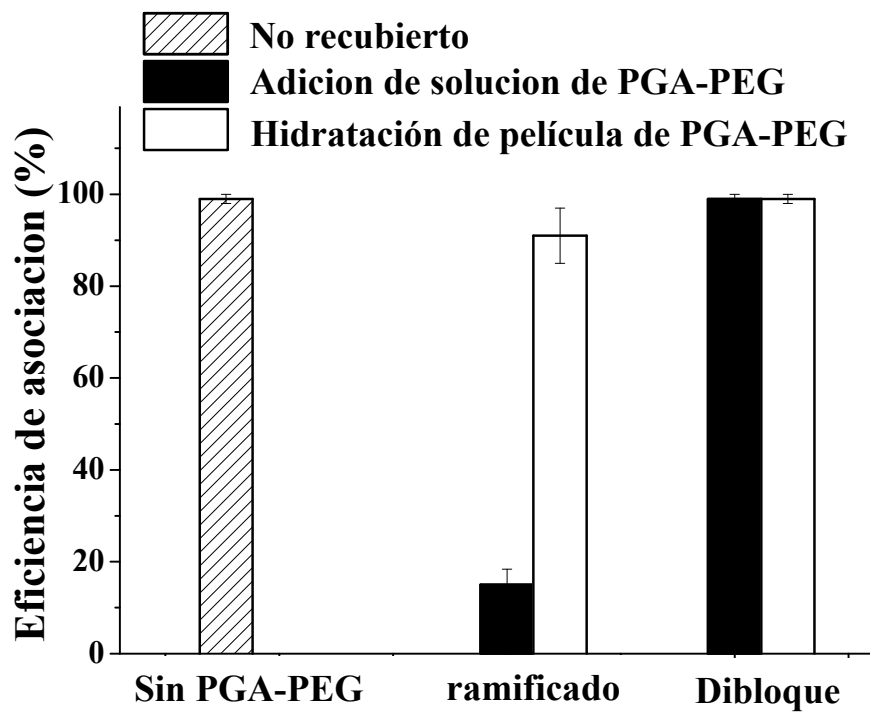


Figura 3B

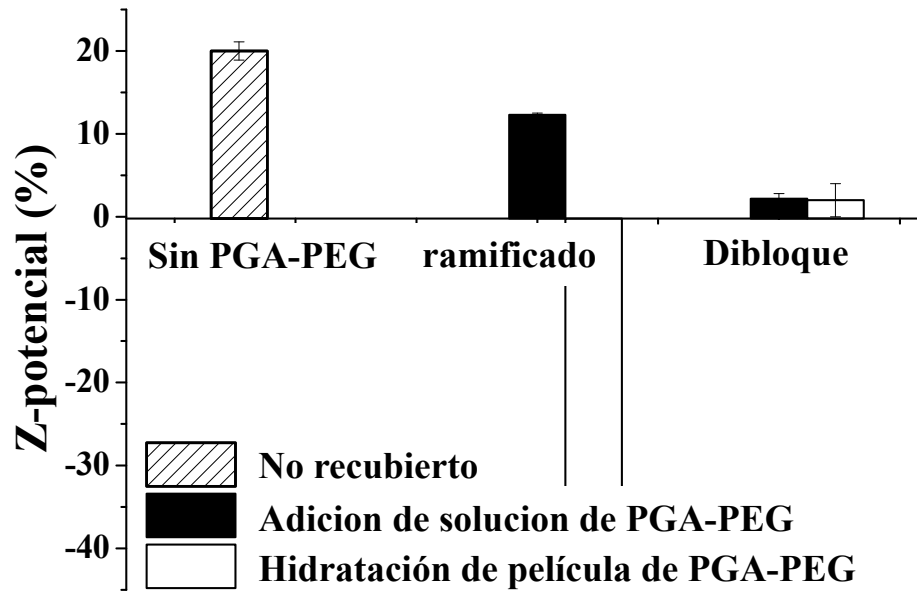


Figura 3C

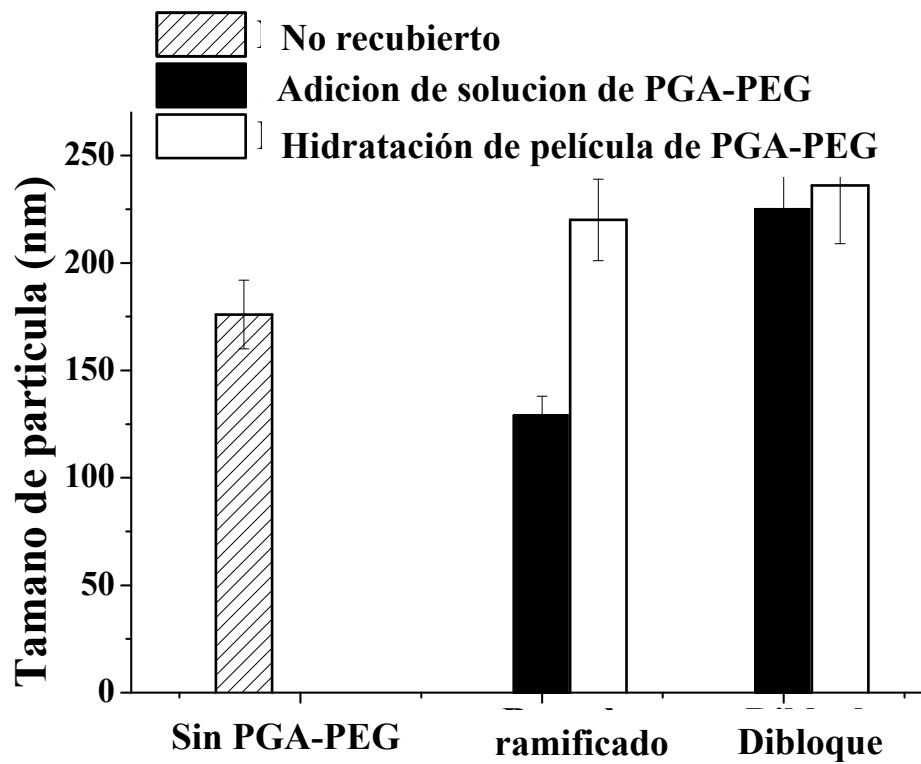


