Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21 **EXPEDIENTE No.** 05-58645

54 **TÍTULO** "COMPOSICIONES Y METODOS PARA LA ADMINISTRACION MEJORADA POR VIA MUCOSA DE PEPTIDOS FIJADORES AL RECEPTOR DE Y2 Y METODOS PARA TRATAR Y PREVENIR LA OBESIDAD.

51 **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A61K9/00 ; 38/00

71 **SOLICITANTE** NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.

DOMICILIO BOTHELL, WASHINGTON, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74 **APODERADO** HUMBERTO CUBIO CAMACHO

22 **BOGOTÁ, D. C.,** JUNIO 16 DE 2005

(FORMA P 10)

90971 Imprenta nacional de Colombia- 2004

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL 17-07-05

(1) SOLICITUD DE:

X Patente de Invención ___ Patente de Modelo de Utilidad

___ Capítulo I X Capítulo II

SOLICITANTE (71)
Nombre: **NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC.**
Dirección: **3450 Monte Villa Parkway**
Teléfono: **3132408 Fax: 3131647**
E-mail:
Domicilio: **BOTHELL, WASHINGTON, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**
Lugar de constitución: **WASHINGTON, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**

REPRESENTANTE O APODERADO (74)
Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
Dirección: **Carrera 7 No. 74 – 64, Of. 506** C.C. X NIT ___
Teléfono: **3132408 Fax: 3131647** C.E. ___ OTRO ___
E-mail: No. **17'192.062** T.P. **50.887 CSJ**

INVENTOR(ES): (72)
Nombre:
1.- **Steven, C. QUAY**
2.- **Gordon BRANDT**
3.- **Mary, S. KLEPPE**
4.- **Conor, J. MACEVILLY**
Dirección:
1.- **23632 Hwy 99, Ste. F PMB 454 Edmonds**
2.- **780 Kalmia Ct., Issaquah**
3.- **P.O. BOX 1535, Kingston**
4.- **3046 N.W. 60th Street, Seattle**
Teléfono: **3132408 Fax: 3131647**
E-mail:
Domicilio: **WASHINGTON, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

PCT (86)
Solicitud Internacional No. **PCT/US2003/040538** Fecha **17 DE DICIEMBRE DE 2.003**
Publicación Internacional No. **WO 2004/056314** Fecha **08 DE JULIO DE 2.004**

TITULO (54) **"COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA ADMINISTRACIÓN MEJORADA POR VÍA MUCOSA DE PEPTIDOS FIJADORES AL RECEPTOR DE Y2 Y METODOS PARA TRATAR Y PREVENIR LA OBESIDAD"**

Clasificación Internacional (51) A 61 K 9/00; 38/00

Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI X NO ___	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	17 DE DICIEMBRE DE 2002	10/322,266
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	07 DE AGOSTO DE 2003	60/493,226
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	08 DE SEPTIEMBRE DE 2.003	60/501,170
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	10 DE OCTUBRE DE 2.003	60/510,785
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	04 DE NOVIEMBRE DE 2003	60/517,290
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	10 DE NOVIEMBRE DE 2003	60/518,812

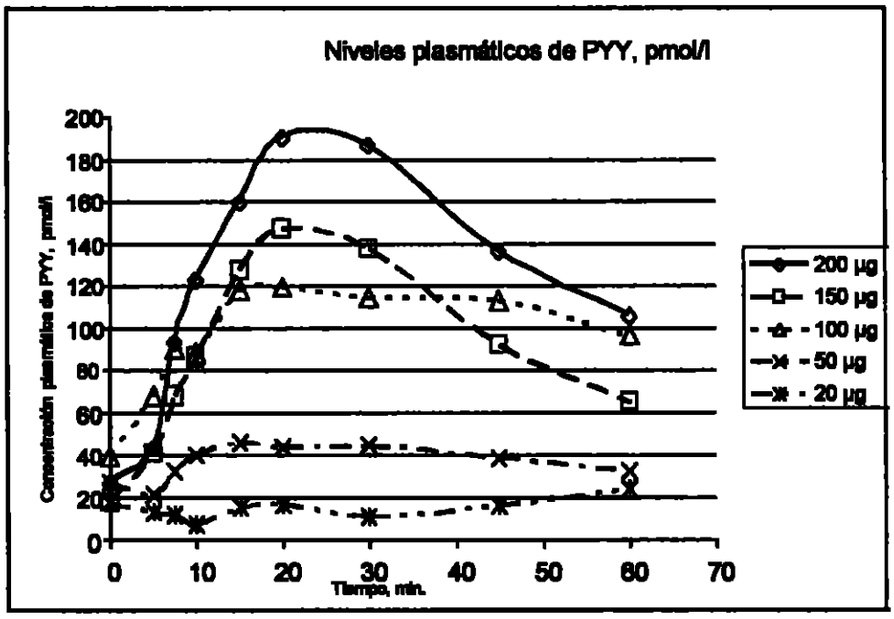
Comprobante de pago No. **05-40,619** Fecha: **03 DE JUNIO DE 2.005**

ANEXOS

- X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ___ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ___ Poderes, si fuere el caso.
- ___ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ___ Declaraciones
- X Copia de la publicación PCT
- X Copia informe búsqueda internacional.
- ___ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- X Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- X Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ___ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- X Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo 28 PCT en Fase Nacional.
- ___ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ___ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ___ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- X Arte final 12 x 12
- ___ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ___ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- X Otros **VER ANEXO**

---

(11) Figura característica:



---

(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA _____

C.C. 17'192.062 de Bogotá

T.P. 50.007 Consejo Superior de La Judicatura

ANEXOS

1.- **Formulario PTO-1382, PCT Request Form, Annex PCT/RO/101. Declaración del listado de secuencia.**

2.- Solicitud para corrección de errores, PCT/RO/106, presentado el 10 de marzo de 2.004, respondido por la Sociedad **NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.**

3.- Notificación del número y fecha de presentación de la solicitud Internacional (PCT Rule 20.5(c), formulario PCT/RO/105, enviado con fecha 10 de marzo de 2.004.

4.- **Petición para corregir Prioridad, formulario PCT/RO/110, enviado con fecha 10 de marzo de 2.004. La solicitud Norteamericana No/ 60/510,785.**

5.- **Respuesta a la petición de corrección en la presentación internacional, poder y declaración firmada por los inventores y reemplazo de páginas, con fecha 5 de abril de 2.004.**

6.- **Informa al solicitante sobre el registro de los países designados por las Oficinas encargadas (PCT Rule 24.2 (a)), formulari PCT/IB/301, de fecha 31 de marzo de 2.004.**

7.- Notificación correspondiente a la presentación de documentos prioritarios emitida el 31 de marzo de 2.004 (Section 411 Admin Instructions), Formulario PCT/IB/304.

8.- Carta y solicitud para Examen Preliminar, formulario PCT/IPEA/401 tal como fue presentada con fecha 06 de julio de 2.004.

9.- Notificación emitida al solicitante sobre la Designación de Oficinas (PCT Rule 47.1 (c)), formulario PCT/IB/308, de 08 de julio de 2.004.

10.- Solicitud de corrección de publicación de Solicitud Internacional. Intento de corrección de registros de Solicitud Prioritaria U.S. No. 60/510,785.

11.- Formulario de corrección para la fase nacional.

54

12.- Correcciones preliminares de acuerdo con el artículo 19, para enmendar reivindicación con fecha 03 de febrero de 2.005.

6

5

PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

REGISTRO
PATENTE DE INVENCIÓN:
COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA ADMINISTRACIÓN MEJORADA POR VÍA MUCOSA DE PÉPTIDOS FIJADORES AL RECEPTOR Y2 Y MÉTODOS PARA TRATAR Y PREVENIR LA OBESIDAD

[illegible] 05363643 20030003 Folio: 332
Fecha Grab: 2005-06-15 15:30:32
Tramite : 011 DIT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 40,829
FECHA : JUNIO 3 DE 2005

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO CAMACHO	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	41442018	03/06/2005	2,215,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL : $	443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Folio 74
to

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

LUNN, Paul, G.
Nastech Pharmaceutical Company Inc.
3450 Monte Villa Parkway
Bothell, WA 98021-8906
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED
JUL 13 2004

Date of mailing *(day/month/year)* 08 July 2004 (08.07.2004)	
Applicant's or agent's file reference 02-04PCT	IMPORTANT NOTICE

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2003/040538	17 December 2003 (17.12.2003)	17 December 2002 (17.12.2002)

Applicant
NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC. et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

   AU, AZ, BY, CH, CN, CO, DZ, EP, HU, JP, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, RU, TM, US

   In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

   AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PG, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

   The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-*bis*)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 08 July 2004 (08.07.2004) under No. WO 2004/056314

4. **TIME LIMITS for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase**

   The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the ~~expiration of 19 months~~ from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

   In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

   For filing a demand for international preliminary examination, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

   It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nora Lindner
Facsimile No.+41 22 740 14 35	Facsimile No.+41 22 338 89 65

Form PCT/IB/308 (April 2002)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 July 2004 (08.07.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/056314 A2

(51) International Patent Classification[7]: A61K

(21) International Application Number:
PCT/US2003/040538

(22) International Filing Date:
17 December 2003 (17.12.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

10/322,266	17 December 2002 (17.12.2002)	US
60/493,226	7 August 2003 (07.08.2003)	US
60/501,170	8 September 2003 (08.09.2003)	US
60/510,785	10 October 2003 (08.10.2003)	US
60/517,290	4 November 2003 (04.11.2003)	US
60/518,812	10 November 2003 (10.11.2003)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC. [US/US]; 3450 Monte Villa Parkway, Bothell, WA 98021-8906 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: QUAY, Steven, C. [US/US]; 23632 Hwy 99, Ste. F PMB 454, Edmonds, WA 98026-9224 (US). BRANDT, Gordon [US/US]; 790 Kalmia Ct., Issaquah, WA 98027 (US). KLEPPE, Mary, S. [US/US]; P.O. Box 1535, Kingston, WA 98346 (US). MACEVILLY, Conor, J. [US/US]; 3046 N.W. 60th Street, Seattle, WA 98107 (US).

(74) Agent: LUNN, Paul, G.; Nastech Pharmaceutical Company Inc., 3450 Monte Villa Parkway, Bothell, WA 98021-8906 (US).

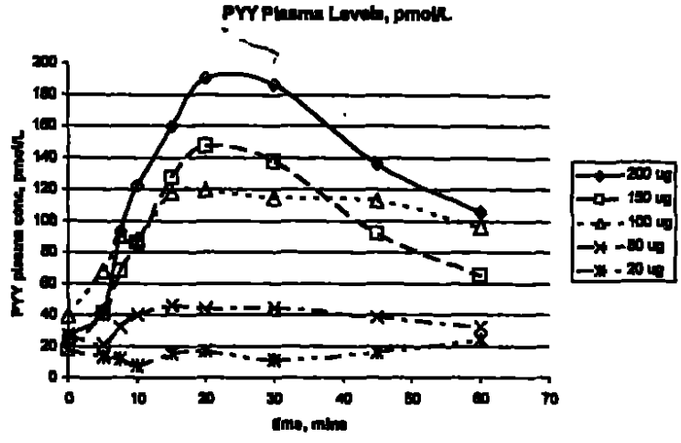
(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY

RECEIVED
JUL 13 2004



(57) Abstract: Pharmaceutical compositions and methods are described comprising at least one peptide YY compound and one or more intranasal delivery-enhancing agents for enhanced nasal mucosal delivery of the peptide YY, for treating a variety of diseases and conditions in mammalian subjects, including obesity. In one aspect, the intranasal delivery formulations and methods provide enhanced delivery of peptide YY to the blood plasma or central nervous system (CNS) tissue or fluid, for example, by yielding a peak concentration (C_{max}) of the peptide YY in the blood plasma or CNS tissue or fluid of the subject that is 20% or greater compared to a peak concentration of the peptide YY in the blood plasma or CNS tissue or fluid of the subject following administration to the subject of a same concentration or dose of the peptide YY to the subject by subcutaneous injection.

WO 2004/056314 A2

European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:
— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

RECEIVED

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 July 2004 (08.07.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/056314 A3

(51) International Patent Classification[7]: A61K 38/00

(21) International Application Number:
PCT/US2003/040538

(22) International Filing Date:
17 December 2003 (17.12.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

10/322,266	17 December 2002 (17.12.2002)	US
60/493,226	7 August 2003 (07.08.2003)	US
60/501,170	8 September 2003 (08.09.2003)	US
60/510,785	10 October 2003 (10.10.2003)	US
60/517,290	4 November 2003 (04.11.2003)	US
60/518,812	10 November 2003 (10.11.2003)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC. [US/US]; 3450 Monte Villa Parkway, Bothell, WA 98021-8906 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: QUAY, Steven, C. [US/US]; 23632 Hwy 99, Ste. F PMB 454, Edmonds, WA 98026-9224 (US). BRANDT, Gordon [US/US]; 790 Kalmia Ct., Issaquah, WA 98027 (US). KLEPPE, Mary, S. [US/US]; P.O. Box 1535, Kingston, WA 98346 (US). MACEVILLY, Conor, J. [US/US]; 3046 N.W. 60th Street, Seattle, WA 98107 (US).

(74) Agent: LUNN, Paul, G.; Nastech Pharmaceutical Company Inc., 3450 Monte Villa Parkway, Bothell, WA 98021-8906 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:
— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

(88) Date of publication of the international search report:
31 March 2005

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2004/056314 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY

(57) Abstract: Pharmaceutical compositions and methods are described comprising at least one peptide YY compound and one or more intranasal delivery-enhancing agents for enhanced nasal mucosal delivery of the peptide YY, for treating a variety of diseases and conditions in mammalian subjects, including obesity. In one aspect, the intranasal delivery formulations and methods provide enhanced delivery of peptide YY to the blood plasma or central nervous system (CNS) tissue or fluid, for example, by yielding a peak concentration (C_{max}) of the peptide YY in the blood plasma or CNS tissue or fluid of the subject that is 20% or greater compared to a peak concentration of the peptide YY in the blood plasma or CNS tissue or fluid of the subject following administration to the subject of a same concentration or dose of the peptide YY to the subject by subcutaneous injection.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/40538

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 38/00
US CL : 514/12; 530/324
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 514/12; 530/324

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
West and STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Morley "An approach to the development of drugs for appetite disorders" Neuropsychobiology, 1989, vol. 21, pp.-22-30	1-177
Y	Morley "Peptide YY (PYY), a potent orexigenic agent" Brain Research, 1985, vol. 341, pp.-200-203	1-177
Y	Lelbowitz " Analysis of neuropeptide Y-induced feeding: dissociation of Y1 and Y2 receptor effects on natural meal patterns" Peptides, 1991, vol. 12, pp.-1251-1260	1-177

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 December 2004 (10.12.2004)	21 JAN 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Roy Teller Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA ADMINISTRACIÓN MEJORADA POR VÍA MUCOSA DE PÉPTIDOS FIJADORES AL RECEPTOR DE Y2 Y MÉTODOS PARA TRATAR Y PREVENIR LA OBESIDAD

Antecedentes de la Invención

La obesidad y los trastornos que ella causa constituyen problemas muy serios de salud que son frecuentes en los Estados Unidos y en el mundo entero. La obesidad elevada del cuerpo es el factor de riesgo más importante conocido de la diabetes mellitus tipo 2, y representa un importante factor de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. La obesidad es un factor de riesgo reconocido de la hipertensión, la arterioesclerosis, la insuficiencia cardíaca congestiva, el accidente cerebrovascular, la enfermedad de la vesícula biliar, la osteoartritis, la apnea del sueño, los trastornos de la reproducción, tales como el síndrome de poliquistosis ovárica, los cánceres de mama, próstata y colon, y, además, de una mayor incidencia de complicaciones de la anestesia general. Asimismo, restringe la longevidad y conlleva un serio riesgo de comorbilidad por las afecciones ya descriptas y por alteraciones tales como infecciones, várices, *acantosis nigricans*, eczemas, intolerancia al ejercicio, resistencia a la insulina, hipertensión, hipercolesterolemia, colelitiasis, lesiones ortopédicas y enfermedad tromboembólica. La obesidad también constituye un factor de riesgo del grupo de enfermedades denominado "síndrome de resistencia a la insulina" o "Síndrome X".

Ha quedado demostrado que ciertos péptidos que se fijan al receptor de Y2 cuando son administrados periféricamente a un mamífero provocan pérdida de peso. Los péptidos fijadores al receptor de Y2 son neuropéptidos que se unen a este receptor. Los neuropéptidos son pequeños péptidos que se originan a partir de proteínas precursoras de gran tamaño sintetizadas por neuronas peptidérgicas y células endocrinas o parácrinas. Con frecuencia, los precursores contienen múltiples péptidos biológicamente activos. El cerebro contiene una amplia variedad de neuropéptidos que devienen de un empalme alternativo de transcriptores genéticos primarios y procesamiento de precursores diferenciales. Los receptores neuropéptidos sirven para discriminar entre los ligandos y para activar las señales apropiadas. Estos péptidos fijadores al receptor de Y2 pertenecen

a una familia de péptidos de la que forman parte el péptido YY (PYY), el neuropéptido Y (NPY) y el péptido pancreático (PP).

El NPY es un péptido de 36 aminoácidos y es el neuropéptido más abundante de los identificados en el cerebro de los mamíferos. Es un importante regulador de los sistemas nervioso central y periféricos que influye en una variedad de parámetros fisiológicos, entre los que se cuentan la actividad psicomotora, la ingesta de alimentos, la secreción endocrina central y la vasoactividad del sistema cardiovascular. Los nervios simpáticos que abastecen a los vasos coronarios, cerebrales y renales contienen altas concentraciones de NPY, que provocan vasoconstricción. Se han identificado sitios de uniones NPY en una variedad de tejidos, entre ellos, el bazo, las membranas intestinales, el cerebro, el músculo liso de la aorta, los riñones, los testículos y la placenta.

Desde la perspectiva farmacológica actual, el receptor del neuropéptido Y (NPY) se define por las relaciones estructurales de su actividad dentro de la familia de polipéptidos pancreáticos. Esta familia incluye al NPY, que se sintetiza principalmente en las neuronas; el PYY, sintetizado principalmente por las células endocrinas del intestino; y el PP, sintetizado principalmente por las células endocrinas del páncreas. Estos péptidos de aproximadamente 36 aminoácidos tienen una estructura helicoidal compacta que comprende una "banda PP" en el centro del péptido. Entre sus características específicas se cuentan una hélice de poliprolina en los residuos 1 a 8, una hélice β en los residuos 9 a 14, una hélice α en los residuos 15 a 30, una región C terminal de proyección exterior en los residuos 30 a 36, y una amida terminal de carboxilo, que aparentemente es fundamental para la actividad biológica. Estos péptidos han sido empleados para definir al menos cinco subtipos de receptores denominados "Y1", "Y2", "Y3", "Y4" e "Y5". El reconocimiento del receptor Y1 por parte del NPY consta de las regiones terminales N y C del péptido; el reemplazo de Gln^{34} con Pro^{34} es bastante bien tolerado. El reconocimiento del receptor de Y2 por parte del NPY depende primordialmente de los cuatro residuos del C terminal del péptido (Arg^{33} - Gln^{34} -Arg^{35} - Tir^{36} -NH_2) precedido por una hélice α anfipática; el reemplazo de Gln^{34} con Pro^{34} no es bien tolerado. Una de las principales características farmacológicas que distinguen a los Y1 de los Y2 radica en que el receptor de Y2 (y no el receptor Y1) tiene gran afinidad por el fragmento carboxilo terminal NPY del péptido NPY (13-36) y por el fragmento PYY del PYY (22-36).

Según se ha demostrado, cuando se inyecta periféricamente el péptido de 36 aminoácidos denominado "Péptido YY" (1-36) [PYY_{3-36}] [YPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY, SEQ ID NO.: 1] a un individuo provoca pérdida de peso y, por ende, puede ser utilizado como fármaco para tratar la obesidad y otras enfermedades relacionadas con ella, Morley, J. *Neuropsychobiology 21*:22-30 (1989). Luego se halló que, para tener ese efecto, el PYY se unía a un receptor de Y2 y que la unión de un agonista de Y2 con un receptor de Y2 disminuía la ingesta de hidratos de carbono, proteínas y volumen de las comidas, Leibowitz, S.F. *et al. Peptides, 12:* 1251-1260 (1991). Otra forma molecular del ***PYY*** es PYY_{3-36} IKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY [SEQ ID NO.: 2], Eberlein, Eysselein *et al. Peptides 10*: 797-803, 1989). Este fragmento constituye aproximadamente el 40% del total de inmunorreactividad pseudo ***PYY*** en extractos intestinales humanos y caninos y cerca del 36% de inmunorreactividad ***PYY*** plasmática total en ayunas, porcentaje que aumenta a algo más del 50% tras una comida. Aparentemente, se trata de un producto de la división de la dipeptidil peptidasa IV (DPP4) del ***PYY***. Según la bibliografía, el PYY_{3-36} es un ligando selectivo que se produce en los receptores Y2 e Y5, que son los únicos que farmacológicamente prefieren análogos NPY truncados en su N terminal (es decir, fragmentos C terminales de los análogos). También ha quedado demostrado que un fragmento de PYY que sólo contiene residuos 22-36 de todos modos se fija al receptor de Y2. Sin embargo, si cualquiera de los carboxilos terminales de los péptidos se divide, el péptido pierde la capacidad de fijarse al receptor de Y2. Por ello, un agonista de PYY es un péptido que contiene una secuencia parcial de PYY de longitud completa y es capaz de fijarse al receptor de Y2 en el núcleo arciforme del hipotálamo. En consecuencia, el término PYY se refiere a un PYY de longitud completa y a cualquier fragmento de PYY que se fije a un receptor de Y2.

Es sabido que los PYY y los PYY_{3-36} pueden ser administrados por infusión o inyección intravenosa para tratar la hipotensión con riesgo de vida, tal como la que se presenta en el caso de *shock*, en especial aquélla causada por endotoxinas (Patente de EE.UU. 4.839.343), para inhibir la proliferación de tumores pancreáticos en mamíferos mediante perfusión parenteral, intravenosa o subcutánea, y por implantación (Patente de EE.UU. 5.574.010), y, además, para tratar la obesidad (Morley, J. *Neuropsychobiology 21*:22-30 (1989) y solicitud de Patente EE.UU. 20020141985). También se asevera que los PYY pueden ser administrados por las vías parenteral, oral, nasal, rectal y tópica a

animales domesticados o a seres humanos en una cantidad que sea eficaz para aumentar la ganancia ponderal de dicho sujeto aumentando la absorción gastrointestinal del nutriente sodio-dependiente cotransportado (Patente de EE.UU. 5.912.227). No obstante, para el tratamiento de la obesidad y otras enfermedades relacionadas con ella, incluida la diabetes, el modo de administración queda limitado a la infusión intravenosa (IV) sin formulaciones eficaces optimizadas para la administración alternativa de PYY_{3-36}. Ninguna de las referencias antes mencionadas proporciona formulaciones que contengan PYY ni PYY_{3-36} combinado con excipientes que mejoren la absorción por la mucosa (nasal, bucal, oral), ni tampoco señalan el valor de las formulaciones de péptidos fijadores al receptor de Y2 libres de endotoxinas para la administración no infundida. Por lo tanto, queda clara la necesidad de elaborar formulaciones y métodos para administrar el PYY_{3-36}.

Resumen de la Invención

La presente invención cumple con las necesidades ya descriptas, satisface otros objetivos y brinda otras ventajas porque proporciona nuevos métodos y composiciones que son eficaces para la administración, especialmente por la mucosa, especialmente por vía intranasal, de un péptido fijador al receptor de Y2, tal como el PYY, el Péptido Pancreático (PP) y el NPY, para tratar la obesidad, provocar saciedad, favorecer la pérdida de peso y prevenir o curar la diabetes. En ciertos aspectos de la invención, el péptido fijador al receptor de Y2 se administra en formulaciones del agonista receptor de Y2 en la mucosa intranasal con el fin de aumentar la concentración plasmática en un mamífero del péptido fijador al receptor de Y2 en al menos 5 pmol, preferentemente en al menos 10 pmol. Es más, las formulaciones predilectas serían capaces de aumentar la concentración plasmática en los mamíferos del péptido fijador al receptor de Y2 en 10 pmol, preferentemente 20 pmol, cuando el péptido fijador al receptor de Y2 se administra por vía intranasal. Cuando se administran 150 µg intranasales de la formulación predilecta, ésta sería capaz de aumentar la concentración plasmática del agonista receptor de Y2 en un mamífero en al menos 40 pmol por litro de plasma. Cuando se administran 200 µg por vía intranasal del péptido fijador al receptor de Y2, las formulaciones de la presente invención causan un aumento de al menos 80 pmol del péptido fijador al receptor de Y2 por litro de plasma.

Preferiblemente el péptido fijador al receptor de Y2 es un péptido PP, PYY o NPY y el mamífero es un humano. En realizaciones aún más predilectas, el péptido fijador al receptor de Y2 es un péptido PYY, preferentemente PYY_{3-36} y el mamífero es un humano.

La presente invención también está relacionada con una formulación del péptido fijador al receptor de Y2 que es capaz de aumentar la concentración plasmática del péptido fijador al receptor de Y2 en al menos 5 pM cuando se administra a un mamífero una dosis que contiene al menos 50 µg del péptido fijador al receptor de Y2.

La presente invención también está relacionada con una formulación del péptido fijador al receptor de Y2 que es capaz de aumentar la concentración plasmática del péptido fijador al receptor de Y2 en al menos 20 pM cuando se administra a mamíferos una dosis que contiene al menos 100 µg del péptido fijador al receptor de Y2.

La presente invención también está relacionada con una formulación del péptido fijador al receptor de Y2 que es capaz de aumentar la concentración plasmática del péptido fijador al receptor de Y2 en al menos 30 pM cuando se administra a mamíferos una dosis intranasal que contiene al menos 150 µg del péptido fijador al receptor de Y2. Preferentemente, el mamífero es un humano.

La presente invención también está relacionada con una formulación del péptido fijador al receptor de Y2 que es capaz de aumentar la concentración plasmática del péptido fijador al receptor de Y2 en al menos 60 pM cuando se administra a mamíferos una dosis intranasal que contiene al menos 200 µg del péptido fijador al receptor de Y2. Preferentemente, el mamífero es un humano.

La presente invención también comprende una formulación intranasal de un agonista del receptor de Y2 que sustancialmente carece de proteínas o polipéptidos que estabilizan la formulación. En particular, la formulación predilecta carece de proteínas tales como la albúmina, y de proteínas derivadas del colágeno, por ejemplo, la gelatina.

En otros aspectos, la presente invención representa una formulación transmucosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende un péptido fijador al receptor de Y2,

agua y un agente solubilizante que tiene un pH de 3-6,5. En realizaciones predilectas, el agente solubilizante es una ciclodextrina.

En otra realización de la presente invención, una formulación transmucosa del péptido fijador al receptor de Y2 comprende un péptido fijador al receptor de Y2, agua y un agente solubilizante, preferentemente ciclodextrina, y al menos un poliol, preferentemente 2 polioles. En otras formas, las formulaciones pueden contener uno o todos de los siguientes elementos: un quelante, un surfactante y un agente de control buffer.

En otra realización de la presente invención, la formulación comprende un péptido fijador al receptor de Y2, agua, un quelante y un agente solubilizante.

En otra realización de la presente invención, la formulación comprende un péptido fijador al receptor de Y2, agua y un quelante que tiene un pH de 3-6,5.

En otra realización de la presente invención, la formulación comprende un péptido fijador al receptor de Y2, agua, un quelante y al menos un poliol, preferentemente 2 polioles. Otras realizaciones pueden incluir uno o más de los siguientes elementos: un surfactante, un agente solubilizante y un agente de control buffer.

En otra realización de la presente invención, la formulación comprende de un péptido fijador al receptor de Y2, agua, y al menos un poliol, preferentemente 2 polioles, tales como la lactosa y el sorbitol. Entre otros agentes que pueden agregarse a la formulación, sin estar limitados a los enumerados, se cuentan un agente solubilizante, un quelante, uno o más agentes de control buffer y un surfactante.

El aumento de la absorción intranasal de un agonista del péptido fijador al receptor de Y2 que ofrecen los métodos y composiciones de la invención permite el uso farmacéutico eficaz de estos agentes para el tratamiento de una variedad de enfermedades y afecciones en los mamíferos.

La presente invención cumple con esta necesidad porque brinda una formulación líquida o deshidratada del péptido fijador al receptor de Y2 en la que la formulación

esencialmente carece de un estabilizador polipéptido o proteínico. La formulación líquida de PYY contiene agua, PYY y al menos uno de los siguientes aditivos seleccionados del grupo formado por polioles, surfactantes, agentes solubilizantes y quelantes. El pH de la formulación debería ser de 3 hasta aproximadamente 7,0, preferentemente de 4,5 a alrededor de 6,0, más preferentemente alrededor de 5,0±0,03.

Otra realización de la presente invención es una formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende agua, un péptido fijador al receptor de Y2, un poliol y un surfactante, en la que la formulación tiene un pH de alrededor de 3 a 6,5, y sustancialmente carece de estabilizadores polipeptídicos o proteínicos.

Otra realización de la presente invención es una formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende agua, un péptido fijador al receptor de Y2, un poliol y un agente solubilizante, en la que la formulación tiene un pH de alrededor de 3,0 a 6,5 y sustancialmente carece de estabilizadores polipeptídicos o proteínicos.

Otra realización de la presente invención es una formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende agua, un péptido fijador al receptor de Y2, un agente solubilizante y un surfactante, en la que la formulación tiene un pH de alrededor de 3,0 a 6,5 y sustancialmente carece de estabilizadores polipeptídicos o proteínicos.

Otra realización de la presente invención es una formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende agua, un péptido fijador al receptor de Y2, un agente solubilizante, un poliol y un surfactante, en la que la formulación tiene un pH de alrededor de 3,0 a 6,5 y carece de estabilizadores polipeptídicos o proteínicos.

En otro aspecto de la presente invención, la formulación acuosa estable se deshidrata para producir una formulación deshidratada del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende el péptido fijador al receptor de Y2 y al menos uno de los siguientes aditivos seleccionados del grupo formado por polioles, surfactantes, agentes solubilizantes y quelantes, en la que dicha formulación deshidratada del péptido fijador al receptor de Y2 está sustancialmente libre de estabilizadores proteínicos o polipéptidos tales como la albúmina, el colágeno o las proteínas derivadas del colágeno, por ejemplo, la gelatina. La deshidratación se puede lograr por varios medios: liofilización, secado al

spray, precipitación con sal y secado, secado por aspiración, evaporación rotatoria o precipitación de CO_2 supercrítico.

En otra realización, la formulación deshidratada del péptido fijador al receptor de Y2 está comprendida del péptido fijador al receptor de Y2, un poliol y un agente solubilizante, en la que la formulación sustancialmente carece de un estabilizador proteínico.

En otra realización, la formulación deshidratada del péptido fijador al receptor de Y2 está comprendida de un péptido fijador al receptor de Y2, un poliol y un surfactante, en la que la formulación del péptido fijador al receptor de Y2 sustancialmente carece de un estabilizador proteínico o polipeptídico.

En otra realización, la formulación deshidratada del péptido fijador al receptor de Y2 está comprendida de un péptido fijador al receptor de Y2, un surfactante y un agente solubilizante, en la que la formulación del péptido fijador al receptor de Y2 sustancialmente carece de un estabilizador proteínico o polipeptídico.

En otra realización de la presente invención, la formulación deshidratada del péptido fijador al receptor de Y2 está comprendida de un péptido fijador al receptor de Y2, un poliol, un surfactante y un agente solubilizante, en la que la formulación del péptido fijador al receptor de Y2 sustancialmente carece de un estabilizador proteínico o polipeptídico.

Se puede utilizar cualquier agente solubilizante pero el predilecto es seleccionado de un grupo que consiste de hidroxipropilo-β-ciclodextrina, sulfobutileter- β -ciclodextrina, metil- β -ciclodextrina y quitosan.

Por lo general, se selecciona un poliol del grupo que consiste de lactosa, sorbitol, trehalosa, sacarosa, manosa y maltosa, y derivados y homólogos a partir de ellos.

Se elige un surfactante satisfactorio seleccionado del grupo que se compone de didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC), polisorbato-20 (Tween 20), polisorbato-80

(Tween 80), polietilénglicol (PEG), alcohol cetílico, polivinilpirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), alcohol lanolínico y monooleato de sorbitán.

En una formulación predilecta, la formulación del péptido fijador al receptor de Y2 también comprende un quelante, por ejemplo, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) o ácido etilenglicol tetraacético (EGTA). Para inhibir la proliferación microbiana también se puede agregar a la fórmula un agente preservativo, como ser clorobutanol, o cloruro de benzalconio.

El pH generalmente se regula por medio de un buffer, por ejemplo, ácido cítrico y citrato de sodio, y acetato de sodio y ácido acético. Otros buffers alternativos serían ácido acético y acetato de sodio o ácido succínico e hidróxido de sodio.

El péptido fijador al receptor de Y2 predilecto es un péptido PYY, PP o NPY, preferentemente un péptido PYY_{3-36}.

La presente invención también comprende una formulación en la que la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 es 0,1 – 15,0 mg/ml, preferentemente 1,0 – 2 mg/ml, y el pH de la solución acuosa es 3,0 – 6,5, preferentemente alrededor de $5,0 \pm 0,3$.

La presente invención también incluye una formulación del péptido fijador al receptor de Y2 en la que la concentración de poliol está alrededor de 0,1% y 10% (peso/volumen) y, además, varía de 0,1% a alrededor de 3% (peso/volumen).

Esta invención también incluye una formulación en la que la concentración del surfactante está entre 0,00001% y 5% (peso/volumen), y en la que la concentración del surfactante está entre 0,0002 y 0,1% (peso/volumen).

Esta invención también incluye una formulación en la que la concentración del agente solubilizante se ubica entre 1% - 10% (peso/volumen), y la concentración del agente solubilizante es de 2% a 5% (peso/volumen).

La solución terminada puede ser filtrada y secada a frío seco, liofilizada, usando métodos bien conocidos de habilidad común, y siguiendo las instrucciones del fabricante del equipo de liofilización. Este proceso genera una formulación deshidratada del péptido fijador al receptor de Y2 que sustancialmente carece de un estabilizador proteínico.

En otra realización de la presente invención, una formulación del péptido fijador al receptor de Y2 está comprendida de un péptido fijador al receptor de Y2 y un excipiente farmacológico aceptable en la que, según se comprobó en un ensayo de penetración en tejido *in vitro*, la formulación del péptido fijador al receptor de Y2 tiene una penetración mayor, de al menos 1%, preferentemente 3% y más preferentemente de al menos 6%, que la formulación de control compuesta de agua, cloruro de sodio, un buffer y el péptido fijador al receptor de Y2, tal como lo determina el ensayo de resistencia eléctrica transepitelial que se puede apreciar en los Ejemplos 2 y 7. En una realización predilecta, la formulación del péptido fijador al receptor de Y2 comprende al menos un excipiente seleccionado del grupo que se compone de un surfactante, un agente solubilizante, un poliol y un quelante. Preferentemente, el péptido fijador al receptor de Y2 es un péptido PYY, un péptido NPY o un péptido PP.

En otra realización de la presente invención, se proporciona una formulación del péptido fijador al receptor de Y2 que es capaz de aumentar la concentración plasmática de un mamífero del péptido fijador al receptor de Y2 en al menos 5, preferentemente 10, 20, 40, 60, 80 o más pmoles por litro de plasma cuando se administran 100 µl de la formulación por vía intranasal a dicho mamífero.

En ejemplos de realizaciones, las mejoras de los métodos de administración y las composiciones de la presente invención proporcionan una absorción por vía mucosa del agonista del péptido fijador al receptor de Y2 eficaz para la prevención o el tratamiento de la obesidad y las alteraciones de la alimentación de mamíferos. En un aspecto, esta invención proporciona las formulaciones farmacéuticas apropiadas para la vía intranasal que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido fijador al receptor de Y2 y uno o más agentes que mejoran la absorción intranasal, descritos en el presente; dichas formulaciones son eficaces para la administración de la invención en la mucosa nasal de mamíferos con el objeto de prevenir la aparición de la obesidad o de alteraciones de la alimentación o impedir que progresen. La administración en la mucosa nasal de una

cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista del péptido fijador al receptor de Y2 y uno o más agentes que mejoran la absorción intranasal deriva en una alta concentración terapéutica del agonista del péptido fijador al receptor de Y2 en el individuo e inhibe la ingesta de alimentos en los mamíferos, por lo cual disminuyen los síntomas de obesidad y los trastornos de la alimentación.

Las mejoras en los métodos y las composiciones de la presente invención proporcionan una absorción mucosa terapéuticamente eficaz de un péptido fijador al receptor de Y2 para la prevención o el tratamiento de una variedad de enfermedades y afecciones en mamíferos. El péptido fijador al receptor de Y2 puede ser administrado mediante una variedad de vías mucosas: por ejemplo, administrando el péptido fijador al receptor de Y2 en el epitelio de la mucosa nasal, el epitelio de la mucosa bronquial o pulmonar, la superficie bucal oral o la superficie mucosa del intestino delgado. En ejemplos de realizaciones, los métodos y composiciones están concebidos para la administración intranasal (por ejemplo, en la mucosa nasal o intranasal).

En un aspecto, la presente invención proporciona las formulaciones farmacéuticas apropiadas para la administración intranasal comprendidas de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista del péptido fijador al receptor de Y2 y uno o más agentes que mejoran la absorción intranasal como se describe en la presente; dichas formulaciones son eficaces para la administración según la invención en la mucosa nasal con el objeto de prevenir el comienzo o el progreso de la obesidad, la diabetes, el cáncer o la desnutrición o el desgaste por cáncer en mamíferos, o bien para aliviar uno o más síntomas muy conocidos de la obesidad, así como para tratar la enfermedad de Alzheimer, el carcinoma de colon, el adenocarcinoma de colon, el carcinoma pancreático, el adenocarcinoma pancreático y el carcinoma de mama.

En otro aspecto, esta invención tiene como objetivo brindar métodos y formulaciones farmacéuticas para administrar un agonista del péptido fijador al receptor de Y2 en combinación con succinato de vitamina E. Esta combinación de un agonista del péptido fijador al receptor de Y2 y el succinato de vitamina E sirven para aliviar síntomas o impedir la aparición o disminuir la incidencia o la gravedad del cáncer, por ejemplo, del adenocarcinoma de colon, el adenocarcinoma pancreático o el cáncer de mama.

En otro aspecto de esta invención, resultó sorprendente hallar que el uso de los péptidos fijadores al receptor de Y2 libre de endotoxinas, por ejemplo el PYY_{3-36}, produjo una mayor absorción mucosa en comparación con el empleo de péptidos a los que no se había extraído la endotoxina. El uso de péptidos fijadores al receptor de Y2 libres de endotoxinas en las formulaciones farmacéuticas consecuentemente permitió la administración por vías no infusivas, entre ellas, la administración por vía mucosa, nasal, oral, pulmonar, vaginal y rectal.

Las formulaciones del péptido fijador al receptor de Y2 para la administración por vía mucosa y los métodos de preparación y administración que se han descrito mejoran la absorción mucosa de un péptido fijador al receptor de Y2 en mamíferos. Estas composiciones y métodos pueden constar de una formulación combinatoria o administración coordinada de uno o más péptidos fijadores al receptor de Y2 con uno más agentes que mejoran la absorción mucosa. Para elaborar estas formulaciones y métodos, se dispone de los agentes que mejoran la absorción mucosa que se enumeran a continuación: (a) agentes solubilizantes; (b) modificadores de carga; (c) controladores del pH; (d) inhibidores de enzimas degradantes (e) agentes que aclaran el mucus; (f) fármacos ciliostáticos; (g) agentes que mejoran la penetración de la membrana (por ejemplo, (i) un surfactante, (ii) una sal biliar, (ii) un aditivo fosfolípido o ácido graso, micelo mezclado, liposoma o portador, (iii) un alcohol, (iv) una enamina, (v) un compuesto de NO donante, (vi) una molécula anfipática de cadena larga, (vii) un mejorador hidrofóbico pequeño de penetración, (viii) sodio o un derivado del ácido salicílico, (ix) un éster glicerol del ácido acetoacético, (x) un derivado de la ciclodextrina o beta-ciclodextrina, (xi) un ácido graso de cadena media, (xii) un quelante, (xiii) un aminoácido o sal, (xiv) cualquier sal o ácido N-acetilamino, (xv) una enzima degradante de un determinado componente de membrana, (ix) un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos, (x) un inhibidor de la síntesis del colesterol, (xi) cualquier combinación de los agentes que mejoran la penetración de la membrana de (i) a (x)); (h) moduladores de la fisiología de las uniones epiteliales, por ejemplo, estimulantes de óxido de nitrógeno (ON), quitosan y derivados del quitosán; (i) vasodilatadores; (j) mejoradores selectivos de transporte; y (k) excipientes, transportadores, soportes o especies que forman complejos estabilizantes con los que el/los péptido(s) fijador(es) al/ a los receptor(es) de Y2 está(n) eficazmente combinados, asociados, contenidos, encapsulados o ligados para estabilizar el agente activo que mejora la absorción mucosa.

En varias realizaciones de la invención, el péptido YY puede estar combinado con uno, dos, tres, cuatro o más agentes que mejoran la absorción mucosa descriptos en (a) a (k). Estos agentes que mejoran la absorción mucosa pueden estar combinados, solos o en conjunto, con el péptido YY, o en su defecto, combinados en una formulación farmacológica o excipiente aceptable. La formulación del receptor de YY con uno o más de los agentes que mejoran la absorción mucosa de acuerdo con lo expuesto en el presente (que pueden incluir cualquier combinación de dos o más de los agentes que mejoran la absorción mucosa de los puntos (a) a (k) anteriormente descritos) aumenta la biodisponibilidad del péptido YY tras la administración en una superficie mucosa de un mamífero.

Por lo tanto, la presente invención es un método para suprimir el apetito, fomentar la pérdida de peso, disminuir la ingesta de alimentos, tratar la obesidad y/o la diabetes de mamíferos mediante la administración transmucosa de una formulación que comprende un péptido fijador al receptor de Y2, de manera tal que cuando se administran aproximadamente 50 g del receptor de Y2 al mamífero por vía transmucosa, la concentración plasmática del mamífero del péptido fijador al receptor de Y2 aumenta en al menos 5 pmol, preferentemente al menos 10 pmol por litro de plasma. Previamente se describen ejemplos de dichas formulaciones.

La presente invención comprende también el uso del péptido fijador al receptor de Y2 para la producción de medicamentos de administración transmucosa de un péptido fijador al receptor de Y2 con el objetivo de suprimir el apetito, fomentar la pérdida de peso, disminuir la ingesta de alimentos o tratar la obesidad de mamíferos, de manera tal que cuando se administran aproximadamente 50 µg del receptor de Y2 al mamífero por vía transmucosa, la concentración plasmática del mamífero del péptido fijador al receptor de Y2 aumenta en al menos 5 pmol por litro de plasma. Cuando se administran 100 µg del péptido fijador al receptor de Y2 al mamífero por vía intranasal, la concentración plasmática del agonista del péptido fijador al receptor de Y2 aumenta en al menos 20 pmol por litro de plasma. Cuando se administran 150 µg, la concentración.

De las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, se considera que una dosis del péptido YY para la administración por vía mucosa es eficaz si, por ejemplo,

comprende aproximadamente 0,001 pmol a aproximadamente 100 pmol por kilogramo de peso corporal, aproximadamente 0,01 pmol a aproximadamente 10 pmol por kilogramo de peso corporal, o aproximadamente 0,1 pmol a aproximadamente 5 pmol por kilogramo de peso corporal. En otras realizaciones ejemplificadoras, la dosis del péptido YY es entre aproximadamente 0,5 pmol a aproximadamente 1,0 pmol por kilogramo de peso corporal. En una realización predilecta, una dosis intranasal variará entre 50 µg a 400 µg, preferiblemente 100µg a 200µg, más preferiblemente alrededor de 100µg a 150µg. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administradas una o más veces al día (por ejemplo, antes de una comida), o 3 veces o una vez a la semana durante un período de entre una semana y al menos 96 semanas o incluso de por vida a un determinado paciente o sujeto. En ciertas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención son administradas al menos una o más veces al día, dos veces al día, cuatro veces al día, seis veces al día o ocho veces al día.

Se emplean agentes que mejoran la administración intranasal para aumentar la absorción del péptido YY dentro o a través de la superficie de la mucosa nasal. Para los fármacos de absorción pasiva, la participación relativa de las vías paracelulares y transcelulares en el transporte de las drogas depende del pKa, el coeficiente de partición, el radio molecular y la carga del fármaco, el pH del medio luminal en el cual se administra la droga, y el área de la superficie de absorción. El agente que mejora la absorción intranasal de la presente invención puede ser un agente controlador del pH. El pH de la formulación farmacéutica de la presente invención es un factor que influye en la absorción del péptido YY mediante las vías paracelulares y transcelulares para el transporte de las drogas. En una realización, la formulación farmacéutica de la presente invención tiene el pH ajustado a aproximadamente entre 3,0 a 6,5. En otra realización, la formulación farmacéutica de la presente invención tiene el pH ajustado a aproximadamente entre 3,0 a 5,0. En otra realización, la formulación farmacéutica de la presente invención tiene el pH ajustado a aproximadamente entre 4,0 a 5,0. Por lo general, el pH es 5,0±0,3.

Breve Descripción de las Ilustraciones

La FIG. 1 ilustra la estabilidad del PYY_{3-36} a alta temperatura (40° C) con varios pH que oscilan entre 3,0 y 7,4.

La FIG. 2 ilustra la información brindada por el estudio de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de agentes que aumentan la permeabilidad.

La FIG. 3 ilustra las viabilidades celulares de las formulaciones candidatas de PYY.

La FIG. 4 ilustra los efectos citotóxicos de las formulaciones candidatas. En las figuras 2 a 4

EN1 = PBS pH 5,0

EN2 = L-Arginina (10% peso/volumen)

EN3 = Poli-L-Arginina (0.5% peso/volumen)

EN4 = Gamma-Ciclodextrina (1% peso/volumen)

EN5 = Alfa-Ciclodextrina (5% peso/volumen)

EN6 = Metil-Beta-Ciclodextrina (3% peso/volumen)

EN7 = Sal sódica del ácido n-cáprico (0.075% peso/volumen)

EN8 = Quitosan (0,5% peso/volumen)

EN9 = Didecanoilato de L-Alfa-fosfatidilcolina (3.5% peso/volumen)

EN10 = S-Nitroso-N-acetilpenicilamina, (0,02% peso/volumen)

EN11 = Palmitoil-DL-Carnitina (0,5% peso/volumen)

EN12 = Pluronic-127 (0,3% peso/volumen)

EN13 = Nitroprusiato de sodio (0,3% peso/volumen)

EN14 = Glucocolato de sodio (1% peso/volumen)

La FIG. 5 ilustra las contribuciones sinérgicas de los distintos componentes en la penetración de la droga. En la figura 5 EN1 es DDPC, EN2 es metil-β- ciclodextrina y EX1 es EDTA.

La FIG. 6 ilustra el PYY_{3-36} plasmático de ratas; el cuadrado representa una dosis de 4,1 µg/kg; el triángulo representa una dosis de 41 µg/kg; y el círculo representa una dosis de 205 µg/kg.

La FIG. 7 ilustra la linealidad de la dosis que sigue a la administración intranasal de PYY_{3-36} en ratas como Cmáx (concentración máxima)-Cbás (concentración basal) pg/ml comparada con la dosis en µg/kg.