Figura 4

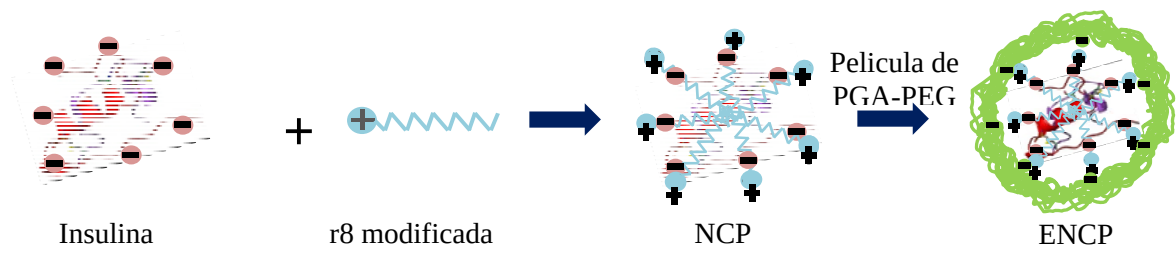


Figura 5A

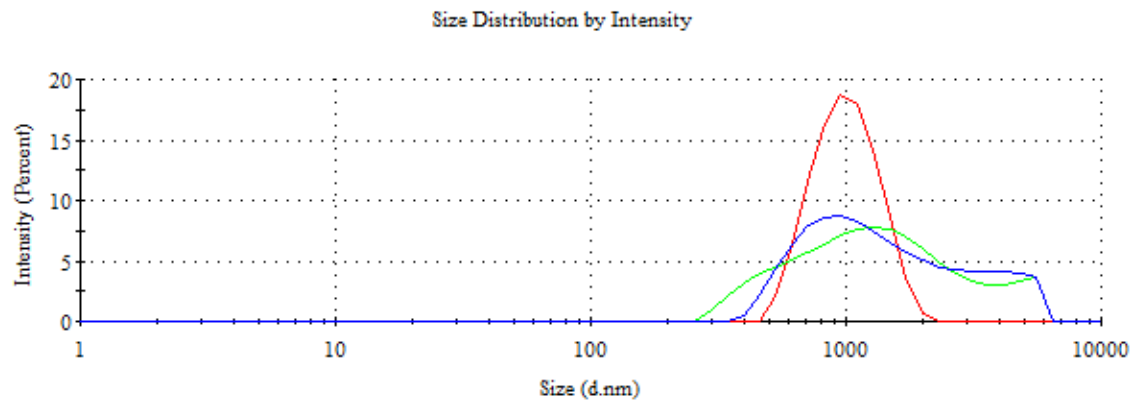


Figura 5B

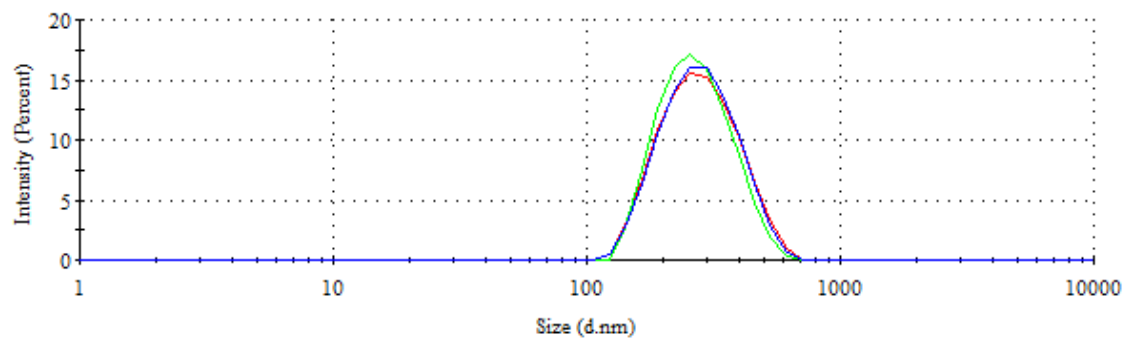