La FIG. 8 ilustra la linealidad de la dosis que sigue a la administración intranasal de PYY_{3-36} en ratas como área bajo la curva (AUC) en comparación con la dosis en µg/kg.

La FIG. 9 ilustra la concentración plasmática media del PYY frente al tiempo en minutos de tres voluntarios humanos que recibieron 20 µg de PYY_{3-36} por vía intranasal cada uno.

La FIG. 10 ilustra la concentración plasmática media del PYY frente al tiempo en minutos de tres voluntarios humanos que recibieron 50 µg de PYY_{3-36} por vía intranasal cada uno.

La FIG. 11 ilustra la concentración plasmática media del PYY frente al tiempo en minutos de tres voluntarios humanos que recibieron 100 µg de PYY_{3-36} por vía intranasal cada uno.

La FIG. 12 ilustra la concentración plasmática media del PYY frente al tiempo en minutos de tres voluntarios humanos que recibieron 150 µg de PYY_{3-36} por vía intranasal cada uno.

La FIG. 13 ilustra la concentración plasmática media del PYY frente al tiempo en minutos de tres voluntarios humanos que recibieron 200 µg de PYY_{3-36} por vía intranasal cada uno.

La FIG. 14 ilustra la concentración plasmática del PYY en pmol/l frente al tiempo de cinco grupos de voluntarios humanos sanos que recibieron PYY_{3-36} intranasal. Las dosis de PYY_{3-36} fueron de 200 µg, 150 µg, 100 µg, 50 µg y 20 µg.

La FIG. 15 ilustra la linealidad de la Cmáx de la dosis del PYY en pg/ml frente a la dosis de PYY_{3-36} administrada a voluntarios humanos.

La FIG. 16 ilustra la AUC media de la linealidad de la dosis del PYY en pg/ml frente a la dosis del PYY_{3-36} administrada a voluntarios humanos.

La FIG. 17 ilustra la escala análoga visual (VAS) frente a la dosis de PYY_{3-36} administrada a voluntarios humanos.

Se les preguntó:

"¿Cuánto hambre tiene?"

Sobre una escala de 100 puntos, a menor puntaje, menor era el hambre que tenía el individuo.

La FIG. 18 ilustra la escala análoga visual (VAS) frente a la dosis de PYY_{3-36} administrada a voluntarios humanos. Se les pregunto: ¿cuánto podría comer? Sobre una escala de 100 puntos, a menor puntaje, menor era el hambre que tenía el individuo.

La FIG. 19 ilustra la escala análoga visual (VAS) frente a la dosis de PYY_{3-36} administrada a voluntarios humanos. Se les preguntó: ¿cuán satisfecho se siente? Sobre una escala de 100 puntos, a menor puntaje, menor era la satisfacción que sentía el individuo.

La FIG. 20 ilustra el porcentaje de penetración del PYY_{3-36} que contiene endotoxina frente al del PYY_{3-36} libre de endotoxina.

Descripción Detallada de la Invención

Tal como ya se ha mencionado, la presente invención brinda métodos y composiciones que mejoran la absorción del péptido fijador al receptor de Y2 en mamíferos para el tratamiento o la prevención de diversas enfermedades y afecciones. Entre los mamíferos que son adecuados para recibir el tratamiento y la prevención de acuerdo con los métodos propuestos por la presente invención, se incluyen, sin estar limitados a los enumerados, los primates humanos y no humanos, el ganado, por ejemplo, el equino, vacuno, bovino y caprino, y las especies domésticas y de investigación, por ejemplo, perros, gatos, ratones, ratas, conejillos de Indias y conejos.

Con el fin de comprender mejor la presente invención, se brindan las siguientes definiciones:

PÉPTIDOS FIJADORES A LOS RECEPTORES DE Y2

Los péptidos fijadores a los receptores de Y2 utilizados en las formulaciones para la vía mucosa que propone la presente invención comprenden a "la familia de los polipéptidos pancreáticos", tal como se los utiliza en la presente invención, que comprende tres familias de péptidos bioactivos naturales: PP, NPY y PYY. Se proporcionan ejemplos de péptidos fijadores a los receptores de Y2 y se describen sus usos en las patentes de los EE.UU. No. 5.026.685; No. 5.574.010; No. 5.604.203; No. 5.696.093; No. 6.046.167; Gehlert *et. al.*, *Proc Soc Exp Biol Med 218:*7-22 (1998); Sheikh *et al.*. *Am J Physiol, 261:*701-15(1991); Fournier *et al.*, *Mol Pharmacol 45:*93-101 (1994); Kirby *et al.*, *J Med Chem 38:*4579-4586 (1995); Rist *et al.*, *Eur J Biochem 247:* 1019-1028 (1997); Kirby *et al.*, *J Med Chem 36:*3802-3808 (1993); Grundemar *et al.*, *Regulatory Peptides 62:* 131-136 (1996); Patente de EE.UU. No. 5.696.093 (ejemplos de agonistas del PYY), Patent de EE.UU. No 6.046.167. De acuerdo con la presente invención, un péptido fijador al receptor de Y2 se compone de bases libres. sales ácidas de adición o sales metálicas, tales como sales de potasio o de sodio, o los péptidos fijadores a los receptores de Y2 que fueron modificados por procedimientos tales como amidación, glucosilación, acilación, sulfatación, fosforilación, acetilación y ciclización (Patentes de EE.UU. No. 6.093.692 y No. 6.225.445) y la pegilación.

AGONISTAS DEL PÉPTIDO YY

Tal como se lo utiliza en la presente invención, "PYY" se refiere al PYY$_{(1-36)}$ en secuencia pura o en forma variada, así como a derivados, fragmentos y análogos del PYY de cualquier origen, ya sea natural, sintético o recombinado. El PYY debe comprender al menos los últimos 15 residuos aminoácidos o análogos de la secuencia de PYY, PYY(22-36) (SEQ ID NO: 3). Otros péptidos PYY que pueden utilizarse son los siguientes: PYY(1-36) (SEQ ID NO: 1) PYY(3-36) SEQ ID NO: 2) PYY(4-36)(SEQ ID NO:4) PYY(5-36) (SEQ ID NO: 5), PYY(6-36) (SEQ ID NO:6), PYY(7-36) (SEQ ID NO:7) PYY(8-36) (SEQ ID NO: 8), PYY9-36 (SEQ ID NO: 9) PYY(10-36) (SEQ ID NO: 10), PYY(11-36) (SEQ ID NO: 11), PYY(12-36) (SEQ ID NO: 12), PYY(13-36) (SEQ ID NO:13), PYY(14-36) (SEQ ID NO: 14), PYY(15-36) (SEQ ID NO: 15), PYY(16-36) (SEQ ID NO: 16), PYY(17-36) (SEQ ID NO: 17), PYY(18-36) (SEQ ID NO: 18), PYY(19-36) (SEQ ID NO: 19), PYY(20-36) (SEQ ID NO: 20) y PYY(21-36) (SEQ ID NO: 21). Es característico de estos péptidos fijarse a los receptores Y en el cerebro y en otros lugares, en particular a los receptores de Y2 y/o Y5. Es característico que estos péptidos se sinteticen en formas libres de endotoxina o apirógenas, aunque no siempre es necesario.

Otros péptidos PYY son aquellos péptidos PYY en los que efectuaron cambios conservadores en los residuos aminoácidos, por ejemplo, una mutación en un sitio específico de un péptido PYY, como ser [Asp^{15}] PYY(15-36) (SEQ ID NO: 90), [Thr^{13}] PYY(13-36) (SEQ ID NO: 91), [Val^{12}] PYY(12-36)(SEQ ID NO: 92), [Glu^{11}] PYY(11-36) (SEQ ID NO: 93), [Asp^{10}] PYY(10-36) (SEQ ID NO: 94), [Val^{7}] PYY(7-36) (SEQ ID NO: 95), [Asp^{6}] PYY(6-36) (SEQ ID NO: 96), [Gln^{4}] PYY(4-36) (SEQ ID NO: 97), [Arg^{4}] PYY(4-36) (SEQ ID NO: 98), [Asn^{4}] PYY(4-36) (SEQ ID NO: 99), [Val^{3}] PYY(3-36) (SEQ ID NO: 100) y [Leu^{3}] PYY(3-36) (SEQ ID NO: 101). Otros péptidos PYY son aquellos péptidos en los que se produjeron al menos dos cambios conservadores en los residuos aminoácidos, por ejemplo, [Asp^{10}, Asp^{15}] PYY(10-36) (SEQ ID NO: 102), [Asp^{6}, Thr^{13}] PYY(6-36) (SEQ ID NO: 103), [Asn^{4}, Asp^{15}] PYY(4-36) (SEQ ID NO: 104) y [Leu^{3}, Asp^{10}] PYY(3-36) (SEQ ID NO: 105. También se incluyen análogos de un PYY, por ejemplo, aquellos divulgados en las patentes de los EE.UU. 5.604.203 y 5.,574.010; Balasubramaniam, *et al.*, *Peptide Research 1*: 32 (1988); y en la solicitud de

patente de invención japonesa 2.225.497 (1990); Balasubramaniam, *et al.*, *Peptides 14*: 1011, 1993; Grandt, *et al.*, *Reg. Peptides 51*: 151, (1994); PCT International Application (Solicitud Internacional) 94/03380, patentes de los EE.UU. 5.604.203 y 5.574.010. Es característico de estos péptidos ligarse en el cerebro y en otros lugares a los receptores Y, en particular a los receptores de Y2 y/o Y5. Es característico que estos péptidos se sinteticen en formas libres de endotoxina o apirógenas, aunque no siempre es necesario.

Los agonistas de PYY pueden ser PYY de rata (SEQ ID NO: 72) y las formas truncadas de terminales de amino correspondientes a humanos, PYY porcino (SEQ ID NO: 73) y las formas truncadas de terminales de amino correspondientes a humanos y PYY de conejillo de Indias (SEQ ID NO: 74) y las formas truncadas de terminales de amino correspondientes a humanos.

De acuerdo con la presente invención, un péptido PYY también comprende bases libres, sales ácidas de adición o sales metálicas, tales como sales de potasio o de sodio de los péptidos, y péptidos PYY que fueron modificados mediante procedimientos tales como amidación, glucosilación, acilación, sulfatación, fosforilación, acetilación, ciclización y otros métodos conocidos de modificación covalente. Es característico de estos péptidos ligarse a los receptores Y en el cerebro y en otros lugares, en particular a los receptores de Y2 y/o Y5. Es característico que estos péptidos se sinteticen en formas libres de endotoxina o apirógenas, aunque no siempre es necesario.

AGONISTAS DEL NEUROPÉPTIDO Y

El NPY es otro péptido fijador al receptor de Y2. Los péptidos NPY pueden ser NPY de extensión completa (1-36) (SEQ ID NO: 22) así como fragmentos de NPY(1-36), que fueron truncados en el amino terminal. Para que la fijación al receptor de Y2 sea eficaz, el agonista del NPY debe tener al menos los 11 últimos residuos aminoácidos en el carboxilo terminal, es decir, debe ser NPY(26-36) (SEQ ID NO: 23). Otros ejemplos de agonistas del NPY que se fijan al receptor de Y2 son los que se enumeran a continuación: NPY (3-36) (SEQ ID NO: 24), NPY(4-36) (SEQ ID NO: 25), NPY(5-36) (SEQ ID NO: 26), NPY(6-36) (SEQ ID NO: 27), NPY(7-36) (SEQ ID NO: 28), NPY(8-36) (SEQ ID NO: 29), NPY(9-36) (SEQ ID NO: 30), NPY(10-36) (SEQ ID NO: 31), NPY(11-36) (SEQ ID NO: 32), NPY(12-36) (SEQ ID NO: 33), NPY(13-36) (SEQ ID NO: 34),

NPY(14-36) (SEQ ID NO: 35), NPY(15-36) (SEQ ID NO: 36), NPY(16-36) (SEQ ID NO: 37), NPY(17-36) (SEQ ID NO: 38), NPY(18-36) (SEQ ID NO: 39), NPY(19-36) (SEQ ID NO: 40), NPY(20-36) (SEQ ID NO: 41), NPY(21-36) (SEQ ID NO: 42), NPY(22-36) (SEQ ID NO: 43), NPY(23-36) (SEQ ID NO: 44), NPY(24-36) (SEQ ID NO: 45) y NPY(25-36) (SEQ ID NO: 46).

Otros agonistas del NPY son el NPY de ratas (SEQ ID NO: 75) y las formas truncadas en el amino terminal desde NPY(3-36) a NPY(26-36) como en la forma humana, el NPY de conejos (SEQ ID NO: 76) y las formas truncadas en el amino terminal desde NPY(3-36) a NPY(26-36) como en los humanos, NPY canino (SEQ ID NO: 77) y las formas truncadas en el amino terminal desde NPY(3-36) a NPY(26-36) como en la forma humana, el NPY porcino (SEQ ID NO: 78) y las formas truncadas en el amino terminal desde NPY(3-36) a NPY(26-36) como en la forma humana, el NPY vacuno (SEQ ID NO: 79) y las formas truncadas en el amino terminal desde NPY(3-36) a NPY26-36 como en la forma humana, el NPY ovino (SEQ ID NO:80) y las formas truncadas en el amino terminal desde NPY(3-36) a NPY(26-36) como en la forma humana, y el NPY del conejillo de Indias (SEQ 81) y las formas truncadas en terminales amino desde NPY(3-36) a NPY(26-36) como en la forma humana.

De acuerdo con la presente invención, un péptido NPY también comprende bases libres, sales ácidas de adición o sales metálicas, tales como sales de potasio o de sodio de los péptidos, y péptidos NPY que fueron modificados con procedimientos tales como amidación, glucosilación, acilación, sulfatación, fosforilación, acetilación, ciclización y otros métodos conocidos de modificación covalente. Es característico de estos péptidos ligarse a los receptores Y en el cerebro y en otros lugares, en particular a los receptores de Y2 y/o Y5. Es característico que estos péptidos se sinteticen en formas libres de endotoxina o apirógenas, aunque no siempre es necesario.

Péptido pancreático

El péptido pancreático (PP) y el agonista del PP también se fijan al receptor de Y2. Entre otros, los agonistas del PP son los PP de longitud completa (1-36) (SEQ ID NO: 47) y una cantidad de fragmentos de PP que están truncados en la terminal amino. Para fijarse al receptor de Y2, el agonista del PP debe tener los últimos 11 residuos

aminoácidos en el carboxilo terminal, PP(26-36), (SEQ ID NO: 48). Otros ejemplos de PP, que se fijan al receptor de Y2, son los que se enumeran a continuación: PP (3-36) (SEQ ID NO: 49), PP(4-36) (SEQ ID NO: 50), PP(5-36) (SEQ ID NO: 51), PP(6-36) (SEQ ID NO: 52), PP(7-36) (SEQ ID NO: 53), PP(8-36) (SEQ ID NO: 54), PP(9-36) (SEQ ID NO: 55), PP(10-36) (SEQ ID NO: 56), PP(11-36) (SEQ ID NO: 57), PP(12-36) (SEQ ID NO: 58), PP(13-36) (SEQ ID NO: 59), PP(14-36) (SEQ ID NO: 60), PP(15-36) (SEQ ID NO: 61), PP(16-36) (SEQ ID NO: 62), PP(17-36) (SEQ ID NO: 63), PP(18-36) (SEQ ID NO: 64), PP(19-36) (SEQ ID NO: 65), PP(20-36) (SEQ ID NO: 66), PP(21-36) (SEQ ID NO: 67), PP(22-36) (SEQ ID NO: 68), PP(23-36) (SEQ ID NO: 69), PP(24-36) (SEQ ID NO: 70) y PP(25-36) (SEQ ID NO: 71).

Otros agonistas del PP son el PP ovino (SEQ ID NO: 82) y las formas truncadas en el amino terminal desde PP(3-36) a PP(26-36) como en la forma humana, el PP porcino (SEQ ID NO: 83) y las formas truncadas en el amino terminal desde PP(3-36) a PP(26-36) como en la forma humana, el PP canino (SEQ ID NO: 84) y las formas truncadas en el amino terminal desde PP(3-36) a PP(26-36) como en la forma humana, el PP felino (gato) (SEQ ID NO: 85) y las formas truncadas en el amino terminal desde PP(3-36) a PP(26-36) como en la forma humana, el PP vacuno (SEQ ID NO: 86) y las formas truncadas en el amino terminal desde PP(3-36) a PP(26-36) como en la forma humana, el PP de rata (SEQ ID NO:87) y las formas truncadas en el amino terminal desde PP(3-36) a PP(26-36) como en la forma humana, el PP de ratón (SEQ 88) y las formas truncadas en el amino terminal desde PP(3-36) a PP(26-36) como en la forma humana, y el PP del conejillo de Indias (SEQ ID NO: 89).

De acuerdo con la presente invención, un péptido PP también comprende bases libres, sales ácidas de adición o sales metálicas, tales como sales de potasio o de sodio de los péptidos, y los péptidos PP que fueron modificados con procedimientos tales como amidación, glucosilación, acilación, sulfatación, fosforilación, acetilación, ciclización y otros métodos conocidos de modificación covalente. Es característico de estos péptidos unirse a los receptores Y en el cerebro y en otros lugares, en particular a los receptores de Y2 y/o Y5. Es característico que estos péptidos se sinteticen en formas libres de endotoxina o apirógenas, aunque no siempre es necesario.

Agentes que mejoran la absorción mucosa

"Se entiende por "agentes que mejoran la absorción mucosa" sustancias químicas u otros excipientes que, cuando se agregan a formulaciones que contienen agua, sales y/o buffers comunes y el péptido fijador al receptor de Y2 (la formulación de control) generan una formulación que aumenta significativamente el transporte del péptido fijador al receptor de Y2 a través de una mucosa, como lo demuestra la cuantificación de la concentración máxima ($C_{máx}$) en sangre, suero o líquido cefalorraquídeo o el área bajo la curva (AUC) en un diagrama que compara la concentración con el tiempo. Se entiende por superficie mucosa las superficies mucosas nasal, oral, intestinal, bucal, broncopulmonar, vaginal y rectal y, de hecho, las membranas que segregan moco que bordean todas las cavidades y vías del cuerpo que se comunican con el exterior. Los agentes que mejoran la absorción mucosa a veces se denominan "transportadores".

Formulación libre de endotoxina

Se denomina "formulación libre de endotoxina" a una formulación que contiene un péptido fijador al receptor de Y2 y uno o más agentes que mejoran la absorción mucosa que es sustancialmente libre de endotoxinas y/o sustancias pirogénicas relacionadas. Las endotoxinas son toxinas que se mantienen dentro de un microorganismo y sólo son liberadas cuando los microorganismos se degradan o mueren. Las sustancias pirogénicas son sustancias termoestables (glucoproteínas) que provocan fiebre y provienen de la membrana externa de bacterias y otros microorganismos. Ambas sustancias pueden causar fiebre, hipotensión y *shock* si se las administra a los humanos. La producción de formulaciones libres de endotoxinas puede requerir equipos especiales y especialistas, y puede ser significativamente más costosa que la producción de formulaciones que contienen endotoxinas. Debido a que se ha demostrado que la administración intravenosa de NPY o PYY conjuntamente con la infusión de endotoxina en roedores previene la hipotensión y aun la muerte asociada a la administración de endotoxina sola (Patente de EE.UU. 4.839.343), no se espera que sea necesario elaborar formulaciones sin endotoxina de estos fármacos para la administración por vías no parenterales (no inyectable).

Administración no infusión

Se entiende por "administración no infusión" cualquier método de administración que no implique inyectar el fármaco directamente en una arteria o vena, un método que fuerza o impulsa algo (típicamente un líquido) hacia algún lugar y, en especial, introducir

el fármaco en una parte del cuerpo por medio de una aguja, jeringa u otro medio invasivo. La administración no infusión puede ser una inyección subcutánea, una inyección intramuscular, una inyección intraperitoneal y los métodos de administración por vía mucosa que no son inyectables.

Tratamiento y prevención de la obesidad

Tal como ya se ha indicado, la presente invención proporciona métodos y composiciones mejores y útiles para administrar un péptido fijador al receptor de Y2 en la mucosa nasal con el fin de prevenir y tratar la obesidad en los mamíferos. Tal como se utiliza en la presente, se entiende por "prevención y tratamiento de la obesidad" la prevención de la aparición o la disminución de la incidencia o la gravedad de la obesidad clínica gracias a que se reduce la ingesta de alimentos durante las comidas y/o se reduce el peso corporal durante el tratamiento, o se mantiene un peso corporal reducido tras el descenso de peso o antes del aumento de peso.

La presente invención proporciona métodos y composiciones mejores y útiles para que el péptido fijador al receptor de Y2 administrado en la mucosa nasal llegue a regiones del cerebro, por ejemplo, el hipotálamo o las neuronas arciformes de NPY o de proopiomelanocortina (POMC) con el objeto de prevenir y tratar la obesidad en los mamíferos. El péptido fijador al receptor de Y2 también puede administrarse junto con un antagonista del receptor de Y1, como ser la dihidropiridina.

Métodos y composiciones de administración

Las mejoras propuestas para los métodos y las composiciones de administración mucosa del péptido fijador al receptor de Y2 en mamíferos optimizan el esquema de dosificación del péptido fijador al receptor de Y2. La presente invención provee una administración mucosa del péptido fijador al receptor de Y2 formulado con uno o más agentes que mejoran la absorción mucosa, en la que la liberación de la dosis del péptido fijador al receptor de Y2 se normaliza y/o se prolonga sustancialmente durante un período de administración eficaz del péptido fijador al receptor de Y2 con márgenes de liberación que oscilan desde aproximadamente 0,1 y 2,0 horas, 0,4 a 1,5 horas, 0,7 a 1,5 horas o 0,8 a 1,0 horas tras la administración por vía mucosa. Se puede facilitar la liberación prolongada del péptido fijador al receptor de Y2 reiterando la administración del péptido

fijador al receptor de Y2 exógeno mediante los métodos y las composiciones de la presente invención.

Composiciones y métodos de liberación prolongada

Las mejoras propuestas para las composiciones y los métodos de administración mucosa del péptido fijador al receptor Y2 en mamíferos optimizan el esquema de dosificación del péptido fijador al receptor de Y2. La presente invención mejora la administración por vía mucosa (por ejemplo, nasal) de una formulación que comprende el péptido fijador al receptor de Y2 en combinación con uno o más agentes que mejoran la absorción mucosa y uno o más agentes opcionales que mejoran la liberación prolongada. Los agentes que mejoran la absorción mucosa de la presente invención producen un aumento eficaz de la absorción, por ejemplo, un aumento de la concentración plasmática máxima ($C_{máx}$), que tiene por objeto mejorar la acción terapéutica del péptido fijador al receptor de Y2 administrado por vía mucosa. Un segundo factor que influye en la acción terapéutica del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma sanguíneo y en el SNC es el tiempo de permanencia (TR, sigla en inglés de "*time of residence*"). Los agentes que mejoran la liberación prolongada combinados con agentes que mejoran la absorción intranasal aumentan la $C_{máx}$ y el tiempo de permanencia (TR, sigla en inglés de "*time of residence*") del péptido fijador al receptor de Y2. La presente descripción también incluye excipientes poliméricos y otros agentes y métodos empleados para elaborar formulaciones que mejoran la administración prolongada, por ejemplo, el polietilenglicol (PEG). La presente invención propone un mejor método de administración del péptido fijador al receptor de Y2 y una forma posológica mejorada para tratar síntomas relacionados con la obesidad, el cáncer de colon, el cáncer de páncreas o el cáncer de mama en los mamíferos.

En las formulaciones y métodos de administración mucosa propuestas por esta invención, el péptido fijador al receptor de Y2 suele combinarse o administrarse junto con un transportador o vehículo adecuado para la administración mucosa. En la presente, se entiende por "transportador" un relleno, diluyente o material encapsulante sólido o líquido farmacéuticamente aceptable. Un transportador líquido que contiene agua puede contener aditivos farmacéuticamente aceptables tales como acidificantes, alcalinizantes, conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes de control buffers, quelantes, complejantes, agentes solubilizantes, humectantes, solventes, suspensores y/o

incrementadores de la viscosidad, tonificantes, hidratantes y otros materiales biocompatibles. La *U.S. Pharmacopeia National Formulary*, 1857-1859, (1990) brinda una descripción de los ingredientes enumerados en las categorías anteriores. Algunos ejemplos de los materiales que pueden actuar como portadores farmacéuticamente aceptables son los azúcares, tales como la lactosa, la glucosa y la sacarosa; los almidones, tales como el almidón de maíz y el almidón de papa; la celulosa y sus derivados, tales como la carboximetilcelulosa sódica, la etilcelulosa y el acetato de celulosa; el tragacanto en polvo; la malta; la gelatina; el talco; los excipientes tales como la manteca de cacao y las ceras para supositorios; los aceites, tales como el aceite de maní, el aceite de semilla de algodón, el aceite de cártamo, el aceite de sésamo, el aceite de oliva, el aceite de maíz y el aceite de soja; los glicoles, tales como el propilenglicol; los polioles, tales como la glicerina, el sorbitol, el manitol y el polietilenglicol; los ésteres, tales como el oleato de etilo y el laurato de etilo; el agar; los agentes de control buffers, tales como el hidróxido de magnesio y el hidróxido de aluminio; el ácido algínico; el agua sin pirógeno; la solución salina isotónica; la solución de Ringer, el alcohol etílico y las soluciones buffer de fosfato, así como otras sustancias no tóxicas utilizables en formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones también pueden contener hidratantes, emulsionantes y lubricantes, tales como el laurilsulfato de sodio y el estearato de magnesio, así como colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes, de acuerdo con el deseo del formulador. Entre los antioxidantes farmacéuticamente aceptables se incluyen los antioxidantes hidrosolubles, tales como el ácido ascórbico, el hidrocloruro de cisteína, el bisulfito de sodio, el metabisulfito de sodio, el sulfito de sodio y similares; los antioxidantes liposolubles, tales como el palmitato de ascorbilo, el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT), la lecitina, el galato de propilo, el alfa-tocoferol y similares; y los quelantes metálicos, tales como el ácido cítrico, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el sorbitol, el ácido tartárico, el ácido fosfórico y similares. La cantidad de principio activo que se puede combinar con los portadores para producir una dosis de administración única depende de cada modo de administración.

En las composiciones y métodos de administración mucosa propuestas por esta invención, se emplean varios agentes que mejoran la absorción del péptido fijador al receptor de Y2 dentro o a través de la superficie de la mucosa. En este sentido, la administración del péptido fijador al receptor de Y2 en el epitelio mucoso puede ser

"transcelular" o "paracelular". El grado en el cual estas vías influyen en el flujo y la biodisponibilidad general del péptido fijador al receptor de Y2 depende del medio de la mucosa, de las propiedades físico-químicas del principio activo y de las propiedades del epitelio mucoso. El transporte paracelular implica sólo la difusión pasiva, mientras que el transporte transcelular puede producirse mediante procesos pasivos, facilitados o activos. En general, los solutos polares hidrófilos de transporte pasivo se difunden a través de la vía paracelular, mientras que los solutos más lipófilos utilizan la vía transcelular. La absorción y la biodisponibilidad (por ejemplo, que se reflejan a través del coeficiente de permeabilidad o el ensayo fisiológico) de diversos solutos que son absorbidos pasiva y activamente se pueden evaluar fácilmente, en cuanto a sus componentes de administración tanto paracelular como transcelular, respecto de cualquier péptido fijador al receptor de Y2 de la invención. Para las drogas de absorción pasiva, la participación relativa de las vías paracelulares y transcelulares en el transporte de las drogas depende del pKa, el coeficiente de partición, el radio molecular y la carga del fármaco, el pH del medio luminal en el cual se administra el fármaco, y el área de la superficie de absorción. La vía paracelular representa una fracción relativamente pequeña del área de superficie accesible del epitelio de la mucosa nasal. En términos generales, se ha informado que las membranas celulares ocupan un área de superficie mucosa que es mil veces mayor que el área ocupada por los espacios paracelulares. De este modo, el menor tamaño del área accesible y la discriminación sobre la base del tamaño y a la carga frente a la permeabilidad macromolecular sugieren que la vía paracelular es generalmente menos favorable que la absorción transcelular para el transporte de la droga. Resulta sorprendente que los métodos y las composiciones de la invención brinden un transporte significativamente mejorado de los biofármacos en el epitelio mucoso a través de la vía paracelular. Por lo tanto, los métodos y las composiciones de la invención abordan con éxito tanto la vía paracelular como la vía transcelular, sea una u otra, o mediante un único método o composición.

En la presente, se entiende por "agentes que mejoran la absorción mucosa" aquéllos que mejoran la liberación o la solubilidad (por ejemplo, a partir de un excipiente de la formulación), la velocidad de difusión, la capacidad y el tiempo de penetración, la absorción, el tiempo de permanencia, la estabilidad, la vida media eficaz, los niveles de concentración máxima o prolongada, la depuración y otras características de administración mucosa deseadas (por ejemplo, medidas en el sitio de administración o en

un sitio de actividad seleccionado, como ser el torrente sanguíneo o el sistema nervioso central) del péptido fijador al receptor de Y2 u otro(s) compuesto(s) biológicamente activo(s). De este modo, se puede mejorar la absorción mucosa mediante varios mecanismos, por ejemplo, aumentando la difusión, el transporte, la persistencia o la estabilidad del péptido fijador al receptor de Y2, aumentando la fluidez de la membrana, modulando la disponibilidad o acción de iones cálcicos o de otros iones que regulan la penetrabilidad intracelular o paracelular, solubilizando los componentes de la membrana mucosa (por ejemplo, los lípidos), modificando la concentración del sulfidrilo proteínico y no proteínico en los tejidos de la mucosa, aumentando el flujo de agua a través de la superficie mucosa, modulando la fisiología de unión del epitelio, reduciendo la viscosidad de la mucosidad que recubre al epitelio mucoso, reduciendo los índices de depuración mucociliar, y otros mecanismos.

En la presente invención, se entiende por "cantidad eficaz del péptido fijador al receptor de Y2 para la administración por vía mucosa", la administración mucosa eficaz del péptido fijador al receptor de Y2 a un sitio objetivo para que actúe el fármaco, que puede comprender distintas vías de administración y transferencia. Por ejemplo, un determinado principio activo puede transitar por las separaciones que dejan las células de la mucosa y alcanzar una pared vascular adyacente, mientras que, por otra vía, el fármaco puede, ya sea activa o pasivamente, absorberse en las células de la mucosa y actuar dentro de ellas o ser eliminado o transportado fuera de las células para alcanzar un segundo sitio objetivo, por ejemplo, la circulación general. Los métodos y composiciones de la presente invención pueden activar la translocación de principios activos a lo largo de una o más de tales vías posibles, o pueden actuar directamente sobre el tejido mucoso o el tejido vascular proximal para activar la absorción o penetración del/de los principio(s) activo(s). Las mejoras de la absorción o la penetración en este contexto no se limitan a estos mecanismos.

En la presente invención, "la concentración plasmática máxima ($C_{máx}$) del péptido fijador al receptor de Y2", "el área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo (AUC) del péptido fijador al receptor de Y2" y "el tiempo de máxima concentración plasmática sanguínea ($t_{máx}$) del péptido fijador al receptor de Y2" son parámetros farmacocinéticos conocidos por el especialista. Laursen *et al.*, *Eur. J. Endocrinology*, 135: 309-315, 1996. La "curva de concentración frente al tiempo" mide

la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el suero sanguíneo de un individuo frente al tiempo transcurrido tras la administración intranasal, intramuscular, subcutánea u otra vía parenteral de una dosis del péptido fijador al receptor de Y2. "$C_{máx}$" representa la concentración plasmática máxima del péptido fijador al receptor de Y2 después de una única dosis del péptido fijador al receptor de Y2. "$t_{máx}$" representa el tiempo que el péptido fijador al receptor de Y2 tarda en llegar a la concentración plasmática máxima tras la administración de una única dosis del péptido fijador al receptor de Y2.

En la presente invención, "el área bajo la curva (AUC) de concentración plasmática sanguínea del péptido fijador al receptor de Y2 frente al tiempo" se calcula empleando la regla trapezoidal lineal y sumándole las áreas residuales. Se podría detectar una disminución del 23% o un aumento del 30% entre dos dosis, con una probabilidad del 90% (tipo II error β = 10%). La "velocidad de administración" o la "velocidad de absorción" se calcula por comparación entre el tiempo máximo ($t_{máx}$) que se tarda en alcanzar la concentración máxima ($C_{máx}$). Tanto $C_{máx}$ como $t_{máx}$ se analizan utilizando métodos no paramétricos. Se empleó el análisis de variancia (ANOVA) para comparar la farmacocinética de las dosis intramuscular, subcutánea, intravenosa e intranasal del péptido fijador al receptor de Y2. Para evaluar la significación de comparaciones emparejadas, se utilizó el procedimiento secuencial de Bonferroni-Holmes. Se calculó la relación de respuesta a la dosis entre las tres dosis nasales según el análisis de regresión. Se consideró significativo un resultado de $P < 0,05$. Los resultados se dan como valores medios +/- SEM.

Si bien puede variar el mecanismo de los diferentes agentes que mejoran la absorción mucosa de la invención, en este contexto los reactivos útiles no tienen efectos adversos sobre el tejido mucoso, sino que se seleccionan según las características fisicoquímicas de cada péptido fijador al receptor de Y2 u otro principio activo o agente que mejora la absorción. En este contexto, los agentes que mejoran la absorción, que aumentan la penetración o permeabilidad de los tejidos mucosos, por lo general causan alguna alteración en la barrera protectora de la permeabilidad de la mucosa. Para que dichos agentes que mejoran la absorción sean de importancia en el marco de la presente invención, por lo general es conveniente que cualquier cambio significativo de la permeabilidad de la mucosa sea reversible dentro de un lapso que se adecue a la duración

de la absorción del fármaco. Además, es conveniente que la toxicidad acumulada no sea importante ni que el uso prolongado provoque cambios nocivos en las propiedades de la barrera mucosa.

En ciertos aspectos de la invención, se eligen agentes que fomentan la absorción para formar parte de administraciones conjuntas o formulaciones combinatorias con el péptido fijador al receptor Y2 de un grupo de pequeñas moléculas hidrófilas, entre las que se incluyen, sin estar limitadas a la enumeración que sigue: dimetilsulfóxido, dimetilformamida, etanol, propilenglicol y 2-pirrolidonas. Otra posibilidad sería utilizar moléculas anfipáticas de cadena larga, por ejemplo, deacilmetil sulfóxido, azina, laurilsulfato sódico, ácido oleico y sales biliares, para potenciar la penetración mucosa del péptido fijador al receptor de Y2. En otros aspectos, se utilizan surfactantes (por ejemplo, polisorbatos) como compuestos adjuntos, agentes de procesado o agregados a la formulación para aumentar la absorción intranasal del péptido fijador al receptor de Y2. Si se encuentran presentes en concentraciones suficientemente elevadas agentes tales como dimetilsulfóxido, polietilénglicol y etanol en medios de administración (por ejemplo, por preadministración o incorporación en una formulación terapéutica) pueden entrar en la fase acuosa de la mucosa y alterar sus propiedades de solubilidad y, de este modo, aumentar la separación del péptido fijador al receptor de Y2 del excipiente dentro de la mucosa.

Otros agentes que mejoran la absorción mucosa que pueden emplearse en la administración conjunta y los procedimientos y las formulaciones combinatorias de la invención son, sin estar limitados a la siguiente enumeración: micelas mezcladas, enaminas, donadores de monóxido de nitrógeno (por ejemplo, S-nitroso-N-acetilo-DL-penicilamina, NOR1, NOR4, que preferentemente se administran con un antioxidante de NO, tal como carboxi-PITO sódico o diclofenac sódico); salicilato de sodio; ésteres glicéridos de ácido acetoacético (por ejemplo, gliceril-1,3-diacetoacetato o 1,2-isopropilideneglicerina-3-acetoacetato); y otros difusores o promotores de la penetración intra o transepitelial que son fisiológicamente compatibles para la administración mucosa. Se eligen otros agentes que mejoran la absorción se seleccionan de una variedad de portadores, un grupo de bases y excipientes que mejoran la absorción mucosa, la estabilidad, la actividad o la penetración transepitelial del péptido fijador al receptor de Y2. Estos agentes pueden ser, entre otros, las ciclodextrinas y los derivados de la β-

ciclodextrina (por ejemplo 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina y heptakis (2,6-di-O-metil-β-ciclodextrina). Estos compuestos, que pueden estar combinados con uno a más principios activos y también formulados en una base oleaginosa, aumentan la biodisponibilidad de las formulaciones para la vía mucosa de la presente invención. Otros agentes adaptados para la administración mucosa que mejoran la absorción son los ácidos grasos de cadena mediana, entre los que se cuentan los mono y diglicéridos (por ejemplo, el caprato sódico: extractos de aceite de coco, Capmul), y los triglicéridos (por ejemplo, amilodextrina, Estaram 299, Migliol 810).

Las composiciones de administración mucosa para el tratamiento y la prevención que propone la presente invención se pueden complementar con cualquier promotor de la penetración que sea adecuado para facilitar la absorción, la difusión o la penetración de péptido fijador al receptor de Y2 a través de las barreras mucosas. El promotor de la penetración puede ser cualquiera que sea farmacológicamente aceptable. De este modo, en aspectos más detallados de la presente invención, se brindan las composiciones que incorporan uno o más promotores de la penetración elegidos de un grupo compuesto por el salicilato de sodio y derivados de ácidos salicílicos (acetil salicilato, salicilato de colina, salicilamida, etc.); los aminoácidos y las sales aminoácidas (por ejemplo, ácidos monoaminocarboxílicos, tales como la glicina, alanina, fenilalanina, prolina, hidroxiprolina, etc.; ácidos hidroxiaminos, tales como la serina; aminoácidos ácidos, tales como el ácido aspártico, el ácido glutámico, etc.; y aminoácidos básicos tales como la lisina (incluso sus sales metálicas alcalinas y sales de metales alcalinotérreos); y N-acetilaminoácidos (N-acetilalanina, N-acetilfenilalanina, N-acetilserina, N-acetilglicina, N-acetilisina, ácido N-acetilglutámico, N-acetilprolina, N-acetilhidroxiprolina, etc.) y sus sales (sales metálicas alcalinas y sales de metales alcalinotérreos). También se proporcionan como parte de los métodos y composiciones de la presente invención promotores de la penetración que generalmente se utilizan como emulsionantes (por ejemplo, oleilfosfato sódico, laurilfosfato de sodio, laurilsulfato de sodio miristilsulfato de sodio, éteres alquílicos de polioxietileno, ésteres alquílicos de polioxietileno, etc.), ácido caproico, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico y sus sales de metales alcalinos, ácidos pirrolidonecarboxílicos, ésteres de ácido alquilpirrolidonecarboxílico, N-alquilpirrolidonas, ésteres de acil prolina, y similares.

En varios aspectos de la presente invención, se proporcionan mejoras de las formulaciones y los métodos de administración en la mucosa nasal que posibilitan la absorción de péptidos fijadores al receptor de Y2 y otros principios activos a través de barreras mucosas entre los sitios de administración y los de sitios objetivos seleccionados. Algunas formulaciones se adaptan específicamente a una célula, tejido u órgano específico o aún a una enfermedad particular. En otros aspectos, las formulaciones y los métodos de la presente invención proponen una absorción del péptido fijador al receptor de Y2 que es eficaz y selectiva por vía intracelular o intercelular específica mediante endocitosis o transcitosis. Es característico que el péptido fijador al receptor de Y2 se cargue adecuadamente en concentraciones eficaces contenidas en un portador y se absorba y mantenga en una forma estable tanto en la mucosa nasal como durante el paso a través de compartimientos y membranas intracelulares hacia un sitio objetivo remoto en el cual debe actuar la droga (por ejemplo, el torrente sanguíneo o un tejido u órgano específico, o un compartimiento extracelular). El péptido fijador al receptor de Y2 se puede administrar con un excipiente o modificado de otro modo (por ejemplo, como prodroga), medio en el que la liberación o activación del péptido fijador de Y2 se desencadena fisiológicamente (por ejemplo, cambio de pH, enzimas lisosómicas, etc.). Con frecuencia, el péptido fijador al receptor Y2 permanece farmacológicamente inactivo hasta que alcanza su sitio objetivo de acción. En la mayoría de los casos, el péptido fijador al receptor de Y2 y otros componentes de la formulación no son tóxicos ni inmunógenos. En este contexto, generalmente los portadores y otros componentes de la formulación se seleccionan por la rapidez con que se degradan y son eliminados en condiciones fisiológicas. Al mismo tiempo, las formulaciones son química y físicamente estables en las presentaciones, lo que permite almacenarlas eficazmente.

Análogos y Miméticos Peptídicos y Proteínicos

Dentro de la definición de péptidos y proteínas biológicamente activos de la presente invención, se encuentran las proteínas y los péptidos (compuestos de dos o más aminoácidos de unión covalente) de origen natural o sintético, de acción terapéutica o preventiva, los fragmentos de péptidos o proteínas, los análogos de proteínas o péptidos, y derivados modificados químicamente o sales de péptidos o proteínas activos. La presente invención contempla el empleo de una gran variedad de análogos y miméticos útiles del péptido fijador al receptor de Y2, que pueden ser producidos y cuya actividad biológica puede ser probada por medio de métodos conocidos. Con frecuencia, los péptidos o las

proteínas del péptido fijador al receptor de Y2 u otros péptidos o proteínas biológicamente activos dentro del marco de la invención son muteínas que se obtienen con facilidad por medio de sustitución, adición o deleción parcial de aminoácidos dentro de una secuencia de péptidos o proteínas natural u original (por ejemplo: cepas salvajes, mutaciones naturales o variaciones alélicas). Además, quedan contemplados también los fragmentos biológicamente activos de péptidos o proteínas naturales. Dichos derivados y fragmentos mutantes retienen sustancialmente la actividad biológica deseada del péptido o proteína natural. En el caso de los péptidos o las proteínas de cadenas de hidratos de carbono, la presente invención también contempla las variantes biológicamente activas marcadas por alteraciones de estas especies de hidratos de carbono.

En la presente invención, se entiende por "sustitución conservadora de aminoácidos" la intercambiabilidad general de residuos aminoácidos de cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos intercambiables que tiene cadenas laterales alifáticas es el que se compone de alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales hidroxil alifáticas es el de la serina y la treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales con amida es el de la asparagina y la glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es el de la fenilalanina, tirosina y el triptofano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es el de la lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales con azufre es el de la cisteína y metionina. Un ejemplo de sustituciones conservadoras es la sustitución de un residuo no polarizado (hidrófobo), tal como la isoleucina, valina, leucina o metionina. De igual modo, la presente invención contempla la sustitución de un residuo polarizado (hidrófilo), como entre la arginina y la lisina, entre la glutamina y la asparagina, y entre la treonina y la serina. Asimismo, está contemplada la sustitución de un residuo básico, tal como la lisina, arginina o histidina, o la sustitución de un residuo ácido como el ácido aspártico o el ácido glutámico. Algunos ejemplos de grupos de sustitución conservadora de aminoácidos son los siguientes: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Si se lleva a cabo una alineación óptima de un análogo peptídico o proteínico con el péptido o la proteína natural correspondiente y se emplean análisis apropiados, por ejemplo, de adhesión proteínica o de fijación a receptores para determinar una actividad biológica determinada, es posible identificar con facilidad análogos peptídicos y proteínicos utilizables en los métodos y composiciones de

la presente invención. Los análogos proteínicos y peptídicos utilizables son característica y específicamente inmunorreactivos y contienen anticuerpos que reaccionan ante el correspondiente péptido o proteína natural.

Un método para estabilizar las formulaciones proteínicas sólidas de la invención consiste en aumentar la estabilidad física de la proteína purificada, por ejemplo, liofilizándola. Este procedimiento inhibe la agregación a través de interacciones hidrófobas, como también a través de vías covalentes que podrían incrementarse al desdoblarse las proteínas. En este contexto, las formulaciones estabilizantes suelen ser formulaciones con bases de polímeros, por ejemplo, una formulación o sistema de administración de hidrogel biodegradable. Tal como ya se mencionó, es bien conocida la función fundamental que tiene el agua en la estructura, la función y la estabilidad de las proteínas. Es característico de las proteínas ser relativamente estables en estado sólido sin volumen de agua. Sin embargo, las formulaciones terapéuticas sólidas de proteínas pueden hidratarse si son almacenadas a niveles altos de humedad o durante la administración desde una composición o dispositivo de liberación prolongada. Generalmente, cuanto mayor es la hidratación, menor es la estabilidad de las proteínas. El agua también puede tener una función significativa en la agregación de proteínas sólidas, por ejemplo, aumentando la flexibilidad proteínica, lo que mejora la accesibilidad de los grupos reactivos, brindando una fase móvil a los reactivos y sirviendo de reactivo en diversos procesos deletéreos, tales como la eliminación beta y la hidrólisis.

Los preparados proteínicos más inestables son los que contienen entre 6% y 28% de agua. Por debajo de estos niveles, son bajos tanto la movilidad del agua ligada como los movimientos internos de la proteína. Por encima de estos niveles, la movilidad del agua y los movimientos de las proteínas se acercan a los de la hidratación completa. Hasta un punto, se ha observado en varios sistemas que el aumento de la hidratación aumenta la susceptibilidad a la agregación de fase sólida. Sin embargo, a mayor cantidad de agua, menor es la agregación debido al efecto de dilución.

De acuerdo con estos principios, un método eficaz para estabilizar los péptidos y las proteínas de forma tal que no sufran agregación en estado sólido para que puedan ser administrados por vía mucosa consiste en controlar el contenido de agua en una formulación sólida y mantener la actividad del agua de la formulación en niveles óptimos.

Este nivel depende de la naturaleza de la proteína, pero, por lo general, las proteínas mantenidas debajo de la cobertura acuosa "monocapa" tendrán más estabilidad en estado sólido.

La presente invención brinda una variedad de aditivos, diluyentes, bases y excipientes que controlan con eficacia el contenido de agua a fin de mejorar la estabilidad de las proteínas. Estos reactivos y portadores, que son eficaces como antiagregantes, pueden ser polímeros de funcionalidad distinta, como el polietilenglicol, el dextrano, el dietilaminoetil dextrano y la celulosa carboximetílica, que aumentan significativamente la estabilidad y reducen la agregación en la fase sólida de los péptidos y proteínas mezclados o unidos. En algunos casos, la actividad o estabilidad física de las proteínas puede también mejorarse mediante numerosos aditivos para soluciones acuosas de las drogas peptídicas o proteínicos. Por ejemplo, pueden utilizarse los siguientes aditivos: polioles (incluidos los azúcares), aminoácidos, proteínas tales como el colágeno y la gelatina, y varias sales.

Ciertos aditivos, en particular los azúcares y otros polioles, otorgan, asimismo, una estabilidad física significativa a las proteínas secas, por ejemplo, liofilizadas. Estos aditivos también pueden utilizarse en el marco de la presente invención para impedir la agregación de las proteínas no sólo durante la liofilización sino también durante el almacenamiento en estado seco. Por ejemplo, la sacarosa y el Ficoll 70 (un polímero con unidades de sacarosa) presentan, en ciertas condiciones, una importante protección contra la agregación peptídica o proteínica durante la incubación en fase sólida. Estos aditivos también pueden aumentar la estabilidad de las proteínas sólidas incluidas en matrices poliméricas.