Figura 5C

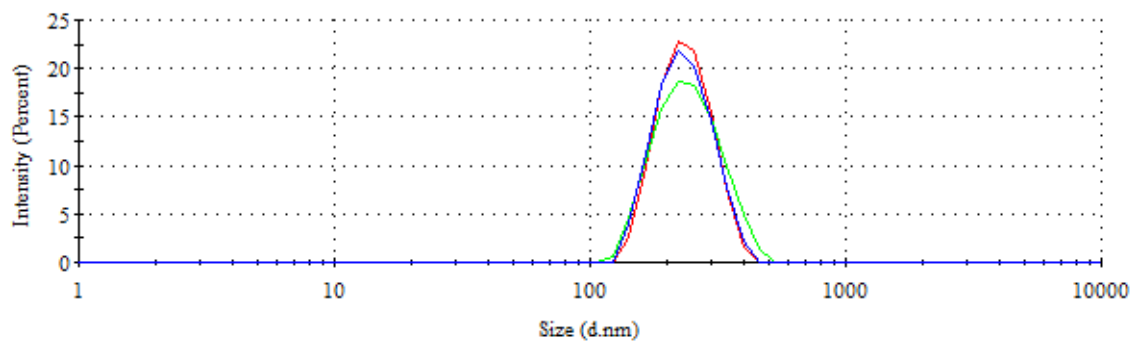


Figura 6A

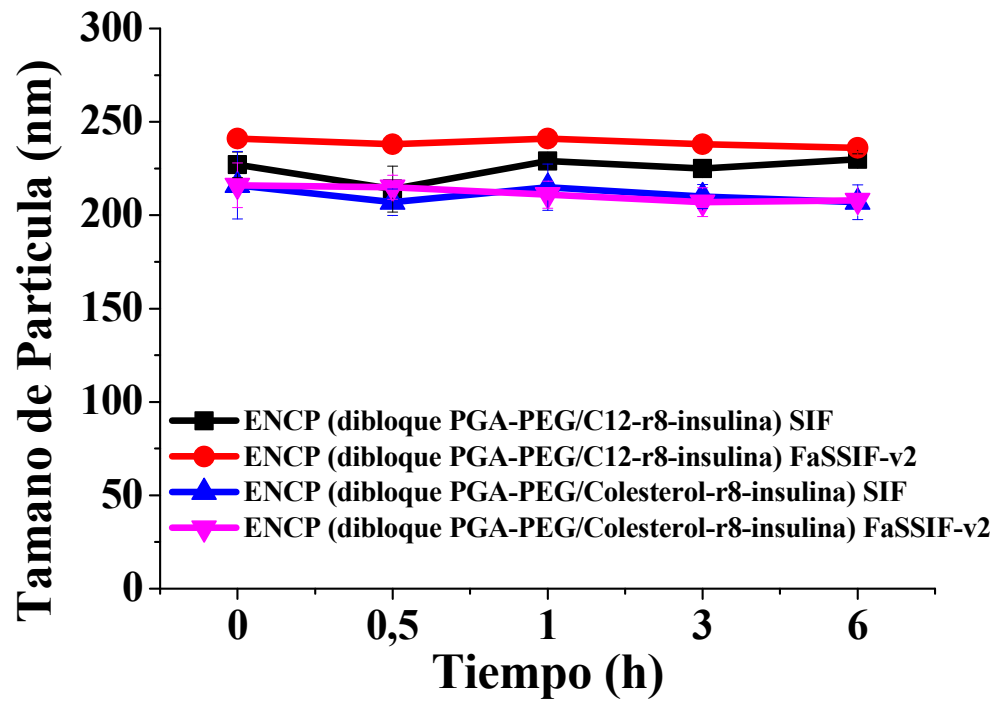


Figura 6B

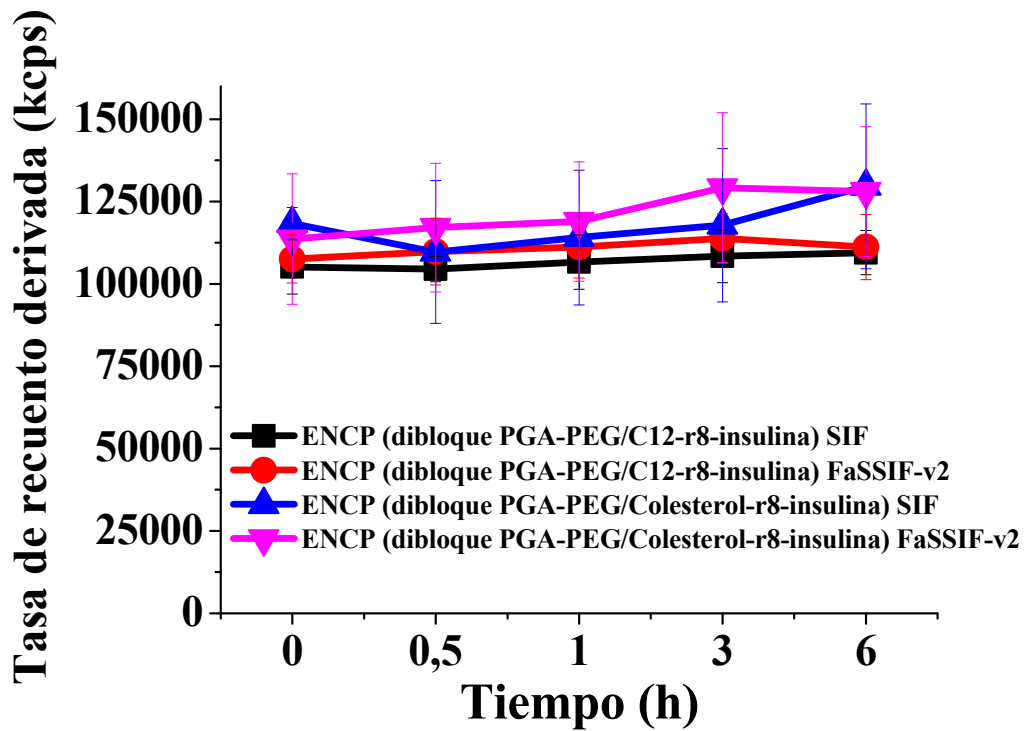


Figura 7

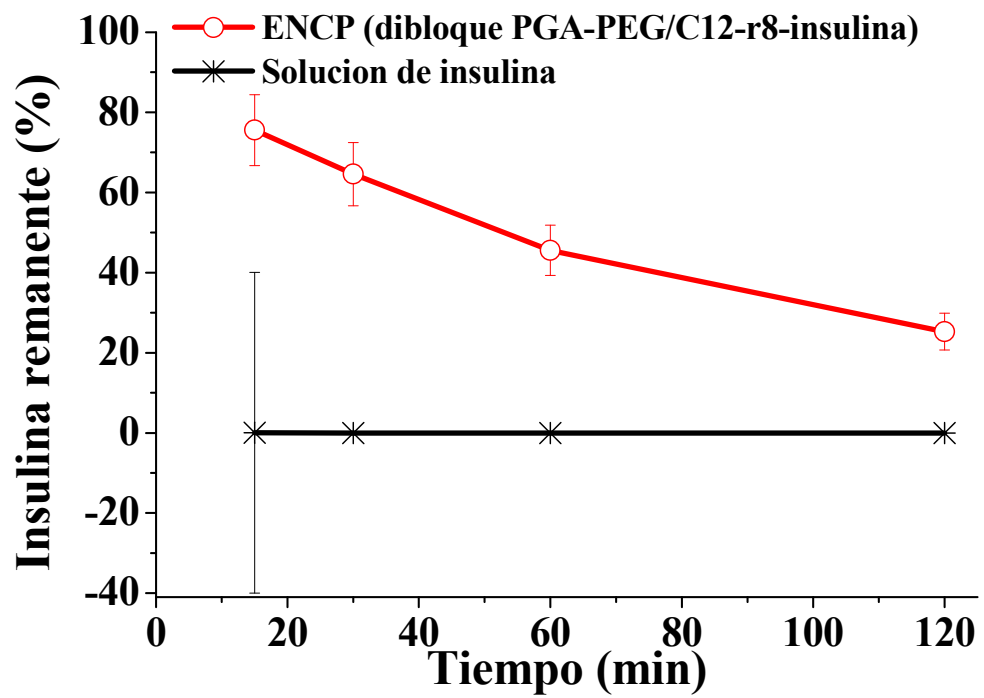


Figura 8

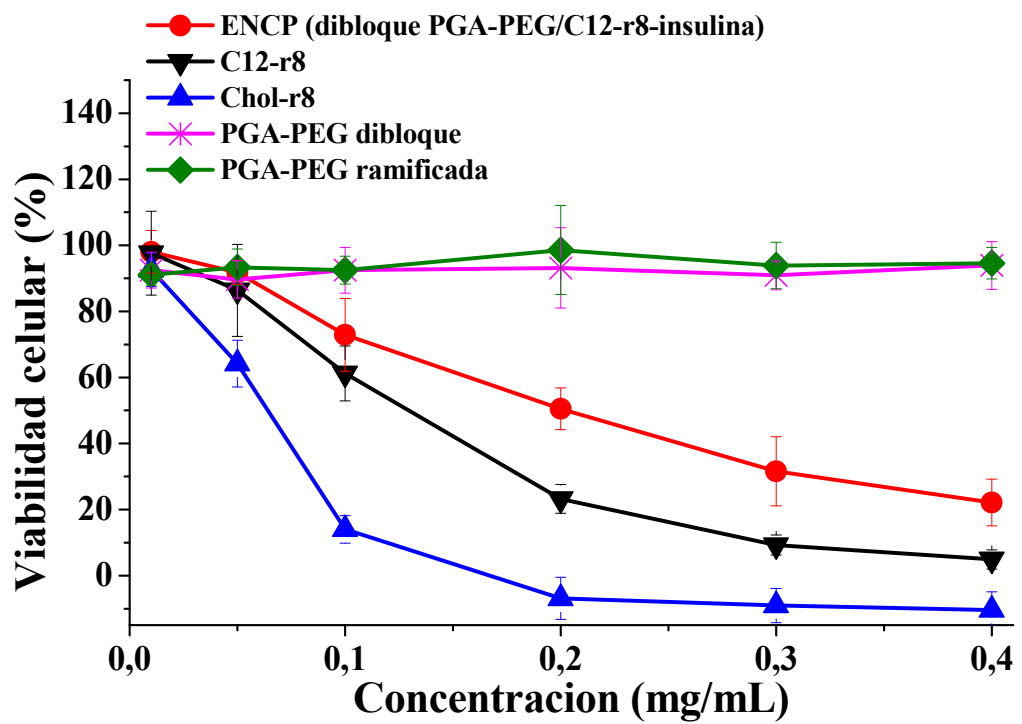


Figura 9A

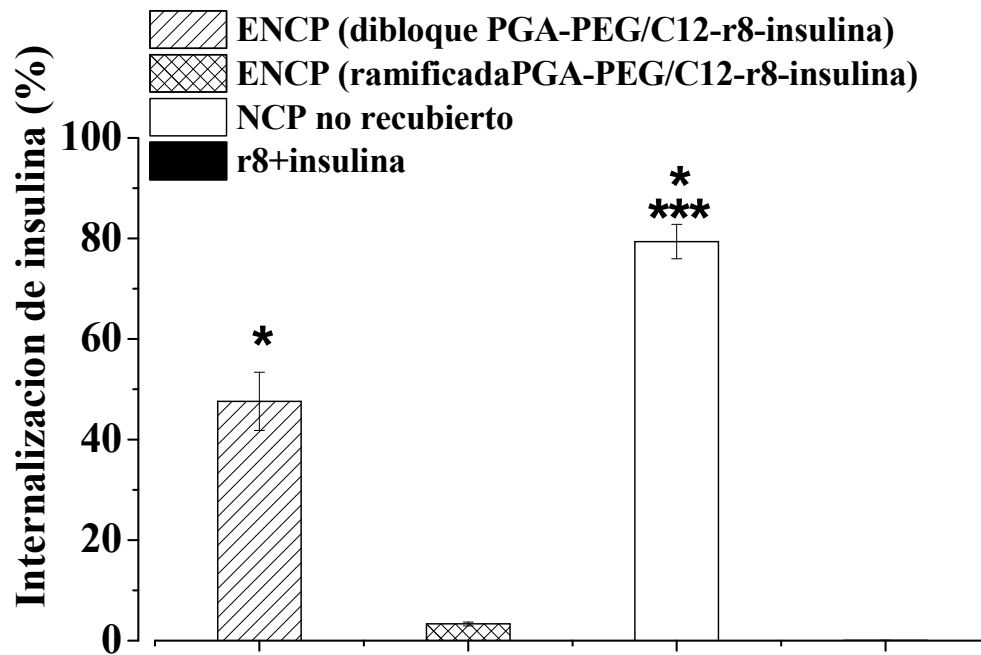