Existen otros aditivos, por ejemplo, la sacarosa, que estabilizan las proteínas e impiden la agregación en estado sólido en atmósferas húmedas a temperaturas altas, como puede suceder en ciertas formulaciones de liberación prolongada de la presente invención. Las proteínas como la gelatina o el colágeno sirven asimismo como estabilizadores o engrosantes que reducen la desnaturalización y la agregación de proteínas inestables en este contexto. Es posible incorporar estos aditivos en los procesos de fusión polimérica y en las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, pueden prepararse micropartículas polipeptídicas simplemente liofilizando o secando con spray una solución

que contenga diversos aditivos estabilizadores descritos anteriormente. De esta manera, pueden obtenerse péptidos y proteínas no agregados de liberación prolongada durante un lapso extenso.

En la presente invención, se proporcionan numerosos componentes y métodos de preparación adicionales, así como aditivos de formulación específicos, que pueden producir formulaciones para la administración mucosa de péptidos y proteínas con tendencia a la agregación, en las que los péptidos y proteínas se estabilizan en una forma sustancialmente pura y no agregada utilizando un solvente. Esta invención contempla una gran cantidad de componentes y aditivos que pueden utilizarse en los métodos y las formulaciones que se proponen. Entre otros, algunos de estos agentes solubilizantes pueden ser los dímeros ligados de ciclodextrinas (CD), que fijan de manera selectiva las cadenas laterales hidrófobas de los polipéptidos. Se ha descubierto que estos dímeros de CD se unen a las placas hidrófobas de las proteínas de una manera en que inhiben significativamente la agregación. Esta inhibición es selectiva con respecto al dímero de CD y a la proteína implicada. Esta inhibición selectiva de la agregación proteínica proporciona otras ventajas a los métodos y composiciones de administración intranasal de la invención. Otros agentes que pueden emplearse en este contexto son los trímeros y tetrámeros de la CD con geometrías variables, controlados por los enlaces que bloquean específicamente la agregación de péptidos y proteínas. Asimismo, los agentes solubilizantes y los métodos de solubilización que plantea incorporar la presente invención implican el uso de péptidos y miméticos peptídicos que bloquean selectivamente las interacciones proteína-proteína. En un aspecto, la unión específica de cadenas laterales hidrófobas que, según se informa, tienen los multímeros CD se extiende a las proteínas a través del uso de péptidos y miméticos peptídicos que bloquean la agregación de las proteínas de manera similar. Se dispone de una gran cantidad de métodos apropiados y antiagregantes que pueden ser incorporados en las composiciones y los procedimientos de la presente invención.

Agentes y Métodos Modificadores de Carga y de Control del pH

Con el fin de mejorar las características de transporte de los agentes biológicamente activos (incluso del péptido fijador al receptor de Y2, otros péptidos y proteínas activos y los fármacos macromoleculares y micromoleculares) a fin de conseguir una mejor absorción a través de las barreras hidrófobas de las membranas

mucosas, la invención también proporciona técnicas y reactivos que modifican la carga de los principios biológicamente activos seleccionados o de los agentes que mejoran la absorción descriptos en la presente. En este aspecto, la permeabilidad relativa de las macromoléculas por lo general se relaciona con sus coeficientes de partición. El grado de ionización de las moléculas, que depende del pK_a de la molécula y del pH de la superficie de la membrana mucosa, también influye en la permeabilidad molecular. La penetración y la partición de los principios biológicamente activos, incluso del péptido fijador al receptor de Y2 y de análogos de la invención para la administración mucosa, se pueden facilitar alterando o extendiendo la carga del principio activo o del permeabilizante, lo que se logra, por ejemplo, alterando los grupos funcionales cargados, modificando el pH del excipiente o la solución mediante la cual se administra el principio activo, o efectuando una administración conjunta de un reactivo que altera la carga o el pH con el principio activo.

De acuerdo con estos conceptos generales, la administración mucosa de las especies macromoleculares cargadas, incluso del péptido fijador al receptor de Y2 y otros péptidos y proteínas biológicamente activos, dentro del marco de los métodos y las composiciones de la invención, mejora sustancialmente cuando el principio activo se administra en la superficie mucosa en estado de carga sustancialmente no ionizada, o carga eléctrica neutra.

La carga de un determinado péptido fijador al receptor de Y2 y de otros componentes peptídicos y proteínicos biológicamente activos de las formulaciones para la vía mucosa que propone la presente invención será modificada a fin de aumentar la densidad de la carga positiva del péptido o de la proteína. Estas modificaciones también se extienden a la cationización de los conjugados peptídicos y proteínicos, excipientes y otras formas de administración que se revelan en la presente. La cationización brinda un medio conveniente de alterar las propiedades de biodistribución y transporte de las proteínas y las macromoléculas dentro del marco de la presente invención. La cationización se lleva a cabo de manera tal que quede sustancialmente conservada la actividad biológica del principio activo y se limiten los efectos secundarios potencialmente adversos, entre los que se cuentan el daño tisular y la toxicidad.

Agentes y Métodos Inhibidores de Enzimas Degradantes

Otro excipiente que puede formar parte de una preparación transmucosa es un inhibidor de enzimas degradantes. Entre los complejos mucoadhesivos inhibidores de enzimas y polímeros que son útiles para las formulaciones y los métodos de administración mucosa de la presente invención se incluyen, sin estar limitados a la siguiente enumeración, los que siguen: Carboximetilcelulosa-pepstatina (con actividad anti-pepsina); inhibidor (ácido poliacrílico)-Bowman-Birk (antiquimotripsina); ácido poliacrílico-quimostatina (antiquimotripsina); ácido poliacrílico-elastinal (antielastasa); Carboximetilcelulosa-elastinal (antielastasa); policarbofil-elastinal (antielastasa); Quitosan, antipaína (antitripsina); (ácido poliacrílico)-bacitracina (antiaminopeptidasa N); Quitosan-EDTA (antiaminopeptidasa N, anticarboxipeptidasa A); Quitosan-EDTA-antipaína (antitripsina, antiquimotripsina, antielastasa). Según se detalla más adelante, determinadas realizaciones de la invención pueden incorporar un nuevo derivado del Quitosan o una nueva fórmula del Quitosan modificada químicamente. Uno de esos derivados nuevos que propone utilizar la presente invención se describe como un polímero β-[1→4]-2-guanidino-2-desoxi-D-glucosa (poli-GuD).

Puede ser de utilidad emplear cualquier inhibidor que inhiba la actividad de una enzima para proteger al/a los agente(s) biológicamente activo(s) en las composiciones y los métodos de la invención. Entre los inhibidores enzimáticos que sirven para proteger proteínas y péptidos biológicamente activos se incluyen, por ejemplo, los inhibidores de la tripsina del poroto de soja, de la tripsina pancreática, de la quimotripsina y de la tripsina y la crimotripsina aisladas de los tubérculos de la papa (*solanum tuberosum L.*). Los inhibidores pueden utilizarse en combinación o mezclas. Entre otros inhibidores de las enzimas proteolíticas que pueden utilizarse en el marco de la presente invención se incluyen el inhibidor de la enzima ovomucoide, el mesilato de gabaxato, la alfa-1-antitripsina, la aprotinina, la amastatina, la bestatina, la puromicina, la bacitracina, la leupepsina, alfa-2-macroglobulina, la pepstatina y el inhibidor de la tripsina de la clara de huevo o del poroto de soja. Se pueden utilizar estos y otros inhibidores por separado o combinados. Es posible incorporar el/los inhibidor(es) a un excipiente, por ejemplo, un polímero hidrófilo, o ligarlos a él, cubriendo la superficie de la formulación que entrará en contacto con la mucosa nasal, o incorporándolo a la fase superficial de la superficie, en combinación con el principio biológicamente activo o en una formulación administrada por separado (por ejemplo, administrada con anterioridad).

La cantidad de inhibidor, por ejemplo, de un inhibidor de la enzima proteolítica que se puede incorporar a las composiciones de la invención, varía según (a) las propiedades de cada inhibidor, (b) el número de grupos funcionales que contenga la molécula (que pueden ser activados para introducir la insaturación etilénica necesaria para que se produzca copolimerización con los monómeros que forman el hidrogel) y (c) el número de grupos de lectínicos, tales como glucósidos, que está presente en la molécula del inhibidor. También puede variar según el principio activo específico que se desee administrar. En términos generales, una cantidad útil de un inhibidor enzimático varía entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, a menudo entre aproximadamente 0,2 mg/ml y aproximadamente 25 mg/ml, y más comúnmente, entre aproximadamente 0,5 mg/ml y 5 mg/ml de la formulación (es decir, una formulación aislada del inhibidor de la proteasa o una formulación que combine el inhibidor y el principio biológicamente activo).

En el caso de la inhibición de la tripsina, pueden seleccionarse los inhibidores adecuados del siguiente grupo, entre otros: aprotinina, BBI, inhibidor de la tripsina del poroto de soja, ovomucoide del pollo, ovoinhibidor del pollo, inhibidor de la tripsina pancreática humana, camostat mesilato, inhibidores flavonoides, antipaína, leupeptina, p-aminobenzamidina, AEBSF, TLCK (tosil lisina clorometilcetona), APMSF, DFP, PMSF y derivados del poli(acrilato). En el caso de la inhibición de la quimotripsina, se pueden elegir inhibidores adecuados del siguiente grupo, entre otros: aprotinina, BBI, inhibidor de la tripsina del poroto de soja, quimostatina, benciloxicarbonil-Pro-Fe-CHO, FK-448, ovoinhibidor del pollo, complejos de ácidos bifenilborónicos del azúcar, DFP, PMSF, β-fenil propionato, y derivados del poli(acrilato). En el caso de la inhibición de la elastasa, se pueden elegir inhibidores adecuados del siguiente grupo, entre otros: elastatinal, metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-clorometilcetona (MPCMK), BBI, inhibidor de la tripsina del poroto de soja, ovoinhibidor del pollo, DFP y PMSF.

Se pueden elegir otros inhibidores enzimáticos para utilizar con la presente invención de un amplio grupo de inhibidores no proteínicos que varían en el grado de potencia y toxicidad. Según se detalla más adelante, resulta fácil inmovilizar estos agentes asociados a las matrices u otros excipientes, o elaborar análogos modificados químicamente para reducir o aun eliminar los efectos tóxicos, si es que están presentes.

Dentro de este amplio grupo de inhibidores enzimáticos posibles para emplear en el marco de la invención pueden mencionarse los inhibidores órganofosforados, tales como el diisopropilfluorofosfato (DFP) y el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), que son inhibidores poderosos e irreversibles de las proteasas de la serina (por ejemplo, tripsina y quimotripsina). La inhibición de la acetilcolinaesterasa que agregan estos compuestos los hace muy tóxicos en las formulaciones no controladas. Otro inhibidor posible, el fluoruro de 4-(2-Aminoetilo)-bencenosulfonilo (AEBSF), tiene una acción inhibidora comparable con la del DFP y del PMSF, pero es mucho menos tóxico. El hidrocloruro de fluoruro del (4-Aminofenil)-metanosulfonilo (APMSF) es otro potente inhibidor de la tripsina, pero resulta tóxico en formulaciones no controladas. A diferencia de estos inhibidores, el 4-(4-isopropilpiperidinocarbonil)fenil 1,2,3,4,-tetrahidro-1-naftoato metanosulfonato (FK-448) es una sustancia de escasa toxicidad que es un inhibidor potente y específico de la quimotripsina. Otros representantes de este grupo de inhibidores no proteínicos, que también muestran bajo riesgo de toxicidad, son el camostat-mesilato [Fenilacetato Metan-Sulfonato de (N,N' - dimetil carbamoilmetil-p'-(p-guanidino-benzoiloxi)].

Otro tipo de inhibidor enzimático que puede formar parte de los métodos y composiciones de la presente invención son los aminoácidos y los aminoácidos modificados que interfieren en la degradación enzimática de determinados compuestos farmacológicos. Dentro de este contexto, los aminoácidos y aminoácidos modificados no son sustancialmente tóxicos y se pueden producir a bajo costo. Sin embargo, debido al pequeño tamaño de su molécula y a la buena solubilidad, se diluyen y absorben con facilidad en medios mucosos. No obstante, en condiciones adecuadas, los aminoácidos pueden actuar como inhibidores enzimáticos competitivos y reversibles de la proteasa. Ciertos aminoácidos modificados pueden mostrar una actividad inhibidora mucho más intensa. El aminoácido modificado deseado en este contexto se conoce como un inhibidor en "estado de transición". La intensa actividad inhibidora de estos compuestos se basa en la similitud estructural que tienen respecto del sustrato en la geometría del estado de transición, si bien por lo general son elegidos porque tiene una afinidad mucho mayor por el sitio activo de una enzima que el sustrato mismo. Los inhibidores en estado de transición son inhibidores competitivos y reversibles. Entre otros, esta clase de inhibidores pueden ser los derivados de ácido α-aminoborónico, tales como la boroleucina, la borovalina y la boroalanina. El átomo de boro que contienen estos derivados puede formar un ión del boronato tetrahedro que, según se cree, se asemeja al

estado de transición de los péptidos durante la hidrólisis a la que los someten las aminopeptidasas. Estos derivados de aminoácidos son inhibidores potentes y reversibles de las aminopeptidasas y se informa que la boroleucina supera a la bestatina más de 100 veces en cuanto a la eficacia inhibitoria enzimática y a la puromicina en más de 1000 veces. Otro aminoácido modificado que, según se ha informado, tiene una intensa actividad inhibidora de la proteasa, es la N-acetilcisteína, que inhibe la actividad enzimática de la aminopeptidasa N. Este agente asociado también tiene propiedades mucolíticas que se pueden emplear dentro de los métodos y composiciones de la invención para reducir los efectos de la barrera de propagación de la mucosidad.

También es posible emplear otros inhibidores enzimáticos del grupo de inhibidores enzimáticos peptídicos y peptídicos modificados para utilizar con los métodos de administración conjunta y las formulaciones combinadas de la invención. Un representante importante de esta clase de inhibidores es el dodecapéptido cíclico, la bacitracina, que se obtiene del *Bacillus licheniformis*. Además de estos tipos de péptidos, ciertos dipéptidos y tripéptidos muestran una actividad inhibidora débil e inespecífica de algunas proteasas. Por analogía con los aminoácidos, la actividad inhibidora que presentan se puede mejorar mediante modificaciones químicas. Por ejemplo, los análogos del dipéptido del ácido fosfínico también son inhibidores en "estado de transición" con una intensa actividad inhibidora de las aminopeptidasas. Se ha informado que han sido utilizados para estabilizar la leucina encefalina administrada por vía nasal. Otro ejemplo de análogos en estado de transición es el de la pepstatina pentapéptida modificada, que es un inhibidor muy potente de la pepsina. El análisis estructural de la pepstatina, efectuado mediante pruebas de la actividad inhibidora de varios análogos sintéticos, reveló las principales características de la función estructural de la molécula que es responsable de la actividad inhibidora. Otro tipo especial de péptido modificado son los inhibidores que tienen una función de aldehído ubicada en una terminal de la estructura del péptido. Por ejemplo, se ha encontrado que la secuencia benciloxicarbonil-Pro-Fe-CHO, que cumple con los requisitos primarios y secundarios de especificidad conocidos de la quimotripsina, es un potente inhibidor reversible de esta proteinasa. Las estructuras químicas de otros inhibidores que contienen una función de aldehído ubicada en una terminal, por ejemplo, la antipaína, leupeptina, quimostatina y elastatinal, también son bien conocidos en farmacología, como lo son las estructuras de otros inhibidores peptídicos modificados reversibles, tales como la fosforamidona, bestatina, puromicina y amastatina.

Debido a que la masa molecular es alta en comparación, los inhibidores polipeptídicos de la proteasa son más receptivos que los compuestos más pequeños a las formulaciones concentradas en una matriz de excipientes farmacológicos. Otros inhibidores de la proteasa que pueden emplearse en las formulaciones y los métodos de la invención son los complejantes. Los complejantes intervienen en la inhibición enzimática privando al medio intranasal (o composición de preparación o farmacológica) de los cationes divalentes, que son cofactores de muchas proteasas. Por ejemplo, los complejantes EDTA y DTPA agregados conjuntamente o en combinación, en la concentración adecuada, son suficientes para inhibir las proteasas seleccionadas y, por ende, para mejorar la absorción intranasal de los principios biológicamente activos de acuerdo con la invención. Otros representantes de esta clase de inhibidores son los siguientes: EGTA, 1,10-fenantrolina e hidroxiquinolina. Además, debido a la tendencia a quelar los cationes divalentes, estos complejantes y otros de su tipo son de utilidad en el marco de la invención como promotores directos de la absorción.

Tal como se menciona más detalladamente en otro párrafo de la presente, también se contempla emplear diversos polímeros, en particular los polímeros mucoadhesivos, como inhibidores enzimáticos en los métodos y composiciones de la formulación combinada y/o multiprocesada y la administración conjunta de la invención. Por ejemplo, los derivados del poliacrilato, tales como el ácido poliacrílico y el policarbófilo, pueden influir en la actividad de diversas proteasas, por ejemplo, de la tripsina y la quimotripsina. El efecto inhibidor de estos polímeros también puede basarse en la complejidad de los cationes divalentes, tales como Ca^{2+} y Zn^{2+}. Además, se contempla que estos polímeros puedan servir como socios o portadores conjugados de otros inhibidores enzimáticos, como ya se ha descrito en párrafos anteriores. Por ejemplo, se ha elaborado un conjugado de Quitosan y EDTA que es de utilidad en el marco de la invención y que tiene un fuerte efecto inhibidor de la actividad enzimática de las proteasas dependientes del zinc. No se espera que se vean muy comprometidas las propiedades mucoadhesivas de los polímeros por la adhesión de otros inhibidores enzimáticos en este contexto, ni se espera que disminuya la utilidad general de dichos polímeros empleados como excipientes de los principios biológicamente activos en el marco de la presente invención. Por el contrario, la menor distancia que media entre el excipiente y la superficie mucosa que consigue el mecanismo mucoadhesivo minimizará el metabolismo presistémico del principio activo,

mientras que los inhibidores enzimáticos de fijación covalente permanecen concentrados en el lugar de administración del fármaco, por lo que también se minimizan los efectos indeseados de dilución que pueden causar los inhibidores, como también los efectos tóxicos y otros efectos secundarios. De esta manera, es posible reducir la cantidad eficaz de los inhibidores enzimáticos en administración conjunta debido a que se anulan los efectos de dilución.

Entre los complejos mucoadhesivos que son inhibidores enzimáticos y poliméricos que pueden formar parte de las formulaciones y los métodos de administración mucosa que propone la presente invención se incluyen, entre otros: Carboximetilcelulosa-pepstatina (con actividad antipepsina); inhibidor ácido poliacrílico-Bowman-Birk (antiquimotripsina); ácido poliacrílico-quimostatina (antiquimotripsina); ácido poliacrílico-elastinal (antielastasa); Carboximetilcelulosa-elastinal (antielastasa); Policarbófilo-elastinal (antielastasa); Quitosan-antipaína (antitripsina); ácido poliacrílico-bacitracina (antiaminopeptidasa N); Quitosan-EDTA (antiaminopeptidasa N, anti-carboxipeptidasa A); Quitosan-EDTA-antipaína (antitripsina, antiquimotripsina, antielastasa).

Métodos y Agentes Mucolíticos y Liberadores de Mucus

La administración eficaz de los agentes bioterapéuticos por vía intranasal debe considerar que el porcentaje de la droga que se transporta se ve disminuido por la capa de mucosidad protectora que recubre a la mucosa nasal, además de que disminuye la cantidad de fármaco porque se une a glucoproteínas de la capa mucosa. La mucosidad normal es una sustancia viscoelástica con apariencia de gel que está compuesta de agua, electrolitos, mucinas, macromoléculas y células epiteliales de desecho. Esta mucosidad tiene como función principal actuar como un cobertor citoprotector y lubricante de los tejidos mucosos subyacentes. La mucosidad es segregada por células secretoras distribuidas al azar que se encuentran en el epitelio nasal y en otros epitelios mucosos. La unidad estructural de la mucosidad es la mucina. Esta glucoproteína es la principal responsable de la naturaleza viscoelástica de la mucosidad, aunque otras macromoléculas también pueden contribuir con esta característica. En la mucosidad de las vías respiratorias, esas macromoléculas son las siguientes: IgA (Inmunoglobulina A), IgM (Inmunoglobulina M), IgE (Inmunoglobulina E) de secreción local, lisozima y

broncotransferrina, que también tienen un papel importante en los mecanismos de defensa del huésped.

Los métodos de administración conjunta de la presente invención incorporan opcionalmente mucolíticos o agentes liberadores del mucus eficaces, que sirven para degradar, diluir o eliminar la mucosidad de las superficies mucosas intranasales a fin de facilitar la absorción de los fármacos bioterapéuticos administrados por vía intranasal. En el marco de estos métodos, un mucolítico o agente liberador del mucus se administran conjuntamente como un compuesto adicional para aumentar la absorción intranasal del principio biológicamente activo. Otra posibilidad sería incorporar una cantidad eficaz de un mucolítico como agente de procesamiento en un método de multiprocesamiento de la presente invención, o como un aditivo dentro de una formulación combinatoria de la invención, a fin de brindar una formulación mejorada que aumente la absorción intranasal de los compuestos bioterapéuticos reduciendo los efectos de barrera de la mucosidad intranasal.

Se dispone de distintos mucolíticos o agentes liberadores de mucus que pueden ser incorporados a los métodos y las composiciones de la invención. Los mucolíticos y agentes liberadores de mucus suelen clasificarse según su mecanismo de acción en los siguientes grupos: proteasas (por ejemplo, pronasa, papaína) que escinden el núcleo proteínico de las glucoproteínas mucínicas; los compuestos de sulfidrilo que separan las uniones disulfuro de mucoproteínas; y los detergentes (ej., Triton X-100, Tween 20) que destruyen los enlaces no covalentes dentro de la mucosidad. Otros compuestos que pueden emplearse en este contexto son, sin limitarse a la siguiente enumeración, las sales biliares y los surfactantes, por ejemplo, el desoxicolato sódico, el taurodesoxicolato sódico, el glucocolato sódico y la lisofosfatidilcolina.

La eficacia de las sales biliares para provocar la degradación estructural de la mucosidad sigue el orden desoxicolato > taurocolato > glucocolato. Otros agentes eficaces en reducir la viscosidad o la adhesión de la mucosidad a fin de aumentar la administración intranasal de acuerdo con los métodos de la invención son, por ejemplo, los ácidos grasos de cadena corta y los agentes mucolíticos que funcionan por quelación, como los péptidos de N-acilcolágeno, los ácidos biliares y las saponinas (estas últimas

funcionan en parte quelando el Ca^{2+} y/o el Mg^{2+}, que tienen un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la capa mucosa).

Otros mucolíticos que pueden ser utilizados en los métodos y las composiciones de la presente invención son la N-acetil-L-cisteína (ACS), mucolítico muy potente que reduce tanto la viscosidad como la adhesión de la mucosidad broncopulmonar y que, según se informa, provoca un aumento escaso de la biodisponibilidad nasal de la hormona de crecimiento humana en ratas anestesiadas (desde 7,5 hasta 12,2%). Estos y otros agentes mucolíticos y agentes liberadores de mucus entran en contacto con la mucosa nasal, generalmente a una concentración que varía de alrededor de 0,2 a 20 mM, conjuntamente con la administración de los principios biológicamente activos, para reducir la viscosidad y/o la elasticidad polar de la mucosidad intranasal.

Se pueden elegir otros mucolíticos o agentes liberadores de mucosidad dentro de una variedad de enzimas glucosidasas, que son capaces de escindir las uniones de glucósidos dentro de la glucoproteína mucosa. La α-amilasa y ß-amilasa representan esta clase de enzimas, aunque su efecto mucolítico probablemente sea limitado. Por el contrario, las glucosidasas bacterianas permiten que estos microorganismos penetren las capas mucosas de sus huéspedes.

En combinación con la mayoría de los principios biológicamente activos dentro del marco de la invención, entre ellos, fármacos peptídicos y proteínicos, también se suelen utilizar detergentes no ionogénicos como mucolíticos o liberadores de mucus. Es característico que estos agentes no modifiquen ni afecten sustancialmente la acción de los fármacos polipeptídicos.

Métodos y Agentes Cilioestáticos

Debido a que la capacidad de autolimpieza de algunos tejidos mucosos (por ejemplo, los tejidos mucosos nasales) por medio de la depuración mucociliar es necesaria como función protectora (por ejemplo, para eliminar polvo, alérgenos y bacterias), en general se considera que esta función no debería verse afectada sustancialmente por los medicamentos administrados por vía mucosa. El transporte mucociliar por el tracto respiratorio es un mecanismo de defensa particularmente importante contra las infecciones. Para lograr esta función, el batido ciliar en las vías nasales y respiratorias

mueve una capa de mucosidad a lo largo de la mucosa para remover partículas y microorganismos que hayan sido inhalados.

Los agentes cilioestáticos son de utilidad dentro de los métodos y composiciones de la invención porque aumentan el tiempo de permanencia de los péptidos fijadores al receptor de Y2 administrados por vía mucosa (por ejemplo, intranasal), de análogos y miméticos, y de otros principios biológicamente activos que se describen en la presente invención. En particular la administración de estos agentes mediante los métodos y las composiciones de la invención aumenta significativamente, en ciertos aspectos, gracias a una administración conjunta o formulación combinatoria de uno o más agentes cilioestáticos que inhiben de modo reversible la actividad ciliar de las células mucosas, a fin de causar un aumento provisorio y reversible del tiempo de permanencia del/de los principio(s) activo(s) administrado(s) por vía mucosa. En estos aspectos de la invención, todos los factores cilioestáticos mencionados, sean de actividad específica o indirecta, pueden ser utilizados con éxito como agentes cilioestáticos en cantidades adecuadas (de acuerdo con la concentración, la duración y el modo de administración) de modo que produzcan una reducción o interrupción transitoria (es decir, reversible) de la depuración mucociliar en el sitio mucoso de administración a fin de mejorar la absorción del péptido fijador al receptor de Y2, de análogos y miméticos, y de otros principios biológicamente activos descritos en la presente, sin efectos adversos inaceptables.

En aspectos más detallados, se utiliza un agente cilioestático específico en una formulación combinada o protocolo de administración conjunta con una o más proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de análogos y de miméticos, u otros principios biológicamente activos descriptos en la presente. Podrían emplearse en estas realizaciones de la invención diversos factores ciliostáticos bacterianos aislados y caracterizados en la bibliografía. Los factores ciliostáticos de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* son, entre otros, un derivado de la fenacina, un pio compuesto (2-alquilo-4-hidroxiquinolinas), y un ramnolípido (también denominado "hemolisina"). El pio compuesto genera cilioestasis cuando se emplean concentraciones de 50 µg/ml sin lesiones ultraestructurales obvias. El derivado de la fenacina también inhibe la motilidad ciliar pero causa algunas alteraciones membranosas, aunque en concentraciones sustancialmente muy superiores a los 400 µg/ml. La exposición limitada de los explantes traqueales al ramnolípido provocó cilioestasis, que está asociada a la alteración de las

membranas ciliares. La exposición más prolongada al ramnolípido está asociada a la eliminación de los brazos de dineína de los axonemas.

Agentes y Métodos Surfactantes

En aspectos más detallados de la presente invención, es posible agregar agentes que mejoran la penetración de la membrana a un método o una formulación de administración mucosa propuesto por la presente invención a fin de aumentar la administración por vía mucosa de las proteínas, análogos y miméticos del péptido fijador al receptor de Y2, y otros principios biológicamente activos que se describen en la presente. Los agentes que aumentan la penetración de la membrana en este contexto se pueden elegir del siguiente grupo: (i) un surfactante, (ii) una sal biliar, (ii) un aditivo fosfolipídico, una micela mezclada, un liposoma o un portador, (iii) un alcohol, (iv) una enamina, (v) un compuesto donante de NO (vi) una molécula anfipática de cadena larga (vii) un intensificador hidrófobo pequeño de penetración; (viii) sodio o un derivado del ácido salicílico; (ix) un glicerol éster de ácido acetoacético (x) un derivado de la ciclodextrina o beta-ciclodextrina (xi) un ácido graso de cadena media, (xii) un quelante, (xiii) un aminoácido o sal aminoácida, (xiv) un N-acetilaminoácido o una sal de N-acetilaminoácido, (xv) una enzima degradante de un determinado componente de la membrana, (ix) un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos, o (x) un inhibidor de la síntesis del colesterol; o (xi) cualquier combinación de los agentes que aumentan la penetración de la membrana enumerados anteriormente en (i)-(x).

Ciertos agentes surfactantes están ya incorporados en los métodos y las formulaciones de administración mucosa de la invención como agentes que aumentan la absorción por vía mucosa. Estos agentes, que podrían ser administrados conjuntamente o formulados en combinación con las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, sus análogos y miméticos, y otros principios biológicamente activos descritos en la presente podrían ser elegidos de un amplio grupo de surfactantes conocidos. Los surfactantes generalmente se dividen en tres clases: (1) éteres de polioxietileno no iónicos; (2) sales biliares, tales como el glucocolato sódico (SGC) y el deoxicolato (DOC); y (3) derivados del ácido fusídico, tales como el taurodihidrofusidato sódico (STDHF). El mecanismo de acción de estas diversas clases de surfactantes generalmente incluye la solubilización del principio biológicamente activo. En cuanto a las proteínas y los péptidos que suelen formar agregados, las propiedades tensioactivas de estos promotores de la absorción

pueden permitir interacciones con proteínas de modo tal que unidades pequeñas, como ser los monómeros revestidos de surfactante, sean mantenidos en solución con más facilidad. Otros ejemplos de surfactantes son didecanoilato de L-Alfa-fosfatidilcolina (DDPC), polisorbato 80 y polisorbato 20. Estos monómeros son, según se cree, más unidades de transporte que agregados. Un segundo mecanismo potencial es la protección del péptido o de la proteína de la degradación proteolítica que efectúan las proteasas en el medio mucoso. Según se informa, tanto las sales biliares como algunos derivados del ácido fusídico inhiben la degradación proteolítica de las proteínas que efectúan los homogeneizados nasales en concentraciones menores o equivalentes a aquéllas requeridas para aumentar la absorción de proteínas. Esta inhibición de la proteasa podría ser especialmente importante para los péptidos que tienen vida media biológica corta.

Enzimas Degradantes e Inhibidores de Ácidos Grasos y de la Síntesis del Colesterol

En aspectos relacionados con la invención, las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2 y sus análogos y miméticos, y otros principios biológicamente activos para la administración por vía mucosa se formulan o administran conjuntamente con un agente que aumenta la penetración tomado de una enzima degradante, o con un estimulador del metabolismo o inhibidor de la síntesis de ácidos grasos, esteroles u otros componentes de la barrera epitelial, Patente de EE.UU. 6.190.894. Por ejemplo, las enzimas degradantes, tales como la fosfolipasa, hialuronidasa, neuraminidasa y condroitinasa, pueden ser empleadas para aumentar la penetración por vía mucosa de las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos, y de otros principios biológicamente activos sin causar un daño irreversible a la barrera mucosa. En una realización, la condroitinasa se utiliza en un método o una composición como se describe en la presente para alterar los componentes glucoproteínicos o glucolipídicos de la barrera de permeabilidad de la mucosa, por lo que aumenta la absorción por vía mucosa de las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos, y de otros principios biológicamente activos descritos en la presente.

Con respecto a los inhibidores de la síntesis de los componentes de la barrera mucosa, se observa que los ácidos grasos libres representan un 20-25% de los lípidos epiteliales por peso. Dos enzimas que limitan la velocidad de la biosíntesis de los ácidos grasos libres son la acetil CoA carboxilasa y la sintetasa de ácidos grasos. A través de una serie de pasos, los ácidos grasos libres se metabolizan a fosfolípidos. Así, los

inhibidores de la síntesis y el metabolismo de ácidos grasos libres que pueden utilizarse en los métodos y las composiciones de la presente invención son, sin estar limitados a la siguiente enumeración, inhibidores de la acetil CoA carboxilasa, tales como el ácido 5-tetradeciloxi-2-furancarboxílico (TOFA); inhibidores de la sintetasa de ácidos grasos; inhibidores de la fosfolipasa A, tales como la gomisina A, el ácido 2-(p-amilcinamil)amino-4-clorobenzoico, el bromuro de bromofenacilo, monoalide, ácido 7,7-dimetil-5,8-eicosadienoico, nicergolina, cefarantina, nicardipina, quercetina, el dibutiril–AMP cíclico, el R-24571, la N-oleoiletanolamina, la N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il) fosfatidil serina, la ciclosporina A, los anestésicos tópicos, entre los que se cuentan la dibucaína, la prenilamina, los retinoides, tales como ácido transrretinoico y ácido 13-cis-retinoico, W-7, trifluoperazina, R-24571 (calmidazolium), 1-hexadocil-3-trifluoroetil glicero-sn-2-fosfomentol (MJ33); los bloqueantes de los canales del calcio, como la nicardipina, verapamil, diltiazem, nifedipina y nimodipina; los antipalúdicos, por ejemplo, quinacrina, mepacrina, cloroquina y hidroxicloroquina; los betabloqueantes, como propranalol y labetalol; los antagonistas de calmodulina; EGTA; timerosal; los glucocorticoesteroides, como dexametasona y prednisolona; y los AINE por ejemplo, indometacina y naproxeno.

Los esteroles libres, principalmente el colesterol, representan un 20-25% de los lípidos epiteliales por peso. La enzima que limita la velocidad de biosíntesis del colesterol es la 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) CoA reductasa. Los inhibidores de la síntesis del colesterol que pueden ser utilizados en los métodos y las composiciones de la presente invención son, sin estar limitados a la siguiente enumeración, inhibidores competitivos de la (HMG) CoA reductasa, tales como la simvastatina, la lovastatina, la fluindostatin (fluvastatina), la pravastatina, la mevastatina, así como otros inhibidores de la HMG CoA reductasa, tales como el oleato de colesterol, el sulfato y el fosfato de colesterol, y los esteroles oxigenados, tales como 25-OH- colesterol y 26-OH-colesterol; inhibidores de la escualeno-sintetasa; inhibidores de la escualeno- epoxidasa; inhibidores de la DELTA7 o DELTA24 reductasas, tales como 22,25-diazacolesterol, 20,25-diazacolesterol, AY9944 y triparanol.

Cada uno de los inhibidores de la síntesis de ácidos grasos o los inhibidores de la síntesis de esteroles puede ser administrado en conjunto o formularse en combinación con una o más proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, sus análogos y miméticos, y

otros principios biológicamente activos que se describen en la presente a fin de aumentar la penetración epitelial del/ de los principio(s) activo(s). Un margen de concentración eficaz del inhibidor del esterol en una formulación farmacológica o asociada para la administración por vía mucosa está aproximadamente entre 0,0001% y aproximadamente 20% por peso del total, con más frecuencia entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 5%.

Donantes y Métodos de Monóxido de Nitrógeno

En otros aspectos relacionados de la invención, se elige un donante de monóxido de nitrógeno (NO) como agente mejorador de la penetración por membrana a fin de mejorar la absorción mucosa de una o más proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos, y otros principios biológicamente activos que se describen en la presente. Son varios los donantes de NO conocidos que son de utilidad en concentraciones eficaces para los métodos y las formulaciones de la invención. Entre otros, los donantes de NO pueden ser, sin estar limitados a la siguiente enumeración, la nitroglicerina, el nitroprusiato, NOC5 [3-(2-hidroxi-1-(metil-etil)-2-nitrosohidrazino)-1-propanamina], NOC12 [*N*-etil-2-(1-etil-hidroxi-2-nitrosohidrazino)-etanamina], SNAP [S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina], NORI y NOR4. Dentro del marco de los métodos y las composiciones de la presente invención, se administra conjuntamente una cantidad eficaz de un donante NO o se formula en combinación con una o más proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos, y/u otros principios biológicamente activos que se describen en la presente que atraviesen o penetren el epitelio mucoso.

Agentes que Modulan la Estructura y/o Fisiología de la Unión Epitelial

La presente invención brinda una composición farmacéutica que contiene una o más proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos, y/u otros principios biológicamente activos en combinación con los agentes que mejoran la absorción mucosa que se describen en la presente y que se formularon en un preparado farmacéutico para la administración mucosa.

El agente permeabilizante provoca un aumento reversible del transporte paracelular del epitelio mucoso, generalmente modulando la estructura y/o fisiología de la unión epitelial en la superficie del epitelio mucoso del individuo. Este efecto

generalmente implica que el permeabilizante inhibe el enlace homotípico o heterotípico entre las proteínas adhesivas de la membrana epitelial de las células epiteliales vecinas. Las proteínas blanco cuyo enlace homotípico o heterotípico será bloqueado se pueden elegir de diversas moléculas de unión adhesiva relacionadas (JAM, del inglés *junctional adhesión molecule*), ocludinas o claudinas.

En otras realizaciones detalladas, la invención brinda péptidos permeabilizantes y análogos y miméticos peptídicos que mejoran el transporte paracelular en el epitelio mucoso. Los péptidos del individuo y los análogos y miméticos peptídicos generalmente actúan en las composiciones y los métodos de la invención modulando las estructuras y/o la fisiología de unión epitelial de los mamíferos. En determinadas realizaciones, los péptidos y los análogos y miméticos peptídicos inhiben eficazmente el enlace homotípico y/o heterotípico de una proteína adhesiva de la membrana epitelial seleccionada de una molécula de unión adhesiva (JAM), ocludina o claudina.

Un agente que ha sido muy estudiado es la toxina bacteriana de *Vibrio cholerae* denominada "*zona occludens toxin*" (ZOT). Esta toxina media el aumento de la permeabilidad de la mucosa intestinal y causa síntomas como la diarrea en los individuos infectados. Fasano *et al, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 8*:5242-5246 (1991). Cuando se probó en la mucosa ileal de un conejo, la ZOT aumentó la permeabilidad intestinal modulando la estructura de uniones intercelulares estrechas. Más recientemente, se ha descubierto que la ZOT es capaz de efectuar una apertura reversible de las uniones estrechas de la mucosa intestinal. También se ha informado que la ZOT es capaz de efectuar una apertura reversible de las uniones estrechas de la mucosa nasal. Pat de EE.UU. No. 5.908.825.

En el marco de los métodos y las composiciones de la presente invención, la ZOT, así como diversos análogos y miméticos de la ZOT que actúan como agonistas o antagonistas de la actividad de la ZOT, es de utilidad para aumentar la absorción intranasal de los principios biológicamente activos aumentando la absorción paracelular dentro de la mucosa nasal y a través de ella. En este contexto, es característico que la ZOT actúe causando una reorganización estructural de las uniones estrechas que tiene como característica la alteración de la ubicación de la proteína de unión ZO1. En estos aspectos de la invención, la ZOT se administra en conjunto o se formula en combinación

con los principios biológicamente activos en una cantidad eficaz que genere una absorción significativamente mejor del principio activo, causando un aumento reversible de la permeabilidad de la mucosa nasal sin provocar efectos adversos sustanciales.

Métodos y Agentes Vasodilatadores

Otra clase de agentes promotores de la absorción que es beneficioso para la administración conjunta y la formulación combinada de los métodos y las composiciones de la presente invención son los compuestos vasoactivos, más específicamente los vasodilatadores. Estos compuestos actúan en el marco de la presente invención modulando la estructura y la fisiología de la vasculatura submucosa, y aumentan la velocidad de transporte del péptido fijador al receptor de Y2, y de sus análogos y miméticos, y de otros principios biológicamente activos dentro o a través del epitelio mucoso y/o de los compartimientos o tejidos objetivo (por ejemplo, la circulación general o el sistema nervioso central) y a través de ellos.

Es característico que los vasodilatadores que pueden emplearse con la presente invención relajen vasos sanguíneos de la submucosa sea disminuyendo el calcio citoplásmico, aumentando el monóxido de nitrógeno (NO) o inhibiendo la quinasa de miosina de cadena ligera. En general, se dividen en 9 clases: antagonistas del calcio, abridores de los canales del potasio, inhibidores de la ACE, antagonistas de los receptores de angiotensina –II, antagonistas de los receptores α-adrenérgicos e imidazol, agonistas β1-adrenérgicos, inhibidores de la fosfodiesterasa, eicosanoides y donantes NO.

A pesar de las diferencias químicas, las propiedades farmacocinéticas de los antagonistas del calcio son similares. Tienen una alta absorción dentro de la circulación general y, por ende, son metabolizados casi en su totalidad en el primer pasaje por el hígado, por lo que la farmacocinética depende de cada individuo. A excepción de los fármacos nuevos del tipo dihidropiridina (amlodipina, felodipina, isradipina, nilvadipina, nisoldipina y nitrendipina), los antagonistas del calcio tienen vida media corta. Por lo tanto, a fin de mantener una concentración eficaz de muchos de estos fármacos, podría ser necesario administrar varias dosis o emplear formulaciones de liberación controlada, como se describe en otro párrafo de la presente. El tratamiento con minoxidil, que abre los canales del potasio, también podría estar limitado en el modo y en el nivel de administración debido a que puede tener efectos adversos.

Los inhibidores de la ACE impiden que la angiotensina I se convierta en angiotensina II y son más eficaces cuando aumenta la producción de renina. Puesto que la ACE es idéntica a la quininasa-II, que deja inactiva la bradiquinina, potente vasodilatadora endógena, la inhibición de la ACE reduce la degradación de la bradiquinina. Los inhibidores de la ACE tienen la ventaja adicional de que son cardioprotectores y cardiorreparadores, ya que previenen y revierten la fibrosis cardíaca y la hipertrofia ventricular en los modelos de animales. La vía de eliminación renal es la predominante de la mayoría de los inhibidores de la ACE. Por lo tanto, la insuficiencia renal está asociada a una menor eliminación, por lo que se recomienda reducir la dosis de 25% a 50% para los pacientes que padecen insuficiencia renal moderada a grave.

Con respecto a los donantes NO, estos compuestos son particularmente útiles en el marco de la presente invención debido a que tienen otros efectos sobre la permeabilidad de las mucosa. Además de los donantes NO indicados anteriormente, los complejos de NO y nucleófilos, denominados "NO/nucleófilos" o "NONOatos", liberan el NO de manera espontánea y no enzimática cuando se disuelven en una solución acuosa de pH fisiológico. Por el contrario, los nitro-vasodilatadores, tales como la nitroglicerina, requieren una actividad enzimática específica para liberar NO. Los NONOatos liberan NO con una estequiometría definida y a una velocidad previsible que va desde <3 minutos en el caso de la dietilamina/NO a aproximadamente 20 horas en la dietilentriamina/NO (DETANO).

En ciertos métodos y composiciones de la presente invención, un vasodilatador determinado se administra conjuntamente (por ejemplo, por vía general o intranasal, simultáneamente o en una combinación temporal eficaz) o se formula en combinación con uno o más péptidos fijadores al receptor de Y2, o con sus análogos y miméticos, y otro/s principio/s biológicamente activo/s en una cantidad que aumente la absorción mucosa del/de los principios/s activo/s a fin de que llegue a un determinado compartimiento o tejido en el individuo (por ejemplo, el hígado, la vena porta hepática, tejido o fluido del SNC, o plasma sanguíneo).

Métodos y Agentes que Mejoran el Transporte Selectivo

Las composiciones y los métodos de administración de la invención pueden incorporar un agente que mejore el transporte selectivo, que facilita el transporte de uno o más principios biológicamente activos. Estos agentes que mejoran el transporte pueden ser empleados en una formulación combinatoria o de un protocolo de administración conjunta con una o más de las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos que se describen en la presente, con el fin de aumentar conjuntamente la absorción de uno o más principio/s biológicamente activo/s a través de las barreras de transporte mucoso, a fin de mejorar la absorción del principio activo para que llegue a un determinado tejido o compartimiento en el individuo (por ejemplo, el epitelio mucoso, el hígado, los tejidos o fluidos del SNC, o el plasma sanguíneo). Otra posibilidad sería emplear estos agentes en una formulación combinatoria o en un protocolo de administración conjunta para aumentar directamente la absorción mucosa de una o más de las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos, sea acompañada o no de una mejora de la absorción de otro principio biológicamente activo.

Entre los agentes que aumentan el transporte selectivo que pueden utilizarse en este aspecto de la invención se cuentan, sin estar limitados a la siguiente enumeración, los glucósidos, las moléculas que contienen azúcar y los agentes ligantes, tales como los agentes ligantes de lectina, conocidos por interactuar específicamente con los componentes de la barrera de transporte epitelial. Por ejemplo, los ligandos "bioadherentes" específicos, como ser diversas lectinas de bacterias y plantas, que se fijan a las fracciones de azúcar de la superficie celular por medio de interacciones mediadas por receptores, se pueden utilizar como portadores o mediadores conjugados de transporte para mejorar la absorción mucosa, por ejemplo, la nasal, de los principios biológicamente activos en el marco de la presente invención. Ciertos ligandos bioadherentes que pueden utilizarse en la presente invención median la transmisión de señales biológicas a las células epiteliales blanco que provocan la absorción selectiva del ligando adherente mediante procedimientos de transporte celular especializados (endocitosis o transcitosis). Por lo tanto, estos mediadores del transporte se pueden utilizar como un "sistema de transporte" para estimular o dirigir la absorción selectiva de una o más proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos, y de otro/s principio/s biológicamente activos dentro de los epitelios mucosos y/o a través de ellos. Estos y otros agentes que mejoran significativamente el transporte selectivo aumentan la absorción

mucosa de los biofármacos macromoleculares (en especial, de péptidos, proteínas y vectores oligonucleótidos y polinucleótidos) dentro del marco de la presente invención. Las lectinas son proteínas provenientes de plantas que se fijan a azúcares específicos que se encuentran en la superficie de las glucoproteínas y glucolípidos de las células eucariotas. Las soluciones concentradas de lectinas tienen un efecto 'mucotractor', y diversos estudios han demostrado que las lectinas y los conjugados de lectinas (por ejemplo, la concanavalina A conjugada con partículas de oro coloidal) sufren una rápida endocitosis mediada por receptores (EMR) a través de las superficies mucosas. Otros estudios informan que se pueden utilizar los mecanismos de absorción de las lectinas para dirigir *in vivo* drogas hacia el intestino. En algunos de estos estudios, se acoplaron en forma covalente las nanopartículas de poliestireno (500 nm) a la lectina del tomate, prueba que demostró una mejor absorción sistémica tras la administración oral en ratas.

Además de las lectinas provenientes de las plantas, la adhesión microbiana y los factores invasivos brindan una importante fuente de candidatos que pueden utilizarse como transportadores adherentes o selectivos en los métodos y las composiciones de administración mucosa de la presente invención. Se necesitan dos componentes para los procesos de adherencia bacteriana: una "adhesina" bacteriana (factor de adherencia o colonización) y un receptor sobre la superficie de la célula huésped. Es preciso que las bacterias que causan infecciones mucosas penetren la capa de mucosidad antes de acoplarse a la superficie epitelial. Este acoplamiento suele estar mediado por las estructuras de las fimbrias o pilus bacterianas, aunque otros componentes superficiales de las células también podrían participar del proceso. Las bacterias adherentes colonizan los epitelios mucosos multiplicándose e iniciando una serie de reacciones bioquímicas dentro de la célula blanco a través de los mecanismos de transducción de señales (con o sin la ayuda de toxinas). Se sabe que está asociada a estos mecanismos invasivos una amplia variedad de proteínas bioadhesivas (por ejemplo, la invasina y la internalina) producidas naturalmente por diversas bacterias y virus. Estas proteínas bioadhesivas propician el acoplamiento extracelular de los microorganismos que son extraordinariamente selectivos de las especies huésped y los tejidos particulares que afectan. Las señales transmitidas por dichas interacciones entre receptores y ligandos inician el transporte de microorganismos vivos e intactos hacia las células epiteliales y a través de ellas por medio de los procesos de endocitosis y transcitosis. Dichos fenómenos que ocurren de manera natural pueden ser aprovechados (por ejemplo, complejizando los principios

biológicamente activos, como el péptido fijador al receptor de Y2, con una adhesina) de acuerdo con los conceptos vertidos en la presente, a fin de mejorar la distribución de los compuestos biológicamente activos en los epitelios mucosos o a través de ellos y/o hacia otros sitios objetivo donde debe actuar la droga.