Figura 9B

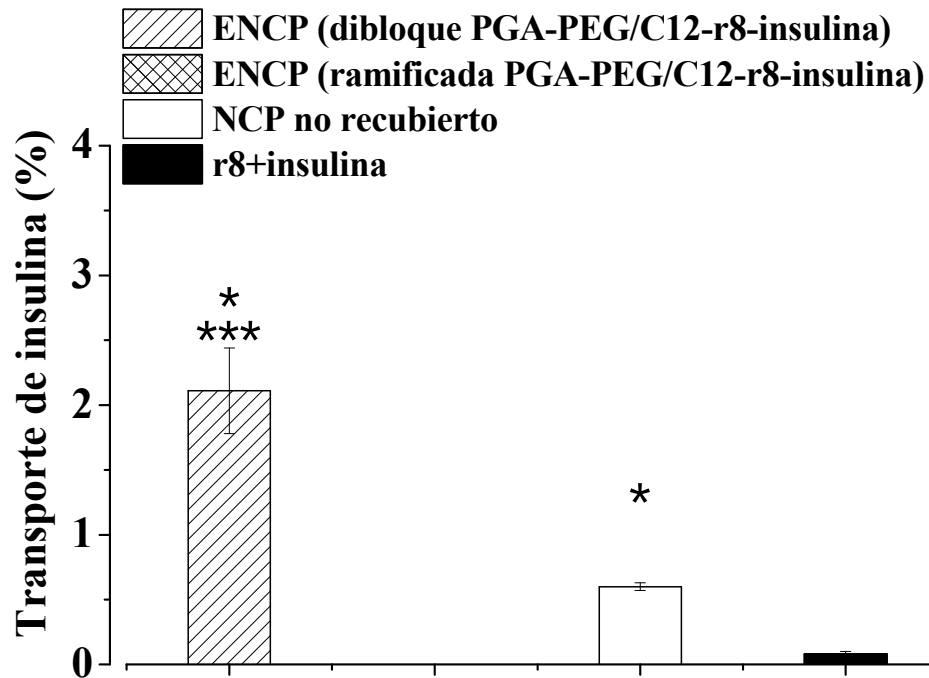


Figura 10A

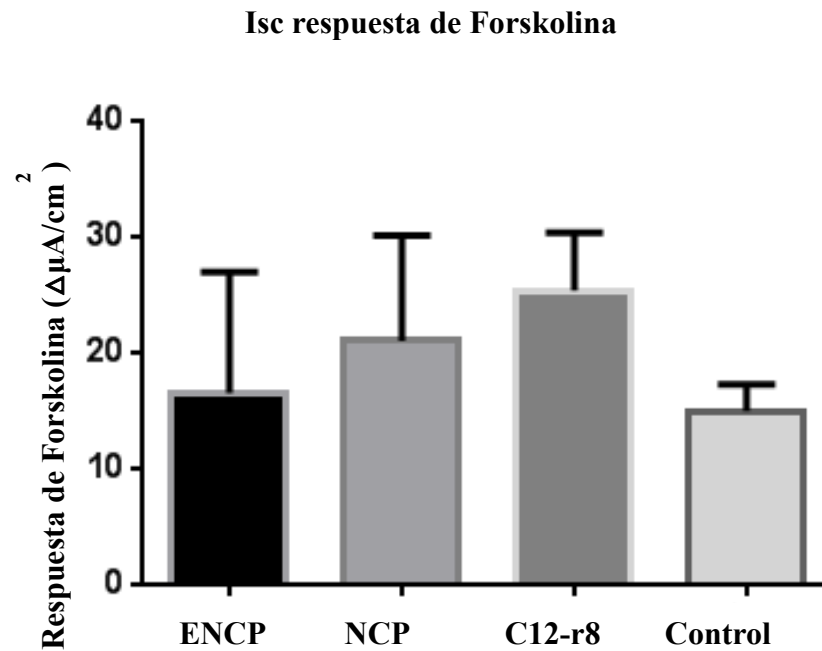


Figura 10B

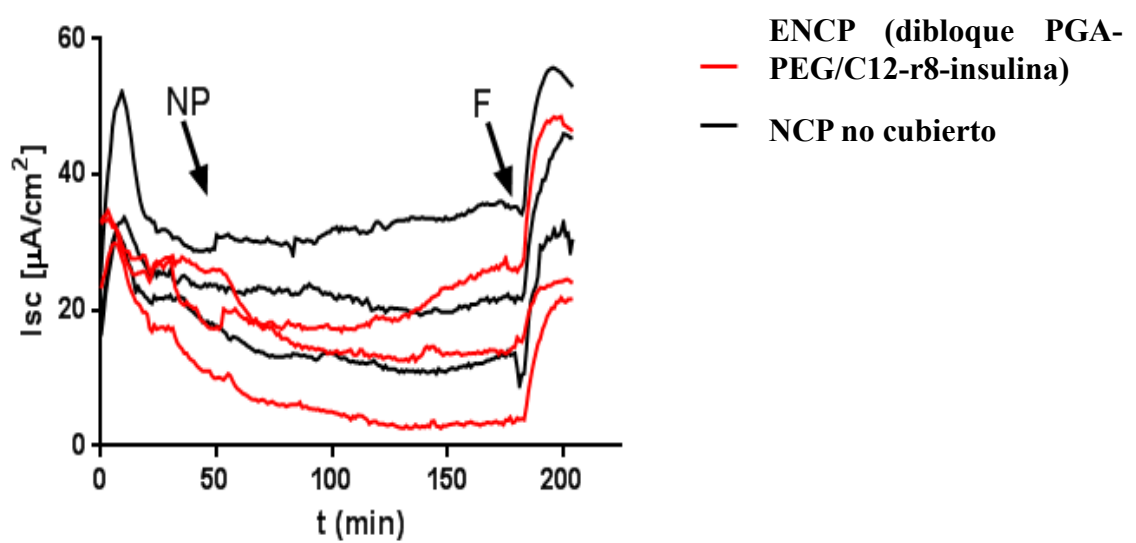


Figura 10C

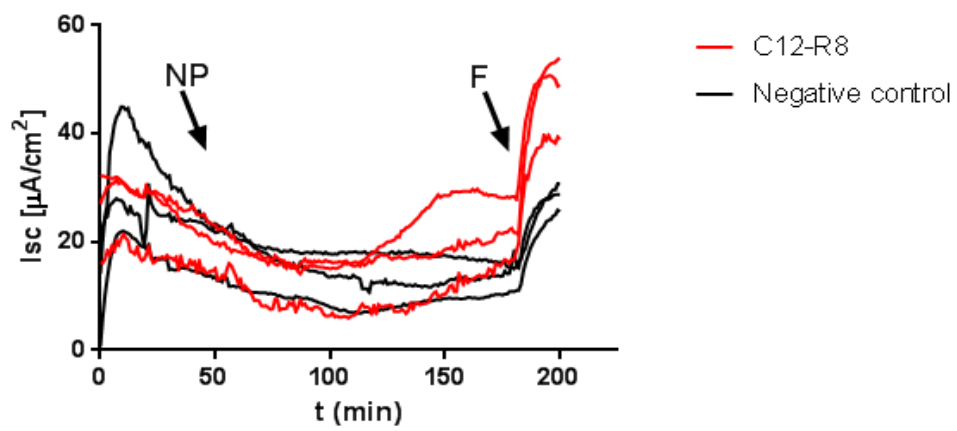


Figura 11A

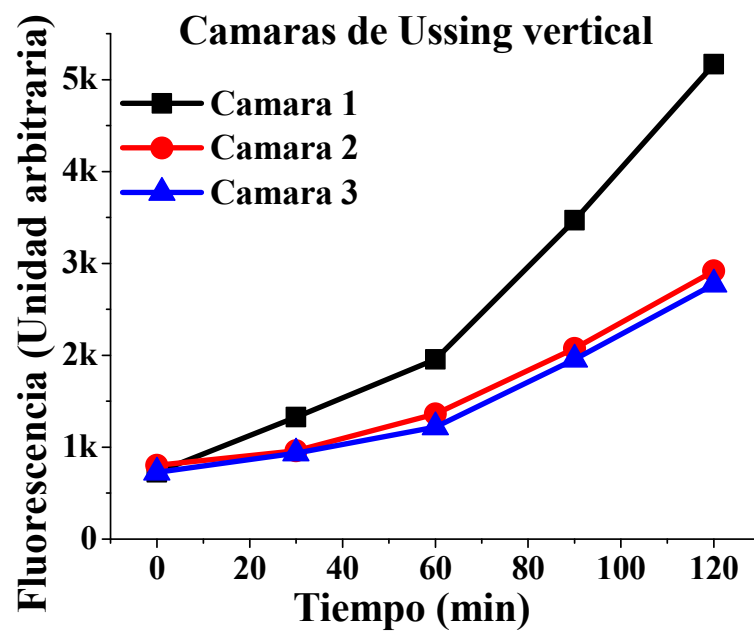


Figura 11B