Diversas toxinas provenientes de plantas y bacterias que aglutinan las superficies epiteliales de una forma específica, similar a como lo hace la lectina, también son de utilidad para los métodos y las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, la toxina diftérica (DT) introduce células huésped rápidamente mediante endocitosis mediada por receptores (EMR). Asimismo, la subunidad B de la toxina termolábil *E.coli* se fija al borde en cepillo de las células epiteliales del intestino de una forma muy específica, similar a la de la lectina. La absorción de esta toxina y la transcitosis al lado basolateral de los enterocitos se ha probado tanto *in vivo* como *in vitro*. Otras investigaciones expresan que el dominio transmembranoso de la toxina diftérica en el *E. coli* es una proteína de fusión fijante de la maltosa que fue acoplada químicamente a la poli-L-lisina de alto peso molecular. El complejo resultante se utilizó con éxito para mediar la internalización de un gen indicador *in vitro*. Además de estos ejemplos, el *Staphylococcus aureus* produce un grupo de proteínas (por ejemplo, la enterotoxina estafilocócica A (SEA), la SEB y la toxina 1 del síndrome de *shock* tóxico (TSST- I) que actúan como superantígenos y toxinas. Se han efectuado estudios sobre estas proteínas, que han informado el hallazgo de transcitosis de la enterotoxina estafilocócica B y la TSST- I dependiente de la dosis en las células Caco-2.

Las hemoglutininas virales constituyen otro tipo de agentes transportadores que facilitan la absorción mucosa de los principios biológicamente activos en el marco de los métodos y las composiciones de la invención. El primer paso de muchas infecciones virales es la fijación de las proteínas superficiales (hemoglutininas) a las células mucosas. Se han identificado estas proteínas ligantes en la mayoría de los virus, entre ellos, los rotavirus, el virus del herpes varicela-zoster, el virus del bosque Semliki, los adenovirus, el virus del enrollamiento de la hoja de papa y los reovirus. Estos y otros ejemplos de hemoglutininas virales se pueden emplear en una formulación combinatoria (por ejemplo, formulaciones mezcladas o conjugadas) o en un protocolo de administración conjunta con uno o más péptidos fijadores al receptor de Y2, y sus análogos y miméticos que se describen en la presente, a fin de mejorar la absorción mucosa de uno o más principios

biológicamente activos. Otra posibilidad sería emplear las hemoglutininas virales en una formulación combinatoria o en un protocolo de administración conjunta para aumentar directamente la absorción mucosa de una o más de las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos, sea acompañada o no de una mejora de la absorción de otro principio biológicamente activo.

También puede ser utilizada en el marco de la invención una diversidad de factores endógenos selectivos que median en el transporte. Las células de los mamíferos han desarrollado una variedad de mecanismos para facilitar la internalización de sustratos específicos y dirigirlos a compartimientos determinados. En conjunto, estos procesos de deformación de membranas se denominan "endocitosis" y contemplan a la fagocitosis, la pinocitosis, la endocitosis mediada por receptores (EMR mediada por clatrina) y la potocitosis (EMR no mediada por clatrina). La EMR es un proceso biológico celular muy específico por el cual, como lo indica su nombre, diversos ligandos se fijan a los receptores de la superficie celular y luego se internalizan y transitan dentro de la célula. En muchas células, el proceso de endocitosis es tan activo que se internaliza la totalidad de la superficie de la membrana, que es reemplazada en menos de media hora. Se proponen dos clases de receptores tomando como base su orientación en la membrana celular: el amino terminal de los receptores de tipo I se localiza sobre el lado extracelular de la membrana, mientras que los receptores de tipo II tienen esta misma cola proteínica en el medio intracelular.

Otras realizaciones de la invención utilizan transferrina como portador o estimulante de la EMR de los principios biológicamente activos administrados por vía mucosa. La transferrina, glucoproteína transportadora de hierro de 80 kDa, es tomada eficazmente por las células mediante la EMR. Los receptores de transferrina se encuentran sobre la superficie de la mayoría de las células proliferantes, en gran cantidad en los eritroblastos y en varios tipos de tumores. Según lo consignan algunos estudios, la transcitosis de transferrina (Tf) y los conjugados de transferrina aumentan en presencia de Brefeldina A (BFA), que es un metabolito micótico. Otros estudios informan que el tratamiento con Brefeldina A aumenta rápidamente la endocitosis apical tanto de la ricina como de HRP en las células MDCK. Por lo tanto, es posible emplear la BFA y otros fármacos que estimulan el transporte mediado por receptores dentro del marco de los métodos de la invención como agentes en formulaciones combinatorias (por ejemplo,

conjugados) y/o en la administración conjunta a fin de mejorar el transporte mediado por receptores de los principios biológicamente activos, entre ellos, de las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2 y de sus análogos y miméticos.

Métodos y Excipientes para la Administración de Polímeros

En ciertos aspectos de la invención, las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, sus análogos y miméticos, otros principios biológicamente activos descritos en la presente y los agentes que mejoran la administración ya descritos, son incorporados, por separado o en combinación, a una formulación administrada por vía mucosa (por ejemplo, por vía nasal) que contiene un polímero biocompatible que actúa como portador o base. Dichos portadores poliméricos pueden ser micropartículas, matrices y polvos poliméricos, entre otros polímeros. El polímero puede ser de origen vegetal, animal o sintético. A menudo el polímero está entrecruzado. Además, en estos sistemas de administración, el péptido fijador al receptor de Y2, o su análogo o mimético, se puede funcionalizar de manera tal que establezca un enlace covalente con el polímero y se haga inseparable de éste a través de un simple lavado. En otras realizaciones, el polímero se modifica químicamente con un inhibidor enzimático u otros agentes que puedan degradar o desactivar el/los principio(s) biológicamente activo(s) y/o el/los agente(s) que mejoran la administración. En ciertas formulaciones, el polímero es parcial o completamente insoluble pero hinchable en agua, por ejemplo, un hidrogel. En este aspecto de la invención, los polímeros útiles son preferentemente interactivos con el agua y/o de naturaleza hidrófila para absorber cantidades de agua significativas, y a menudo forman hidrogeles al ponerse en contacto con el agua o con un medio acuoso, durante un período de tiempo lo suficientemente prolongado para equilibrarse con el medio líquido. En realizaciones más detalladas, el polímero es un hidrogel que, al ponerse en contacto con un exceso de agua, absorbe al menos dos veces su peso en dicho líquido cuando se encuentra en el punto de equilibrio y se expone a temperatura ambiente. Patente de EE.UU. N° 6.004.583.

En muchas aplicaciones biomédicas, se prefieren los sistemas de administración de drogas basadas en polímeros biodegradables, debido a que dichos sistemas se descomponen por hidrólisis o por reacción enzimática dentro de moléculas atóxicas. El índice de degradación se controla manipulando la composición de la matriz polimérica biodegradable. Por lo tanto, estos tipos de sistemas pueden utilizarse en determinados

entornos para efectuar una liberación prolongada de los principios biológicamente activos. Se ha prestado considerable atención a los polímeros biodegradables tales como el ácido poliglicólico (APG), el ácido poliláctico (APL) y el ácido D,L-láctico-co-glicólico (APLG) como posibles portadores para la administración de drogas, dado que se ha descubierto que los productos degradantes de estos polímeros son de baja toxicidad. Durante la función metabólica normal del cuerpo, estos polímeros se degradan a dióxido de carbono y agua. Estos polímeros también han demostrado tener una excelente biocompatibilidad.

A fin de prolongar la actividad biológica del péptido fijador al receptor de Y2, y de sus análogos y miméticos, y de otros principios biológicamente activos descritos en la presente, así como de otros agentes que mejoran la administración, es posible incorporar estos agentes a matrices poliméricas, por ejemplo, poliortoésteres, polianhídridos o poliésteres. Esto produce una actividad y liberación continuas del/de los principios(s) activo(s), por ejemplo, tal como lo determine la degradación de la matriz polimérica. Aunque el encapsulado de moléculas bioterapéuticas dentro de los polímeros sintéticos puede estabilizarlos durante el almacenamiento y la administración, el mayor obstáculo que presenta la tecnología de liberación basada en polímeros es que las moléculas terapéuticas pierden actividad durante los procesos de formulación, que a menudo implican calor, sonicación o exposición a solventes orgánicos.

Los polímeros que estimulan la absorción, cuyo uso se ha contemplado en esta invención, pueden contener derivados y versiones química o físicamente modificadas de los tipos de polímeros ya mencionados, además de otros polímeros naturales o sintéticos, gomas, resinas y otros agentes, así como combinaciones de esos materiales –entre sí o con otros polímeros– siempre que las alteraciones, modificaciones o combinaciones no tengan un efecto adverso sobre las propiedades buscadas, tales como absorción de agua, formación de hidrogeles y/o estabilidad química para una aplicación útil. En aspectos más detallados de la invención, los polímeros como el nylon, el acrilano y otros polímeros normalmente sintéticos e hidrófobos pueden estar suficientemente modificados por reacción para volverse hinchables y/o formar geles estables en un medio acuoso.

Los polímeros que estimulan la absorción en esta invención pueden ser del grupo de los homo y copolímeros, basados en varias combinaciones de los siguientes

monómeros vinílicos: ácidos acrílicos y metacrílicos, acrilamida, metacrilamida, hidroxietilacrilato o metacrilato, vinilopirrolidonas, así como alcohol polivinílico y sus copolímeros y terpolímeros, acetato polivinílico, sus copolímeros y terpolímeros con los monómeros anteriormente mencionados y ácido 2-acrilamida-2-metilpropansulfónico (AMPS®). Son muy útiles los copolímeros de los monómeros anteriormente mencionados combinados con monómeros funcionales copolimerizables tales como el acrilato metacrilamídico o acrilamídico, o los ésteres metacrilatos, en los que los grupos ésteres derivan de cadenas alquílicas o arílicas lineales o ramificadas, y en el que el aril tiene hasta cuatro anillos aromáticos que pueden contener sustitutos del alquil de 1 a 6 carbonos; monómeros esteroideos, sulfatos, fosfatos o catiónicos tales como el N,N-dimetilaminoalquil (met)acrilamida, el dimetilaminoalquil (met)acrilato, el cloruro de (met)acriloaxialquiltrimetilamonio y el cloruro de (met)acriloxialquildimetilbencil amonio.

Otros polímeros que estimulan la absorción que pueden ser utilizados en esta invención son los clasificados como dextranos, dextrinas y los pertenecientes a la clase de materiales clasificados como gomas y resinas naturales, o a la clase de polímeros naturales tales como el colágeno, la quitina, el quitosan, pullalan, zooglan, los alginatos y alginatos modificados como el "Kelocoloid" (alginato modificado con propilenglicol), las gomas gellan como "Kelocogel", las gomas Xanatán como "Keltrol", estatina, butirato alfahidroxi y sus copolímeros, ácido hialurónico y sus derivados, los ácidos poliláctico y glicólico.

Una clase muy útil de polímeros aplicables a la presente invención son los ácidos carboxílicos insaturados olefínicamente que contienen al menos un doble enlace olefínico activado de carbono-carbono, y al menos un grupo carboxílico; es decir, un ácido o grupo funcional que se convierta rápidamente en un ácido que contenga un doble enlace olefínico que actúe rápidamente en la polimerización, debido a su presencia en la molécula monomérica, ya sea en la posición alfa-beta con respecto al grupo carboxílico, o como parte de una agrupación terminal de metileno. Los ácidos olefínicamente insaturados de esta clase pueden ser los ácidos acrílicos tipificados por el mismo ácido acrílico, el ácido acrílico alfa-ciano, el ácido beta metacrílico (ácido crotónico), el ácido acrílico alfa-fenil, el ácido beta-acriloxipropiónico, el ácido cinámico, el ácido p-clorocinámico, el ácido 1-carboxi-4-fenil butadieno-1,3 itacónico, el ácido citracónico, el

ácido mesacónico, el ácido glutacónico, el ácido aconítico, el ácido maleico, el ácido fumárico y el tricarboxietileno. En la presente, el término "ácido carboxílico" comprende a los ácidos policarboxílicos y a los anhídridos ácidos, tales como el anhídrido maleico, en el que se forma el grupo anhídrido a través de la eliminación de una molécula de agua proveniente de dos grupos carboxílicos localizados en la misma molécula de ácido carboxílico.

Los acrilatos representativos que son de utilidad como promotores de la absorción dentro del marco de la presente invención son, entre otros, metil acrilato, etil acrilato, propil acrilato, isopropil acrilato, butil acrilato, isobutil acrilato, metil metacrilato, metil etacrilato, etil metacrilato, octil acrilato, heptil acrilato, octil metacrilato, isopropil metacrilato, 2-etilexil metacrilato, nonil acrilato, hexil acrilato, n-hexil metacrilato y otros similares. Los ésteres alquilo acrílicos superiores son: decil acrilato, isodecil metacrilato, lauril acrilato, estearil acrilato, behenil acrilato y versiones del acrilato y del metacrilato de melisilo. Se pueden polimerizar con éxito mezclas de dos, tres o más cadenas largas de ésteres acrílicos con uno de los monómeros carboxílicos. Otros comonómeros son las olefinas, entre ellos, las olefinas alfa, los éteres vinílicos, los ésteres vinílicos y otras mezclas.

Otros monómeros vinilidenos, entre los que se incluyen los nitriles acrílicos, también pueden ser utilizados como promotores de la absorción en los métodos y composiciones de la presente invención, a fin de mejorar la administración y la absorción de una o más proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos, y de otro(s) principio(s) biológicamente activo(s), incluso para mejorar la administración del/de los principio(s) activo(s) hacia un tejido o compartimiento determinado en un individuo (por ejemplo, el hígado, la vena porta hepática, tejido o fluido del SNC o plasma sanguíneo). Los nitriles insaturados olefínicamente alfa y beta son, de preferencia, los insaturados mono-olefínicamente que tienen de 3 a 10 átomos de carbono, tales como el acrilonitrilo, el metacrilonitrilo y otros similares. Los más preferidos son el acrilonitrilo y el metacrilonitrilo. También pueden utilizarse las amidas acrílicas que contienen de 3 a 35 átomos de carbono, de las que pueden emplearse las amidas insaturadas monoolefínicamente. Entre las amidas representativas se cuentan la acrilamida, la metacrilamida, la N-t-butil acrilamida, las N-ciclohexil acrilamida, las amidas alquílicas superiores, en las que el grupo alquil del nitrógeno contiene de 8 a 32

átomos de carbono, las amidas acrílicas, por ejemplo, las N-alkilol amidas de los ácidos carbolíxicos insaturados alfa y beta-olefínicamente, entre ellas, las que tienen de 4 a 10 átomos de carbono, tales como la N-metilol acrilamida, la N-propanol acrilamida, la N-metilol metacrilamida, la N-metilol maleimida, los ésteres ácidos N-metilol maleámico. la N-metilol-p-vinil benzamida y otros similares.

Otros promotores de la absorción son las olefinas alfas que contienen de 2 a 18 átomos de carbono, preferentemente de 2 a 8 átomos de carbono; los dienos que contienen de 4 a 10 átomos de carbono; los ésteres vinílicos y ésteres alilos como el acetato vinílico; los aromáticos vinílicos como el estireno, el metilestireno y el cloroestireno; las cetonas y los éteres vinílicos y alílicos tales como el éter metilvinílico y la metilcetona vinílica; los cloroacrilatos; los acrilatos cianoalquílicos tales como los acrilatos alfa-cianometílicos y los acrilatos cianopropílicos alfa, beta y gama; los alcoxiacrilatos tales como el metoxietil acrilato; los haloacrilatos como el acrilato cloroetílico; los haluros vinílicos y el cloruro vinílico, el cloruro vinilideno y otros similares; los divinilos, diacrilatos y otros monómeros polifuncionales como el éter divinílico, el dietilenglicol diacrilato, el etilenglicol diametacrilato, la metilen-bis-acrilamida, el alilpentaeritritol y otros similares; y los alquenil-bis-beta-haloalquil fosfonatos como los bis-beta-cloroetil-vinil fosfonatos y otros similares, que son conocidos por los especialistas. Los copolímeros con monómeros que contienen carboxi son un elemento constitutivo menor, y los otros monómeros vinilidenos presentes como componentes mayoritarios se preparan con facilidad de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

Cuando los hidrogeles se utilizan como agentes promotores de la absorción en la presente invención, pueden estar compuestos de copolímeros sintéticos del grupo de ácidos acrílicos y metacrílicos, acrilamidas, metacrilamidas, hidroxietilacrilatos (HEA) o metacrilatos (HEMA), y vinilpirrolidonas que interactúan y se dilatan con el agua. Los siguientes tipos de polímeros son ejemplos ilustrativos de polímeros útiles, en especial para la administración de péptidos o proteínas: metacrilamida y 0,1 a 99 %pp ácido metacrílico; (met)acrilamidas y 0,1-75 %pp cloruro de metacriloxietil trimetilamonio; (met)acrilamidas y 0,1-75 %pp (met)acrilamida; ácido acrílico y 0,1-75 % pp alquil (met)acrilatos; (met)acrilamida y 0,1-75 %pp AMPS.RTM (marca registrada de Lubrizol Corp.); (met)acrilamida y 0 a 30 %pp alquil (met)acrilamidas y 0,1-75 %pp AMPS.RTM; (met)acrilamida y 0,1-99 %pp HEMA; (met)acrilamida y 0,1 a 75 %pp HEMA y 0,1 a 99

%pp ácido (met)acrílico; ácido (met)acrílico y 0,1-99 %pp HEMA; 50 moles % de éter vinílico y 50 moles % de anhídrido maleico; (met)acrilamida y 0,1 a 75 %pp cloruro de bencilamonio metacriloxialquil dimetilo; (met)acrilamida y 0,1 a 99 %pp vinil pirrolidona; (met)acrilamida y 50% p/p vinil pirrolidona y 0,1-99,9% p/p ácido (met)acrílico ; ácido (met)acrílico y 0,1 a 75 %pp de AMPS.RTM y 0,1-75 %pp de alquil (met)acrilamida. En los ejemplos que anteceden, el alquil representa C_1 a C_{30}, preferentemente C_1 a C_{22}, lineal y ramificado y C_4 a C_{16} cíclico; el compuesto (meta) significa que se incluyen los monómeros con y sin el grupo metílico. Otros polímeros hidrogélicos muy útiles se dilatan, pero son versiones insolubles del almidón polivinilpirrolidona, de la carboximetilcelulosa y del alcohol polivinílico.

Otros hidrogeles poliméricos útiles en el marco de esta invención son los (poli)hidroxialquil (met)acrilatos; los hidrogeles aniónicos y catiónicos; los complejos poli(electrolíticos); los alcoholes polivinílicos que tienen bajo residuo de acetato; una mezcla hinchable de agar entrecruzado y carboximetilcelulosa entrecruzada; una composición hinchable compuesta de metilcelulosa mezclada con agar moderadamente entrecruzado; un copolímero hinchable producido por la dispersión de un copolímero de anhídrido maleico finamente dividido con estireno, etileno, propileno o isobutileno; un polímero hinchable de N-vinil lactamos; sales de sodio hinchables de carboximetilcelulosa, y otros similares.

Otros polímeros capaces de convertirse en gel y de retener y asimilar líquidos gelables que son útiles para formar hidrogel hidrófilo para la administración mucosa de principios biológicamente activos en el marco de la presente invención son la pectina; los polisacáridos como el agar, la acacia, la karaya, el tragacanto, las alginas y el guar y sus versiones entrecruzadas; los polímeros, copolímeros y derivados de la sal de ácido acrílico; las poliacrilamidas; los polímeros de anhídrido maleico e indene hinchables en agua; los copolímeros de injerto en almidón; los polímeros y copolímeros de tipo acrilato con capacidad de absorción de agua de 2 a 400 veces su peso original; los diésteres de poliglucano; una mezcla de alcohol polivinílico y poli N-vinil-2-pirrolidona entrecruzados; los geles de bloques de copolímeros de polioxibutileno-polietileno; la goma de algarrobo; los geles de poliésteres; geles de poliurea; geles de poliéteres; geles de poliamidas; geles de poliimida; geles polipéptidos; geles de ácido poliamínico; geles

policelulósicos; polímeros acrilatos de anhídrido indeno-maleicos entrecruzados; y los polisacáridos.

Los polímeros hidrogélicos sintéticos que pueden utilizarse en el marco de la invención pueden obtenerse a través de infinitas combinaciones de varios monómeros en diversas proporciones. El hidrogel puede estar entrecruzado y generalmente tiene la capacidad de asimilar y absorber líquidos, y dilatarse o expandirse hacia un estado de equilibrio más amplio. Es característico que el hidrogel se dilate o expanda durante su administración en la superficie mucosa nasal porque absorbe alrededor de 2-5, 5-10, 10-50 y hasta 50-100 o más veces su peso en agua. El grado óptimo de dilatabilidad de un determinado hidrogel de distintos principios biológicamente activos está determinado por factores tales como el peso, el tamaño y la solubilidad molecular, y las características de difusión del principio activo transportado, o atrapado o encapsulado dentro de éste, y del espaciado específico y del movimiento cooperativo en cadena asociado a cada polímero.

Los polímeros hidrófilos que pueden emplearse en la presente invención son los no hidrosolubles pero hinchables en agua. Es común referirse a estos polímeros hinchables en agua como hidrogeles o geles. Puede ser conveniente fabricar dichos geles a partir de polímeros hidrosolubles, entrecruzando los polímeros con un agente adecuado. Sin embargo, los hidrogeles estables también pueden formarse a partir de polímeros específicos en condiciones definidas de pH, temperatura y/o concentración iónica, de acuerdo con métodos ya conocidos. Es característico que los polímeros estén entrecruzados, es decir, entrecruzados a tal punto que los polímeros presenten buenas propiedades hidrófilas, hayan mejorado su integridad física (comparados con polímeros no entrecruzados del mismo tipo o similar) y exhibido una mejor capacidad para retener, dentro de la red del gel, tanto al principio biológicamente activo de interés como a los compuestos adicionales para la coadministración, tales como una citosina o inhibidor enzimático, al tiempo que mantienen la capacidad de liberar al/a los principio(s) activo(s) en el lugar y momento apropiados.

En general, los polímeros de hidrogel que pueden utilizarse en la invención se entrecruzan en forma entrecruzada disfuncional en una proporción de 0,01 a 25 % de peso, basado en el peso de los monómeros que forman el copolímero, y, preferentemente,

de 0,1 a 20 % de su peso, y más a menudo de 0,1 a 15 % del peso del entrecruzador. Otra proporción útil de un agente entrecruzador es de 0,1 a 10 % de peso. También pueden utilizarse entrecruzadores multifuncionales tri, tetra o superiores. Cuando se utilizan estos reactivos, pueden necesitarse cantidades menores para obtener una densidad de entrecruzamiento equivalente, es decir, el grado de entrecruzamiento, o las propiedades de la red que son suficientes para contener de manera eficaz al/a los principio(s) biológicamente activo(s).

Los entrecruzamientos pueden tener un enlace covalente, iónico o hidrógeno con el polímero que tiene la capacidad de dilatarse en presencia de líquidos que contienen agua. Los entendidos en la materia conocen estos entrecruzamientos y las reacciones de entrecruzamiento, que, en muchos casos, dependen del sistema polimérico. Por lo tanto, una cadena entrecruzada puede formarse mediante copolimerización de radicales libres de monómeros insaturados. Los hidrogeles poliméricos también pueden formarse entrecruzando polímeros preformados mediante reacciones de grupos funcionales encontrados en los polímeros, tales como alcoholes, ácidos y aminas con grupos como glioxal, formaldehído o glutaraldehído, bis anhídridos y otros similares.

Los polímeros también pueden entrecruzarse con cualquier polieno, por ejemplo, el decadieno o trivinil ciclohexano; las acrilamidas tales como la N,N-metilen-bis (acrilamida); los acrilatos polifuncionales tales como el trimetilol propano triacrilato; o los monómeros vinilidenos polifuncionales que contengan al menos dos grupos terminales CH_2 <, por ejemplo, el benceno divinílico, el naftaleno divinílico, los alilacrilatos y otros similares. En ciertas realizaciones, los monómeros entrecruzadores utilizados para preparar los copolímeros son poliéteres polialquenílicos que tienen más de un agrupamiento alquenil éter por molécula, que opcionalmente pueden contener grupos de alquenil en los cuales puede estar presente un doble enlace olefínico adherido a un agrupamiento terminal de metileno (por ejemplo, por eterificación de un alcohol polihídrico que contenga al menos 2 átomos de carbono y al menos 2 grupos hidroxílicos). Es posible producir los compuestos de esta clase mediante reacción de un haluro de alquenilo, como el cloruro de alilo o el bromuro de alilo, con una solución acuosa muy alcalina de uno o más alcoholes polihídricos. El producto puede ser una mezcla compleja de poliéteres que contenga distintas cantidades de grupos de éter. La eficacia del entrecruzador de poliéter aumenta conforme crece la cantidad de grupos

potencialmente polimerizables en la molécula. Es característico utilizar poliéteres que contengan un promedio de dos o más agrupamientos de alquenil éter por molécula. Otros monómeros entrecruzadores son, por ejemplo, los dialil ésteres, los dimetalil éteres, los alil o metalil acrilatos y acrilamidas, el tetravinil silano, los polialquenil metanos, los diacrilatos y dimetacrilatos, los compuestos divinílcos como el benceno divinílco, el polialil fosfato, los compuestos dialiloxi y fosfito ésteres y otros similares. Son agentes típicos el alil pentaeritritol, la alil sacarosa, el trimetilolpropano triacrilato, el 1,6-hexanediol diacrilato, el éter dialil trimetilolpropano, el pentaeritritol triacrilato, el tetrametileno dimetacrilato, el etilendiacrilato, el etilendimetacrilato, el trietilenglicol dimetracrilato, y otros similares. El alil pentaeritritol, el éter dialil trimetilolpropano y la alil sacarosa proporcionan polímeros adecuados. Cuando está presente el entrecruzador, las mezclas poliméricas generalmente contienen alrededor de 0,01 a 20 % de peso, por ejemplo, 1%, 5% o 10% o más por peso de monómero entrecruzador basado en el total del monómero de ácido carbolíxico, más otros monómeros.

En aspectos más detallados de la presente invención, la administración mucosa del péptido fijado al receptor de Y2, y sus análogos y miméticos, y de otros principios biológicamente activos que se describen en la presente, se ve mejorada porque el portador de liberación lenta o protector enzimático o fisiológico retiene el/los principio(s) activo(s), como en el caso de un hidrogel que resguarda al principio activo de la acción de enzimas degradantes. En ciertas realizaciones, el principio activo está fijado químicamente al excipiente, al cual también pueden agregarse o fijarse otros agentes, tales como inhibidores enzimáticos, citosinas, etc. Otra posibilidad sería inmovilizar el principio activo, atrapándolo en un medio físico adecuado dentro del excipiente, por ejemplo, dentro de una matriz polimérica.

Los polímeros tales como los hidrogeles que son de utilidad en esta invención pueden incorporar agentes fijados de manera funcional, tales como los glicósidos incorporados químicamente al polímero a fin de mejorar la biodisponibilidad intranasal de los principios activos. Algunos ejemplos de dichos glicósidos son los glucósidos, fructósidos, galactósidos, arabinósidos, manósidos y sus derivados sustituidos de alquil, y los glicósidos naturales como la arbutina, la florizina, la amigdalina, la digitonina, la saponina y el indican. Existen varias maneras por medio de las cuales un glicósido típico puede fijarse a un polímero. Por ejemplo, el hidrógeno de los grupos hidroxil de un

glicósido o de otro carbohidrato similar puede ser reemplazado por el grupo alquil de un polímero hidrogélico para formar un éter. También se puede provocar una reacción química de los grupos hidroxil de los glicósidos a fin de esterificar los grupos carboxilo de un hidrogel polimérico, y así formar ésteres poliméricos *in situ*. Otro método consiste en emplear condensación de acetobromoglucosa con colest-5-en-3beta-ol en un copolímero de ácido maleico. Es posible sintetizar las poliacrilamidas N-sustituidas provocando una reacción química de los polímeros activados con omega-aminoalquilglicósidos: (1) (carbohidrato-espaciador) (n)-poliacrilamida, "seudopolisacáridos"; (2) (carbohidrato espaciador) (n)-fosfatidiletanolamina (m)-poliacrilamida, neoglucolípidos, derivados de la fosfatidiletanolamina; (3) (carbohidrato-espaciador) (n)-biotina (m)-poliacrilamida. Estos derivados biotinilados pueden adherirse a lectinas en la superficie mucosa para facilitar la absorción del/de los principio(s) biológicamente activo(s), por ejemplo, un péptido fijador al receptor de Y2 encapsulado en un polímero.

En aspectos más detallados de la presente invención, uno o más péptidos fijadores al receptor de Y2, o sus análogos y miméticos, y/u otros principios biológicamente activos descritos en la presente, que pueden contener principios activos secundarios tales como inhibidores de la proteasa, citosina u otros moduladores de la fisiología de unión intercelular, etc., están modificados y fijados al excipiente polimérico o a la matriz polimérica. Por ejemplo, lo mencionado se puede lograr enlazando químicamente un principio activo proteínico o peptídico con otro(s) agente(s) dentro de una cadena polimérica entrecruzada. También es posible modificar químicamente el polímero por separado con un agente interactivo, tal como una molécula que contenga glucósido. En ciertos aspectos, es posible funcionalizar el/los principio(s) biológicamente activo(s) con otro(s) principio(s) activo(s), por ejemplo, en el que se identifique un grupo reactivo adecuado o agregado químicamente al/a los principio(s) activo(s). Lo más frecuente es que se agregue un grupo etilénico polimerizable, y que el principio activo funcionalizado sea luego copolimerizado con monómeros y un entrecruzador utilizando un método convencional de polimerización, como la polimerización en una solución (generalmente en agua) o por emulsión, suspensión o dispersión. A menudo se proporciona al funcionalizador una concentración lo suficientemente alta de grupos polimeralizables o funcionales a fin de asegurarse de que varios puntos de los principio(s) activo(s) estén

funcionalizados. Por ejemplo, en un polipéptido que contiene 16 sitios amino, generalmente se quiere funcionalizar al menos 2, 4, 5, 7 y hasta 8 o más de estos sitios.

Después de ser funcionalizados, el/los principio(s) activo(s) se mezcla(n) con monómeros y con un entrecruzador que incluye a los reactivos a partir de los cuales se formó el polímero en cuestión. Luego, se induce la polimerización en este medio para crear un polímero que contenga al/a los principio(s) activo(s) fijados. Luego, el polímero se lava con agua o con otros solventes adecuados o se purifica para eliminar los rastros de impurezas no reactivas y, de ser necesario, se pulveriza o descompone a través de medios físicos, por ejemplo agitándolo, pasándolo a través de una malla, o por ultrasonicación u otro medio apropiado, hasta obtener el tamaño de partícula deseado. Luego se elimina el solvente, que en general es agua, a fin de no desnaturalizar o degradar de modo alguno el/los principio(s) activo(s). Un método preferido es la liofilización (secado por congelación), pero se dispone de otros métodos que se pueden utilizar (por ejemplo, secado por aspiración, secado al aire, secado por spray, etc.).

Para introducir los grupos polimerizables en péptidos, proteínas y otros principios activos en el marco de la invención, se puede provocar una reacción química en el grupo reactivo amino, hidroxil, tiol y otros disponibles con electrófilos que contengan grupos insaturados. Por ejemplo, pertenecen a esta categoría de reactivos los monómeros insaturados que contienen grupos N-hidroxi succinimidil, los carbonatos activos como el p-nitrofenil carbonato, los carbonatos triclorofeniles, el tresilato, los oxicarbonilimidazoles, el epóxido, los isocianatos y el aldehído, las carboximetilazidas insaturadas y el ortopiridil-disulfuro insaturado. Son ejemplos ilustrativos de reactivos insaturados el éter alilglicidilo, el cloruro de alilo, el bromuro de alilo, el yoduro de alilo, el cloruro de acrilolilo, el alil isocianato, el cloruro de alilsulfonilo, el anhídrido maleico, los copolímeros de anhídrido maleico y éter alilo, y otros similares.

En general, todos los derivados activos de la lisina, excepto el aldehído, pueden reaccionar con otros aminoácidos tales como los grupos imidazol de histidina y los grupos hidroxílicos de tirosina y los grupos tiol de cistina, en el caso de que el medio mejore la nucleofilidad de estos grupos. Los aldehídos que contienen reactivos funcionalizadores son específicos de la lisina. Estos tipos de reacciones con grupos disponibles de lisinas,

cisteínas y tirosina han sido documentados en muchísimos artículos y son conocidos por los expertos en la materia.

En el caso de principios biológicamente activos que contienen grupos aminos, es conveniente hacer reaccionar dichos grupos con un cloruro de aciloilo, como el cloruro de acriloilo, e introducir el grupo acrílico polimerizable en el agente reactivado. Luego, durante la preparación del polímero, por ejemplo, durante el entrecruzamiento del copolímero de acrilamida y ácido acrílico, el principio activo funcionalizado se adhiere al polímero y se une a él mediante los grupos acrílicos.

En otros aspectos de la presente invención, los principios biológicamente activos, entre ellos, péptidos, proteínas, nucleósidos y otras moléculas que son bioactivas *in vivo* se estabilizan por conjugación a través del enlace covalente de uno o más principios activos a un polímero, incorporando como parte integral de éste tanto una fracción hidrófila –por ejemplo, un polialquilenglicol lineal– como un lipófilo (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. No 5.681.811). En un aspecto, el principio biológicamente activo se asocia de manera covalente con un polímero que puede ser: (i) una porción de polialquilenglicol lineal y (ii) una porción lipófila, asociación en la que el principio activo, la fracción de polialquilenglicol lineal y la porción lipófila están dispuestas en relación con la otra de tal manera que el agente terapéutico tiene una mejor resistencia a la degradación enzimática *in vivo* (es decir, en relación con su estabilidad en condiciones similares en una forma no conjugada desprovista del polímero asociado). En otro aspecto, la formulación estabilizada por conjugación tiene una conformación tridimensional que comprende al principio biológicamente activo asociado de manera covalente con un complejo de polisorbato que comprende(i) una fracción de polialquilenglicol lineal y (ii) una fracción lipófila, complejo en el que el principio activo, la fracción de polialquilenglicol lineal y la fracción lipófila están dispuestas conformacionalmente en relación con la otra de tal manera que: (a) la fracción lipófila está disponible en el exterior con una conformación tridimensional, y (b) el principio activo de la composición tiene una mejor resistencia a la degradación enzimática *in vivo*.

En otro aspecto también relacionado, se proporciona un complejo conjugado con multiligandos, que comprende un principio biológicamente activo complejado en forma covalente con una fracción triglicérida vertebral a través de un grupo separador de

polialquilenglicol unido a un átomo de carbono de la fracción triglicérida vertebral, y al menos una fracción de ácido graso adherida de manera covalente, ya sea directamente a un átomo de carbono de la fracción triglicérida vertebral o unida de manera covalente a través de un espaciador de polialquilenglicol (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. No 5.681.811). En dicho complejo de agente terapéutico conjugado con multiligandos, los átomos de carbono alfa y beta de la fracción triglicérida bioactiva pueden tener fracciones de ácidos grasos adheridos a través de un enlace covalente, ya sea directa o indirectamente, a través de fracciones espaciadoras de polialquilenglicol. Otra posibilidad puede ser que una fracción de ácido graso esté adherida de manera covalente –ya sea directamente o a través de una fracción espaciadora de polialquilenglicol– a los carbonos alfa o alfa' de la fracción vertebral triglicérida, con el fármaco bioactivo que tenga un enlace covalente con el carbono-gama de la fracción vertebral triglicérida, ya sea que esté vinculado de manera covalente directa o indirectamente a través de una fracción espaciadora de polialquileno. Se reconoce que existe una amplia variedad de formas estructurales, composicionales y conformacionales para el complejo del agente conjugado con multiligandos que comprende la fracción vertebral triglicérida, dentro de los alcances de la presente invención. También se advierte que en dicho complejo terapéutico conjugado con multiligandos, el/los principio(s) biológicamente activo(s) puede(n), de manera favorable, tener un enlace covalente con la fracción triglicérida vertebral modificada a través de grupos alquilo separadores, o bien a través de otros grupos separadores aceptables, dentro de los alcances de esta invención. Tal como se utilizan en este contexto, la aceptabilidad del grupo espaciador se refiere a características de aceptabilidad específicas, estéricas, composicionales y de aplicación final.

En otros aspectos de esta invención, se proporciona un complejo estabilizado por conjugación que contiene un complejo de polisorbato, que a su vez incluye una fracción de polisorbato con un triglicérido vertebral que tiene átomos de carbono alfa, alfa' y beta y grupos funcionalizadores que incluyen: (i) un grupo ácido graso; y (ii) un grupo de polietilenglicol con un principio o fracción biológicamente activo/a unido/a en forma covalente, por ejemplo, a una funcionalidad adecuada del grupo de polietilenglicol. Dicha unión covalente puede ser directa, por ejemplo, a una funcionalidad hidroxi terminal del grupo polietilenglicol, o puede ser indirecta, por ejemplo, limitando por reacción del hidroxi terminal del grupo polietilenglicol con un carboxi funcionalizador del grupo espaciador, de modo que el grupo de polietilenglicol terminado que resulta

tenga una funcionalidad terminal carboxi a la cual la porción o el principio biológicamente activo/a pueda unirse de manera covalente.

En otros aspectos de la presente invención, se proporciona un complejo hidrosoluble estable, estabilizado por conjugación, que comprende uno/a o más miméticos, análogos, proteínas del péptido fijador al receptor de Y2 y/u otro(s) principio(s) biológicamente activo(s) descritos en la presente y unidos de manera covalente a una fracción glucolipídica modificada con polietilenglicol (PEG) fisiológicamente compatible. En dicho complejo, el/los principio(s) biológicamente activo(s) pueden tener un enlace covalente con una fracción glicolipídica modificada con PEG fisiológicamente compatible, a través de un enlace covalente lábil en un grupo de aminoácidos libres del principio activo, en el que el enlace covalente lábil es segmentable *in vivo* a través de hidrólisis y/o proteólisis. Puede resultar ventajoso que la porción glucolipídica modificada con PEG fisiológicamente compatible incluya un polímero polisorbato, por ejemplo, un polímero polisorbato que contenga grupos de éster de ácidos grasos elegidos del siguiente grupo: monopalmitato, dipalmitato, monolaurato, dilaurato, trilaurato, monoleato, dioleato, trioleato, monoestearato, distearato y triestearato. En dicho complejo, puede ser conveniente que la fracción glicolipídica modificada con PEG fisiológicamente compatible incluya un polímero elegido del grupo compuesto de éteres de polietilenglicol de ácidos grasos y ésteres de polietilenglicol de ácidos grasos, en los que los ácidos grasos, por ejemplo, comprenden un ácido graso del grupo de ácidos láuricos, palmíticos, oleicos y esteáricos.

Almacenamiento del Material

En ciertos aspectos de la invención, las formulaciones combinatorias y/o los métodos de administración conjunta que se describen en la presente incorporan una cantidad eficaz de péptidos y proteínas que pueden adherirse a vidrio cargado, y así reducir la concentración eficaz en el envase. Los envases silanizados, por ejemplo los frascos de vidrio silanizado, se utilizan para almacenar el producto terminado a fin de reducir la absorción de polipéptidos o proteínas en el frasco de vidrio.

En otros aspectos de la presente invención, un kit de tratamiento para mamíferos contiene una composición farmacológica estable de uno o más compuestos del péptido fijador al receptor de Y2 formulado(s) para la vía mucosa en un induviduo con una

composición eficaz para aliviar uno o más síntomas de obesidad, cáncer, o desnutrición o desgaste relacionado con el cáncer, sin provocar efectos adversos inaceptables. El kit también incluye una ampolla del reactivo farmacéutico que contiene uno o más compuestos del péptido fijador al receptor de Y2. Esta ampolla de reactivo farmacéutico es de polímero, vidrio u otro material apropiado de grado farmacéutico. La ampolla del reactivo es, por ejemplo, de vidrio silanizado. El kit también contiene un orificio para administrar la composición a través de la superficie mucosa nasal. La apertura para administrar el fármaco es de polímero, vidrio u otro material apropiado de grado farmacéutico. La apertura para administrar el fármaco es, por ejemplo, de vidrio silanizado.

Una técnica de silanización combina una técnica de limpieza especial de las superficies que serán tratadas con un proceso de silanización a baja presión. El silano está en la fase gaseosa y a una mayor temperatura que las superficies que serán silanizadas. El método proporciona superficies reproducibles con capas de silano funcionales, homogéneas y estables que tienen las características de una monocapa. Las superficies silanizadas impiden que se unan al vidrio tanto los polipéptidos como los agentes que mejoran la administración mucosa de la presente invención.

El procedimiento es útil para preparar ampollas silanizadas de reactivos farmacéuticos a fin de que puedan contener las composiciones del péptido fijador al receptor de Y2 de la presente invención. Antes de ser utilizadas, las bandejas de vidrio se limpian enjuagándolas con agua bidestilada (ddH_2O). La bandeja de silano se enjuaga con EtOH al 95%, y la bandeja de acetona se enjuaga con acetona. Las ampollas de los reactivos farmacéuticos son sometidas a sonicación en acetona durante 10 minutos. Después de la sonicación con acetona, se lavan en una bandeja con ddH_2O al menos dos veces. Las ampollas de reactivos son sometidas a sonicación en 0,1 m NaOH durante 10 minutos. Mientras las ampollas reciben sonicación en NaOH, se elabora la solución de silano bajo campana. (Solución de silano: 800 ml de etanol al 95%; 96 l de ácido acético glacial; 25 ml de oxipropiltrimetoxiglicil silano). Después del proceso de sonicación con NaOH, las ampollas de reactivos se lavan en una bandeja de ddH_2O al menos dos veces. Luego se someten a sonicación en una solución de silano durante 3 a 5 minutos. Después se lavan en una bandeja con EtOH al 100%. Se secan con gas N_2 prepurificado y se colocan en un horno a 100° C durante al menos 2 horas antes de ser utilizadas.

Métodos y Excipientes para la Administración de Bioadhesivos

En ciertos aspectos de la invención, las formulaciones combinatorias y/o los métodos de administración conjunta incorporan una cantidad eficaz de un bioadhesivo atóxico como compuesto o excipiente, a fin de mejorar la administración por vía mucosa de uno o más principios biológicamente activos. En este contexto, los bioadhesivos tienen una adhesión general o específica a uno o más compuestos o superficies de la mucosa seleccionada. El bioadhesivo mantiene un gradiente de concentración adecuado del principio biológicamente activo dentro o a través de la mucosa, para asegurar la penetración incluso de moléculas de gran tamaño (por ejemplo, péptidos y proteínas) dentro o a través del epitelio mucoso. Es característico que el uso de un bioadhesivo en los métodos y las composiciones de la invención incremente entre dos y cinco, y a menudo entre cinco y diez veces la permeabilidad de los péptidos y las proteínas dentro o a través del epitelio mucoso. Esta mejora de la penetración epitelial a menudo permite administrar por vía transmucosa macromoléculas de gran tamaño eficazmente, por ejemplo, hacia la porción basal del epitelio nasal, los compartimientos extracelulares adyacentes, el plasma sanguíneo o tejido o fluido del SNC.

Esta mejora proporciona una mayor eficacia en la administración de los péptidos, las proteínas y otras especies terapéuticas bioactivas macromoleculares. Estos resultados dependen en parte de la hidrofilidad del compuesto, por lo cual la penetración es mayor con las especies hidrófilas que con los compuestos hidrófobos. Además de estos efectos, el uso de bioadhesivos para mejorar la persistencia de la droga en la superficie de la mucosa puede generar un mecanismo de reserva para prolongar la administración de la droga mediante el cual los compuestos no sólo penetran a través del tejido mucoso, sino que también se retrodispersan hacia la superficie mucosa una vez que se agota el material en la superficie.

Son numerosos los bioadhesivos apropiados dados a conocer en el medio farmacéutico para ser administrados por vía oral. Patente de EE.UU. No· 3.972.995; 4.259.314; 4.680.323; 4.740.365; 4.573.996; 4.292.299; 4.715.369; 4.876.092; 4.855.142; 4.250.163; 4.226.848; 4.948.580; Patente de EE.UU. reemitida 33,093, que·son de utilidad en el marco de los nuevos métodos y las nuevas composiciones de la presente invención. Es posible evaluar el potencial de varios polímeros bioadhesivos como

plataforma de administración por vía mucosa (por ejemplo, nasal) en el marco de los métodos y las composiciones de la invención, determinando su capacidad para retener y liberar el péptido fijador al receptor de Y2, así como su capacidad para interactuar con las superficies mucosas tras la incorporación del principio activo. Además, se aplicarán métodos bien conocidos a fin de determinar la biocompatibilidad de determinados polímeros con el tejido del sitio que recibe la administración por vía mucosa. Cuando la mucosa seleccionada está cubierta por mucosidad (es decir, en ausencia de tratamiento mucolítico), puede actuar como enlace conector con el epitelio mucoso subyacente. Por lo tanto, el término "bioadhesivo", tal como aquí se aplica, comprende a los compuestos mucoadhesivos que son de utilidad para mejorar la absorción mucosa de principios biológicamente activos en la presente invención. Sin embargo, el contacto adhesivo al tejido mucoso a través de la adhesión a una capa de gel mucoso puede estar limitado por una adherencia incompleta o transitoria entre esta capa y el tejido subyacente, particularmente en las superficies nasales en las que la eliminación de mucosidad es rápida. A este respecto, la secreción de glicoproteínas mucosas es continua; inmediatamente después de ser expulsadas de las células o glándulas forman un gel viscoelástico. No obstante, la superficie luminal de la capa de gel adherente se ve sometida a una erosión continua por acción mecánica, enzimática y/o ciliar. Toda vez que tales actividades son más prominentes o que se pretenden tiempos de adhesión más prolongados, es posible incorporar a los métodos de administración conjunta o a los de formulación combinatoria otros métodos o fármacos mucolíticos y/o ciliostáticos, tal como se describe en la presente.

Es característico que los polímeros mucoadhesivos utilizables en la presente invención sean macromoléculas naturales o sintéticas que se adhieren a las superficies del tejido mucoso húmedo a través de mecanismos complejos pero inespecíficos. Además de estos polímeros mucoadhesivos, la invención también proporciona métodos y composiciones que comprenden bioadhesivos que se adhieren directamente a la superficie celular, en vez de hacerlo a la mucosidad, a través de interacciones específicas, por ejemplo, interacciones mediadas por receptores. Un ejemplo de bioadhesivos que actúan de esta manera específica es el grupo de compuestos denominado lectinas. Las lectinas son glucoproteínas que tienen la capacidad de reconocer específicamente las moléculas de azúcar, por ejemplo, las glicoproteínas o los glicolípidos, y de unirse a ellas, que forman

parte de las membranas celulares del epitelio intranasal y que pueden considerarse "receptores de lectinas".