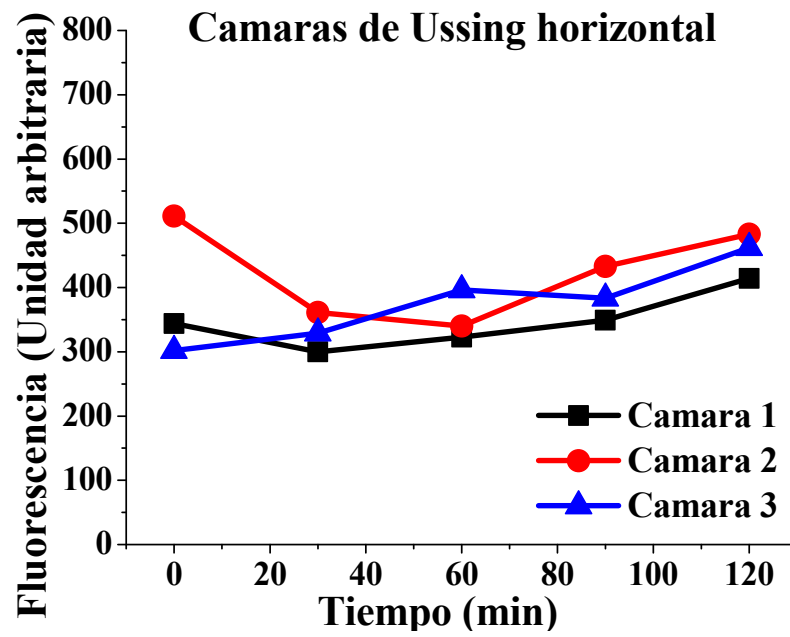


Figura 12

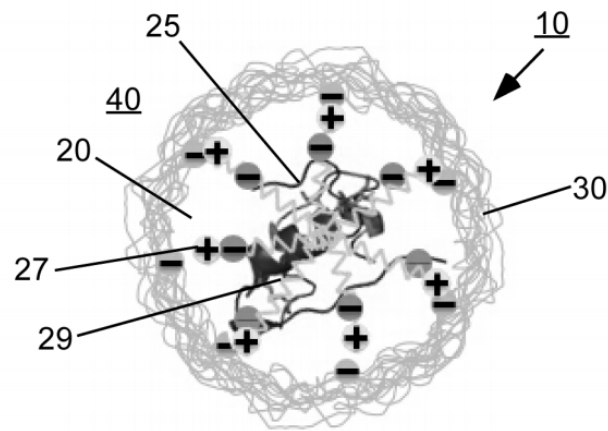


Figura 13

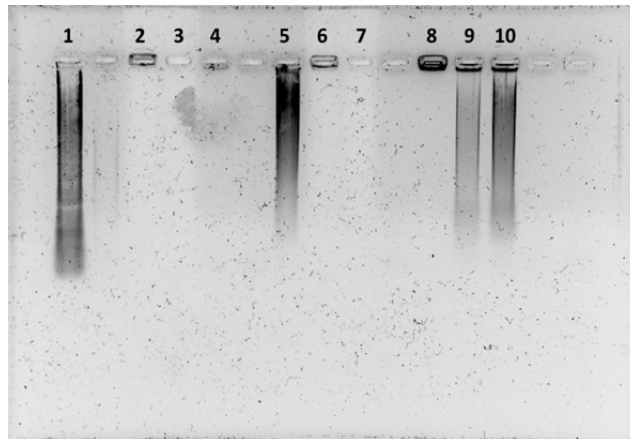


Figura 14A

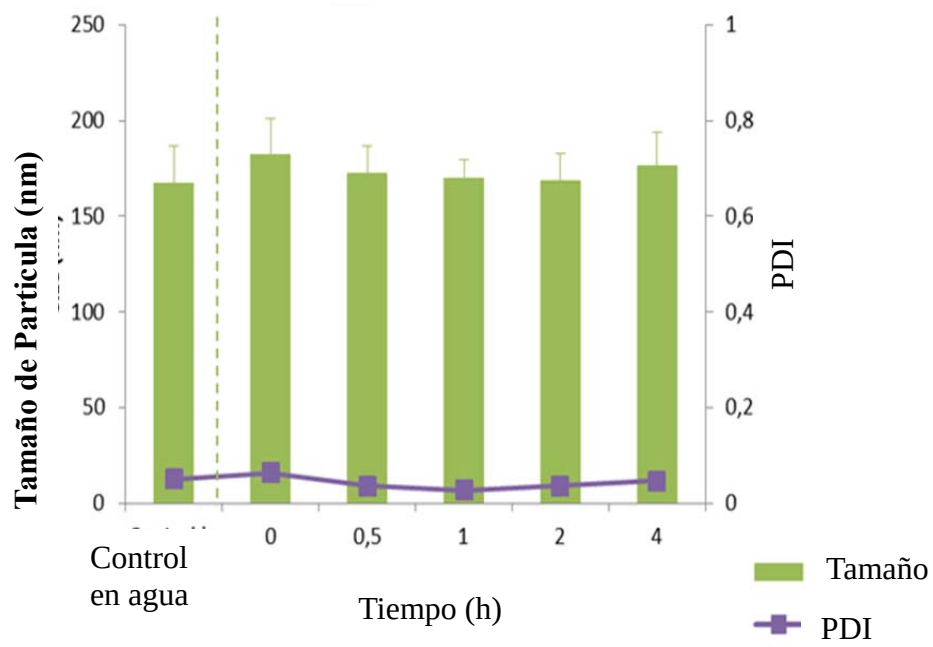


Figura 14B

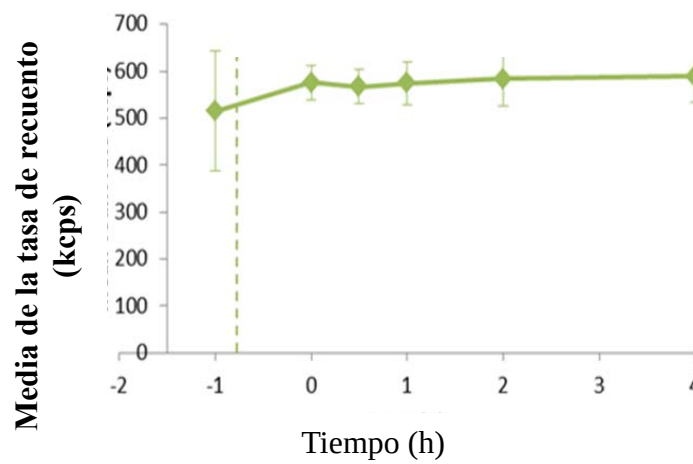


Figura 15A

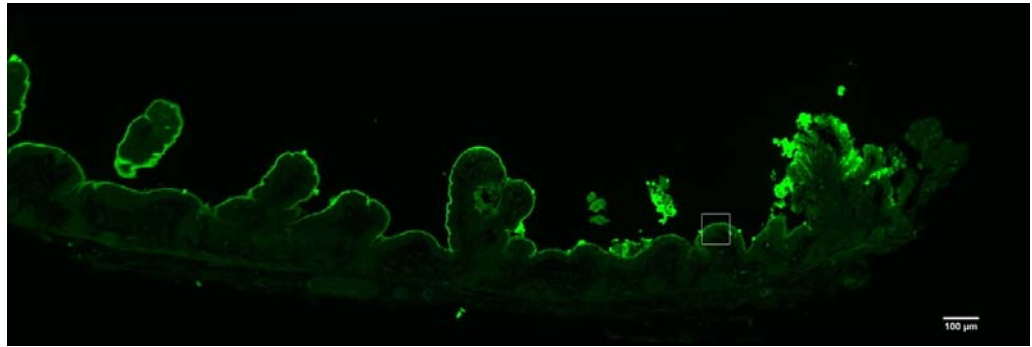


Figura 15B