En ciertos aspectos de la invención, los materiales bioadhesivos que mejoran la absorción intranasal de principios biológicamente activos pueden ser una matriz de polímero hidrófilo, por ejemplo, hidrosoluble o hinchable en agua, o una mezcla de polímeros que puedan adherirse a una superficie mucosa húmeda. Estos adhesivos pueden formularse como ungüentos, películas delgadas de hidrogel (véase atrás) u otras formas de aplicación. A menudo, en estos adhesivos el principio biológicamente activo está mezclado a fin de efectuar una liberación lenta o administración local del principio activo. Algunos están formulados con otros ingredientes que facilitan la penetración del principio activo a través de la mucosa nasal, por ejemplo, hacia el sistema circulatorio del individuo.

Varios polímeros, tanto naturales como sintéticos, muestran una fijación significativa a la mucosidad y/o a las superficies epiteliales mucosas en condiciones fisiológicas. La potencia de esta interacción se puede medir fácilmente mediante pruebas de pelado mecánico o desgarro. Cuando se aplican a una superficie mucosa húmeda, muchos materiales secos se adhieren de manera espontánea, al menos levemente. Tras este contacto inicial, algunos materiales hidrófilos comienzan a atraer agua por absorción, dilatación o fuerzas capilares, y si aquélla es absorbida por el sustrato subyacente o por la interfase del tejido polimérico, la adhesión puede ser suficiente para mejorar la absorción por vía mucosa de los principios biológicamente activos. Dicha "adhesión por hidratación" puede ser bastante acentuada, pero las formulaciones adaptadas para emplear este mecanismo deben tener en cuenta la dilatación, que continúa mientras la dosis se transforma en un mucílago hidratado. Este proceso es aplicable a muchos hidrocoloides útiles en la invención, especialmente algunos derivados de la celulosa, que generalmente no son adhesivos cuando se aplican antes de ser hidratados. No obstante, los sistemas de administración de fármacos bioadhesivos que se aplican por vía mucosa son eficaces en el marco de la presente invención cuando tales materiales se administran en forma de polvo polimérico seco, microesfera o película.

Otros polímeros se adhieren a las superficies mucosas no sólo cuando se aplican en seco, sino también cuando están completamente hidratados, y en presencia de

cantidades excesivas de agua. Por lo tanto, al elegir un mucoadhesivo es preciso considerar debidamente las condiciones, tanto fisiológicas como fisicoquímicas, en las cuales se formará y mantendrá el contacto con el tejido. En especial, se sabe que la cantidad de agua o el porcentaje de humedad que suele contener el sitio donde se quiere lograr la adhesión y el pH prevalente influyen en la fuerza de fijación mucoadhesiva de los distintos polímeros.

Durante los últimos veinte años, se han fabricado y estudiado varios sistemas poliméricos bioadhesivos para administrar fármacos, no siempre con éxito. Sin embargo, hay una variedad de dichos excipientes que se utilizan actualmente en aplicaciones clínicas de uso odontológico, ortopédico, oftalmológico y quirúrgico. Por ejemplo, los hidrogeles con base acrílica se han utilizado ampliamente en mecanismos bioadhesivos. Los hidrogeles con base acrílica son adecuados para la bioadhesión debido a que son flexibles y no abrasivos en estado de dilatación parcial, lo que reduce la destrucción de los tejidos con los que entran en contacto. Más aún, su alta permeabilidad en estado de dilatación permite que el monómero sin reaccionar, las cadenas de polímeros no entrecruzados y el iniciador puedan ser eliminados de la matriz mediante lavado después de la polimerización, lo que es una característica importante cuando se eligen materiales bioadhesivos para utilizar en el marco de la presente invención. Los elementos poliméricos con base acrílica tienen un gran poder adhesivo. A los fines de la administración controlada por vía mucosa de las drogas proteínicas y peptídicas, los métodos y composiciones de la invención pueden emplear portadores, por ejemplo, poliméricos que, en parte, protegen al principio biológicamente activo de la descomposición proteolítica, al tiempo que posibilitan una mejor penetración del péptido o la proteína en la mucosa nasal o a través de ella. En este contexto, los polímeros bioadhesivos han demostrado tener un considerable potencial para mejorar la administración de fármacos por vía oral. Por ejemplo, la biodisponibilidad de la 9-desglicinamida, 8-arginina vasopresina (DGAVP) administrada a ratas por vía intraduodenal, junto con un 1% (peso/volumen) de dispersión salina del policarbófilo derivado del ácido poliacrílico mucoadhesivo, fue de 3 a 5 veces mayor que la obtenida con una solución acuosa del fármaco peptídico sin este polímero.

Los polímeros mucoadhesivos del tipo ácido poliacrílico son potentes inhibidores de algunas proteasas intestinales. El mecanismo de inhibición enzimática se explica por

la gran afinidad que tiene esta clase de polímeros por los cationes divalentes, tales como el calcio o el cinc, que son cofactores esenciales de las metaloproteinasas, como la tripsina y la quimotripsina. Se ha informado que eliminar los cofactores de las proteasas utilizando ácido poliacrílico provoca cambios estructurales irreversibles de las proteínas enzimáticas y anula la actividad enzimática. Al mismo tiempo, otros polímeros mucoadhesivos (por ejemplo, quitosan y algunos derivados de la celulosa) pueden no inhibir las enzimas proteolíticas en ciertas condiciones. A diferencia de otros inhibidores enzimáticos que pueden utilizarse en el marco de la invención (por ejemplo, aprotinina, bestatina), que son moléculas relativamente pequeñas, es probable que la absorción transnasal de polímeros inhibidores sea mínima dado el tamaño de estas moléculas y que, de esa manera, se eliminen posibles efectos adversos. Por lo tanto, los polímeros mucoadhesivos, particularmente los del tipo del ácido (poli)acrílico, pueden actuar como adhesivo que estimule la absorción y como protectores enzimáticos que mejoren la administración controlada de drogas proteínicas y peptídicas, especialmente por una cuestión de seguridad.

Además de servir como protección contra la degradación enzimática, los bioadhesivos y otros agentes poliméricos y no poliméricos que estimulan la absorción utilizados en la invención pueden incrementar directamente la permeabilidad por vía mucosa de los principios biológicamente activos. A fin de facilitar el transporte de moléculas hidrófilas y de gran tamaño (como los péptidos y las proteínas) a través de la barrera epitelial nasal, se ha postulado que los polímeros mucoadhesivos y otros agentes mejoran la penetración mucho más que lo demostrado por la prolongación del tiempo de permanencia premucosa del sistema de administración. Según lo consignan los estudios, el tiempo que se mantienen las concentraciones plasmáticas de la droga sugiere que las microesferas bioadhesivas causan un aumento agudo pero transitorio de la permeabilidad de la insulina a través de la mucosa nasal. Asimismo, se informó que otros polímeros mucoadhesivos utilizados en la invención, por ejemplo el quitosan, mejoran la permeabilidad de determinados epitelios mucosos aunque se apliquen como solución acuosa o gel acuoso. También se informó que otro polímero mucoadhesivo que influye directamente en la permeabilidad epitelial es el ácido hialurónico y los derivados estéricos de dicho ácido. Un bioadhesivo particularmente útil para la administración conjunta y/o para los métodos y las composiciones de la formulación combinatoria de la invención es el quitosan, así como sus análogos y derivados. El quitosan es un polímero atóxico,

biocompatible y biodegradable, muy utilizado en aplicaciones médicas y farmacéuticas debido a sus propiedades favorables de baja toxicidad y buena biocompatibilidad. Es un poliaminosacárido natural preparado a partir de la quitina por N-desacetilación con álcali. Tal como se utiliza en los métodos y composiciones de la invención, el quitosan aumenta la retención de proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos, y de otros principios biológicamente activos descritos en la presente en el sitio mucoso que recibe la aplicación. Este modo de administración también puede mejorar el cumplimiento terapéutico y la aceptación del paciente. Tal como se establece en la presente, los métodos y las composiciones de la invención pueden incluir un nuevo derivado del quitosan o una forma químicamente modificada de éste. Uno de estos nuevos derivados utilizados en el marco de la presente invención se describe como β-[1 → 4]-2-guanidino-2-desoxi-D-glucosa (poli-GuD). El quitosan es el producto de quitina N-desacetilado, polímero natural que se ha utilizado ampliamente para preparar microesferas para formulaciones que se administran por vía oral e intranasal. También se ha propuesto utilizar el polímero quiitosan como excipiente soluble para administrar fármacos por vía parenteral. En un aspecto de la invención, la o-metilisourea se utiliza para convertir a la amina quitosan en su fracción de guanidinio. El compuesto guanidinio se prepara, por ejemplo, provocando una reacción química entre soluciones equinormales de quitosan y o-metilisourea con un pH superior a 8,0.

El producto del guanidinio es un polímero -[14]-guanidino-2-desoxi-D- glucosa. Se abrevia como Poli-GuD en este contexto (Monómero F.W. de amina en quitosan = 161; Monómero F.W. de guanidinio en Poli-GuD = 203).

Un ejemplo del método de preparación de Poli-GuD utilizado en esta invención implica el siguiente protocolo:

Soluciones:

Preparación de la solución de ácido acético al 0,5% (0,088N):

Pipetee 2,5 ml de ácido acético glacial en un matraz aforado de 500 ml, diluya a volumen con agua purificada.

Preparación de la solución NaOH 2N:

Transfiera gránulos de alrededor 20 g NaOH a un vaso de precipitados con alrededor de 150 ml de agua purificada. Disuelva y enfríe a temperatura ambiente. Transfiera la solución a un matraz aforado de 250 ml y diluya a volumen con agua purificada.

Preparación de sulfato de o-metilisourea (equivalente a 0,4N en grupos urea):

Transfiera alrededor de 493 mg de sulfato de O-metilisourea a un matraz aforado de 10 ml, disuelva y diluya a volumen con agua purificada.

El pH de la solución es de 4,2

Preparación de la solución de cloruro de bario (0,2M):

Transfiera alrededor de 2,086 g de cloruro de bario a un matraz aforado de 50 ml, disuelva y diluya a volumen con agua purificada.

Preparación de la solución de quitosan (equivalente de 0,06N de amina):

Transfiera alrededor de 100 mg de quitosan a un vaso de precipitados de 50 ml, agregue 10 ml de ácido acético al 0,5% (0,088 N). Mezcle hasta disolver por completo.

El pH de la solución es de alrededor de 4,5

Preparación de la solución de cloruro de O-metilisourea (equivalente a 0,2N en grupos urea):

Pipetee 5,0 ml de solución de sulfato O-metilisourea (grupo urea equivalente 0,4N) y 5 ml de solución de cloruro de bario 0,2M en un vaso de precipitados. Se forma un precipitado. Continúe mezclando la solución durante otros 5 minutos. Filtre la solución en un filtro de 0,45m y elimine el precipitado. La concentración de cloruro O-metilisourea en la solución sobrenadante es equivalente a 0,2 N en grupos urea.

El pH de la solución es 4,2

Procedimiento:

Agregue 1,5 ml de NaOH 2 N a 10 ml de la solución de quitosan (equivalente a 0,06N de amina) preparado como se describe en la Sección 2.5. Ajuste el pH de la solución con NaOH 2N a aproximadamente 8,2-8,4. Mezcle la solución durante 10 minutos más. Agregue 3,0 ml de la solución de cloruro O-metilisourea (equivalente a 0,2N en grupos urea) preparada como se describió anteriormente. Mezcle la solución durante toda la noche.

Ajuste el pH de la solución a 5,5 con Ácido Acético al 0,5% (0,088N).

Diluya la solución a un volumen final de 25 ml utilizando agua purificada.

La concentración de Poli-GuD en la solución es de 5 mg/ml, equivalente a 0,025N (grupo guanidinio).

Otros compuestos clasificados como bioadhesivos que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención actúan como mediadores de interacciones específicas, comúnmente clasificadas como "interacciones entre receptores y ligandos" entre estructuras complementarias del compuesto bioadhesivo y un compuesto de la superficie del epitelio mucoso. La naturaleza brinda muchos ejemplos que ilustran esta forma de bioadhesión específica de enlace, tal como en el caso de las interacciones entre la lectina y el azúcar. Las lectinas son (glico)proteínas de origen no inmunitario que se fijan a los polisacáridos o glicoconjugados.

Se han investigado varias lectinas vegetales como posibles promotoras de la absorción. Una lectina vegetal, *Phaseolus vulgaris hemagglutinin* (PHA), tiene gran biodisponibilidad oral, de más del 10% tras ser administrada a ratas. Aparentemente, la lectina del tomate (TL) *(Lycopersicon esculeutum)* puede administrarse de varias maneras sin riesgos.

En resumen, los bioadhesivos mencionados son de utilidad en las formulaciones combinatorias y los métodos de administración conjunta de la presente invención, los cuales pueden incorporar una cantidad y una forma de bioadhesivo que sea eficaz para prolongar la permanencia o, de lo contrario, incrementar la absorción mucosa de una o más proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos, y de otros principios biológicamente activos. Los bioadhesivos pueden administrarse en forma conjunta como compuestos adjuntos o como aditivos en las formulaciones combinadas de la invención. En ciertas realizaciones, el bioadhesivo actúa como un "pegamento farmacéutico", en tanto que en otras realizaciones la administración adjunta o formulación combinada del bioadhesivo sirve para intensificar el contacto del principio biológicamente activo con la mucosa nasal, en algunos casos estimulando interacciones ligando-receptoras específicas con "receptores" celulares epiteliales, y en otros casos incrementando la permeabilidad epitelial para aumentar en forma significativa el gradiente de concentración de la droga medido en la zona seleccionada para administrarlo (por ejemplo, el hígado, el plasma sanguíneo o tejido o fluido del SNC). Otros

bioadhesivos que pueden ser utilizados en la invención actúan como inhibidores enzimáticos (por ejemplo, de la proteasa) para aumentar la estabilidad de los fármacos administrados por vía mucosa, administrados en forma conjunta o en una formulación combinada con el bioadhesivo.

Liposomas y Excipientes de Administración Micelar

Los métodos de administración coordinada y las formulaciones combinatorias de la presente invención pueden incorporar portadores con base lipídica o de ácidos grasos, procesadores, o excipientes de administración que mejoren las formulaciones destinadas a administrar por vía mucosa las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, sus análogos y miméticos, y otros principios biológicamente activos. Por ejemplo, se proporciona una variedad de formulaciones y métodos para la administración por vía mucosa, que incluyen uno o más de estos principios activos, como un péptido o una proteína añadidos a un liposoma, a un portador micelar mezclado o a una emulsión, o encapsulados en ellos, o administrados conjuntamente para mejorar la estabilidad química y física y aumentar la vida media de los principios biológicamente activos (por ejemplo, reduciendo la susceptibilidad a la proteólisis, a la desnaturalización y/o a la modificación química) cuando se administra por vía mucosa.

En ciertos aspectos de la invención, los sistemas de administración especializados de principios biológicamente activos comprenden pequeñas vesículas lipídicas denominadas liposomas. Es característico que los liposomas sean producidos a partir de moléculas lipídicas naturales, biodegradables, atóxicas y no inmunogénicas, y que puedan atrapar las moléculas de la droga(sean péptidos o proteínas) o fijarse a ellas con eficacia dentro de sus membranas o sobre ellas. Lo que aumenta el atractivo de los liposomas como sistema para administrar proteínas y péptidos en la presente invención es que las proteínas encapsuladas pueden permanecer en su medio acuoso predilecto dentro de las vesículas, en tanto que la membrana liposómica los protege contra la proteólisis y otros factores desestabilizantes. Aún cuando no todos los métodos conocidos de preparación de liposomas sirven para encapsular péptidos y proteínas, debido a sus propiedades físicas y químicas únicas, existen varios métodos que permiten encapsular estas macromoléculas sin que se produzca una desactivación sustancial.

Se dispone de varios métodos para preparar los liposomas que pueden utilizarse en la presente invención, Patente de EE.UU. No 4.235.871; 4.501.728 y 4.837.028. En la administración que emplea a un liposoma como excipiente, es común que el principio biológicamente activo esté atrapado en el liposoma o en la vesícula lipídica, o que esté fijado a la parte externa de la vesícula.

Al igual que los liposomas, los ácidos grasos insaturados de cadena larga, que también mejoran la absorción mucosa, pueden formar vesículas cerradas con estructuras de dos capas (llamadas "ufasomas"). Éstas se pueden formar, por ejemplo, utilizando ácido oleico para atrapar las proteínas y los péptidos biológicamente activos para la administración por vía mucosa, por ejemplo, intranasal, en el marco de la presente invención.

Otros sistemas de administración empleados en la presente invención combinan el uso de polímeros y liposomas para unir las propiedades favorables de ambos excipientes, como ser el encapsulado dentro de la fibrina, que es un polímero natural. Además, mediante el entrecruzado covalente y el agregado de antifibrinolíticos al polímero fibrina, se puede controlar la liberación de los compuestos bioterapéuticos de este sistema de administración.

Esta invención también contempla el uso de sistemas de administración más simplificados, por ejemplo, el uso de lípidos catiónicos como excipientes, que pueden servir para generar una interacción electroestática entre el excipiente lipídico y principios biológicamente activos cargados, tales como proteínas y ácidos nucleicos polianiónicos. Estos excipientes permiten envasar los fármacos de una manera eficaz y adecuada para la administración por vía mucosa y/o hacia los compartimientos sistémicos.

Otros excipientes que pueden ser utilizados en el marco de la presente invención son los ácidos grasos de cadenas media y larga, así como las micelas surfactantes mezcladas con ácidos grasos. El transporte de los lípidos naturales en forma de ésteres a través de superficies mucosas tiene implicancias importantes. Se ha demostrado que los ácidos grasos libres y sus monoglicéridos, que tienen grupos polares adheridos, actúan en forma de micelas mezcladas como promotores de la permeabilidad en la barrera intestinal. El descubrimiento de que los ácidos grasos libres (ácidos carbolíxicos con una longitud de

cadena que oscila entre 12 y 20 átomos de carbono) y sus derivados polares pueden modificar la barrera intestinal ha fomentado la realización de investigaciones exhaustivas acerca de la aplicación de estos agentes para mejorar la absorción mucosa.

En el marco de los métodos de la invención, los ácidos grasos de cadena larga, especialmente los lípidos fusogénicos (ácidos grasos insaturados y monoglicéridos tales como el ácido oleico, el ácido linoleico, la monoleína, etc.) son portadores que mejoran la administración mucosa del péptido fijador al receptor de Y2, de sus análogos y miméticos, y de otros principios biológicamente activos descritos en la presente. También se ha demostrado que los ácidos grasos de cadena media (C_6 a C_{12}) y los monoglicéridos mejoran la absorción intestinal de la droga, y que pueden adaptarse a los métodos y las formulaciones para la administración por vía mucosa de la presente invención. Además, las sales de sodio de los ácidos grasos de cadena media y larga son excipientes y potenciadores eficaces de la absorción para administrar los principios biológicamente activos por vía mucosa. Por lo tanto, los ácidos grasos pueden emplearse en formas solubles de sales de sodio o mediante el agregado de surfactantes atóxicos, por ejemplo, aceite de castor hidrogenado polioxietilado, taurocolato sódico, etc. Otros ácidos grasos y preparaciones de micelas mezcladas que pueden emplearse en la invención son, sin estar limitados a la enumeración que sigue: caprilato sódico (C8), caprato sódico (C10), laurato sódico (C12) o el oleato sódico (C18), que se pueden combinar con sales biliares tales como el glucocolato y el taurocolato.

Pegilación

Otros métodos y composiciones que se proponen en la presente invención implican la modificación química de péptidos y proteínas biológicamente activos mediante adhesión covalente de materiales poliméricos, por ejemplo dextranos, polivinilpirrolidonas, glicopéptidos, polietilenglicol y ácidos poliamínicos. Las proteínas y los péptidos conjugados resultantes retienen la acción biológica y solubilidad para ser administrados por vía mucosa. En otras realizaciones, las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, sus análogos y miméticos, y otras proteínas y péptidos biológicamente activos, se conjugan con los polímeros oxidopolialquilénicos, particularmente los polietilenglicoles (PEG). Patente de EE.UU. N° 4.179.337.

Los polímeros PEG aminorreactivos que pueden emplearse en la presente invención son los siguientes: SC-PEG con masas moleculares de 2.000, 5.000. 10.000, 12.000 y 20.000; U-PEG-10.000; NHS-PEG-3400-biotina; T-PEG-5.000; T-PEG-12.000; y TPC-PEG-5.000. Los péptidos y las proteínas biológicamente activos se pueden pegilar modificando los sitios carboxílicos (por ejemplo, ácido aspártico o grupos de ácido glutámico, además de las terminales carboxílicas). Se ha descrito la utilidad de la PEG-hidrazida en la modificación selectiva de grupos carboxílicos de proteínas activadas por carbodiimida en condiciones ácidas. Otra posibilidad sería modificar el PEG bifuncional de péptidos y proteínas biológicamente activos. En algunos procedimientos, los sitios aminoácidos cargados, entre ellos la lisina, el ácido aspártico y el ácido glutámico, presentan una marcada tendencia a ser accesibles al solvente en superficies proteínicas.

Otras Modificaciones para Estabilizar Principios Activos

Además de la PEGilación, los principios biológicamente activos, tales como los péptidos y las proteínas que pueden ser utilizados en la presente invención, pueden modificarse para mejorar la vida media circulante protegiendo al principio activo mediante la conjugación de otros compuestos protectores y estabilizadores conocidos, por ejemplo, creando proteínas de fusión con un péptido, proteína, análogo o mimético activo fijado a una o más proteínas transportadoras, tales como una o más cadenas de inmunoglobulina.

Formulación y Administración

Las formulaciones de administración mucosa de la presente invención se componen del péptido fijador al receptor de Y2, sus análogos y miméticos, que suelen combinarse con uno o más excipientes farmacéuticos aceptables o con otros fármacos. El o los portadores deben ser "farmacológicamente aceptables" en el sentido de que deben ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no provocar un efecto nocivo inaceptable en el individuo. Dichos portadores ya fueron descritos en la presente, o son bien conocidos para los expertos en farmacología. Es aconsejable que la formulación no incluya sustancias tales como enzimas u oxidantes con los cuales el principio biológicamente activo sea incompatible. Las formulaciones pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos ampliamente conocidos en farmacología.

En las composiciones y los métodos de la invención, las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, sus análogos y miméticos, y otros principios biológicamente activos que se describen en la presente pueden ser administrados mediante varias vías mucosas, por ejemplo oral, rectal, vaginal, intranasal, intrapulmonar, por administración transdérmica, o por administración tópica en los ojos, los oídos, la piel u otras superficies mucosas. También es posible administrar las proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, sus análogos y miméticos, y otros principios biológicamente activos descritos en la presente de manera conjunta o adjunta por vías no mucosas, por ejemplo, vías intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intrauriculares, intrarticulares, intraperitonales o parenterales. En otras realizaciones, los principios biológicamente activos se pueden administrar *ex vivo* por exposición directa a las células, a los tejidos o a los órganos de un mamífero, por ejemplo como compuesto de una formulación para tratar un tejido u órgano *ex vivo* que contiene al principio biológicamente activo en un portador líquido o sólido adecuado.

A menudo, las composiciones acordes con la presente invención se administran en una solución acuosa como un spray nasal o pulmonar, y se pueden aplicar en forma de spray mediante varios métodos conocidos por los entendidos en la materia. Los sistemas preferidos para aplicar líquidos mediante spray nasal están publicados en la Patente de EE.UU. No 4.511.069. Las formulaciones pueden presentarse en envases para dosis múltiples, por ejemplo en el sistema sellado de aplicación publicado en la Patente de EE.UU. 4.511.069. Otras formas de administración por aerosol pueden incluir, por ejemplo, nebulizadores de aire comprimido, de jet, ultrasónicos y piezoeléctricos, que liberan el principio biológicamente activo disuelto o suspendido en un solvente farmacéutico, por ejemplo, agua, etanol o una mezcla de agua y etanol.

Es característico que las soluciones en spray nasal y pulmonar de la presente invención contengan el fármaco, que puede ser formulado con un principio activo superficial como un surfactante no iónico (por ejemplo, polisorbato-80), y uno o más buffers. En algunas realizaciones de la presente invención, la solución del spray nasal también contiene un propelente. El pH de la solución del spray nasal puede oscilar entre pH 3,0 y 6,0, preferentemente 5,0±0,3. Los buffers apropiados que pueden utilizarse en estas composiciones son los ya descritos o los que se conocen en farmacología. Se pueden agregar otros compuestos para aumentar o mantener la estabilidad química, como ser

conservantes, surfactantes, dispersantes o gases. Los conservantes apropiados son el fenol, el metilparabeno, el m-cresol, el timerosal, el clorobutanol, el cloruro de benzalconio, y otros similares, aunque no se limitan a esta enumeración. Los surfactantes apropiados son el ácido oleico, el trioleato sorbitán, los polisorbatos, la lecitina, las fosfatidilcolinas y varios fosfolípidos y diglicéridos de cadena larga, aunque no se limitan a esta enumeración. Los dispersantes adecuados son, sin estar limitados a la siguiente enumeración, el ácido etilenodiamintetraacético y otros similares. Los gases adecuados son el nitrógeno, el helio, los clorofluorocarbonos (CFC), los hidrofluorocarbonos (HFC), el dióxido de carbono, el aire y otros similares, aunque no se limitan a esta enumeración.

En otras realizaciones, las formulaciones de administración mucosa se aplican como polvo seco, el cual contiene al principio biológicamente activo en forma seca, generalmente liofilizada y de un tamaño de partícula adecuada o dentro de un margen de tamaño de partícula adecuado, para la administración por vía intranasal. El tamaño de partícula mínima adecuada para que se deposite dentro del pasaje nasal o pulmonar a menudo tiene un diámetro aerodinámico equivalente de masa media (MMEAD, por su sigla en inglés) de alrededor de 0,5 μ, comúnmente un MMEAD de 1μ, y más comúnmente un MMEAD de 2μ. El tamaño máximo adecuado de la partícula para que se deposite dentro de los pasajes nasales suele ser de alrededor de 10μ de MMEAD, comúnmente de alrededor de 8μ de MMEAD, y más típicamente de alrededor de 4μ de MMEAD. Los polvos inhalables por vía intranasal que se encuentran dentro de estos tamaños pueden fabricarse mediante varias técnicas convencionales, tales como triturado a chorro, secado por spray, precipitación por solvente, condensación líquida supercrítica, y otros similares. Estos polvos secos de MMEAD adecuado pueden ser administrados al paciente por medio de un inhalador convencional para polvo seco, que depende de la respiración del paciente en el momento de la inhalación pulmonar o nasal, para dispersar el polvo en una cantidad aerosolizada. Otra posibilidad sería administrar el polvo seco mediante dispositivos asistidos con aire, que utilizan una fuente de energía externa para dispersar el polvo en una cantidad aerosolizada, por ejemplo, una bomba a pistón.

Los dispositivos de polvo seco comúnmente requieren de una masa de polvo que oscile entre 1 mg a 20 mg para producir una dosis aerosolizada única ("*puff*" o boçanada). Si la dosis necesaria o deseada del principio biológicamente activo es menor que esta cantidad, el principio activo pulverizado generalmente se combina con un engrosador en

polvo seco para proporcionar la masa total de polvo que es necesaria. Los polvos secos engrosadores que se prefieren son la sacarosa, la dextrosa, el manitol, la glicina, la trehalosa, la seroalbúmina humana (HSA) y el almidón. Otros polvos secos engrosadores que son adecuados son la celobiosa, los dextranos, la maltotriosa, la pectina, el citrato de sodio, el ascorbato de sodio, entre otros.

A fin de formular las composiciones para la administración mucosa en el marco de la presente invención, el principio biológicamente activo puede combinarse con varios aditivos farmacéuticamente aceptables, así como también con una base o portador para dispersar al/a los principio(s) activo(s). Los aditivos preferidos son los controladores del pH, como la arginina, el hidróxido de sodio, la glicina, el ácido clorhídrico, el ácido cítrico, etc., aunque no se limitan a esta enumeración. Además, pueden incluirse anestésicos locales (por ejemplo, alcohol bencílico), agentes isotónicos (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol, sorbitol), inhibidores de la absorción (por ejemplo, Tween 80), agentes para aumentar la solubilidad (por ejemplo, ciclodextrinas y derivados), estabilizadores (por ejemplo, seroalbúmina) y reductores (por ejemplo, glutatión). Cuando la composición para la administración mucosa es líquida, la tonicidad de la formulación, medida en referencia a la tonicidad de la solución salina fisiológica al 0,9% (peso/volumen) tomada como unidad, suele ajustarse a un valor que no produzca ningún daño sustancial e irreversible del tejido de la mucosa nasal en el sitio donde se administra dicha formulación. En general, la tonicidad de la solución se ajusta a un valor aproximado de 1/3 a 3, más comúnmente de 1/2 a 2, y más frecuentemente de 3/4 a 1,7.

El principio biológicamente activo puede dispersarse en una base o excipiente, que puede contener un compuesto hidrófilo con la capacidad de dispersar el principio activo y todos los aditivos que se deseen. La base puede elegirse de una amplia gama de excipientes adecuados, que pueden ser, sin estar limitados a la siguiente enumeración, copolímeros de ácidos policarboxílicos o sales de dichos ácidos, anhídridos carboxílicos (por ejemplo, anhídrido maleico) con otros monómeros (por ejemplo, metil (met)acrilato, ácido acrílico), polímeros vinilo hidrófilos como el acetato polivinílico, el alcohol polivinílico, la polivinilpirrolidona, los derivados de la celulosa como hidroximetilcelulosa, la hidroxipropilcelulosa, etc. y polímeros naturales como el quitosan, el colágeno, el alginato de sodio, la gelatiña, el ácido hialurónico y las sales metálicas no tóxicas derivadas de los polímeros naturales. A menudo, se elige un

polímero biodegradable como base o portador, por ejemplo, un ácido poliláctico, un copolímero poli (ácido-glicólico ácido láctico), un ácido polihidroxibutírico, un copolímero poli(ácido-glicólico ácido hidroxibutírico), y mezclas de los mencionados copolímeros. Sea como alternativa o en conjunto, se pueden utilizar como excipientes los ésteres de ácidos grasos sintéticos como los de ácidos grasos poliglicerínicos, los de ácidos grasos sacarosos, etc. Los polímeros hidrófilos y otros excipientes pueden utilizarse solos o combinados, y se puede mejorar la integridad estructural del excipiente mediante la cristalización parcial, el enlace iónico, el entrecruzado, entre otros procedimientos. El portador puede introducirse de varias maneras, por ejemplo, en soluciones viscosas o fluidas , geles, pastas, polvos, microesferas y películas de aplicación directa en la mucosa nasal. El uso de un determinado excipiente en este contexto puede promover la absorción del principio biológicamente activo.

El principio biológicamente activo puede combinarse con la base o el excipiente mediante una variedad de métodos, y la liberación de aquél puede realizarse por difusión, por desintegración del excipiente o por la formulación asociada de los canales de agua. En algunas circunstancias, el principio activo se dispersa en microcápsulas (microesferas) o nanocápsulas (nanoesferas) preparadas a partir de un polímero apropiado, por ejemplo, isobutil 2-cianoacrilato, y dispersadas en un medio de dispersión biocompatible aplicado en la mucosa nasal, que deriva en una administración y una actividad biológica continuas a lo largo de un período prolongado.

Para mejorar aún más la administración mucosa de los fármacos en el marco de la presente invención, las formulaciones que contienen el principio activo también tienen un compuesto hidrófilo de bajo peso molecular como base o excipiente. Estos compuestos hidrófilos de bajo peso molecular proporcionan un medio de paso mediante el cual el principio activo hidrosoluble, como ser una proteína o un péptido fisiológicamente activo, puede esparcirse a través de la base hacia la superficie del cuerpo donde se absorbe el principio activo. El compuesto hidrófilo de bajo peso molecular puede absorber la humedad de la mucosa o la atmósfera en la que se produce la administración y disolver el péptido activo hidrosoluble. Generalmente, el peso molecular del compuesto hidrófilo de bajo peso molecular no es superior a 10.000, y, preferentemente, no superior a 3.000. Son ejemplos de estos compuestos los compuestos de poliol, como los oligosacáridos, los disacáridos y los monosacáridos tales como sacarosa, manitol, sorbitol, lactosa, L-

arabinosa, D-eritrosa, D-ribosa, D-xilosa, D-manosa, tretalosa, D-galactosa, lactulosa, celobiosa, gentibiosa, glicerina y polietilenglicol. Otros ejemplos de compuestos hidrófilos de bajo peso molecular que pueden utilizarse como portadores en la invención son la N-metilpirrolidona y los alcoholes (por ejemplo, el alcohol oligovinílico, etanol, el etilenglicol, el propilenglicol, etc.). Estos compuestos pueden utilizarse solos o combinados entre sí o con otros compuestos activos o inactivos de la formulación intranasal.

Las composiciones de la invención también pueden contener como excipientes farmacéuticamente aceptables, sustancias que son necesarias para obtener condiciones fisiológicas, tales como buffers y controladores del pH, tonificantes, hidratantes y otros similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaureato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc. Para composiciones sólidas, se pueden utilizar excipientes atóxicos convencionales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio de grados farmacéuticos, entre otros.

Las composiciones terapéuticas para administrar el principio biológicamente activo también pueden formularse como una solución, una microemulsión u otra estructura que pueda contener una alta concentración de ingredientes activos. El portador puede ser un solvente o un medio de dispersión, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y otros similares) y mezclas apropiadas de los mencionados. La fluidez adecuada de las soluciones puede mantenerse, por ejemplo, aplicando un revestimiento, como ser de lecitina, manteniendo un tamaño de partícula deseado en el caso de formulaciones dispersables y agregando surfactantes. En muchos casos, es aconsejable incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. La absorción prolongada del principio biológicamente activo puede obtenerse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, gelatina y sales de monoestearato.

En ciertas realizaciones de la invención, el principio biológicamente activo se administra en una formulación de liberación controlada, por ejemplo, en una composición

que incluye un polímero de liberación lenta. El principio activo puede prepararse con excipientes que actuarán como protectores contra la liberación rápida, por ejemplo, un excipiente de liberación controlada como un polímero, un sistema de administración microencapsulada o un gel bioadhesivo. La administración prolongada del principio activo en varias composiciones de la invención puede obtenerse incluyendo en ella agentes que retardan la absorción, por ejemplo, gelatina e hidrogeles de monoesterato de aluminio. Cuando se pretende obtener formulaciones de administración controlada del principio biológicamente activo, los enlaces de administración controlada que son apropiados para ser utilizados en la invención son todas las sustancias de liberación controlada biocompatibles que sean inertes al principio activo y que tengan la capacidad de incorporar el principio biológicamente activo. Varias de estas sustancias son conocidas en farmacología. Los aglutinantes de liberación controlada son sustancias que se metabolizan lentamente en condiciones fisiológicas tras la administración por vía intranasal (por ejemplo, en la superficie mucosa nasal, o en presencia de fluidos corporales tras la administración transmucosa). Los aglutinantes adecuados pueden ser, aunque no exclusivamente, polímeros y copolímeros biocompatibles, utilizados previamente en farmacología en formulaciones de liberación prolongada. Estos compuestos biocompatibles son atóxicos e inertes a los tejidos circundantes, y no desencadenan efectos adversos significativos tales como irritación nasal, respuesta inmune, inflamación, entre otros. Se metabolizan en productos metabólicos que también son biocompatibles y son eliminados fácilmente del organismo.

Entre las sustancias poliméricas que pueden utilizarse en este contexto se incluyen, sin estar limitadas a la siguiente enumeración, las matrices poliméricas derivadas de poliésteres copoliméricos y homopoliméricos que tienen uniones de éster hidrolizables. En el arte, se sabe que varias de estas sustancias son biodegradables y que derivan en productos de degradación de escasa o ninguna toxicidad. Algunos ejemplos de estos polímeros son los siguientes: ácidos poliglucólicos (PGA) y ácidos polilácticos (PLA), poli(ácido DL-láctico-ácido-co-glucólico) (DL PLGA), poli(ácido D-láctico-ácido-co-glucólico) (D PLGA) y poli(ácido L-láctico-ácido-co-glicólico) (L PLGA). Otros polímeros biodegradables o bioerosionables de utilidad son, entre otros, los siguientes: poli (epsilon-caprolactona), poli (epsilon-aprolactona-CO-ácido láctico), poli (ε-aprolactona-CO-ácido glicólico), poli (beta-hidroxi ácido butírico), poli (alquil-2-cianoacrilato), hidrogeles tales como el poli (hidroxietil metacrilato), poliamidas, poli

(aminoácidos) (por ejemplo, la L-leucina, el ácido glutámico, el ácido L-aspártico, y otros similares), poli (éster de urea), poli (2-hidroxietil DL-aspartamida), polímeros de poliacetal, poliortoésteres, policarbonato, polimaleamidas, polisacáridos y copolímeros derivados de los polímeros mencionados. En general, existen muchos métodos para preparar estas formulaciones, que son conocidas por los expertos en la materia. Otras formulaciones útiles son las composiciones de administración controlada, por ejemplo, las microcápsulas, Patente de EE.UU. No· 4.652.441 y 4.917.893, los copolímeros ácido-glucólico ácido-láctico que son de utilidad para elaborar microcápsulas y otras formulaciones, Patente de EE.UU. No 4.677.191 y 4.728.721, y composiciones de administración prolongada para péptidos hidrosolubles, Patente de EE.UU. No 4.675.189.

Las soluciones estériles se pueden preparar incorporando la cantidad indicada del compuesto activo a un solvente adecuado con uno de los ingredientes enumerados anteriormente o una combinación de ellos, según sea necesario, y luego esterilizando el preparado mediante filtro. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un excipiente estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros ingredientes indicados, que se encuentran entre los ya mencionados. En el caso de los polvos estériles, los métodos de preparación incluyen secado al vacío y en frío, procesos que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional a partir de una solución previamente esterilizada con filtro. Se puede prevenir la acción de microorganismos mediante varios agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares.

La administración por vía mucosa propuesta por la presente invención permite a los pacientes realizar un tratamiento de autoadministración, siempre que se tomen suficientes precauciones para controlar la dosis y los efectos secundarios. La administración mucosa también carece de las desventajas de otras formas de administración, tales como las inyecciones, que son dolorosas, exponen al paciente a posibles infecciones y pueden presentar problemas de biodisponibilidad de la droga. Para la administración por vía nasal y pulmonar, son bien conocidos los sistemas de aplicación controlada por aerosol de líquidos terapéuticos mediante un pulverizador. En una realización, se liberaron dosis fijas del principio activo a través de una válvula por bomba mecánica construida especialmente, Patente de EE.UU. No 4.511.069.

Dosificación

Con fines preventivos y terapéuticos, el/los agente(s) biológicamente activo(s) descrito(s) en la presente puede(n) administrarse mediante un único bolo continuo (por ejemplo, por vía transdérmica, mucosa o intravenosa) durante un período de tiempo prolongado, o según un protocolo de administración reiterada (por ejemplo, un protocolo de administración horaria, diaria o semanal). En este contexto, una dosis terapéuticamente eficaz de los principios biológicamente activos puede constar de dosis reiteradas durante un régimen preventivo o terapéutico prolongado que tendrá resultados significativos en cuanto al alivio de uno o más síntomas o afecciones detectables asociadas a una determinada enfermedad o afección, como ya se describió. En este contexto, la forma típica de determinar las dosis terapéuticas eficaces se basa en los estudios con modelos de animales seguidos de pruebas clínicas en humanos y se guía por la determinación de dosis eficaces y protocolos de administración que reducen significativamente la posibilidad de que se produzcan o se agraven en el sujeto los síntomas de la enfermedad o las afecciones en estudio. A este respecto, son modelos apropiados, por ejemplo, los murinos, ratas, porcinos, felinos, primates no humanos, y otros modelos animales conocidos en farmacología. Otra posibilidad sería determinar las dosis eficaces utilizando modelos *in vitro* (por ejemplo, análisis inmunológicos e histopatológicos). Utilizando dichos modelos, en general sólo se requieren cálculos y ajustes comunes para determinar una dosis y una concentración adecuadas a fin de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del/de los agente(s) biológicamente activo(s) (por ejemplo, cantidades que sean eficaces en dosis intranasales, transdérmicas, intravenosas o intramusculares para provocar una respuesta determinada).

Desde luego, la dosis real de principios biológicamente activos sufrirá variaciones de acuerdo con factores tales como la indicación de la enfermedad y el estado particular del individuo (por ejemplo, la edad, el tamaño, el estado de salud, la gravedad de los síntomas, los factores de sensibilidad, etc.), el momento y la vía de administración, otros fármacos o tratamientos que se le estén administrando en forma simultánea, así como la farmacología específica del/de los agente(s) biológicamente activo(s) para provocar una determinada actividad o respuesta biológica en el individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse a fin de proporcionar una óptima respuesta preventiva o terapéutica. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquélla en la que, en términos clínicos, los efectos beneficiosos compensan todos los efectos secundarios

tóxicos o perjudiciales que pueda provocar el principio biológicamente activo. La cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista del Y2, en el marco de los métodos y las formulaciones de la presente invención, se ubica entre 0,7µg/kg y alrededor de 25µg/kg (este margen no es limitante). A fin de estimular el adelgazamiento, se administra el péptido fijador al receptor de Y2 en una dosis intranasal lo suficientemente alta para provocar saciedad, pero lo suficientemente baja para no causar efectos secundarios indeseables, por ejemplo, náuseas. Una dosis aconsejable de PYY_{3-36} es de alrededor de 1 µg – 10 µg/kg de peso del paciente, más preferentemente entre 1.5 µg/kg y 3 µg/kg de peso del paciente. La dosis convencional se ubica entre 50 µg y 1600µg, más preferentemente entre 75 µg y 800 µg, y aun más preferentemente entre 100µg, 150 µg, 200 µg y alrededor de 400 µg. Otra posibilidad, a fin de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un principio biológicamente activo dentro de los métodos y las formulaciones de la invención, sería una dosis ubicada entre aproximadamente 0,001 pmol hasta aproximadamente 100 pmol por kg de peso, entre 0,01 pmol hasta 10 pmol por kg de peso, entre 0,1 pmol hasta aproximadamente 5 pmol por kg de peso, o entre aproximadamente 0,5 pmol hasta 1,0 pmol por kg de peso. Las dosis ubicadas dentro de esos márgenes pueden obtenerse por medio de administraciones únicas o múltiples, por ejemplo, varias administraciones diarias, o administraciones diarias o semanales. Cada vez que se administra la dosis, es aconsejable proporcionar al menos un microgramo del principio biológicamente activo (por ejemplo, una o más proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, sus análogos y miméticos y otros principios biológicamente activos), si bien lo más frecuente es administrar dosis de aproximadamente 10 µg a 5,0 mg, y en ciertas realizaciones, de aproximadamente 100 µg a 1,0 o 2,0 mg a un individuo humano promedio. Para ciertas aplicaciones orales, es posible que sean necesarias dosis de hasta 0,5 mg por kilogramo de peso corporal para obtener la concentración plasmática necesaria. También es importante destacar que es preciso definir y ajustar los regímenes de dosificación a cada sujeto en particular con el paso del tiempo, de acuerdo con las necesidades individuales y con el criterio profesional de quien administra o supervisa la dosis del/de los péptido(s) penetrabilizante(s) y de otro(s) principio(s) biológicamente activo(s). Una dosis intranasal de un PYY variará desde 50 µg a 1600µg de PYY, preferiblemente 75µg a 800µg, más preferiblemente 100µg a 400µg; estando una dosis más preferida se encuentra entre 100 µg y 200µg; estando considerada una dosis de 150µg como altamente efectiva. Un protocolo de administración reiterada por vía intranasal con las formulaciones de la invención, según un esquema que oscile entre

aproximadamente 0,1 y 24 horas entre cada dosis, preferentemente entre 0,1 y 2 horas, mantiene niveles terapéuticos normalizados y continuos del péptido fijador al receptor de Y2 con el objeto de maximizar los beneficios clínicos, al tiempo que minimiza los riesgos por exposición excesiva y los efectos secundarios. Esta dosis puede administrarse varias veces al día, preferentemente media hora antes de las comidas o cuando se sienta hambre para promover saciedad.

La posología de agonistas de Y2 tales como el PYY puede ser variada por el médico a cargo o el paciente siempre que se estuviera autoadministrando una presentación del fármaco sin prescripción para mantener una concentración adecuada en la zona seleccionada, .

En otra realización, la invención proporciona composiciones y métodos para la administración intranasal del péptido fijador al receptor de Y2, en los cuales el/los compuesto(s) es/son administrados a repetición mediante un protocolo de administración intranasal eficaz que comprende múltiples administraciones de dicho péptido aplicadas al sujeto con frecuencia diaria o semanal, a fin de mantener una concentración pulsátil eficaz tanto elevada como reducida del péptido fijador al receptor de Y2 durante un extenso intervalo de dosificación. Las composiciones y los métodos proporcionan compuestos del péptido fijador al receptor de Y2 que el individuo puede autoadministrarse en una formulación para la vía nasal entre dos y seis veces por día a fin de mantener una concentración pulsátil eficaz tanto elevada como reducida de dicho péptido durante un intervalo de administración de 8 a 24 horas.

Kits

La presente invención también incluye kits, envases y unidades de envases múltiples que contienen las composiciones farmacológicas ya descritas, ingredientes activos y/o medios para administrar estas sustancias con el objeto de prevenir y tratar enfermedades y otras afecciones en los mamíferos. En resumen, estos kits incluyen un envase o formulación que contiene una o más proteínas del péptido fijador al receptor de Y2, análogos y miméticos, y/u otros principios biológicamente activos combinados con promotores de la administración mucosa descritos en la presente formulados en una preparación farmacológica para la administración por vía mucosa.

Las formulaciones de la presente invención que se aplican por vía intranasal pueden administrarse utilizando un pulverizador o una jeringa. Un ejemplo de pulverizador para la vía nasal es "la Bomba de Spray Nasal con Precinto", Pfeiffer SAP nº 60548, que administra una dosis de 0,1ml por chorro y cuyo aplicador tiene una longitud de 36,05 mm. Puede adquirirse en Pfeiffer of America of Princeton, NJ. Las dosis por vía intranasal del péptido fijador al receptor de Y2, tal como el PYY, pueden oscilar entre 0,1 µg/kg y aproximadamente 1500 µg/kg. Cuando la dosis es por pulverización intranasal, es preferible que el tamaño de partícula de la pulverización sea de 10-100 µm (micrones), preferentemente de 20-100 µm.

A fin de estimular la pérdida de peso, se administra una dosis intranasal del péptido PYY fijador al receptor de Y2 lo suficientemente alta para provocar saciedad pero lo suficientemente baja para que no cause ningún efecto secundario indeseable, por ejemplo, náuseas. Una dosis intranasal aconsejable del péptido fijador al receptor de Y2, por ejemplo, del PYY (3-36), es de aproximadamente 3-10 µ/kg de peso del paciente, más preferentemente alrededor de 6 µg/kg. Una dosis convencional es de 50 µg a 800 µg, y más preferentemente de alrededor de 100 µg a 400 µg, más preferentemente 150 µg hasta aproximadamente 200 µg. Un péptido fijador al receptor de Y2 tal como el PYY(3-36) se administra preferentemente al menos entre diez minutos y una hora antes de comer a fin de prevenir las náuseas, pero no más de aproximadamente 12 a 24 horas antes de las comidas. La dosis se administra al menos una vez al día, preferentemente antes de cada comida, hasta que el paciente haya perdido el peso deseado. Luego se le administran dosis de mantenimiento al menos una vez por semana, pero preferentemente una vez por día. a fin de mantener la pérdida del peso.

Como lo demuestra la información proporcionada por los siguientes ejemplos, se descubrió que, cuando se administra la formulación del péptido fijador al receptor de Y2 a humanos por vía intranasal, el PYY(3-36) reduce el apetito. Los ejemplos también demuestran que, por primera vez, pudieron obtenerse niveles fisiológicos posprandiales de un péptido PYY tras la administración intranasal de las formulaciones del péptido fijador al receptor de Y2 de la presente invención, en la cual dicho péptido fue PYY(3-36).

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo ilustrativo, pero no son limitantes:

EJEMPLO 1

Se elaboró y evaluó un ejemplo de formulación nasal para mejorar la administración por vía mucosa del péptido YY según el siguiente cuadro:

CUADRO 1

Composición de la Formulación del Péptido YY

Formulaciones	Péptido YY_{3-36} por muestra de 100 ml	Agente que mejora la administración por vía mucosa
A	60 µg	Solución salina regulada de fosfato (0,8%) pH 7,4 (Control 1)
B	60 µg	Solución salina regulada de fosfato (0,8%) pH 5,0 (Control 2)
C	60 µg	L-Arginina (10% peso/volumen)
D	60 µg	Poli-L-Arginina (0,5% peso/volumen)
E	60 µg	Gama-Ciclodextrina (1% peso/volumen)
F	60 µg	α-Ciclodextrina (5% peso/volumen)
G	60 µg	Metil-β-Ciclodextrina (3% peso/volumen)
H	60 µg	Sal sódica del ácido n-caproico (0,075% peso/volumen)
I	60 µg	Quitosan (0,5% peso/volumen)
J	60 µg	Didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (3,5% peso/volumen)
K	60 µg	S-Nitroso-N-acetilo-Penicilamina (0,5% peso/volumen)
L	60 µg	Palmitoil-DL-Carnitina (0,02% peso/volumen)
M	60 µg	Pluronic-127 (0,3% peso/volumen)
N	60 µg	Nitroprusiato sódico (0,3% peso/volumen)
O	60 µg	Glucocolato sódico (1% peso/volumen)
P	60 µg	F1: Gelatina, DDPC, MBCD, EDTA
F 1		Didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (0,5% peso/volumen) Metil β ciclodextrina (3% peso/volumen) EDTA (0,1% peso/volumen, Inf. Conc. 0,5 M) Gelatina (0,5% peso/volumen)

EJEMPLO 2

Administración por Vía Mucosa Nasal: Citotoxicidad y Farmacocinética

1. Modelo organotípico

Los siguientes métodos suelen ser de utilidad para evaluar los parámetros, la farmacocinética y los efectos secundarios de la administración en la mucosa nasal del péptido YY en las formulaciones y los métodos de la invención, así como para determinar la eficacia y las características de varios agentes que mejoran la administración intranasal descritos en la presente contenidos en formulaciones combinatorias o en administración conjunta con el péptido YY.

La farmacocinética y la citotoxicidad también son de utilidad para determinar la eficacia y las características de varios agentes que mejoran la absorción mucosa descritos en la presente para las formulaciones combinadas y la administración conjunta con agentes que mejoran la absorción mucosa. En un protocolo ejemplificador, se demuestran tanto la farmacocinética como la ausencia de citotoxicidad inaceptable para un agente que mejora la absorción intranasal, tal como ya se describió, en combinación con un fármaco biológicamente activo, ejemplificado por el péptido YY.

MatTek Corp (Ashland, MA) desarrolló el sistema EpiAirway como un modelo del epitelio seudoestratificado que recubre las vías respiratorias. Las células epiteliales se cultivan en piezas de inserción porosas de cultivos de células de base membranosa en una interfase líquidoaérea, que deriva en la diferenciación de las células de una morfología muy polarizada. La superficie apical está ciliada con una ultraestructura microvellosa y el epitelio produce mucosidad (la prueba de inmunotransferencia (*immunoblotting*) confirmó la presencia de mucina). Las piezas de inserción tienen un diámetro de 0,875 cm, lo que proporciona un área de superficie de 0,6 cm^2. Las células se colocan sobre las piezas de inserción en la fábrica, aproximadamente tres semanas antes de ser enviadas. Un "kit" contiene 24 unidades.

A. Al llegar a destino, las unidades se colocan sobre soportes estériles en microplacas de 6 orificios. Cada orificio recibe 5 ml del medio de cultivo patentado. Este medio con base DMEM carece de suero pero está complementado con factores de crecimiento epidérmico y otros. El medio siempre es sometido a pruebas para determinar la concentración endógena de cualquier citosina o factor de crecimiento –que se considera para la administración intranasal– pero ha sido despojado de todas las citosinas y factores estudiados hasta la fecha, a excepción de la insulina. El volumen de 5 ml es suficiente para obtener un contacto con la base de las unidades en sus ubicaciones, pero la superficie

apical del epitelio puede permanecer en contacto directo con el aire. En esta etapa, y en todas las etapas subsiguientes que impliquen la transferencia de unidades a orificios que contengan líquido, se utilizan pinzas estériles a fin de que no quede aire atrapado entre el fondo de las unidades y el medio.

B. Las unidades se mantienen en sus placas a 37 °C en una incubadora, con una atmósfera de 5% CO_2 en aire durante 24 horas. Al concluir este período, se reemplaza el medio con uno nuevo y se regresan las unidades a la incubadora durante otras 24 horas.

2. Protocolo Experimental: Cinética de la Penetración

A. Siempre puede utilizarse un "kit" de 24 unidades EpiAirway para evaluar cinco formulaciones diferentes, cada una de las cuales se aplica para cuadruplicar los orificios. Cada orificio se utiliza para determinar la cinética de la penetración (4 puntos temporales), la resistencia transepitelial, la actividad de la reductasa mitocondrial medida mediante reducción de MTT y la citólisis medida mediante administración de LDH. Se utiliza otro grupo de orificios como control sometidos a simulación (*sham treatment*) en cuanto a la determinación de la farmacocinética, pero tratados de manera idéntica a las unidades que contienen muestras para pruebas a fin de determinar la resistencia y la viabilidad transepitelial. Las determinaciones de los controles también se realizan rutinariamente en unidades cuadruplicadas, pero a veces se emplean unidades triplicadas para dichos controles, y las cuatro restantes del kit quedan destinadas a medir la resistencia y la viabilidad transepitelial en las unidades no tratadas o se congelan y luego descongelan las unidades para determinar la concentración total de LDH, lo que sirve de referencia para la citólisis de 100%.

B. En todos los experimentos, la formulación de administración mucosa nasal en estudio se aplica sobre la superficie apical de cada unidad en un volumen de 100 µl, cantidad que es suficiente para cubrir toda la superficie apical. Se separa un volumen adecuado de la formulación de prueba en la concentración aplicada sobre la superficie apical (en general, no se necesitan más de 100 µl) para luego determinar la concentración de la sustancia activa mediante el método ELISA u otro análisis designado.

C. Para efectuar el experimento, las unidades se colocan en placas de 6 orificios sin soportes: cada orificio contiene 0,9 ml del medio, que es suficiente para hacer contacto con la base de la membrana porosa de la unidad, pero que no genera en ésta ningún tipo de presión hidroestática ascendente significativa.

D. A fin de minimizar posibles fuentes de error y de evitar la formación de gradientes de concentración, las unidades se transfieren de un orificio con 0,9 ml hacia otro, en cada punto temporal del estudio. Dichas transferencias se realizan en los siguientes puntos temporales, a partir del momento de partida durante el cual se aplica un volumen de 100 µl del material de prueba sobre la superficie apical: 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos.

E. Entre cada punto temporal, las unidades se mantienen en sus placas en una incubadora a 37 °C. Las placas que contienen 0,9 ml del medio por orificio también se mantienen en la incubadora, de manera que sea mínimo el cambio de temperatura que se produzca durante los breves períodos en que se cambian las placas, y las unidades se transfieren de un orificio a otro utilizando pinzas estériles.

F. Al concluir cada punto temporal, se retira el medio del orificio del cual se transfirió cada unidad y se separa en dos tubos (en uno se colocan 700 µl y en el otro 200µl) para determinar la concentración del material de prueba penetrable, en el caso de que dicho material sea citotóxico, para liberar del epitelio la enzima citosólica, la deshidrogenasa láctica. Estas muestras se mantienen en la heladera si los análisis se llevan a cabo dentro de las 24 horas siguientes o, de lo contrario, se separan y se congelan a -80 °C hasta que se descongelan una única vez para efectuar los análisis. No es aconsejable congelar y descongelar las muestras varias veces.

G. A fin de minimizar los errores, deben etiquetarse todos los tubos, placas y orificios antes de comenzar con el experimento.

H. Al concluir el punto temporal de 120 minutos, las unidades se transfieren del último de los orificios que contiene 0,9 ml hacia las microplacas de 24 orificios, que contienen 0,3 ml del medio por orificio. Una vez más, este volumen es suficiente para hacer contacto con la base de las unidades, pero no para ejercer presión hidroestática ascendente sobre éstas. Las unidades se vuelven a colocar en la incubadora antes de medir la resistencia transepitelial.

3. Protocolo Experimental: Resistencia Transepitelial

A. Tanto *in vivo* como *in vitro,* las células epiteliales de las vías respiratorias forman uniones estrechas, que restringen el flujo de solutos a través del tejido. Estas uniones confieren una resistencia epitelial de varios cientos de ohmios por cm^2 en tejidos extirpados de las vías respiratorias; en las unidades MatTek EpiAirway, la resistencia transepitelial (TER) de rutina es, según su fabricante, de alrededor de 1.000 ohmios por cm^2. Hemos descubierto que la TER de las unidades de control EpiAirway sometidas a simulación durante la secuencia de etapas del estudio de penetrabilidad es algo menor (700-800 ohms por cm^2), pero, dado que la penetrabilidad de pequeñas moléculas es inversamente proporcional a la TER, este valor sigue siendo suficientemente alto para proporcionar una barrera importante a la penetración. Sin embargo, las unidades de base membranosa porosa sin células sólo proporcionan una resistencia transmembranosa mínima (5-20 ohmios por cm^2).

B. Para determinar la TER con precisión es preciso que los electrodos del óhmetro estén colocados sobre un área significativa de la superficie, encima y debajo de la membrana, y que la distancia entre los electrodos y la membrana esté controlada de manera reproducible. El método recomendado por MatTek para determinar la TER, y empleado en todos los experimentos descritos en la presente, utiliza un voltóhmetro epitelial "EVOM"™ y una cámara de medición de resistencia tisular "ENDOHM"™, fabricados por World Precision Instruments Inc., Sarasota, Florida.

C. Inicialmente, la cámara se llena con solución salina regulada con fosfato (PBS) Dulbecco durante al menos 20 minutos antes de determinar la TER a fin de equilibrar los electrodos.

D. La determinación de la TER se realiza con 1,5 ml de PBS en la cámara y 350 µl de PBS en la unidad de base membranosa que se está midiendo. El electrodo superior se coloca justo encima de la membrana de una unidad carente de células (que contiene 350 µl de PBS) y luego se fija para asegurar una posición reproducible. La resistencia de una unidad sin células es, por lo general, de 5-20 ohmios por cm^2 ("resistencia de fondo").

E. Una vez que la cámara está preparada y que se registró la resistencia de fondo, se sacan de la incubadora las unidades que están colocadas en una placa de 24 orificios y que se han utilizado para determinar la penetración, y se colocan por separado en la cámara para determinar la TER.

F. Primero se transfiere cada unidad a una placa de Petri que contiene PBS a fin de que esté humedecida la base membranosa. Se agrega una porción de 350 µl de PBS a la unidad, y luego se la aspira cuidadosamente con un tubo rotulado para enjuagar la superficie apical. Luego se realiza un segundo lavado de 350 µl de PBS y se aspira con el mismo tubo recolector.

G. Se seca suavemente la unidad para quitarle el exceso de PBS de la superficie exterior poco antes de colocarla dentro de la cámara (que contiene una nueva porción de PBS de 1,5 ml). Se agrega una porción de 350 µl de PBS a la unidad antes de colocar el electrodo superior en la cámara, y se lee la TER en el voltóhmetro EVOM.

H. Después de leer la TER de la unidad en la cámara ENDOHM, se saca la unidad, se aspira y se guarda el PBS, y se vuelve a colocar la unidad con una interfase aérea sobre la superficie apical, en una placa de 24 orificios que contiene 0,3 ml del medio por orificio.

I. Las unidades se leen de acuerdo con la siguiente secuencia: todos los controles sometidos a simulación, seguidos de todas las muestras tratadas con las formulaciones, seguidas de una segunda lectura de la TER de cada uno de los controles sometidos a simulación. Después de haber concluido con todas las determinaciones de la TER, las unidades colocadas en la microplaca de 24 orificios se vuelven a poner en la incubadora para determinar la viabilidad mediante reducción de MTT.

4. Protocolo Experimental: Viabilidad por Reducción de MTT

El MTT es una sal de tetrazolio penetrable en las células que se reduce a un tinte formazán insoluble por actividad de la deshidrogenasa mitocondrial mediante células viables con función mitocondrial intacta, o mediante actividad de la deshidrogenasa NAD(P)H no mitocondrial a partir de células capaces de generar un estallido respiratorio. La formación de formazán es un buen indicador de la viabilidad de las células epiteliales, dado que dichas células no generan un estallido respiratorio significativo. Hemos

utilizado un kit de reactivos MTT preparado por MatTek Corp para sus unidades, a fin de evaluar la viabilidad.

A. El reactivo MTT se fabrica como un concentrado y se diluye en un diluyente con base de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) el día en que se va a realizar el análisis de viabilidad (por lo general, la tarde del día en el que, durante la mañana, se determinaron la TER y la farmacocinética). El reactivo insoluble se elimina antes de utilizar el preparado mediante centrifugado breve. La concentración final de MTT es de 1 mg/ml.

B. Se agrega la solución final de MTT en los orificios de una microplaca de 24 orificios, con un volumen de 300 µl por orificio. Tal como se señaló anteriormente, este volumen es suficiente para hacer contacto con las membranas de las unidades EpiAirway, pero no ejerce ninguna clase de presión hidroestática significativa sobre las células.

C. Las unidades se quitan de la placa de 24 orificios en la que se habían colocado después de realizar las mediciones de la TER, y, luego de eliminar todo exceso de líquido de la superficie exterior, se las transfiere a la placa que contiene el reactivo MTT. Las unidades de la placa se colocan luego en una incubadora a 37 °C con una atmósfera de 5% CO_2 en aire durante 3 horas.

D. Al concluir la incubación de 3 horas, se observará que las unidades que contienen células viables han adquirido un color notoriamente morado. El formazán insoluble debe extraerse de las células en sus unidades, a fin de cuantificar el grado de reducción de MTT. La extracción de formazán se realiza transfiriendo las unidades a una microplaca de 24 orificios que contiene 2 ml de solución para extracción por orificio, después de eliminar el exceso de líquido de la superficie exterior de las unidades, tal como se procedió previamente. Este volumen es suficiente para cubrir por completo tanto la membrana como la superficie apical de las unidades. El proceso de extracción avanza durante la noche a temperatura ambiente, y dentro de una cámara que no deje pasar la luz. Las soluciones de MTT tradicionalmente contienen altas concentraciones de detergente, y destruyen las células.

E. Al concluir el proceso de extracción, el fluido contenido dentro de cada unidad y el que se encuentra en el orificio circundante se combinan y se transfieren a un tubo

para luego separarlas por alícuotas en una microplaca de 96 orificios (son óptimas las porciones de 200 µl) y determinar su absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro con microplaca multihueca VMáx. Para garantizar que la turbidez provocada por los desechos de las unidades no aumente la absorbancia, también se determina la absorbancia de 650 nm de cada orificio en VMáx y se resta automáticamente de la absorbancia a 570 nm. El "blanco" para determinar la absorbancia de formazán es una porción de 200 µl de solución de extracción, al cual no se ha expuesto a ninguna de las unidades. Se presume que este valor de absorbancia representa una viabilidad cero.

F. De cada kit de 24 unidades EpiAirway, dos se dejan sin tratar durante la determinación de la TER y de la farmacocinética. Estas unidades se utilizan como control positivo para el 100% de viabilidad de las células. En ninguno de los estudios realizados se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad de las células de estas unidades no tratadas, en comparación con las células de control que han sido tratadas con simulación para determinar la farmacocinética y en los cuales se han realizado las determinaciones de la TER. Se presume que la absorbancia de todas las unidades tratadas con formulaciones de prueba son linealmente proporcionales a la viabilidad porcentual de las células de las unidades registrada en el momento de la incubación con MTT. Es importante destacar que este análisis no suele efectuarse antes de transcurridas cuatro horas de haber colocado el material de prueba sobre la superficie apical y de haber enjuagado la superficie apical de las unidades durante la determinación de la TER.

5. Determinación de la Viabilidad Mediante la Liberación de LDH

En tanto que la medición de la actividad de la reductasa mitocondrial por reducción de MTT es una investigación que mide con exactitud la viabilidad celular, el análisis necesariamente destruye las células y, por lo tanto, sólo puede realizarse al final de cada estudio. Cuando las células se necrotizan, el contenido citosólico se derrama en el medio circundante, en el cual pueden detectarse las enzimas citosólicas, como la deshidrogenasa láctica (LDH, sigla en inglés). Puede efectuarse un análisis para detectar la LDH en muestras del medio extraídas en cada punto temporal que tiene la determinación de la farmacocinética, que dura 2 horas. Por lo tanto, también es posible detectar los efectos citotóxicos de las formulaciones, que no aparecen hasta que no ha

pasado un lapso significativo, así como los efectos de las formulaciones que provocan citólisis en los primeros escasos minutos de exposición al epitelio de las vías respiratorias.

A. El análisis recomendado para detectar la LDH a fin de evaluar la citólisis de las unidades EpiAirway se basa en la conversión del lactato en piruvato con generación de NADH a partir de NAD. Luego se reoxida el NADH junto con la reducción simultánea del INT de sal de tetrazolio, catalizado mediante una preparación cruda de "diaforasa". El formazán obtenido por la reducción de INT es soluble, de manera que el análisis completo para determinar la actividad de la LDH puede realizarse en un medio acuoso homogéneo que contenga lactato, NAD, diaforasa e INT.

B. El análisis para determinar la actividad de la LDH se realiza en porciones de 50 µl a partir de muestras del medio "sobrenadante" que rodean a una unidad EpiAirway y recolectadas en cada punto temporal. Se almacenaron estas muestras en la heladera durante no más de 24 horas, o se las descongeló después de ser congeladas al cabo de escasas horas después de la recolección. Cada unidad EpiAirway genera muestras del medio sobrenadante recolectadas a los 15 minutos, 30 minutos, 1 hora y 2 horas tras aplicar el material de prueba. Se transfieren todas las porciones a una microplaca de 96 orificios.

C. Una porción de 50 µl del medio que no ha sido expuesta a una unidad sirve como control negativo o "blanco" del 0% de citotoxicidad. Hemos descubierto que el nivel aparente de LDH "endógena" que se encuentra después de provocar la reacción de la mezcla del reactivo del análisis con el medio no expuesto es el mismo dentro del error experimental que el nivel de LDH aparente liberado por todas las unidades de control sometidas a simulación durante las 2 horas necesarias para evaluar la farmacocinética. Por lo tanto, dentro del error experimental, estas unidades sometidas a simulación no muestran citólisis de las células epiteliales durante el lapso en que se realizaron las pruebas farmacocinéticas.

D. Para preparar una muestra de un medio sobrenadante que refleje el nivel de LDH liberado después de que se hayan destruido el 100% de las células de una unidad, se agrega una unidad que no haya sido manipulada previamente en un orificio de una microplaca de 6 orificios que contenga 0,9 ml del medio de cultivo como en el protocolo para determinar la farmacocinética, la placa que contiene la unidad se congela a -80 °C y el contenido del orificio se deja descongelar. Este ciclo de congelamiento y

descongelamiento destruye con eficacia las células y libera el contenido citosólico celular, incluida la LDH, en el medio sobrenadante. Se agrega una porción de 50 µl del medio de las células congeladas y descongeladas a una placa de 96 orificios como control positivo que refleje el 100% de citotoxicidad.

E. Se agrega una porción de 50 µl del reactivo LDH del análisis a cada orificio que contenga una porción del medio sobrenadante. Luego, la placa se deja incubar durante 30 minutos en la oscuridad.

F. Se concluye con las reacciones agregando una solución de 1 m de ácido acético, y una hora después se determina la absorbancia de la placa a 490 nm.

G. El cálculo del porcentaje de citólisis se basa en el supuesto de que hay una relación lineal entre la absorbancia y la citólisis: la absorbancia obtenida del medio es la única referencia del 0% de citólisis y la obtenida del medio que circunda a una unidad congelada y descongelada es la referencia del 100% de citólisis.

6. Determinaciones con el Método ELISA

Los procedimientos para determinar la concentración de los principios biológicamente activos como materiales de prueba empleados para evaluar la mejora de la penetración de principios activos junto con la administración conjunta de los agentes que mejoran la administración mucosa o la formulación combinatoria de la invención generalmente son los ya descriptos y concuerdan con los métodos conocidos y con las instrucciones específicas del fabricante del ELISA utilizado para cada análisis en particular. La farmacocinética del principio biológicamente activo generalmente se determina tomando medidas en varios puntos temporales (por ejemplo, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos) después de que el principio biológicamente activo toma contacto con la superficie celular del epitelio apical (que puede ser simultánea o posterior a la exposición de la superficie celular apical al/a los agente(s) que mejoran la administración mucosa).

Los procedimientos que determinan la concentración del péptido YY, del neuropéptido Y, y del péptido pancreático en el suero sanguíneo, en los tejidos o fluidos del SNC, en el líquido cefalorraquídeo, o en otros tejidos o fluidos de un mamífero, pueden utilizar un inmunoanálisis del péptido YY, del neuropéptido Y y del péptido pancreático. Los procedimientos que determinan la concentración del péptido YY, del

neuropéptido Y y del péptido pancreático como materiales de prueba para evaluar la mejora de la penetrabilidad de los principios activos junto con la administración conjunta de los agentes que potencian la absorción mucosa o con formulaciones combinatorias propuestas por la presente invención generalmente son los ya descritos, que son acordes a los métodos conocidos y las instrucciones del fabricante para los radioinmunoanálisis (RIA), los inmunoanálisis enzimáticos (EIA) y los reactivos anticuerpos para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia a fin de detectar el péptido YY, el neuropéptido Y y el péptido pancreático. Bachem AG (King of Prussia, PA).

Las membranas tisulares EpiAirway™ se cultivan en rojo de fenol y un medio sin hidrocortisona (MatTek Corp, Ashland, MA). Las membranas tisulares se cultivan a 37 °C durante 48 horas, para permitir que se equilibren los tejidos. Cada membrana tisular se coloca en un orificio de una placa de 6 orificios que contenga 0,9 ml del medio de cultivo sin suero. Se aplican 100 µl de la formulación (muestra de prueba o control) sobre la superficie apical de la membrana. En cada análisis, se evalúan muestras triplicadas o cuadruplicadas de cada muestra de prueba (el agente que potencia la absorción mucosa en combinación con un principio biológicamente activo, el péptido YY) y de control (sólo el principio biológicamente activo, péptido YY). En cada punto temporal (15, 30, 60 y 120 minutos) las membranas tisulares se trasladan a nuevos orificios que contienen un medio de cultivo nuevo. Se recogen las muestras subyacentes de 0,9 ml del medio en cada punto temporal y se almacenan a 4°C para ser utilizadas en pruebas ELISA y de lactato deshidrogenasa (LDH).

Los kits ELISA constan de dos etapas: primero se "captura" la forma inmunorreactiva del agente en estudio mediante un anticuerpo inmovilizado en una microplaca de 96 orificios y, después de extraer el material no fijado de las células, se hace reaccionar un anticuerpo de "detección" con el agente inmunorreactivo fijado. Este anticuerpo de detección comúnmente se conjuga con una enzima (lo más frecuente es emplear la peroxidasa del rábano), y luego la cantidad enzimática ligada a la placa en complejos inmunes se mide analizando la actividad que presenta ante el reactivo cromogénico. Además de las muestras del medio sobrenadante recogidas en cada punto temporal durante los estudios de farmacocinética, el análisis de las muestras de la formulación adecuadamente diluidas (es decir, que contengan al principio biológicamente activo de prueba que es sujeto del estudio) que fueron aplicadas sobre la superficie apical

de las unidades al comienzo del estudio farmacocinético también se realiza en la placa ELISA junto con una serie de estándares establecidos por el fabricante. Generalmente, el análisis de cada muestra del medio sobrenadante se realiza mediante ELISA en orificios duplicados (cabe recordar que se emplean unidades cuadruplicadas en cada formulación para determinar la farmacocinética, por lo que así se genera un total de dieciséis muestras del medio sobrenadante recogidas durante los cuatro puntos temporales).

A. Es frecuente que la concentración aparente del principio activo de prueba que contienen las muestras del medio sobrenadante o las muestras de material diluido que fue aplicado sobre la superficie apical de las unidades se encuentren fuera del margen de las concentraciones de los parámetros después de efectuar un ELISA. No se determina mediante extrapolación la concentración del material presente en las muestras experimentales, fuera de las concentraciones de los parámetros; en cambio, las muestras se rediluyen adecuadamente para generar concentraciones del material de prueba que se puedan determinar con mayor precisión mediante interpolación entre parámetros en un nuevo ELISA.

B. El ELISA empleado para un principio biológicamente activo, por ejemplo, el péptido YY, es único en cuanto a diseño y protocolo recomendado. A diferencia de la mayoría de los kits, el ELISA utiliza dos anticuerpos monoclonales, uno que captura y otro que se dirige hacia un determinante no superpuesto para el agente de prueba biológicamente activo, por ejemplo, el péptido YY como anticuerpo de detección (dicho anticuerpo se conjuga con una peroxidasa de rábano). Siempre que las concentraciones del péptido YY que se encuentren debajo del límite superior del análisis en las muestras experimentales, el protocolo del análisis puede utilizarse según las instrucciones del fabricante, lo que permite incubar las muestras en la placa del ELISA con ambos anticuerpos presentes en simultáneo. Cuando los niveles del péptido YY de una muestra son significativamente más elevados que este límite superior, los niveles del péptido YY inmunorreactivo pueden exceder la cantidad de los anticuerpos en la mezcla de incubación; algunos péptidos YY que no tengan anticuerpo de detección fijado quedarán capturados en la placa, en tanto que algunos péptidos YY que sí tengan anticuerpo de detección fijado probablemente no queden capturados. Esta circunstancia conduce a subestimar seriamente los niveles del péptido YY de la muestra (parecerá que dichos niveles están muy por debajo del límite superior del análisis). A fin de eliminar esta posibilidad, se ha modificado el protocolo de análisis:

B.1. Primero se incuban las muestras diluidas en la placa ELISA que contiene el anticuerpo capturado inmovilizado durante una hora, pero no contiene ningún anticuerpo de detección. Después de una hora de incubación, los orificios se lavan para eliminar el material no fijado.

B.2. Se incuba el anticuerpo de detección con la placa durante una hora para permitir que se formen complejos inmunes con todos los antígenos capturados. La concentración del anticuerpo de detección es suficiente para generar la reacción con el nivel máximo del péptido YY que se ha fijado mediante el anticuerpo de captura. La placa se lava nuevamente para eliminar todos los anticuerpos de detección no fijados.

B.3. El sustrato peroxidasa se agrega a la placa y se incuba durante quince minutos a fin de que tome color.

B.4. La solución de detención se agrega a la placa y se observa la absorbancia que marca el espectrofotómetro microplaca VMáx, que es de 450 nm así como de 490 nm. La absorbancia del producto coloreado es mucho menor en 490 nm que en 450 nm, pero la absorbancia en cada longitud de onda sigue siendo proporcional a la concentración del producto. Las dos lecturas aseguran que la absorbancia tenga una relación lineal con la cantidad del péptido YY fijado en el margen de funcionamiento del instrumento VMáx (por lo general, restringimos el margen de 0 a 2,5 OD, aunque se ha informado que el instrumento posee una precisión que oscila entre 0 y 3,0 OD). La cantidad del péptido YY que contienen las muestras se determina mediante interpolación entre los valores OD obtenidos a través de diferentes parámetros incluidos en el ELISA. Las muestras cuyas medidas OD se encuentren fuera del margen obtenido de los parámetros se rediluyen y se prueban en un nuevo ELISA.

RESULTADOS

Medición de la resistencia transepitelial mediante el análisis TER: de los últimos puntos temporales del análisis, se ubicaron las membranas en los orificios individuales de una placa de cultivo de 24 orificios en 0,3 ml de medio limpio y se midió la resistencia eléctrica transepitelial utilizando el Voltóhmetro Epitelial EVOM y una cámara Endohm (World Precision Instruments, Sarasota, FL). El electrodo superior se ajustó de modo que quedara próximo a la superficie superior de la membrana, pero no en contacto con ésta. Los tejidos se quitaron, de a uno por vez, de sus respectivos orificios y las superficies

basales se enjuagaron sumergiéndolas en PBS limpia. Las superficies apicales se enjuagaron suavemente dos veces con PBS. La unidad de tejido se colocó en la cámara Endohm, se agregaron 250 µl de PBS, se volvió a acomodar el electrodo superior y se midió y registró la resistencia. Tras la medición, se decantó la PBS y la inserción de tejido volvió a colocarse en la placa de cultivo. Todos los valores del TER se expresan en función del área de superficie del tejido.

Los números finales se calcularon como:

TER de la membrana celular = (Resistencia (R) de la inserción con membrana – R de la inserción vacío) X Área de superficie de la membrana (0,6 cm^2).

El efecto de las formulaciones farmacéuticas que comprenden el péptido YY y agentes potenciadores de la administración intranasal sobre las medidas de TER a través de la membrana celular EpiAirway™ (capa celular de la mucosa epitelial) se muestra en la Figura 1. Una reducción en los valores de TER relativo al valor control (control= 1000 ohms-cm^2 aproximadamente; normalizado hasta 100) indica una reducción en la resistencia de la membrana celular y un incremento en la permeabilidad de la célula de la mucosa epitelial.

La formulación del péptido YY del ejemplo, Formulación P, mostró la mayor disminución en la resistencia de la membrana celular (Cuadro 2). Los resultados indican que, a las concentraciones analizadas, la formulación de ejemplo (por ejemplo, la Formulación P) reduce la resistencia de la membrana a menos del 1% comparada con la de control. Los valores exhibidos son el promedio de tres muestras de cada formulación. Las formulaciones A y B son controles preparados mediante la reconstitución del péptido YY (Bachem AG, King of Prussia, PA), que contienen 60 µg de péptido Y_{3-36} en 100 ml de PBS con un pH de 7,4 o 5,0. El péptido YY sin potenciadores de la administración mucosa no redujo la resistencia.

Los resultados indican que una formulación ejemplificadora para mejorar la absorción intranasal del péptido YY (por ejemplo, la Formulación P) reduce la resistencia de la membrana celular y aumenta de manera significativa la permeabilidad de las células epiteliales mucosas. Las formulaciones ejemplificadoras aumentarán la administración intranasal del péptido YY en el suero sanguíneo o en el tejido o fluido del sistema nervioso central. Los resultados indican que, al entrar en contacto con un epitelio

mucoso, estas formulaciones ejemplificadoras producen aumentos significativos en la permeabilidad al péptido YY de las células epiteliales mucosas.

CUADRO 2

Influencia de las Formulaciones Farmacéuticas con Péptido YY y Agentes Potenciadores de la Administración Intranasal sobre la Resistencia Transepitelial (TER) de la Membrana Celular EpiAirway

Formulación	Potenciador de la administración por vía mucosa	% TER
A	PBS de pH 7,4 (Control 1)	100
B	PBS de pH 5,0 (Control 2)	100
C	L-Arginina (10% peso/volumen)	47,88
D	Poli-L-Arginina (0,5% peso/volumen)	3,96
E	Gamma-ciclodextrina (1% peso/volumen)	91,67
F	Alfa-ciclodextrina (5% peso/volumen)	88,91
G	Metil-β-ciclodextrina (3% peso/volumen)	97,51
H	Sal sódica de ácido n-cáprico (0,075% peso/volumen)	47,72
I	Quitosan (0,5% peso/volumen)	4,77
J	Didecanoilato de L-α -fosfatidilcolina (3,5% peso/volumen)	0,49
K	S-nitroso-N-acetilpenicilamina (0,5% peso/volumen)	44,35
L	Palmitoil-DL-Carnitina (0,02% peso/volumen)	1,76
M	Pluronic-127 (0,3% peso/volumen)	97,57
N	Nitroprusiato de sodio (0,3% peso/volumen)	92,41
O	Glicocolato de sodio (1% peso/volumen)	14,25
P	F1: Gelatina, DDPC, MBCD, EDTA	0,65

Farmacocinética de acuerdo con el análisis ELISA:

El efecto provocado por las formulaciones farmacéuticas de la presente invención que contienen el péptido YY y potenciadores de la administración intranasal sobre la penetración del péptido YY a través de la membrana celular EpiAirway™ (capa celular epitelial mucosa) se mide según se describió atrás. Los resultados figuran en el Cuadro 3. La penetración del péptido YY a través de la membrana celular EpiAirway™ se mide mediante el análisis ELISA.

Para las formulaciones intranasales ejemplificadoras (por ejemplo, la Formulación P) de la presente invención, el mayor aumento en la penetración del péptido YY se registró en la Formulación P, como se muestra en el Cuadro 3. Se realiza un análisis ELISA para determinar la concentración del péptido YY biológicamente activo que penetró a través de las células epiteliales al medio circundante en varios puntos temporales. Los resultados demuestran un aumento de la penetración del péptido YY en la Formulación P comparado con las Formulaciones A o B (formulación de control del péptido YY; 60 µg de péptido YY_{3-36} en 100 ml de PBS con un pH de 7,4 o 5,0; Bachem AG, King of Prussia, PA). En promedio, el aumento acumulado de la penetración en 120 minutos con la Formulación P intranasal ejemplificada es aproximadamente 1195 veces mayor que con las Formulaciones de control A o B.

CUADRO 3

Influencia de las formulaciones farmacéuticas con péptido YY y agentes potenciadores de la administración intranasal sobre la penetración del péptido YY a través de la membrana celular EpiAirway mediante el análisis ELISA

	Formulación del péptido YY3-36 (60 µg/100 ml)	% de penetración en los puntos temporales (min)					% total penetración	Cant de veces que aumenta la penetración
		0	15	30	60	120		
A	PBS de pH 7 4 (Control 1)	0	0 00171	0 00098	0 00451	0 00327	0 01	1
B	PBS de pH 5 0 (Control 2)	0	0 00093	0 00048	0 00042	0 00367	0 01	1
C	L-Arginina (10% peso/volumen)	0	0 00119	0 00277	0 00685	0 00566	0 02	2
D	Poli-L-Arginina (0 5% peso/volumen)	0	0 00324	0 01587	0 10395	0 49656	0 62	62
E	Gamma-ciclodextrina (1% peso/volumen)	0	0 00017	0 00042	0 00028	0 0035	0	1
F	α-ciclodextrina (5% peso/volumen)	0	0 00031	0 000745	0 00147	0 0031	0 01	1
G	Metil-β-ciclodextrina (3% peso/volumen)	0	0 00028	0 00038	0 00059	0 01028	0 01	1
H	n-Sal sódica de ácido cáprico (0 075% peso/volumen)	0	0 0004	0 00131	0 00448	0 00821	0 01	1
I	Quitosan (0 5% peso/volumen)	0	0 00086	0 01098	0 09749	0 82128	0 93	93
J	Didecanoilato de L-α -fosfatidilcolina (3 5% peso/volumen)	0	0 00934	0 02	0 08507	1 9642	2 08	208

K	S-nitroso-N-acetilpenicilamina (0 5% peso/volumen)	0	0 00074	0 0032	0 0688	0 90432	0 98	98
L	Palmitoil-DL-Carnitina (0 02% peso/volumen)	0	0 00378	0 03422	0 15141	1 31011	1 5	150
M	Pluronic-127 (0 3% peso/volumen)	0	0 00025	0 00027	0 00086	0 00395	0 01	1
N	Nitroprusiato de sodio (0 3% peso/volumen)	0	0 00171	0 00114	0 00079	0 05492	0 05	5
O	Glucocolato de sodio (1% peso/volumen)	0	0 00325	0 00313	0 09023	0 70214	0 8	80
P	F1 Gelatina DDPC MBCD EDTA	0	0 05864	1 3972	2 9799	7 519	11 95	1195

Análisis de MTT: Los análisis de MTT se realizaron usando los kits MatTek MTT-100. En cada orificio se agregaron 300 ml de la solución de MTT. Las inserciones de tejido se enjuagaron suavemente con PBS limpia y se colocaron dentro de la solución de MTT. Las muestras se incubaron a 37°C durante 3 horas. Tras la incubación, las inserciones de cultivo celular se sumergieron en 2,0 ml de la solución de extracción por orificio hasta cubrir completamente cada inserto. La placa de extracción se cubrió y se selló para reducir la evaporación. La extracción continúa durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. Una vez finalizado el período de extracción, la solución de extracción se mezcló y transfirió por pipeta a una placa de microtitulación de 96 orificios. Se cargaron triplicados de cada muestra, así como blancos de la solución de extracción. La densidad óptica de las muestras se midió luego en 550 nm en un lector de placa (dispositivos moleculares).

En el Cuadro 4 se exhibe el análisis de MTT de una formulación ejemplificadora que mejora la absorción de la mucosa nasal del péptido YY siguiendo las instrucciones de esta descripción (por ejemplo, la Formulación P) y su correspondiente comparación con la formulación de control (Formulaciones A o B). Los resultados de las formulaciones que contienen el péptido YY y uno o más potenciadores de la administración intranasal, por ejemplo, la Formulación P (experimento realizado en tres muestras) demuestran un efecto tóxico mínimo de esta realización ejemplificadora sobre la viabilidad del tejido epitelial mucoso.

CUADRO 4

Influencia de las formulaciones farmacéuticas que contienen el péptido YY y agentes potenciadores de la administración intranasal sobre la viabilidad de la membrana celular EpiAirway, indicada en % MTT

Formulaciones	Tratamiento	% MTT
A	PBS de pH,4 (Control 1)	100
B	PBS de pH 5,0 (Control 2)	100
C	L-Arginina (10% peso/volumen)	91,54
D	Poli-L-Arginina (0,5% peso/volumen)	79,39
E	Gamma-ciclodextrina (1% peso/volumen)	100
F	α-ciclodextrina (5% peso/volumen)	96,63
G	Metil- ß -ciclodextrina (3% peso/volumen)	100
H	Sal sódica de ácido n-cáprico (0,075% peso/volumen)	100
I	Quitosan (0,5% peso/volumen)	100
J	Didecanoilato de L-α -fosfatidilcolina (3,5% peso/volumen)	94,25
K	S-nitroso-N-acetilpenicilamina (0,5% peso/volumen)	97,64
L	Palmitoil-DL-Carnitina (0,02% peso/volumen)	91,77
M	Pluronic-127 (0,3% peso/volumen)	100
N	Nitroprusiato de sodio (0,3% peso/volumen)	100
O	Glicocolato de sodio (1% peso/volumen)	100
P	F1: Gelatina, DDPC, MBCD, EDTA	88,75

Análisis del LDH: En el Cuadro 5 se exhibe el análisis del LDH de una formulación ejemplificadora para mejorar la administración mucosa nasal del péptido YY siguiendo las instrucciones de la presente descripción (por ejemplo, la Formulación P). Los resultados de tres muestras de la Formulación P demuestran un efecto tóxico mínimo de esta realización ejemplificadora sobre la viabilidad del tejido epitelial mucoso.

CUADRO 5

Influencia de las Formulaciones Farmacéuticas que Contienen el Péptido YY y Agentes Potenciadores de la Administración Intranasal sobre la Viabilidad de la Membrana Celular Epiairway, indicada en % de Células Muertas (Análisis Del LDH)

Formulaciones	Tratamiento	% de células muertas
A	PBS de pH,4 (Control 1)	1,0

B	PBS de pH 5,0 (Control 2)	1,1
C	L-Arginina (10% peso/volumen)	0,8
D	Poli-L-Arginina (0,5% peso/volumen)	1,4
E	Gamma-ciclodextrina (1% peso/volumen)	0,8
F	α-ciclodextrina (5% peso/volumen)	0,7
G	Metil- ß -ciclodextrina (3% peso/volumen)	0,8
H	Sal sódica de ácido n-cáprico (0,075% peso/volumen)	1,3
I	Quitosan (0,5% peso/volumen)	0,7
J	Didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (3,5% peso/volumen)	1,2
K	S-nitroso-N-acetilpenicilamina (0,5% peso/volumen)	0,7
L	Palmitoil-DL-Carnitina (0,02% peso/volumen)	0,8
M	Pluronic-127 (0,3% peso/volumen)	1,0
N	Nitroprusiato de sodio (0,3% peso/volumen)	0,8
O	Glicocolato de sodio (1% peso/volumen)	0,8
P	F1: Gelatina, DDPC, MBCD, EDTA	2,0

EJEMPLO 3

La Formulación P (péptido YY) de la presente invención en combinación con el corticoesteroide triamcinolona acetonida mejora la viabilidad celular

El presente ejemplo comprende un estudio *in vitro* para determinar la permeabilidad de un péptido YY y la reducción de la inflamación mucosa epitelial que provoca administrado por vía intranasal, por ejemplo, el péptido humano YY, en combinación con un compuesto corticoesteroide, por ejemplo, la triamcinolona acetonida, y también en combinación con uno o más potenciadores de la administración intranasal. El estudio incluye la determinación de la permeabilidad de las células epiteliales mediante el análisis de la TER y la reducción de la

inflamación mucosa epitelial medidas por la viabilidad celular en un análisis de MTT aplicando una realización que contiene el péptido YY y triamcinolona acetonida.

La Formulación P (véase el Cuadro 1 anterior) se combina en una formulación con triamcinolona acetonida en una dosis de 0,5, 2,0, 5,0 o 50 µg. La dosis normal de la triamcinolona acetonida (Nasacort®, Aventis Pharmaceuticals) para la rinitis alérgica estacional es de 55 µg por pulverización. La Formulación P en combinación con el corticoesteroide triamcinolona acetonida aumenta la viabilidad celular según el análisis de MTT, al tiempo que mantiene la permeabilidad de las células epiteliales según los análisis TER y ELISA.

De acuerdo con los métodos y formulaciones de la invención, la permeabilidad de la Formulación P en presencia o ausencia de la triamcinolona acetonida se mide mediante análisis de resistencia eléctrica transepitelial (TER) en una membrana celular EpiAirway™. Los análisis TER de la Formulación P con triamcinolona acetonida en una concentración de 0,5, 2,0, 5,0 o 50 µg por pulverización indican que la permeabilidad del péptido YY no disminuyó, sino que fue igual a la de la Formulación P sola. La permeabilidad de la Formulación P con triamcinolona acetonida en una concentración de entre 0 y 50 µg por pulverización suele superar entre 10 y 100 veces la de las Formulaciones A o B (control del péptido YY).

De acuerdo con los métodos y formulaciones de la invención, la permeabilidad de la Formulación P en presencia o ausencia de triamcinolona acetonida se mide mediante el análisis ELISA en una membrana celular EpiAirway™. De manera similar al análisis TER ya mencionado, el análisis ELISA de la Formulación P que contiene triamcinolona acetonida en una concentración de 0,5, 2,0, 5,0 o 50 µg por pulverización indica que la permeabilidad del

péptido YY no disminuyó, sino que fue igual a la de la Formulación P sola. La permeabilidad de la Formulación P con triamcinolona acetonida en una concentración de entre 0 y 50 μg por pulverización suele superar la de las Formulaciones A o B (control del péptido YY).

De acuerdo con los métodos y formulaciones de la invención, el análisis de MTT midió la viabilidad celular de la Formulación P en presencia o ausencia de triamcinolona acetonida. Es característico que, al agregar triamcinolona acetonida (en una concentración de 0,5, 2,0, 5,0 o 50 μg por pulverización) a la Formulación P, aumente la viabilidad celular con respecto a la Formulación P sin triamcinolona acetonida.

Según el análisis TER, al agregar triamcinolona acetonida a la Formulación P, la viabilidad celular aumenta con respecto a la Formulación P sin triamcinolona acetonida y la permeabilidad epitelial se mantiene igual.

Es posible reducir la inflamación mucosa epitelial de un péptido YY administrado por vía intranasal mediante una formulación intranasal de péptido YY en combinación con uno o más compuesto(s) corticoesteroides o esteroides, compuestos o formulaciones típicamente de alta potencia, pero también, en ciertos casos, de media o baja potencia. Se proporciona la potencia global (dosis equivalentes) de corticoesteroides de potencia alta, media y baja. Usualmente, una formulación intranasal del péptido YY en combinación con un compuesto corticoesteroide de alta potencia incluye, pero no de manera exclusiva, betametasona (dosis de 0,6 a 0,75 mg) o dexametasona (dosis de 0,75 mg).En otra formulación posible, una formulación intranasal del péptido YY en combinación con un compuesto corticoesteroide de potencia media incluye, pero no de manera exclusiva, metilprednisolona (dosis de 4 mg), triamcinolona (dosis de 4 mg) o prednisolona (dosis de 5 mg). En otra formulación, una formulación intranasal del péptido YY en combinación con un compuesto corticoesteroide de

baja potencia incluye, pero no de manera exclusiva, hidrocortisona (dosis de 20 mg) o cortisona (dosis de 25 mg).

EJEMPLO 4

Preparación de una formulación del PYY libre de estabilizador proteínico

Se preparó una formulación del PYY sustancialmente libre de estabilizador proteínico, adecuada para la administración intranasal de PYY, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

1. Se incorpora aproximadamente ¾ de agua a un vaso de precipitado y se agita con una varilla sobre una placa; se añade citrato de sodio hasta disolverlo por completo.
2. Luego se agrega EDTA y se agita hasta disolverlo por completo.
3. Se añade ácido cítrico y se agita hasta disolverlo por completo.
4. A continuación, se agrega metil-ß-ciclodextrina, que se agita hasta disolverla por completo.
5. Luego se sigue el mismo procedimiento con el DDPC.
6. El mismo procedimiento se sigue con la lactosa.
7. Luego se agrega y agita el sorbitol hasta disolverlo por completo.
8. Se añade el clorobutanol, que se agita hasta disolverlo por completo.
9. Se agrega el PYY 3-36 y se agita suavemente hasta disolverlo.
10. Se mide el pH para verificar que sea de 5,0 ± 0,25. Se agrega HCl diluido o NaOH diluido para ajustar el pH.

11. Se agrega agua hasta alcanzar el volumen final.

CUADRO 6

Reactivo	Grado	Proveedor	mg/ml	%
Clorobutanol, anhidro	NF	Spectrum	5,0	0,50
Metil-ß-ciclodextrina		Sigma	45	4,5
Didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina		Sigma	1	0,1
Edetato disódico	USP	Dow Chemicals	1	0,1
Citrato de sodio, dihidrato	USP	Spectrum	1,62	0,162
Ácido cítrico, anhidro	USP	Sigma	0,86	0,086
Monohidrato de α-lactosa		Sigma	9	0,9
Sorbitol		Sigma	18,2	1,82
PYY 3-36	GMP	Bachem	1	0,1
Agua purificada				

Formulación de pH 5 +/- 0,25

Osmolaridad ~250

EJEMPLO 5

Se preparó una segunda formulación según lo indicado anteriormente, con la salvedad de que la concentración del PYY 3-36 fue de 15 mg/ml, como se muestra en el Cuadro 7.

CUADRO 7

Reactivo	Grado	Proveedor	mg/ml	%
Clorobutanol, anhidro	NF	Spectrum	5,0	0,50

Metil-ß-ciclodextrina		Sigma	45	4,5
Didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina		Sigma	1	0,1
Edetato disódico	USP	Dow Chemicals	1	0,1
Citrato de sodio, dihidrato	USP	Spectrum	1,62	0,162
Ácido cítrico, anhidro	USP	Sigma	0,86	0,086
Monohidrato de α-lactosa		Sigma	9	0,9
Sorbitol		Sigma	18,2	1,82
PYY 3-36	GMP	Bachem	15	0,1
Agua purificada				

Formulación de pH 5 +/- 0,25

EJEMPLO 6

Determinación del pH óptimo del PYY

Determinación de la estabilidad del PYY_{3-36} frente al pH a 40° C durante 5 días

A. Protocolo para formular las muestras para el estudio de la estabilidad del PYY (3-36) / pH

Osmolaridad: objetivo, 250mM

Usando un buffer de citrato / citrato de sodio tribásico, 10mM

Osmolaridad = cantidad de partículas x molaridad
= (1 + 4) x 10mM = 50mM

En consecuencia, se lleva la osmolaridad a 250mm con 100mm NaCl (2 partículas)

B. Preparación de muestras de estabilidad según se indica a continuación (3500µl)

Concentración final

Buffer de citrato	1400 µl	25mM (del pH final de referencia)	10mM
PYY	700 µl	1,5mg/ml	300ug/ml
Clorobutanol	350µl	2,5%,	0,25%
NaCl,	350µl	1.0M,	100mm

Verifique el pH y ajuste si es necesario

Cantidad suficiente hasta 3500 µl con agua

Procedimiento:

Muestra de 120µl en inserciones silanizadas de 200 µl en ampollas de automuestreo

3 extracciones / punto temporal

Muestras incubadas a 40° C durante 5 días

C. Comparación entre el pH objetivo y el final real de las mezclas de estabilidad

pH objetivo	pH real
3,0	2,99
3,5	3,47
4,0	3,90
4,5	4,42
5,0	4,90
7,0	7,38

D. Procedimiento de HPLC

Columna:	Waters C18 Bondapak 10µm 4,6 x 300mm
Sistema de HPLC:	Waters Alliance 2690
Detector:	Waters 2487 Longitud de onda dual a 220nm
Caudal:	1ml/min
Volumen de inyección:	30µl
Temperatura de la columna	30°C

Fases móviles:

Buffer A: 0,1% TFA, 1% acetonitrilo en agua

Buffer B: 0,11% TFA en acetonitrilo

Gradiente:

Tiempo (minutos)	%A	%B
0	75	25
17	42	58
19	75	25
28	75	25

E. Resultados y Conclusiones:

Los resultados indican que, en las condiciones particulares de este estudio, el pH óptimo para conseguir estabilidad es de 4,90. Se observa un aumento de la estabilidad del 76 al 87% conforme aumente el pH de 2,99 a 4,90. Con un pH más elevado, por ejemplo 7,38, se

produce una marcada caída de la estabilidad del PYY_{3-36} y sólo queda el 15% de la registrada en el punto de partida (0).

EJEMPLO 7

Elaboración de la Formulación Intranasal

Los péptidos y las proteínas son moléculas relativamente frágiles en comparación con los fármacos de bajo peso molecular. La fase de la elaboración de la formulación tiene como objeto encontrar una formulación candidata adecuada para la administración intranasal, para lo cual se sometieron a prueba numerosas formulaciones candidatas a fin de identificar alguna que demostrara un nivel aceptable de estabilidad de la droga, de administración a través de la mucosa nasal, de toxicidad y de eficacia del conservante.

Se comenzó por examinar el efecto del pH. La figura 1 muestra la estabilidad del PYY_{3-36} a alta temperatura (40° C) con diversos pH, de entre 3,0 y 7,4. En el pH fisiológico, se produce una pérdida sustancial de la droga a alta temperatura. La mayor estabilidad se alcanzó con un pH de 5,0, que fue el elegido para optimizar la formulación aún más.

Con el fin de optimizar la estabilidad aún más, se examinó la capacidad de diversos estabilizadores para facilitar el pasaje del fármaco a través de la mucosa nasal. Los agentes examinados se eligieron por su capacidad para abrir uniones muy cerradas con escasa toxicidad celular. Para lograrlo se empleó un modelo primario de célula epitelial humana (EpiAirway, MatTek, Inc., Ashland MA). Esta estirpe celular forma una capa seudoestratificada de células epiteliales cilíndricas con uniones cerradas, similar al epitelio

respiratorio que se halla en la nariz. Se colocaron las formulaciones farmacológicas en la parte apical de la capa tisular y se realizó la cuantificación del fármaco para los medios basales. Se midió el grado de apertura de las uniones estrechas disminuyendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). La viabilidad celular y la citotoxicidad se controlaron mediante análisis de MTT y LDH, respectivamente. En las Figuras 2-5, se muestran los datos obtenidos a partir de un experimento representativo de exploración.

En la Figura 2 se muestran los datos de la TEER. En algunos casos hubo escasa o ninguna disminución en la TEER en comparación a la del control, lo cual indica que hay uniones estrechas que no se abrieron. En otros casos, se advirtió una disminución importante en la TEER, lo cual significa que se abrieron uniones estrechas. Los resultados demuestran que el modelo celular *in vitro* sirve para determinar la capacidad de distintas formulaciones para abrir las uniones estrechas.

En las formulaciones candidatas analizadas, la viabilidad celular fue adecuada (Figura 3, MTT) y, la citotoxicidad fue baja (Figura 4, LDH).

En total se analizaron más de 200 formulaciones diferentes, lo cual refleja el alto rendimiento del modelo de exploración *in vitro*. Con todos los datos disponibles, se llevó a cabo un análisis multifactorial de la variancia para elucidar el efecto que ejerció cada componente de la formulación sobre cada una de las 7 variables de rendimiento (permeabilidad del fármaco, osmolalidad, estabilidad en condiciones de refrigeración y aceleración, TEER y análisis de MTT y LDH). El análisis multifactorial de la variancia consistió en un análisis inicial de cada componente de la formulación en busca de algún nivel de correlación con los parámetros del rendimiento ($p<0,1$). Una vez identificado el subconjunto, se utilizó un modelo de selección logística escalonada o de regresión lineal. Los

resultados indican que un excipiente está vinculado a la osmolalidad y la toxicidad ($r^2 = 0.91$ y 0,27, respectivamente), dos están vinculados a la penetración del PYY_{3-36} ($r^2 = 0,44$), tres influyeron en la estabilidad ($r^2 = 0,24$) y cinco influyeron en la resistencia paracelular ($r^2 = 0,55$). Las mejores formulaciones, según lo determinó este proceso, aumentaron al menos entre 30 y 75 veces el transporte del PYY_{3-36} en comparación con las soluciones de buffer simples.

A partir de estos análisis, se seleccionó una formulación de PYY_{3-36} optimizada a fin de continuar desarrollándola. Esa formulación optimizada contenía dos estabilizadores, dos potenciadores de la penetración, un quelante y un conservante en un buffer de acetato de sodio, con un pH de 5,0. La formulación aprobó la Prueba de Eficacia de los Conservantes de la Farmacopea Estadounidense. En la Figura 5 se observa cómo contribuyen los diversos componentes de manera sinérgica en la penetración de la droga. Comparada con las formulaciones de buffer simples de idéntica osmolalidad, la formulación optimizada muestra una penetración del fármaco 100 veces superior.

Finalmente, se prepararon grupos preclínicos y clínicos de la formulación optimizada, que se colocaron a estabilidades de 5°C y 25°C en el envase final del producto. Según datos preliminares, descriptos en el Cuadro 8 se muestra esencialmente ninguna pérdida de la droga en un mes a 5°C o a 25°C.

	5°C	25°C
Punto temporal	% PYY	% PYY
0	100,0	100,0
3 días	99,8	100,1
7 días	102,6	98,4
10 días	103,3	101,7

2 semanas	101,4	97,9
3 semanas	100,3	95,4
1 mes	100,5	96,3
1 ½ mes	100,1	
2 meses	99,8	

En síntesis, este proceso de desarrollo produjo una formulación de PYY_{3-36} con un nivel adecuado de estabilidad del fármaco, de administración a través de la mucosa nasal, de toxicidad y de eficacia del conservante, que permite la administración de un péptido de 4 kD.

Estudios Preclínicos

Hasta la fecha, se ha realizado una serie de seis estudios preclínicos en ratas, conejos y perros. Se determinó la concentración plasmática del PYY_{3-36} en todas las especies mediante un método patentado y validado de radioinmunoanálisis.

En las ratas, la biodisponibilidad (la fracción molar de fármaco identificada en el plasma dividida por la cantidad administrada por vía nasal) se calculó en alrededor de un 6% y, en conejos, en alrededor de un 8%. Tales valores pueden subestimar la verdadera biodisponibilidad, pues la degradación de un péptido en el plasma antes del muestreo, o la degradación tras el muestreo a pesar de la presencia de un inhibidor de la proteinasa, disminuyen la biodisponibilidad medida.

La toxicidad nasal se ha evaluado en ratas y conejos durante un término de hasta 14 días consecutivos en dosis 50 veces superiores a la dosis clínica que se prevé para los humanos, calculada en mg/kg. No se encontraron hallazgos anatomopatológicos

microscópicos ni macroscópicos relacionados con el objeto del análisis, ni hubo signos clínicos.

La toxicidad sistémica que sigue a la administración intravenosa se evaluó en ratas y conejos. Con dosis intravenosas de hasta aproximadamente 160 veces la dosis prevista para seres humanos (400 µg/kg en ratas y 205 µg/kg en conejos) no se observaron hallazgos anatomopatológicos microscópicos ni macroscópicos en relación con el objeto del análisis.

La toxicidad cardiovascular se evaluó en un perro anestesiado con una dosis que se encontraba en el rango de la del estudio. La dosis más alta, una infusión de PYY_{3-36} de hasta 24ug/kg durante 60 minutos, correspondió a 33 veces la dosis prevista para seres humanos, calculada según el área de superficie corporal. La concentración plasmática resultante, 30 ng/ml, equivale a alrededor de 380 veces la concentración plasmática basal canina. A esa concentración plasmática, no se vieron afectados la tensión arterial, el flujo sanguíneo de la arteria femoral ni el QTc, y sólo se observaron cambios leves en el ritmo cardíaco (aumento de 123 a 148 latidos por minuto (lpm) en promedio) y en el ritmo respiratorio (disminución de 54 a 36).

En estos estudios preclínicos se recogieron datos farmacocinéticos. En las Figuras 6, 7 y 8 se muestra la concentración plasmática registrada tras la administración intranasal de diversas dosis aplicadas en un estudio con ratas. Como se aprecia en la Figura 6, el PYY_{3-36} se advierte en el plasma al cabo de 5 minutos, las concentraciones plasmáticas máximas (Tmáx) se alcanzan en 10-15 minutos y la vida media de eliminación terminal ronda los 15 minutos. Tanto la $C_{máx}$ como el AUC_{0-t} se mantienen lineales con respecto a la dosis intranasal.

Estudios Clínicos

Se inició un estudio clínico para establecer el rango de dosificación con el objetivo de determinar la inocuidad, el PK y la biodisponibilidad de la formulación intranasal del PYY_{3-36}. Hasta la fecha, los pacientes se ubicaron en las primeros dos de cinco cohortes de dosis. Uno de los pacientes informó que sintió un sabor en la zona posterior de la garganta, pero hasta el momento no se ha registrado ningún otro acontecimiento adverso.

Conclusión

Se ha comenzado a trabajar en la realización, el estudio preclínico y clínico inicial de una formulación de PYY_{3-36} intranasal. El método de la formulación provocó un aumento superior a cien veces en la permeabilidad a través de la membrana de este péptido 4 kD sin que aumentara la toxicidad celular. Los estudios preclínicos han revelado un margen de inocuidad considerable para el PYY_{3-36} en lo que respecta a toxicidad nasal, cardiovascular y general. Sobre la base de los estudios clínicos que se están llevando a cabo para establecer el margen posológicos, se proyecta estudiar el grado de adelgazamiento conseguido con la administración prolongada.

EJEMPLO 8A

PROTOCOLO CLÍNICO
ABSORCIÓN NASAL DEL PÉPTIDO YY_{3-36} (PYY_{3-36}) INTRANASAL EN SUJETOS HUMANOS SANOS

Objeto del estudio:

El presente estudio tuvo como objeto evaluar la absorción del PYY3-36 administrado por vía intranasal hacia el torrente sanguíneo desde la nariz. Se trató de un estudio de fase I que evaluó el rendimiento de dosis clínicas únicas, escalonadas, del que participaron voluntarios normales sanos (varones y mujeres) en ayunas. Se evaluaron dosis ascendentes de PYY3-36 intranasal de entre 20 µg y 200 µg a fin de comprobar la inocuidad, la tolerancia nasal y la absorción del PYY3-36. Asimismo, se evaluó la sensación de apetito de cada individuo.

Se administró PYY_{3-36} a 15 seres humanos sanos divididos en 5 grupos de 3 individuos cada uno.

Grupo I

Al primer grupo se le administraron 20 µg de PYY_{3-36} en una solución de 0,1 ml mediante un pulverizador intranasal.

Grupo II

El segundo grupo recibió por vía intranasal 50 µg de PYY_{3-36} en una solución de 0,1 ml.

Grupo III

El tercer grupo recibió por vía intranasal 100 µg de PYY_{3-36} en una solución de 0,1 ml.

Grupo IV

El cuarto grupo recibió por vía intranasal 150 µg de PYY_{3-36} en una solución de 0,1 ml.

Grupo V

Al quinto grupo se le administraron por vía intranasal 200 µg de PYY_{3-36} en una solución de 0,1 ml.

Se tomaron muestras de sangre y se determinó la concentración plasmática de PYY a los 0 minutos (es decir, antes de la dosis) y a los 5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos de

administrada la dosis. Luego se dio de comer a los sujetos y se les tomó una muestra de sangre. La concentración de PYY se midió 30 minutos después de la ingesta. Las concentraciones plasmáticas del PYY_{3-36} se determinaron mediante un procedimiento analítico validado.

Para cada sujeto se calcularon los siguientes parámetros de PK, cuando fue posible, sobre la base de las concentraciones plasmáticas del PYY_{3-36}, según el método independiente del modelo:

$C_{máx}$	Concentración máxima observada.
$t_{máx}$	Tiempo para alcanzar la concentración máxima.
AUC_{0-t}	Área bajo la curva de concentración/tiempo desde el punto 0 hasta el momento de la última concentración mensurable, calculada mediante la regla trapecial lineal.

Cuando los datos permitieron la estimación precisa, se calcularon los siguientes parámetros:

$AUC_{0-\infty}$	Área bajo la curva de concentración/tiempo extrapolada al infinito, calculada mediante la fórmula: $$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + \frac{C_t}{K_e}$$ donde C_t es la última concentración mensurable y K_e es la constante de velocidad de fase terminal aparente.
K_e	Constante de velocidad de fase terminal aparente, donde K_e es la magnitud de la inclinación de la regresión lineal de la concentración logarítmica comparada con el perfil temporal durante la fase terminal.

$t_{1/2}$ Vida media de la fase terminal aparente (cuando sea posible), donde $t_{1/2} = (ln2)/K_e$.

Los cálculos de PK se realizaron utilizando software comercial tal como WinNonlin (Pharsight Corporation, versión 3.3 o superior). Los resultados pueden apreciarse en los gráficos que aparecen más adelante.

Discusión y conclusión

Información general:

Cada grupo posológico incluyó tres sujetos a quienes se les administró una vez, por vía intranasal, la formulación de esta invención con una dosis determinada de PYY $_{3-36}$ humano sintético libre de pirógeno. Se organizaron cinco grupos posológicos que recibieron dosis escalonadas de PYY $_{3-36}$ en la formulación. Se extrajeron muestras de sangre a intervalos específicos, con tubos de recolección que contenían heparina de litio (para inhibir la coagulación) y aprotinina (para conservar el PYY_{3-36}). Se extrajo el plasma de cada muestra de sangre por centrifugado y se lo almacenó en alícuotas congeladas. Una alícuota congelada de cada muestra se envió a Nastech Analytical Services, adonde llegó congelada. Cada muestra se almacenó congelada hasta el momento de estudiar la concentración del PYY mediante radioinmunoanálisis (RIA).

Observaciones:

Grupo 1: Los sujetos de este grupo recibieron 20 microgramos de PYY_{3-36}. La concentración plasmática del PYY en los sujetos osciló desde un mínimo de "menos de 20

pg/ml" (por debajo del límite inferior de la cuantificación del radioinmunoanálisis) hasta un máximo de 159 pg/ml. Las tendencias observadas en las concentraciones no concuerdan con una absorción significativa del fármaco en la sangre de los sujetos estudiados.

Grupo 2: Los sujetos de este grupo recibieron 50 microgramos de PYY_{3-36}. La concentración plasmática del PYY en los sujetos osciló desde un mínimo de 50 pg/ml hasta un máximo de 255 pg/ml. Las tendencias observadas en las concentraciones concuerdan con una absorción significativa de la droga en la sangre de los sujetos estudiados.

Grupo 3: Los sujetos de este grupo recibieron 100 microgramos de PYY_{3-36}. La concentración plasmática del PYY en los sujetos osciló desde un mínimo de 87 pg/ml hasta un máximo de 785 pg/ml. Las tendencias observadas en las concentraciones concuerdan con una absorción significativa del fármaco en la sangre de los sujetos estudiados.

Grupo 4: Los sujetos de este grupo recibieron 150 microgramos de PYY_{3-36}. La concentración plasmática del PYY de los sujetos osciló desde un mínimo de 45 pg/ml hasta un máximo de 2.022 pg/ml. Las tendencias observadas en las concentraciones concuerdan con una absorción significativa del fármaco en la sangre de los sujetos estudiados.

Grupo 5: Los sujetos de este grupo recibieron 200 microgramos de PYY_{3-36}. La concentración plasmática del PYY de los sujetos osciló desde un mínimo de 48 pg/ml hasta un máximo de 1.279 pg/ml. Las tendencias observadas en las concentraciones concuerdan con una absorción significativa del fármaco en la sangre de los sujetos estudiados.

Estos resultados concuerdan con una absorción del PYY_{3-36} dependiente de la dosis.

Observaciones y datos adicionales:

Síntesis de los resultados:

- Con dosis intranasales de 50 µg – 200 µg se produce una absorción plasmática del PYY dependiente de la dosis.
- La duración de las concentraciones plasmáticas elevadas es mucho mayor de la prevista y la vida media de la eliminación se calcula en 55 minutos.
- La Cmáx y el AUC 0-t demuestran una buena linearidad con la dosis.
- Se observa gran variabilidad entre los sujetos con dosis idénticas.
- Sorprendentemente, este estudio no logró detectar el aumento posprandial de PYY, aunque no se

microscópicos ni macroscópicos relacionados con el objeto del análisis. ni hubo signos clínicos.

La toxicidad sistémica que sigue a la administración intravenosa se evaluó en ratas y conejos. Con dosis intravenosas de hasta aproximadamente 160 veces la dosis prevista para seres humanos (400 µg/kg en ratas y 205 µg/kg en conejos) no se observaron hallazgos anatomopatológicos microscópicos ni macroscópicos en relación con el objeto del análisis.

La toxicidad cardiovascular se evaluó en un perro anestesiado con una dosis que se encontraba en el rango de la del estudio. La dosis más alta, una infusión de PYY_{3-36} de hasta 24ug/kg durante 60 minutos, correspondió a 33 veces la dosis prevista para seres humanos, calculada según el área de superficie corporal. La concentración plasmática resultante, 30 ng/ml, equivale a alrededor de 380 veces la concentración plasmática basal canina. A esa concentración plasmática, no se vieron afectados la tensión arterial, el flujo sanguíneo de la arteria femoral ni el QTc, y sólo se observaron cambios leves en el ritmo cardíaco (aumento de 123 a 148 latidos por minuto (lpm) en promedio) y en el ritmo respiratorio (disminución de 54 a 36).

En estos estudios preclínicos se recogieron datos farmacocinéticos. En las Figuras 6, 7 y 8 se muestra la concentración plasmática registrada tras la administración intranasal de diversas dosis aplicadas en un estudio con ratas. Como se aprecia en la Figura 6, el PYY_{3-36} se advierte en el plasma al cabo de 5 minutos, las concentraciones plasmáticas máximas (Tmáx) se alcanzan en 10-15 minutos y la vida media de eliminación terminal ronda los 15 minutos. Tanto la $C_{máx}$ como el AUC_{0-t} se mantienen lineales con respecto a la dosis intranasal.

147
144

Estudios Clínicos

Se inició un estudio clínico para establecer el rango de dosificación con el objetivo de determinar la inocuidad, el PK y la biodisponibilidad de la formulación intranasal del PYY_{3-36}. Hasta la fecha, los pacientes se ubicaron en las primeros dos de cinco cohortes de dosis. Uno de los pacientes informó que sintió un sabor en la zona posterior de la garganta, pero hasta el momento no se ha registrado ningún otro acontecimiento adverso.

Conclusión

Se ha comenzado a trabajar en la realización, el estudio preclínico y clínico inicial de una formulación de PYY_{3-36} intranasal. El método de la formulación provocó un aumento superior a cien veces en la permeabilidad a través de la membrana de este péptido 4 kD sin que aumentara la toxicidad celular. Los estudios preclínicos han revelado un margen de inocuidad considerable para el PYY_{3-36} en lo que respecta a toxicidad nasal, cardiovascular y general. Sobre la base de los estudios clínicos que se están llevando a cabo para establecer el margen posológicos, se proyecta estudiar el grado de adelgazamiento conseguido con la administración prolongada.

EJEMPLO 8A

PROTOCOLO CLÍNICO
ABSORCIÓN NASAL DEL PÉPTIDO YY_{3-36} (PYY_{3-36}) INTRANASAL EN SUJETOS HUMANOS SANOS

Objeto del estudio:

El presente estudio tuvo como objeto evaluar la absorción del PYY3-36 administrado por vía intranasal hacia el torrente sanguíneo desde la nariz. Se trató de un estudio de fase I que evaluó el rendimiento de dosis clínicas únicas, escalonadas, del que participaron voluntarios normales sanos (varones y mujeres) en ayunas. Se evaluaron dosis ascendentes de PYY3-36 intranasal de entre 20 µg y 200 µg a fin de comprobar la inocuidad, la tolerancia nasal y la absorción del PYY3-36. Asimismo, se evaluó la sensación de apetito de cada individuo.

Se administró PYY_{3-36} a 15 seres humanos sanos divididos en 5 grupos de 3 individuos cada uno.

Grupo I

Al primer grupo se le administraron 20 µg de PYY_{3-36} en una solución de 0,1 ml mediante un pulverizador intranasal.

Grupo II

El segundo grupo recibió por vía intranasal 50 µg de PYY_{3-36} en una solución de 0,1 ml.

Grupo III

El tercer grupo recibió por vía intranasal 100 µg de PYY_{3-36} en una solución de 0,1 ml.

Grupo IV

El cuarto grupo recibió por vía intranasal 150 µg de PYY_{3-36} en una solución de 0,1 ml.

Grupo V

Al quinto grupo se le administraron por vía intranasal 200 µg de PYY_{3-36} en una solución de 0,1 ml.

Se tomaron muestras de sangre y se determinó la concentración plasmática de PYY a los 0 minutos (es decir, antes de la dosis) y a los 5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos de

administrada la dosis. Luego se dio de comer a los sujetos y se les tomó una muestra de sangre. La concentración de PYY se midió 30 minutos después de la ingesta. Las concentraciones plasmáticas del PYY_{3-36} se determinaron mediante un procedimiento analítico validado.

Para cada sujeto se calcularon los siguientes parámetros de PK, cuando fue posible, sobre la base de las concentraciones plasmáticas del PYY_{3-36}, según el método independiente del modelo:

$C_{máx}$	Concentración máxima observada.
$t_{máx}$	Tiempo para alcanzar la concentración máxima.
AUC_{0-t}	Área bajo la curva de concentración/tiempo desde el punto 0 hasta el momento de la última concentración mensurable, calculada mediante la regla trapecial lineal.

Cuando los datos permitieron la estimación precisa, se calcularon los siguientes parámetros:

$AUC_{0-\infty}$	Área bajo la curva de concentración/tiempo extrapolada al infinito, calculada mediante la fórmula: $$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + \frac{C_t}{K_e}$$ donde C_t es la última concentración mensurable y K_e es la constante de velocidad de fase terminal aparente.
K_e	Constante de velocidad de fase terminal aparente, donde K_e es la magnitud de la inclinación de la regresión lineal de la concentración logarítmica comparada con el perfil temporal durante la fase terminal.

$t_{1/2}$ Vida media de la fase terminal aparente (cuando sea posible), donde $t_{1/2} = (\ln 2)/K_e$.

Los cálculos de PK se realizaron utilizando software comercial tal como WinNonlin (Pharsight Corporation, versión 3.3 o superior). Los resultados pueden apreciarse en los gráficos que aparecen más adelante.

Discusión y conclusión

Información general:

Cada grupo posológico incluyó tres sujetos a quienes se les administró una vez, por vía intranasal, la formulación de esta invención con una dosis determinada de PYY $_{3-36}$ humano sintético libre de pirógeno. Se organizaron cinco grupos posológicos que recibieron dosis escalonadas de PYY $_{3-36}$ en la formulación. Se extrajeron muestras de sangre a intervalos específicos, con tubos de recolección que contenían heparina de litio (para inhibir la coagulación) y aprotinina (para conservar el PYY_{3-36}). Se extrajo el plasma de cada muestra de sangre por centrifugado y se lo almacenó en alícuotas congeladas. Una alícuota congelada de cada muestra se envió a Nastech Analytical Services, adonde llegó congelada. Cada muestra se almacenó congelada hasta el momento de estudiar la concentración del PYY mediante radioinmunoanálisis (RIA).

Observaciones:

Grupo 1: Los sujetos de este grupo recibieron 20 microgramos de PYY_{3-36}. La concentración plasmática del PYY en los sujetos osciló desde un mínimo de "menos de 20

pg/ml" (por debajo del límite inferior de la cuantificación del radioinmunoanálisis) hasta un máximo de 159 pg/ml. Las tendencias observadas en las concentraciones no concuerdan con una absorción significativa del fármaco en la sangre de los sujetos estudiados.

Grupo 2: Los sujetos de este grupo recibieron 50 microgramos de PYY_{3-36}. La concentración plasmática del PYY en los sujetos osciló desde un mínimo de 50 pg/ml hasta un máximo de 255 pg/ml. Las tendencias observadas en las concentraciones concuerdan con una absorción significativa de la droga en la sangre de los sujetos estudiados.

Grupo 3: Los sujetos de este grupo recibieron 100 microgramos de PYY_{3-36}. La concentración plasmática del PYY en los sujetos osciló desde un mínimo de 87 pg/ml hasta un máximo de 785 pg/ml. Las tendencias observadas en las concentraciones concuerdan con una absorción significativa del fármaco en la sangre de los sujetos estudiados.

Grupo 4: Los sujetos de este grupo recibieron 150 microgramos de PYY_{3-36}. La concentración plasmática del PYY de los sujetos osciló desde un mínimo de 45 pg/ml hasta un máximo de 2.022 pg/ml. Las tendencias observadas en las concentraciones concuerdan con una absorción significativa del fármaco en la sangre de los sujetos estudiados.

Grupo 5: Los sujetos de este grupo recibieron 200 microgramos de PYY_{3-36}. La concentración plasmática del PYY de los sujetos osciló desde un mínimo de 48 pg/ml hasta un máximo de 1.279 pg/ml. Las tendencias observadas en las concentraciones concuerdan con una absorción significativa del fármaco en la sangre de los sujetos estudiados.

Estos resultados concuerdan con una absorción del PYY_{3-36} dependiente de la dosis.

Observaciones y datos adicionales:

Síntesis de los resultados:

- Con dosis intranasales de 50 µg – 200 µg se produce una absorción plasmática del PYY dependiente de la dosis.
- La duración de las concentraciones plasmáticas elevadas es mucho mayor de la prevista y la vida media de la eliminación se calcula en 55 minutos.
- La Cmáx y el AUC 0-t demuestran una buena linearidad con la dosis.
- Se observa gran variabilidad entre los sujetos con dosis idénticas.
- Sorprendentemente, este estudio no logró detectar el aumento posprandial de PYY, aunque no se midió la cantidad de comida ingerida y, si la ingesta fue demasiado escasa, ello explicaría las observaciones.
- Según las respuestas a un cuestionario de escala visual análoga sobre apetito, éste disminuyó al aumentar las dosis de PYY.
- Con concentraciones plasmáticas de PYY muy elevadas aparecen náuseas y mareos.
- Los valores basados en el ensayo descripto en esta memoria descriptiva parecen ser 2-3 veces más elevados que los que previamente informa la literatura.

Notas:

- En algunos casos, se utiliza pmol/l como unidad de medida del PYY, mientras que en otros análisis se usa pg/ml. El factor de conversión es pmol/l * 4,05 = pg/ml.
- En algunos casos, el punto temporal de 150 minutos se muestra en diagramas. En rigor, se trata de un punto de referencia posprandial, por lo cual puede confundir la evaluación del PK. No obstante, un hallazgo inesperado, descrito con mayor detalle más adelante, es que la concentración registrada a los 30 minutos posprandiales no difiere del valor basal.

Concentración plasmática de PYY:

El análisis de PYY detallado en la presente descripción ha sido validado para determinar la concentración plasmática del PYY. Con este análisis, se analizaron muestras tomadas en cada uno de los puntos temporales por triplicado. Cabe destacar que de los 180 puntos de referencia, 3 (1,6%) parecen "valores atípicos" biológicamente improbables. A lo largo de este análisis preliminar, se utiliza un conjunto de datos del cual se quitaron estos tres puntos de referencia.

CUADRO 9

Parámetros descriptivos de PK:

Los parámetros de PK calculados incluyen:

	$T_{máx}$ (min)	$C_{máx}$ (pg/ml)	$AUC_{0\text{-última}}$ (min*pg/ml)	$AUC_{0\text{-inf}}$ (min*pg/ml)	$T_{1/2}$ (min)
20	60	47	3850		
50	18	89	4960	12379	112
100	32	342	28535	41102	27
150	23	530	31859	39476	39
200	23	683	34823	48618	42

El examen de los diagramas del PK promedio indica que hay respuesta a las dosis de entre 50 y 200 µg, pero también que la dosis de 20 µg queda en la nariz. Por lo tanto, muchos de los análisis sucesivos se basarán en datos obtenidos únicamente a partir de dosis de entre 50 y 200 µg. Asimismo, se sugiere que, dado que el PYY es una molécula endógena, el $AUC_{0\text{-t}}$ es más importante que el $AUC_{0\text{-inf}}$.

$T_{máx}$ y $T_{1/2}$ (vida media de eliminación):

	Tmáx (min)	$T_{1/2}$ (min)
Valores promedio para grupos que reciben dosis de entre 50 y 200 µg	24	55

El Tmáx de 24 minutos es el característico de los productos de administración nasal. La vida media de eliminación de 55 minutos es considerablemente mayor de lo que se hubiera esperado. Los artículos bibliográficos indicaban una $t_{1/2}$ típica de entre 5 y 10 minutos. La vida media de eliminación también puede verse afectada por cierta absorción continua de la mucosa nasal ocurrida después del Tmáx, y por los componentes de la formulación que afectan al metabolismo de los péptidos. Por otro lado, dado que el análisis detallado en la presente descripción utiliza un procedimiento de extracción, se podrá capturar PYY tanto libre como fijado a una proteína, mientras que un análisis que no utilice extracción podrá analizar fundamentalmente la fracción libre.

A partir de este análisis del cambio promedio de la VAS en comparación con la información basal (media de valores de 10, 30 y 60 minutos menos basal) frente a la dosis, se observa que:

Ante la pregunta 1 de la VAS, "¿Cuánta hambre siente?", los sujetos manifestaron **tener menos apetito** tras recibir dosis más altas de PYY. Ante la pregunta 3, "¿Cuánto cree que podría comer?", los sujetos creyeron que **podrían comer menos** tras recibir dosis más altas de PYY. No obstante, ante la pregunta 2, "¿Cuán satisfecho se siente?", los sujetos declararon **sentirse menos satisfechos** tras recibir dosis más altas de PYY. Lo anterior indica que la sensación posterior a la administración de PYY no incluye saciedad, hinchazón ni hipercontractilidad gástrica.

EJEMPLO 8B

Administración de PYY en humanos y pérdida de peso

Se preparó la siguiente formulación nasal de PYY.

Reactivo	Grado	Proveedor	Cat. Nº	Lote Nº	F.W.	mg/ml	%
Clorobutanol, anhidro	NF	Spectrum	CH123	RI1646	177,46	2,5	0,25
Metil-ß-ciclodextrina		Sigma	C-4555	81K1179		45	4,5
Didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina		Sigma	P-7081	55H8377	565,7	1	0,1
Edetato disódico	USP	Dow Chemicals		1034N-00269-2	372,2	1	0,1
Citrato de sodio, dihidrato	USP	Spectrum	S0165	RH1056	294,1	1,6	0,16
Ácido cítrico, anhidro	USP	Sigma	C-1857	062K003	192,13	0,9	0,09
PYY_{3-36}, libre de endotoxinas		Phoenix	059-02	420338	4049,71	2	0,2
Agua purificada							

Formulación pH 5 +/- 0,25

Se administraron una o dos pulverizaciones diariasa un sujeto humano durante 10 días y se registró pérdida de peso de 2,5 libras. Durante períodos que oscilan entre los 10 minutos y las 12 horas tras la administración, el sujeto sintió menos apetito.

EJEMPLO 9

Formulación Bucal de PYY3-36

(Profético)

Se preparan tabletas en bicapas de la siguiente manera. Se prepara una capa adhesiva pesando 70 partes por peso de óxido de polietileno (Poliox 301N; Union Carbide), 20 partes

por peso de ácido poliacrílico (Carbopol 934P; B.F. Goodrich), y 10 partes por peso de un relleno compresible de xilitol/carboximetil celulosa (Xilitab 200; Xirofin). Estos ingredientes se mezclan en una vasija por rotación por 3 minutos. La mezcla se transfiere luego a una plato de evaporación y rápidamente es granulada en forma húmeda con etanol absoluto hasta obtener una consistencia del tipo semi masa. Inmediata y rápidamente se fuerza esta masa a través de un tamiz de acero inoxidable de 14 mesh (1.4 mm de abertura), en donde se adhieren los gránulos húmedos. El tamiz se cubre con papel metálico de aluminio perforado, y los gránulos se secan durante la noche a 30°C. Los gránulos secados se remueven del tamiz y luego se pasan a través de un tamiz de 20 mesh (0.85mm de abertura) para reducir más el tamaño de los gránulos. Las partículas que no pasan a través del tamiz de 20mesh se muelen brevemente con un mortero y la mano de un mortero para minimizar la cantidad partículas finas y luego se pasan a través de un tamiz de 20mesh. Los gránulos resultantes se pasan luego a una vasija, y se adiciona 0,25 partes por peso de ácido esteárico y 0,06 partes por peso de saborizante de menta (Universal Flavors) y se mezcla con los gránulos. De esta forma los porcentajes finales por peso de los ingredientes son 69,78% de óxido de polietileno, 9,97% de relleno de xilitol/carboximetil celulosa compresible, 19,94% de ácido poliacrílico, 0,25% de ácido esteárico, y 0,06% de saborizante de menta. Una cantidad de 50mg de esta mezcla se coloca en una matriz de 0,375 inch de diámetro y se pre-comprime sobre una Prensa Carver Modelo C con una presión de 0,25 toneladas métricas durante un tiempo residente de 3 segundos para formar una capa adhesiva.

La capa activa se prepara pesando 49,39 partes por peso de manitol, 34,33 partes por peso de hidroxipropil celulosa (Klucel L F Aqualon, Wilmington, Del.) y 15,00 partes por peso de taurocolato de sodio (Aldrich, Milwaukee, Wis.) y mezclando por rotación en una vasija durante 3 minutos. La mezcla es luego transferida a un plato de evaporación y rápidamente granulada en forma húmeda con etanol absoluto hasta una consistencia del tipo

semi-masa. Esta masa es inmediata y rápidamente forzada a través de un tamiz de acero inoxidable de 14 mesh, en donde se adhieren los gránulos húmedos. La matriz se cubre con papel metálico de aluminio perforado, y los gránulos se secan durante la noche a 30°C. Los gránulos secos se pasan luego secuencialmente a través de tamices de 20, 40 mesh (0,425mm de abertura), y 60 mesh (0,25mm de abertura) para reducir más el tamaño de partícula. Las partículas que no pasan a través del tamiz se muelen brevemente con un mortero y la mano de un mortero para minimizar las partículas finas y luego se pasa a través de un tamiz.

Se pesan las partículas tamizadas, y luego se mezclan 0,91 partes por peso de PYY_{3-36} y 0,06 parte por peso de colorante del tipo amarillo FD&C aluminio N° 6HT secuencialmente con el granulado seco por dilución geométrica. El granulado seco se coloca luego en una vasija de mezclado y se mezcla con 0,25 partes por peso de estearato de magnesio (lubricante) y 0,06 partes por peso de saborizante de menta por rotación durante 3 minutos. Una muestra de 50mg de este material se coloca en la parte superior de una capa adhesiva parcialmente comprimida y ambas capas se comprimen luego a una presión de 1,0 toneladas por un tiempo residente de 3 segundos para producir una tableta bicapa adecuada para la administración bucal.

Con este proceso se obtiene en una tableta gingival en donde la capa activa contiene 0,91% por peso de PYY3-36, 15% por peso de NaTC, y 84,09% por peso de relleno, lubricante, colorante, ayudante de formulación y agentes saborizantes.

EJEMPLO 10

Se llevó a cabo un estudio para comparar la capacidad del PYY_{3-36} libre de endotoxina frente a la del PYY_{3-36} con endotoxina para penetrar el epitelio bronquial, según el

procedimiento del Ejemplo 1. Se halló que aproximadamente el doble de PYY_{3-36} libre de endotoxinas penetró el epitelio bronquial en comparación con la formulación de PYY_{3-36} que contenía endotoxina.

Ambas formulaciones contenían clorobutanol 2,5mg/ml, 2 mg/ml de DDPC, 10 mg/ml de albúmina, 1mg/ml de EDTA y 45 mg/ml de M-B-CD. Una de las formulaciones contenía PYY_{3-36} sin endotoxina y la otra contenía 70 o más UE (unidades de endotoxina).

El MTT promedio de la formulación de PYY_{3-36} con endotoxina fue de 91,72%, mientras que el PYY_{3-36} de la formulación libre de endotoxinas alcanzó un MTT promedio de 100,16%.

La penetración promedio de la formulación del PYY_{3-36} con endotoxina fue de 5,36%, mientras que la de la formulación sin endotoxinas alcanzó el 10,75%.

Algunos excipientes conocidos que aumentan la administración mucosa pueden combinarse (con buenos resultados) con los péptidos fijadores al receptor de Y2 libre de endotoxina, en especial el PYY3-36 libre de endotoxinas, y pueden utilizarse para mejorar las formulaciones no infusivas, sobre todo de administración por vía oral. Dichos excipientes se encuentran en las siguientes solicitudes de patente, incorporadas al presente por referencia: Solicitudes de patentes estadounidenses 20030225300, 20030198658, 20030133953, 20030078302, 20030045579, 20030012817, 20030012817, 20030008900, 20020155993, 20020127202, 20020120009, 20020119910, 20020065255, 20020052422, 20020040061, 20020028250, 20020013497, 20020001591, 20010039258, 20010003001.

Formulación Oral de un Péptido fijador al Receptor Y2

Una formulación oral de un péptido fijador al receptor Y2 puede ser preparado de acuerdo con el siguiente procedimiento. Una formulación preferida para la administración oral contiene aproximadamente 0,5mg/kg de PYY libre de endotoxina y entre 100 y aproximadamente 200mg/kg de uno o más excipientes mejoradores de la administración por vía mucosa

(Profético)

EJEMPLO 11

Preparación del aldehido N-ciclohexanoilfenilalanina

Se disuelve fenilalanina metil éster (1g., 0,0046 moles) en 5ml de piridina. Se adiciona cloruro de ciclohexanoilo (0,62ml) y la mezcla se agita por 2 horas. La mezcla de reacción se vierte sobre ácido clorhídrico (1N) y hielo triturado. La mezcla acuosa se extrae dos veces con tolueno. Se concentran los extractos de tolueno combinados en vacío para obtener 1,1g de N-ciclohexanoilfenilalanina metil éster crudo.

Se disuelve N-ciclohexanoilfenilalanina metil éster (0,5g) en etilén glicol dimetil éter (20ml). La solución se enfría a 70°C y se adiciona hidruro de diisobutilaluminio (2,04 ml de una solución 1,5M en tolueno). La mezcla de reacción resultante se agita a -70°C durante 2 horas. La reacción se termina agregando por goteo ácido clorhídrico 2N. La mezcla se extrae con acetato de etilo frío. La solución de acetato de etilo se lava con sal y se seca sobre sulfato de sodio. La concentración en vacío provee un sólido blanco, el cual se purifica por cromatrografía en sílica gel.

160
157

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6): 9.5 (s, 1H), 8.2 (d, 1H), 7.2 (m, 5H), 4.2 (m, 1H), 3.2 (d, 1H), 2.7 (d, 1H), 2.1 (m, 1H), 1.6 (br.m, 4H), 1.2 (br.m, 6H). R (KBr): 3300, 3050, 2900, 2850, 2800, 1700, 1600, 1500 cm-^{1}. Masa Epecífica: M+1 m/e 261. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6): 9.5 (s, 1H), 8.2 (d, 1H), 7.2 (m, 5H), 4.2 (m, 1H), 3.2 (d, 1H), 2.7 (d, 1H), 2.1 (m, 1H), 1.6 (br.m, 4H), 1.2 (br.m, 6H). R (KBr): 3300, 3050, 2900, 2850, 2800, 1700, 1600, 1500 cm-^{1}. Masa Específica: M+1 m/e 261.

EJEMPLO 12

Preparación de N-acetilfenilalanina aldehido

Se disuelve N-acetilfenilalanina metil éster (4,2g, 19mmol) en etilén glicol dimetil éter. La solución se enfría a -70°C y se adiciona hidruro de diisobutilaluminio (25,3 ml de una solución 1,5M en tolueno, 39mmol). La mezcla de reacción resultante se agita a -70°C durante 2 horas. La reacción se termina por adición de ácido clorhídrico 2N. La mezcla se extrae 4 veces con acetato de etilo frío y 4 veces con tolueno. Los extractos se combinan, se lavan con sal y se secan sobre sulfato de sodio. La concentración en vacío seguida de cromatrografía en sílica gel provee 2,7 g de un sólido blanco. El espectro d RMN es como el informado en la literatura, *Biochemistry*, 18: 921-926 (1979).

EJEMPLO 13

Preparación de 3-acetamido-4-(p-hidroxi)fenil-2-butanona (N-acetiltirosinona)

Una mezcla de tirosina (28,9g, 16mmol), anhídrido acético (97,9g, 96mmol) y piridina (35g, 16mmol) se calientan a 100°C durante una hora. La mezcla de reacción se

+61
158

concentra en vacío para proveer un aceite amarillo. El aceite se destila a presión reducida para obtener 29,9 g de un aceite.

^{1}H NMR (DMSO-d6): NMR (d6-DMSO); 8.2 (d, 1H), 7.3 (d, 2H), 7.0 (d, 2H), 4.4 (m, 1H), 3.1 (dd, 1H), 2.7 (dd, 1H), 2.3 (s, 3H), 1.8 (s, 3H)

EJEMPLO 14

Preparación de 3-acetamido-7-amino-2-butanona (N-acetillisinona)

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3, se convierte lisina a N-acetillisinona.

^{1}H NMR (DMSO-d6): 8.1 (d, 1H), 7.8 (br.m. 1H), 4.1 (m, 1H), 3.0 (m, 2H), 2.0 (s, 3H), 1.9 (s, 3H) and 1.3 (br.m, 6H).

EJEMPLO 15

Preparación de 3-acetamido-5-metil-2-butanona (N-acetilleucinona)

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 2, se convierte leucina a N-acetilleucinona.
^{1}H NMR (DMSO-d6): 8.1 (d, 1H), 4.2 (m, 1H), 2.0 (s, 3H), 1.8 (s, 3H). 0.8 (d, 6H).

EJEMPLO 16

Modificación de Ácido 4-(4-aminofenil)butírico utilizando Cloruro de Bencensulfonil

Se disuelve 4-(4-aminofenil)butírico (20g. 0,11 moles) en 110 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio 2N. Después de agitar durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente, se agrega por goteo cloruro de bencensulfonilo (14,2ml, 0,11 moles) en una solución de aminoácido durante un período de 15 minutos. Después de agitar durante aproximadamente 3 horas a temperatura ambiente la mezcla se acidifica a pH 2 por adición de ácido clorhídrico. Este proceso provee un precipitado marrón claro que se aisla por filtración. El precipitado se lava con agua caliente y se seca. El punto de fusión es 123-125°C.

Si fuera necesario, los aminoácidos modificados pueden ser purificados por recristalización y/o cromatografía.

EJEMPLO 17

Modificación de Ácido 4-aminobenzoico utilizando Cloruro de Bencensulfonilo

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 6, se convierte ácido 4-aminobenzoico a ácido 4-(fenilsulfonamido)benzoico.

EJEMPLO 18

Modificación del Ácido 4-Aminofenilacético, Ácido 4-Aminohipúrico, y Ácido 4-Aminometilbenzoico utilizando Cloruro de Bencensulfonilo

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 6, se convierten ácido 4-aminofenilacético, 4-aminohipúrico, y 4-amino-metilbenzoico a ácido 4-(fenilsulfonamido)fenilacético, ácido 4-(fenilsulfonamido)hipúrico, y ácido 4-(fenilsulfonamidometil)benzoico, respectivamente.

EJEMPLO 19

Modificación de Aminoácidos con cloruro de Bencensulfonilo.

Se prepara una mezcla de dieciséis aminoácidos previo a la modificación química. Los constituyentes de la mezcla se resumen en el Cuadro siguiente, se disuelven 65 gramos de la mezcla de aminoácido (concentración total de grupos [$-NH_2$] = 0,61 moles) en 760 ml de una solución de hidróxido de sodio 1N (0,7625 equivalentes) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 20 minutos se adiciona cloruro de bencensulfonilo (78ml, 1eq) durante un período de 20 minutos. La mezcla de reacción se agita entonces durante 2,5 horas, sin calentamiento. Como puede ocurrir alguna precipitación, se puede agregar solución de NaOH (2N) adicional a la solución hasta que se alcance un pH 9,3. La mezcla de reacción, se agita durante la noche a temperatura ambiente. Luego, la mezcla se acidifica utilizando ácido clorhídrico (38%. 1:4) y precipita un material de color crema. El precipitado resultante se aísla por decantación y se disuelve en hidróxido de sodio (2N). Esta solución se reduce luego en vacío para dar un sólido amarillo, que se seca sobre el liofilizador

CUADRO 10

Composición de Aminoácidos

Aminoácido	Peso (g)	% del peso total	N° de moles de cada Aminoácido	N° de moles de [–NH2]

			$(x10^{-3})$	
Tr	2.47	3.8	2.07	2.07
Ser	2.25	3.46	2.1	2.1
Ala	4.61	7.1	5.17	5.17
Val	4.39	6.76	3.75	3.75
Met	0.53	0.82	0.35	0.35
Ile	2.47	3.8	0.36	0.36
Leu	3.86	5.94	2.95	2.95
Tir	1.03	1.58	0.56	0.56
Fe	4.39	6.76	0.27	0.27
His	2.47	3.8	1.8	3.2
Lis	4.94	7.6	3.4	6.8
Arg	5.13	7.9	2.95	5.90
Glutamina	9.87	15.18	6.76	13.42
Ácido Glutamico	9.87	15.18	6.70	6.70
Asparagina	3.32	5.11	2.51	5.02
Ácido Aspartico	3.32	5.11	2.50	2.50

EJEMPLO 20

Modificación de una Mezcla de Cinco Aminoácidos utilizando Cloruro de Bencensulfonilo

Se disuelve 86,1g (0,85 moles de NH_2) de una mezcla de aminoácidos (ver Cuadro siguiente) en 643 ml (1,5eq) de una solución acuosa de hidróxido de sodio 2N. Después de agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente se adiciona cloruro bencensulfonilo (108 ml, 0,86 moles) en porciones dentro de la solución de aminoácido durante un período de 15 minutos. Después de agitar durante 2,5 horas a temperatura ambiente, el pH de la mezcla de

reacción (pH 5) se ajusta a pH 9 con solución de hidróxido de sodio 2N adicional. La mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente. Después de esto, el pH de la mezcla de reacción se ajusta a pH 2,5 por adición de solución acuosa de ácido clorhídrico diluido (4:1, H_2O:HCl) y se forma un precipitado de aminoácidos modificados. La capa superior se descarta y el precipitado amarillo resultante se aísla por decantación, se lava con agua y se disuelve en hidróxido de sodio 2N (2N). La solución se concentra en vacío para dar un sólido amarillo, el cual se liofiliza durante la noche.

CUADRO 11

Aminoácidos	Moles de Aminoácidos ($\times 10^{-2}$)	Moles de [$-NH_2$] $\times 10^{-2}$
Valina	7.5	7.5
Leucina	10.7	10.5
Fenilalanina	13.4	13.4
Lisina	21.0	42.0
Arginina	6.0	12.0

EJEMPLO 21

Modificación de una Mezcla de Cinco Aminoácidos utilizando Cloruro de Benzoílo

Se disuelve 86g (0,85 moles de NH_2) de una mezcla de aminoácidos (ver Cuadro en Ejemplo 20) en 637 ml (1,5eq) de una solución acuosa de hidróxido de sodio 2N. Después de agitar durante 10 minutos a temperatura ambiente se adiciona cloruro benzoílo (99 ml, 0,85 moles) en porciones dentro de la solución de aminoácido durante un período de 10 minutos. Después de agitar durante 2,5 horas a temperatura ambiente, el pH de la mezcla de reacción (pH 12) se ajusta a pH 2,5 con solución de ácido clorhídrico diluido (4:1, H_2O:HCl) y se forma un precipitado de aminoácidos modificados. Después de sedimentar durante 1 hora, el

precipitado resultante se aísla por decantación, se lava con agua y se disuelve en hidróxido de sodio 2N. La solución se reduce luego en vacío para dar un producto de aminoácidos modificados crudo como un sólido blanco (producción esperada 220,5g).

EJEMPLO 22

Modificación de L-Valina utilizando Cloruro de Bencensulfonilo

Se disuelve L-Valina (50g, 0,43mol) en 376 ml (0.75eq) de hidróxido de sodio 2N acuoso con agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se adiciona cloruro de bencensulfonilo (68,7ml, 0,38 mol, 1,25 eq) a una solución de aminoácidos durante un período de 20 minutos a temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente aparece un precipitado. Se disuelve el precipitado por adicción de 200ml de solución de hidróxido de sodio 2N. Después de agitar adicionalmente durante 30 minutos, se adiciona una solución de ácido clorhídrico acuoso diluido (4:1, H_2O:HCl) hasta que el pH de la mezcla de reacción alcanza 2,6. Se forma un precipitado de aminoácidos modificados y se recupera por decantación. Este material se disuelve en hidróxido de sodio 2N y se seca en vacío para dar un sólido blanco. La producción esperada de aminoácidos modificados crudo es 84,6g (77%).

EJEMPLO 23

Modificación de fenilalanina Metil Éster utilizando Cloruro de Hipurilo

Se disuelve hidrocloruro de L-fenilalanina metil éster (15g, 0,084 moles) en dimetilformamida (DMF) (100ml) y se adiciona piridina (30ml). Inmediatamente se adiciona una solución de cloruro de hipurilo (16,6g, 0084 moles en 100ml DMF) a una solución del éster de aminoácido en dos porciones. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla se reduce luego en vacío y se disuelve en hidróxido de sodio acuoso 1N. La solución se calienta a 70°C durante 3 horas para hidrolizar el metil éster a un grupo carboxilo libre. Después de esto, la solución se acidifica a pH 2,25 utilizando una solución de ácido clorhídrico acuoso diluido (1:3 HCl/H2O). Se forma un precipitado del tipo goma que se recupera y disuelve en hidróxido de sodio 1N. La solución se reduce en vacío para dar 18,6 g de un producto crudo de aminoácidos modificados. Después de la recristalización con acetonitrilo, se recupera fenilalanina modificada pura (producción esperada 12g) como un polvo blanco, PF 223-225°C.

EJEMPLO 24

Preparación de Soluciones de PYY(3-36) en dosis

En un tubo de ensayo se adiciona 568mg de acetil fenilalanina aldehido, 132mg de carbometoxifenilalanilleucina y 100 mg de acetil-Fe-Leu-Arg aldehido a 2,9 ml de 15% de etanol. La solución se agita y se adiciona HONa (1,0N) para elevar el pH a 7,2. Se agrega agua para llevar el volumen total a 4,0ml. La muestra tuvo una concentración de portadores de 200 mg/ml. Se adiciona PYY(3-36) a la solución. La concentración de PYY(3-36) total es 200 µg/ml.

Siguiendo un proceso similar, se prepara una segunda solución que tiene 668 mg de acetil fenilalanina aldehido y 132 mg de carbometoxifenilalanilleucina como composición de portador y una tercera solución que tiene acetil fenilalanina aldehido como portador. Cada solución tuvo una concentración de PYY(3-36) libre de endotoxina de 200 µg/ml.

EJEMPLO 25

Preparación de Composiciones de PYY(3-36)/Aminoácido modificado.

Preparación de Microesferas de Aminoácido modificado que contienen PYY(3-36) libre de endotoxina encapsulado.

La mezcla de aminoácido modificada preparada según el Ejemplo 9 se disuelve a 40° C en agua destilada (pH 7,2) a una concentración de 100mg/ml. La solución es luego filtrada con un filtro de 0,2 micrones y la temperatura se mantiene a 40°C. Se disuelve PYY(3-36)(Bachem) en una solución acuosa de ácido cítrico (1,7N) y gelatina (5% a una concentración de 150 mg/ml. Esta solución luego se calienta a 40°C. Las dos soluciones calentadas son luego mezcladas 1:1 (v/v). La suspensión de microesfera resultante se filtra luego en lana de vidrio y se centrifuga durante 50 minutos a 1000g. El pellet se resuspende con ácido cítrico 0,85 N a un volumen de 5 a 7 veces menos que el volumen original. La concentración de PYY(3-36) del pellet resuspendido se determina por HPLC. Se preparan microesferas adicionales según el procedimiento descripto arriba sin PYY(3-36). Si es necesario estas "microesferas vacías" se utilizan para diluir la preparación de microesferas de PYY(3-36) encapsuladas salmón a una suspensión de dosis final.

469
166

b)Preparación de un Sistema de PYY(3-36)/Portadores de aminoácidos Modificados Solubles

Una preparación para dosis de aminoácido soluble que contiene PYY(3-36) se prepara disolviendo el material de aminoácido modificado en agua destilada (pH 8) a una concentración apropiada. La solución se calienta a 40°C y luego se filtra con un filtro de 0.2 micrones. Luego se adiciona PYY(3-36) también disuelto en agua destilada a una solución de aminoácido modificado previo a la administración oral

Administración Pulmonar de PYY_{3-36}

(Profético)

Los compuestos portadores preparados como se describe abajo puede ser utilizado directamente como un portador de suministro mezclando simplemente uno o más compuestos o una sal, un poliaminoácido o péptido con un péptido fijador del receptor Y2 libre de endotoxina para la administración pulmonar.

La mezclas de administración son preparadas mezclando una solución acuosa del portador con una solución acuosa del ingrediente activo, justo previo a la administración. Alternativamente, el portador y el ingrediente química o biológicamente activo pueden se mezclados durante el proceso de manufactura. Las soluciones pueden contener adicionalmente aditivos tales como sales de fosfato buffers, ácido cítrico, ácido acético, gelatina y goma acacia.

Un número de métodos de administración por vía pulmonar puede usar péptidos fijadores al receptor Y2 libre de endotoxina, especialmente PYY3-36 para mejorar la administración de PYY a los pulmones. Las siguientes solicitudes de patentes sin limitar son incorporadas como referencia para la administración pulmonar: solicitud de patente US20030223939; 20030215514; 20030215512; 20030309243; 20030203036; 20030198601: 2003183228; 200301885765; 20030150454; 20030124193; 20030094173.

EJEMPLO 26

Preparación de Portadores

Preparación de ácido 2 -(4-(N-saliciloil)aminofenil) propiónico (Portador B)

Una lechada de 58,6 g (0,355 mol) de ácido 2-(4-aminofenil)propiónico y 500 ml de cloruro de metileno se trata con 90,11 ml (77.13g, 0-710mol) de cloruro de trimetilsililo y se calienta a reflujo durante 120 minutos. La mezcla de reacción se enfría a 0°C y se trata con 184,44 ml (107,77g, 1,065 mol) de trietilamina. Después de agitar durante 5 minutos, esta mezcla se trata con una solución de 70,45 g (0,355 mol) de cloruro de O-acetilsaliciloilo y 150 ml de cloruro de metileno. La mezcla de reacción se calienta a 25°C y se agita durante 64 horas. Se remueven los componentes volátiles en vacío. El residuo se agita en hidróxido de sodio acuoso 2N durante una hora y se acidifica con ácido sulfúrico 2M. El sólido se recristaliza dos veces a partir de etanol/agua para dar un sólido canela. Se aísla por filtración resultando en una producción esperada de 53,05 g (52% de producción) de ácido 2-(4-(N-saliciloil)aminofenil)propiónico. Propiedades: solubilidad: 200mg/m: 200mg+350.µl 2N NaOH+650 .µl H_2O-pH-7.67. Analisis: C, 67.36; H, 5.3; N, 4.91.

FIT
68

Preparación de 2-(4-(N-saliciloil)aminofenil)propionato de Sodio (Sal de Sodio de Portador B)

Se trata una solución de 53,05g (0,186 mol) de ácido 2-(4-(N-saliciloil)aminofenil)propiónico y 300 ml de etanol con 7,59g (0,190 mol) de HONa disuelto en 22 ml de agua. La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos a 25°C y durante 30 minutos a 0°C. El sólido amarillo pálido resultante se aísla por filtración para dar 52.61g de 2-(4-(N-saliciloil)aminofenil)propionato de sodio Propiedades: solubilidad 200 mg/ml solución clara, pH=6.85. Análisis C, 60.45; H, 5.45; N, 3.92; Na, 6.43. Punto de Fusión 236-238° C.

Preparación de la Sal de Sodio del Portador C

Un matraz de fondo redondo de 2l equipado con agitador magnético y un condensador de reflujo se carga con una suspensión de ácido 3-(4-aminofenil)propiónico (15,0g, 0,084 moles, 1,0 equivalentes) en diclorometano (250ml). Se adiciona clorometilsilano (18,19g, 0,856 moles, 2.0 equivalentes) en una vez, y la mezcla se calienta a reflujo durante 1,5 horas bajo argón. La reacción se deja enfriar a temperatura ambiente y se coloca en un baño de hielo (temperatura interna <10°C). El condensador de reflujo se reemplaza con un embudo que contiene trietilamina (25,41, 0,251 moles, 3,0 equivalentes). La trietilamina se adiciona por goteo durante 15 minutos, formándose un sólido amarillo. El embudo se reemplaza con otro embudo adicional que contiene una solución de cloruro de 2,3-dimetoxibenzoilo (18,31g, 0,091 moles, 1,09 equivalentes) en diclorometano (100 ml). Se adiciona la solución por goteo durante 30nm. La reacción se agita en una baño de hielo por

otros 30 minutos y a temperatura ambiente durante 3 horas. El diclorometano se evapora en vacío para dar un aceite marrón. El aceite marrón se enfría en un baño de hielo. y se agrega una solución enfriada en hielo de bicarbonato de sodio saturado (250 ml). El baño de hielo se remueve, y la reación se agita durane 1 hora para dar una solución marrón clara. La solución se acidifica con HCL concentrado y se almacena a SC durante 1 hora. La mezcla se extrae con diclorometano (3 veces, 100 ml), se seca sobre sulfato de sodio, las sales se filtran y el diclorometano se remueve en vacío. El sólido resultante se recristaliza a partir de 50% de acetato de etilo/agua (v/v) para dar el Portador C ácido como agujas blancas (25.92 g, 90%). Análisis: $C_{19}H_{21}NO_5$: C, 66.46; H, 6.16; N, 4.08. Punto de Fusión=99-102°C.

Se disuelve 12g de Portador C ácido en etanol, 75 ml, con calentamiento. A esta solución se adiciona una solución de hidróxido de sodio 8,5M (1,02 equivalentes molares, 1,426 gramos en 4,5 ml de agua) la mezcla se agita durante 15 minutos. Aproximadamente tres cuartos del etanol se remueven en vacío y se adiciona 100 ml de n-heptano al aceite resultante formando un precipitado. Los sólidos se secan en vacío a 50°C. Análisis: $C_{19}H_{20}NO_5Na0.067H_2O$: C, 62.25; H, 5.54; N, 3.82; Na, 6.27.

Preparación de ácido N-(4-metilsaliciloxil)-8-aminocaprílico (Portador D)

a) Preparación de Oligo(4-metilsalicilato)

Se adiciona anhidrido acético (32ml, 34,5g, 0,338 mol, 1,03eq.). ácido 4-metilsalicílico (50g, 0,329 mmol, 1,00eq.) y xileno (100ml) a un matraz de cuatro cuellos de 1l. equipado con una varilla de agitación magnética, un termómetro y un condensador. El matraz se coloca en un baño de arena y se calienta hasta que comienza una mezcla blanca nubosa. La mezcla de reacción se clarifica a una solución amarilla alrededor de los 90°C. La

mayoría de los orgánicos volátiles (xilenos y ácido acético) se destilan en una trampa de Dean-Stark durante tres horas (135-146°C). Se continúa la destilación por otra hora (un total de 110 ml destilado) durante el cual la temperatura de la caldera lentamente se eleva a 204°C y el destilado disminuye a un flujo lento. El residuo se vierte mientras todavía está caliente, dentro de una bandeja de aluminio. Bajo enfriamiento se forma un sólido vítreo amarillo quebradizo. El sólido se muele a un polvo fino. El oligo(4-metilsalicilato) obtenido se utiliza sin purificación adicional.

b) Preparación de ácido N-(4-metilsaliciloil)-8-aminocaprílico

Se agrega una solución de carbonato de potasio 7M (45ml, 46,2g, 0,313 mol, 0,95 eq.), ácido 8-aminocaprílico (41,8g, 262 mol, 798 eq.), y agua (20ml) a un matraz de fondo redondo equipado con una varilla de agitación magnética, un condensador y un abastecedor de combustible adicional. La mezcla nubosa blanca se trata con una solución de oligo(4-metilsalicilato) (44,7g, 0,329 mmol, 1,0 eq.) y se adiciona dioxano (250 ml) durante 30 minutos. La mezcla de reacción se calienta a 90°C durante 3 horas (tiempo en que se determina si tiene que finalizar la reacción por HPLC). La mezcla de reacción anaranjada clara se enfría a 30°C y se acidifica a pH=2 con 50% de ácido sulfúrico acuoso (64g). El sólido resultante se aísla por filtración. El sólido blanco se recristaliza de 1170 ml de 50% de etanol-agua. El sólido se recupera por filtración y se seca durante 18 horas en un horno a 50°C y vacío. El ácido N-(4-metilsaliciloil)-8-aminocaprílico se aísla como un sólido blanco (30.88 g, 52%); PF=113-114°. Análisis: $C_6H_{23}NO_4$: C, 65.51; H, 7.90; N, 4.77.

Se prepara luego una solución acuosa de PYY(3-36) y se mezcla con uno o más de los portadores para producir una composición de PYY(3-36), la cual puede ser rociada dentro

de los pulmones. Una concentración adecuada de PYY(3-36) para la composición resultante debe ser aproximadamente 400µg/ml. Ver solicitud de patente US 20030072740.

EJEMPLO 27

Radioinmunoanálisis de extracción total para determinar la concentración plasmática del PYY

1.0 Introducción:

Se desarrolló un radioinmunoanálisis para medir la concentración del péptido humano YY(3-36) (PYYh) en el plasma humano. Las muestras se recogen con anticoagulante (EDTA) e inhibidor de la proteasa (aprotinina) y se congelan. El proceso lleva cuatro días. El Día 1 se extraen las muestras, los controles y los estándares en alcohol y se secan. El Día 2 se reconstituyen y mezclan todas las muestras con un antisuero policlonal de conejo dirigido contra el PYYh. El Día 3 se agrega PYYh yodado. El Día 4 se añaden precipitantes específicos (suero de cabra anti-IgG de conejo y suero normal de conejo). Se separa el marcador fijado del libre mediante centrifugado, y el marcador unido se cuantifica con el cuantificador gamma. La concentración se calcula interpolando una curva convencional y el resultado del análisis se controla con muestras de Control de Calidad.

2.0 Materiales:

2.1 Kit de PYY Península (Peninsula Laboratories, Cat. No. S-2043-0001)

2.2 Alcohol reactivo (Fisher Inc., Cat. No. A995-4) (o equivalente)

2.3 Plasma humano aislado (con heparina de litio, en ayunas, mezclado de varias muestras) Golden West Biologics Inc. (Cat. No. SD1020-H) (Analytical SOP # A-003)

2.4 Baños de hielo (Fisher, Cat No. 11-676-36) (o equivalente)

2.5 Pipetas descartables de 10 ml (Fisher Cat. No. 13-678-11E) (o equivalentes)

2.6 PYY humano sintético convencional del Control de Calidad de Nastech (3-36) (Bachem Cat. No. H8585)

2.7 Agua destilada (Milli-Q Millipore, Cat. No. ZMQ56VFT1) (o equivalente)

2.8 Tritón X-100 (Sigma, Cat. No. T-9284) (o equivalente)

2.9 Hoja de aluminio (Fisher, Cat. No. 01-213-3) (o equivalente)

2.10 Aprotinina (ICN Biomedicals Inc. Cat. No. 190779) (o equivalente)

2.11 Tubos de 12x75 mm (Evergreen Scientific, Cat. No. 214-2023-010) (o equivalente)

2.12 Tapas para tubos de 12x75 mm (Evergreen Scientific, Cat. No. 300-2912-010) (o equivalente)

2.13 Tubos de microfuga de 1,5 ml (Fisher, Cat. No. 05-402-25) (o equivalente)

3.0 Instrumentos:

3.1 Wallac WIZARD 1470 Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer, Modelo No. 1470-002) (o equivalente)

3.2 Isotemp Basic Freezer, -70°C (Kendro Laboratory Products, Modelo No. C90-3A31) (o equivalente)

3.3 CentriVap Concentrator (Labconco, Cat. No. 7810000) (o equivalente)

3.4 VX-2500 Multi-tube Vortexer (VWR, Cat. No. 58816-115) (o equivalente)

A6
B3

3.5 Marathon 21000R Centrifuge (Fisher, Cat. No. 04-977-21000R) (o equivalente)

3.6 Rotor de cubeta oscilante (Fisher, Cat. No. 04-976-006) (o equivalente)

3.7 Instrumento motorizado para pipeta (Fisher Cat. No. 13-681-15E) (o equivalente)

3.8 Micropipeta Eppendorf

3.8.1 2 µl - 20 µl (Fisher, Cat. No. 21-371-6) (o equivalente)

3.8.2 20 µl -200 µl (Fisher, Cat. No. 21-371-10) (o equivalente)

3.8.3 100 µl -1000 µl (Fisher, Cat. No. 21-371-13) (o equivalente)

3.9 Eppendorf Repeating Pipettor (Fisher, Cat. No. 21-380-9) (o equivalente)

3.10 Eppendorf Repeating Pipettor Combi-tips

3.10.1 2,5 ml (Fisher, Cat. No. 21-381-331) (o equivalente)

3.10.2 25 ml (Fisher, Cat. No. 21-381-115) (o equivalente)

3.11 Pipeta de desplazamiento positivo (Fisher, Cat. No. 21-169-10A) (o equivalente).

4.0 Procedimiento

DÍA 1

4.1 Descongele los reactivos y las muestras necesarios para el análisis. Prepare el buffer del RIA a una concentración de 1X (RIAB) si no se dispone de la cantidad suficiente.

4.2 Prepare muestras de curva estándar en muestras mezcladas de plasma humano aislado. Proceda como se describe a continuación si se usa una concentración inicial de 12,8 µg/ml.

4.2.1 Agregue 990 µl de RIAB al tubo O.

4.2.2 Agregue 990 µl de plasma al tubo A.

4.2.3 Incorpore 500 µl de plasma en los tubos B-H.

4.2.4 Incorpore 10 µl 12,8 µg/ml Standard al tubo O. Someter a agitación vorticial.

4.2.5 Agregue 10 µl de la solución del tubo O al tubo A. Someta a agitación vorticial.

4.2.6 Agregue 500 µl de la solución del tubo A al tubo B. Someta a agitación vorticial.

4.2.7 Agregue 500 µl de la solución del tubo B al tubo C. Someta a agitación vorticial.

4.2.8 Repita las diluciones tal como se indica en 4.2.7 hasta el tubo H (véase el Diagrama 1)

4.3 De ser necesario, diluya muestras desconocidas de plasma humano para someterlas a análisis. Las muestras deberán diluirse en muestras mezcladas de plasma humano aislado.

4.4 Agregue 1,2 ml de alcohol frío a tubos vacíos para someter a análisis las muestras NSB, TB, todos los estándares, las de control de calidad y las de plasma humano.

4.5 Incorpore 400 µl de muestras mezcladas de plasma humano aislado en los tubos de NSB y TB. Tape, someta a agitación vorticial.

4.6 Agregue 400 µl de cada muestra estándar preparada en 4.2.5 a 4.2.8 a los respectivos tubos de curva estándar H-A (véase el Diagrama 1). Tape, someta a agitación vorticial.

4.7 Agregue 400 µl de las muestras de control de calidad a los tubos respectivos. Tape, someta a agitación vorticial.

4.8 Agregue 400 µl de cada muestra que se someterá a análisis en su tubo respectivo. Tape, someta a agitación vorticial.

4.9 Incube todas las muestras en hielo de 30 a 60 minutos.

4.10 Encienda la llave de "frío" del Concentrador.

4.11 Centrifugue todos los tubos a 3000 rpm, 4 °C, durante 15 minutos.

4.12 Transfiera 1,3 ml del sobrenadante de cada muestra a un nuevo conjunto de tubos vacíos. Almacene en un baño de hielo o a 2-8° C si no las agita de inmediato.

4.13 Coloque las muestras en el Concentrador.

4.14 Las muestras deben agitarse durante dos horas a 40° C y luego a temperatura ambiente durante un total de 5 horas o hasta secarse.

4.15 Quite las muestras secas, cubra y guarde hasta el día siguiente a 2-8° C.

DÍA 2

4.16 Quite los tubos secos del refrigerador a 2-8° C.

4.17 Incorpore 100 µl del concentrado buffer 4x del RIA en cada tubo.

4.18 Agregue 100 µl de TX100 al 0,6% a cada tubo. (Anexo 1) Someta a agitación vorticial durante un mínimo de 30 segundos para que todos los extractos queden reconstituidos por completo.

4.19 Incube todas las muestras en hielo de 30 a 60 minutos.

4.20 Agregue 200 µl de agua destilada a cada tubo. Someta a agitación vorticial.

4.21 Transfiera 100 µl del extracto de cada muestra al tubo respectivo.

Nota: Las muestras NSB, TB, TC, curva estándar y control de calidad suelen efectuarse por triplicado, con lo cual se necesitan tres

tubos por muestra. Las muestras de plasma humano pueden analizarse en cualquier variación (hasta tres muestras) según la disponibilidad de la muestra.

4.22 Prepare anti-PYY de conejo conforme se describe en el kit de Peninsula Laboratories.

4.23 Agregue 100 µl de RIAB a cada tubo de NSB.

4.24 Agregue 200 µl de RIAB a cada tubo de TC.

4.25 Agregue 100 µl de anti-PYY de conejo a todos los tubos restantes. Someta a agitación vorticial.

4.26 Cubra con la hoja de aluminio y guarde hasta el día siguiente a 2-8° C.

DÍA 3

4.27 Quite los tubos secos del refrigerador a 2-8° C.

4.28 Prepare el marcador ^{125}I del péptido YY (Anexo 2).

4.29 Agregue 100 µl del marcador preparado a todos los tubos. Tape y someta a agitación vorticial.

4.30 Guarde hasta el día siguiente a 2-8° C.

DÍA 4

4.31 Quite los tubos secos del refrigerador a 2-8° C.

4.32 Prepare suero de cabra anti-IgG de conejo (GARGG) y suero normal de conejo (NRS, por su sigla en inglés) conforme se describe en el prospecto del kit de Peninsula Laboratories.

4.33 Agregue 100 µl de GARGG a cada tubo (salvo los tubos de TC).

4.34 Agregue 100 µl de NRS a cada tubo (salvo los tubos de TC). Someta a agitación vorticial.

4.35 Incube de 90 a 120 minutos a temperatura ambiente.

4.36 Agregue 500 µl de RIAB a los tubos que serán centrifugados de inmediato (salvo los tubos de TC). Someta a agitación vorticial.

Nota: Deben agregarse 500 µl de RIAB a los tubos que serán centrifugados, inmediatamente antes de la centrifugación. Sólo se agregan 500 µl de RIAB a los otros tubos cuando ya estén listos para centrifugar.

4.37 Centrifugue los tubos (con 500 µl de RIAB) a 3000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. No centrifugue los tubos de TC.

4.38 Aspire el sobrenadante de los tubos centrifugados.

4.39 Coloque los tubos en las rejillas negras designadas para su conteo en el contador gamma. La primera rejilla debe llevar incorporado el número de programa correspondiente. Las rejillas siguientes no llevan ningún número de programa. Las muestras se agregan en el orden siguiente:

4.39.1 Tubos de NSB

4.39.2 Tubos de TB

4.39.3 Tubos de TC

4.39.4 Tubos estándar (concentración en aumento)

4.39.5 Muestras de control de calidad (3 concentraciones)

4.39.6 Muestras humanas desconocidas

4.39.7 Muestras de control de calidad (3 concentraciones)

4.40 Adhiera la etiqueta "Parar" a una rejilla negra vacía a continuación de las muestras que se contarán.

4.41 Presione 'Start' en la botonera del contador gamma para dar comienzo al conteo.

4.42 Presione 'E'(*enter*) para visualizar los resultados de las CPM.

5.0 Evaluación de los resultados

5.1 A continuación, se enumeran las pautas que se aplican para identificar y rechazar los valores atípicos hallados en el análisis. Para que un resultado sea considerado atípico y no se lo incluya en el cálculo final de los resultados, deben cumplirse las siguientes condiciones.

5.1.1 Muestras desconocidas y de control de calidad (CC):

5.1.1.1 El %CV de todas las muestras debe superar el 20%.

5.1.1.2 Debe haber por lo menos tres resultados para evaluar.

5.1.1.3 La diferencia entre el supuesto valor atípico y el resultado de valor más próximo debe superar el 20%.

5.1.1.4 La diferencia entre el extremo superior y el inferior de los resultados restantes debe ser menor al 20%.

5.1.2 Muestras de curva estándar:

5.1.2.1 El %CV de todas las muestras debe superar el 15%.

5.1.2.2 Debe haber por lo menos tres resultados para evaluar.

5.1.2.3 La diferencia entre la supuesta aberración y el resultado de valor más próximo debe superar el 15%.

5.1.2.4 La diferencia entre el extremo superior y el inferior de los resultados restantes debe ser menor al 15%.

6.0 Especificaciones del análisis

6.1 Las muestras de control de calidad (CC) se preparan con las concentraciones siguientes. Se someten a análisis dos muestras de CC a cada concentración. Cuatro de las seis muestras de CC sometidas a análisis deben encontrarse dentro de las siguientes escalas (±30% de concentración nominal). Para que los datos resulten aceptables, por lo menos una de las dos muestras de CC analizadas con cualquier concentración debe encontrarse dentro de la escala del análisis.

6.1.1 CC1 (100 pg/ml) 70-130 pg/ml

6.1.2 CC2 (200 pg/ml) 140-260 pg/ml

6.1.3 CC3 (500 pg/ml) 350-650 pg/ml

6.2 Los requisitos de parámetros de curva estándar TBD.

Diagrama N° 1

Estándar del RIA del PYY:

Nombre del tubo	Concentración del estándar
A	1280 pg/ml
B	640 pg/ml
C	320 pg/ml
D	160 pg/ml
E	80 pg/ml
F	40 pg/ml
G	20 pg/ml
H	10 pg/ml

Anexo 1

0,6 % TX-100

Reactivo: 0,6% TX-100

Materiales: Agua destilada Milli-Q
TX-100

Preparación: 1) Mida 50 ml de agua destilada Milli-Q
2) Agregue 300 µl de TX-100 usando una pipeta de desplazamiento positivo
3) Mezcle bien.

Anexo 2

Marcador ^{125}I del péptido PYY

Reactivo: Marcador ^{125}I del péptido PYY

Materiales: Buffer 1x RIA
^{125}I del Péptido PYY

Preparación:

1) Disuelva el marcador con 1 ml de Buffer 1x para RIA.
2) Mida la cantidad del marcador en el contador gamma. Transfiera a un tubo 10 µl del marcador reconstituido. Coloque el tubo en una rejilla negra para el contador gamma con el número de programa 30.
3) Coloque la rejilla en el contador gamma con la rejilla que dice "Parar" detrás.
4) Presione 'Start' para comenzar el conteo y luego 'E' para visualizar los resultados de CPM.
5) Determine la cantidad de marcador (X µl) que se preparará y el RIAB (Y ml) necesario como se indica a continuación:

$$X\ \mu l = \frac{(5\ \mu l)(\text{valor cpm})(N^{\circ}\ \text{tubos} + 10)}{(\text{cpm de la solución de reserva})}$$

$$Y\ ml = (0,1)\ (N^{\circ}\ \text{tubos} + 10)$$

6) Combine X µl del marcador ^{125}I del Péptido YY con Y ml de RIAB. Mezcle bien.

EJEMPLO 28

Preparación de una formulación de NPY libre de estabilizador proteínico

Se preparó una formulación de PYY adecuada para la administración intranasal de NPY que esencialmente carece de estabilizador proteínico, de acuerdo con el siguiente procedimiento.

12. Se incorpora aproximadamente ¾ de agua en un vaso de precipitado y se agita con una varilla sobre una placa; se añade citrato de sodio hasta que quede completamente disuelto.
13. Luego se agrega EDTA y se agita hasta disolverlo por completo.
14. Luego se agrega el ácido cítrico y se agita hasta disolverlo por completo.
15. A continuación, se agrega metil- β -ciclodextrina, que se agita hasta disolverla por completo.
16. Luego se agrega DDPC y se agita hasta disolverlo por completo.
17. Luego se agrega la lactosa y se agita hasta disolverla por completo.
18. Luego se agrega el sorbitol y se agita hasta disolverlo por completo.
19. Luego se agrega el clorobutanol y se agita hasta disolverlo por completo.
20. Se agrega el NPY(3-36) y se agita suavemente hasta disolverlo por completo.
21. 11Se mide el pH para verificar que sea de 5,0 ± 0,25. Se agrega HCl diluido o NaOH diluido para ajustar el pH.
22. Se agrega agua hasta alcanzar el volumen final.

CUADRO 12

Reactivo	Grado	Proveedor	mg/ml	%
Clorobutanol, anhidro	NF	Spectrum	5,0	0,50

Metil-ß-ciclodextrina		Sigma	45	4,5
Didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina		Sigma	1	0,1
Edetato disódico	USP	Dow Chemicals	1	0,1
Citrato de sodio, dihidrato	USP	Spectrum	1,62	0,162
Ácido cítrico, anhidro	USP	Sigma	0,86	0,086
Monohidrato de α-lactosa		Sigma	9	0,9
Sorbitol		Sigma	18,2	1,82
NPY(3-36)	GMP	Bachem	1	0,1
Agua purificada				

Formulación pH 5 +/- 0,25

Osmolaridad ~250

EJEMPLO 29

Se prepara una segunda formulación como se indicó antes, con la excepción de que la concentración del NPY(3-36) es de 15 mg/ml, como se ve en el Cuadro 13.

CUADRO 13

Reactivo	Grado	Proveedor	mg/ml	%
Clorobutanol, anhidro	NF	Spectrum	5,0	0,50
Metil-ß-ciclodextrina		Sigma	45	4,5
Didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina		Sigma	1	0,1
Edetato disódico	USP	Dow Chemicals	1	0.1
Citrato de sodio, dihidrato	USP	Spectrum	1,62	0,162
Ácido cítrico, anhidro	USP	Sigma	0,86	0,086
Monohidrato de α-lactosa		Sigma	9	0,9
Sorbitol		Sigma	18,2	1,82
NPY(3-36)	GMP	Bachem	15	0,1
Agua purificada				

Formulación pH 5 +/- 0,25

EJEMPLO 30

Preparación de una formulación del Péptido Pancreático (PP) libre de estabilizador proteínico

Se preparó una formulación de PYY adecuada para la administración intranasal de PP que esencialmente carece de estabilizador proteínico, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

23. Se incorpora aproximadamente ¾ de agua en un vaso de precipitado y se agita con una varilla sobre una placa; se añade citrato de sodio hasta que quede completamente disuelto.
24. Luego se agrega EDTA y se agita hasta disolverlo por completo.
25. Luego se agrega el ácido cítrico y se agita hasta disolverlo por completo.
26. A continuación se agrega metil-β-ciclodextrina, que se agita hasta disolverla por completo.
27. Luego se agrega DDPC y se agita hasta disolverlo por completo.
28. Luego se agrega la lactosa y se agita hasta disolverla por completo.
29. Luego se agrega el sorbitol y se agita hasta disolverlo por completo.
30. Luego se agrega el clorobutanol y se agita hasta disolverlo por completo.
31. Se agrega el PP(3-36) y se agita suavemente hasta disolverlo por completo.
32. 11 Se mide el pH para verificar que sea de 5,0 ± 0,25. Se agrega HCl diluido o NaOH diluido para ajustar el pH.
33. Se agrega agua hasta alcanzar el volumen final.

CUADRO 14

Reactivo	Grado	Proveedor	mg/ml	%
Clorobutanol, anhidro	NF	Spectrum	5,0	0,50
Metil-ß-ciclodextrina		Sigma	45	4,5
Didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina		Sigma	1	0,1
Edetato disódico	USP	Dow Chemicals	1	0,1
Citrato de sodio, dihidrato	USP	Spectrum	1,62	0,162
Ácido cítrico, anhidro	USP	Sigma	0,86	0,086
Monohidrato de α-lactosa		Sigma	9	0,9
Sorbitol		Sigma	18,2	1,82
PP(3-36)	GMP	Bachem	1	0,1
Agua purificada				

Formulación pH 5 +/- 0,25

Osmolaridad ~250

EJEMPLO 31

Se prepara una segunda formulación como se indicó atrás, con la excepción de que la concentración del PP(3-36) es de 15 mg/ml, como se ve en el Cuadro 15.

CUADRO 15

Reactivo	Grado	Proveedor	mg/ml	%
Clorobutanol, anhidro	NF	Spectrum	5,0	0,50
Metil-ß-ciclodextrina		Sigma	45	4,5
Didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina		Sigma	1	0,1
Edetato disódico	USP	Dow Chemicals	1	0.1
Citrato de sodio, dihidrato	USP	Spectrum	1,62	0,162

Ácido cítrico, anhidro	USP	Sigma	0,66	0,066
Monohidrato de α-lactosa		Sigma	9	0,9
Sorbitol		Sigma	18,2	1,82
PP(3-36)	GMP	Bachem	15	0,1
Agua purificada				

Formulación pH 5 +/- 0,25

Si bien la invención que antecede se describió en detalle mediante ejemplos a los efectos de facilitar la comprensión, el especialista advertirá que la divulgación implica ciertas modificaciones, que podrán practicarse sin incurrir en experimentación indebida dentro de los límites de las solicitudes que se anexan, las cuales se presentan a modo ilustrativo y no taxativo.

LO QUE SE SOLICITA ES:

1. Una formulación del péptido fijador al receptor de Y2 para la administración transmucosa capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 5 pmol o más por litro cuando se administra una dosis que contiene 50 µg del agonista del péptido fijador al receptor de Y2 por vía transmucosa al mamífero.

2. La formulación de la solicitud 1, en donde el péptido fijador al receptor de Y2 se selecciona del grupo que consiste de péptido YY (PYY), neuropéptido Y (NPY) y péptido pancreático (PP).

3. La formulación de las reivindicaciones 1 y 2 comprendida además de al menos un agente mejorador de la administración por vía mucosa seleccionado del grupo que consiste de:
   (a) un agente solubilizante;
   (b) un agente modificador de carga;
   (c) un agente controlador del pH;
   (d) un agente inhibidor de enzimas degradantes;
   (e) un mucolítico o agente liberador de mucus;
   (f) un agente cilioestático;
   (g) un agente que aumenta la penetración de la membrana seleccionado entre (i) un agente surfactante, (ii) una sal biliar, (ii) un aditivo fosfolíquido, micelo mezclado, liposoma o transportador, (iii) un alcohol, (iv) una enamina, (v) un compuesto donante de NO, (vi) una molécula anfipática de cadena larga, (vii) un mejorador de la penetración hidrofóbico pequeño, (viii) sodio o un derivado del ácido salicílico, (ix) un glicerol éster del ácido acetoacético, (x) un derivado de la ciclodextrina o beta-ciclodextrina, (xi) un ácido graso de

cadena media, (xii) un agente quelante, (xiii) un aminoácido o sal del mismo, (xiv) un ácido N-acetilamino o sal del mismo, (xv) una enzima degradante de un determinado componente de membrana, (ix) un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos, (x) un inhibidor de la síntesis del colesterol, o (xi) cualquier combinación de los agentes que mejoran la penetración de la membrana enumerados en (i) a (x);

(h) un agente modulador de la fisiología de unión del epitelio;

(i) un agente vasodilatador;

(j) un agente mejorador de transporte selectivo; y

(k) un excipiente estabilizante, transportador, soporte o especies que forman complejos.

4. La formulación de la reivindicación 1 en donde la formulación es una formulación intranasal.

5. La formulación de la reivindicación 4, en donde la formulación es una formulación acuosa comprendida de agua y un péptido fijador al receptor de Y2.

6. La formulación de la reivindicación 5 en donde el péptido fijador al receptor de Y2 se selecciona del grupo que consiste de un péptido PYY, un péptido NPY, y un péptido PP.

7. La formulación de la reivindicación 6 en donde el péptido fijador al receptor de Y2 es un péptido PYY, en donde el péptido PYY está comprendido de una secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de las SEQ ID números: 1 a 21.

8. La formulación de las reivindicaciones 4, 5, 6 y 7 en donde la formulación está comprendida además de al menos un agente de administración transmucosa.

9. La formulación de la reivindicación 8 en donde el agente de administración transmucosa se selecciona del grupo que consiste de:

(a) un agente solubilizante;

(b) un agente modificador de carga;

(c) un controlador del pH;

(d) un agente inhibidor de enzimas degradantes;

(e) un mucolítico o agente liberador de mucus;

(f) un agente cilioestático;

(g) un agente que aumenta la penetración de la membrana que se selecciona de (i) un agente surfactante, (ii) una sal biliar, (ii) un aditivo fosfolíquido, micelo mezclado, liposoma o transportador, (iii) un alcohol, (iv) una enamina, (v) un compuesto donante de NO, (vi) una molécula anfipática de cadena larga, (vii) un mejorador de la penetración hidrofóbico pequeño, (viii) sodio o un derivado del ácido salicílico, (ix) un glicerol éster del ácido acetoacético, (x) un derivado de la ciclodextrina o beta-ciclodextrina, (xi) un ácido graso de cadena media, (xii) un agente quelante, (xiii) un aminoácido o sal del mismo. (xiv) un ácido N-acetilamino o sal del mismo, (xv) una enzima degradante de un determinado componente de membrana, (ix) un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos, o (x) un inhibidor de la síntesis del colesterol, o (xi) cualquier combinación de los agentes que mejoran la penetración de la membrana enumerados en (i) a (x);

(h) un agente modulador de la fisiología de unión del epitelio;

(i) un agente vasodilatador;

(j) un agente mejorador de transporte selectivo; y

(k) un excipiente estabilizante, transportador, soporte o especies que forman complejos.

10. La formulación de las reivindicaciones 1 a 9 en donde la formulación está comprendida además de al menos dos polioles.

11. La formulación de la reivindicación 10 en donde los polioles son lactosa y sorbitol.

12. La formulación de las reivindicaciones 1 a 11 comprendida además de un agente quelante.

13. La formulación de la reivindicación 12 en donde el agente quelante es ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA).

14. La formulación de las reivindicaciones 1 a 13 comprendida además de un agente solubilizante.

15. La formulación de la reivindicación 14 en donde el agente solubilizante es una ciclodextrina.

16. La formulación de las reivindicaciones 1 a 15 comprendida además de un agente surfactante.

17. La formulación de la reivindicación 16 en donde el agente surfactante es didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC).

18. La formulación de las reivindicaciones 1 a 17 en donde el agonista del receptor de Y2 es un péptido PYY.

19. La formulación de la reivindicación 18 en donde el péptido PYY está comprendido de una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 1 a 21.

20. La formulación de la reivindicación 18 en donde el péptido PYY es un péptido PYY(3-36).

21. La formulación de la reivindicación 20 comprendida además de un agente solubilizante.

22. La formulación de la reivindicación 21 en donde el agente solubilizante es una ciclodextrina.

23. La formulación de la reivindicación 22 en donde la ciclodextrina es metil-β-ciclodextrina.

24. La formulación de las reivindicaciones 20 a 23 en donde la formulación está comprendidad además de agua.

25. La formulación de la reivindicación 24 en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 3 hasta 6.

26. La formulación de la reivindicación 25 en donde el pH es 5,0± 0,3.

27. Una formulación intranasal que comprende un péptido PYY capaz de aumentar la concentración de PYY en el plasma de un individuo en al menos 5 pmol o más por litro de plasma cuando se administra por vía intranasal una dosis de al menos 50 µg de PYY a dicho individuo.

28. La formulación intranasal de la reivindicación 27 comprendida además de un agente mejorador de la administración por vía mucosa.

29. La formulación intranasal de la reivindicación 28 en donde el agente mejorador mucoso se selecciona del grupo que consiste de:

(a) un agente solubilizante;

(b) un agente modificador de carga;

(c) un agente controlador del pH;

(d) un inhibidor de enzimas degradantes;

(e) un mucolítico o agente liberador de mucus;

(f) un agente cilioestático;

(g) un agente que aumenta la penetración de la membrana que se selecciona de (i) un agente surfactante, (ii) una sal biliar, (ii) un aditivo fosfolíquido, micelo mezclado, liposoma o transportador, (iii) un alcohol, (iv) una enamina, (v) un compuesto donante de NO, (vi) una molécula anfipática de cadena larga, (vii) un mejorador de la penetración hidrofóbico pequeño, (viii) sodio o un derivado del ácido salicílico, (ix) un glicerol éster de ácido acetoacético, (x) un derivado de la ciclodextrina o beta-ciclodextrina, (xi) un ácido graso de cadena media, (xii) un agente quelante, (xiii) un aminoácido o sal del mismo, (xiv)) un ácido N-acetilamino o sal del mismo, (xv) una enzima degradante de un determinado componente de membrana, (ix) un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos, o (x) un inhibidor de la síntesis del colesterol, o (xi) cualquier combinación de los agentes que mejoran la penetración de la membrana enumerados en (i) a (x);

(h) un agente modulador de la fisiología de unión del epitelio;

(i) un agente vasodilatador;

(j) un agente mejorador selectivo de transporte; y

496
193

(k) un excipiente estabilizante, transportador, soporte o especies que forman complejos.

30. La formulación intranasal de las reivindicaciones 27 a 29 comprendida además de al menos dos polioles.

31. La formulación intranasal de la reivindicación 30 en donde los dos polioles son lactosa y sorbitol.

32. La formulación intranasal de las reivindicaciones 27 a 31 comprendida además de un agente solubilizante.

33. La formulación intranasal de la reivindicación 32 en donde el agente solubilizante es una ciclodextrina.

34. La formulación intranasal de la reivindicación 33 en donde el agente solubilizante es metil-β-ciclodextrina.

35. La formulación intranasal de las reivindicaciones 27 a 34 comprendida además de un agente quelante.

36. La formulación intranasal de la reivindicación 35 en donde el agente quelante es EDTA.

37. La formulación intranasal de las reivindicaciones 27 a 36 que comprende además un agente surfactante.

38. La formulación de PYY intranasal de la reivindicación 37 en donde el agente surfactante es DDPC.

39. La formulación de PYY intranasal de las reivindicaciones 27 a 38 en donde la formulación es una formulación acuosa.

40. La formulación de PYY intranasal de la reivindicación 39 en donde la formulación acuosa tiene un pH de 3 hasta 6.

41. La formulación intranasal de la reivindicación 40 en donde el pH es 5,0±0,3.

42. La formulación de PYY intranasal de las reivindicaciones 27 a 41 en donde el PYY es PYY(3-36) (SEQ ID número: 2).

43. La formulación de PYY intranasal de las reivindicaciones 27 a 42 en donde la formulación está sustancialmente libre de un polipéptido o proteína que es un estabilizante.

44. El uso de un péptido fijador al receptor de Y2 para la producción de un medicamento intranasal para tratar la obesidad o promover la pérdida de peso en un mamífero en donde el medicamento es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador de receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 5 pmol o más por litro cuando se administra, por vía intranasal, una dosis de al menos 50 µg del agonista del fijador al receptor de Y2 a dicho mamífero.

198
195

45. El uso de la reivindicación 44 en donde el péptido fijador al receptor Y2 se selecciona del grupo que se consiste de péptido YY (PYY), *neuropéptido* Y (NPY) y *péptido pancreático* (PP).

46. El uso de la reivindicación 45 en donde el péptido fijador al receptor de Y2 se selecciona del grupo que consiste de un péptido PYY, un péptido NPY, y un péptido PP.

47. El uso de la reivindicación 46 en donde el péptido fijador de receptor de Y2 es un péptido PYY, en donde el péptido PYY está comprendido de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID números: 1 a 21.

48. El uso de las reivindicaciones 44, 45, 46 y 47 en donde el medicamento está comprendido de al menos un agente de administración transmucosa.

49. El uso de la reivindicación 48 en donde el agente de administración transmucosa se selecciona del grupo que consiste de:

(a) un agente solubilizante;

(b) *un agente modificador* de carga;

(c) un agente controlador del pH;

(d) un agente inhibidor de enzimas degradantes;

(e) un mucolítico o agente liberador de mucus;

(f) un agente cilioestático;

(g) un agente que aumenta la penetración de la membrana que se selecciona de (i) un agente surfactante, (ii) una sal biliar, (ii)un aditivo fosfolíquido, micelo mezclado, liposoma o excipiente, (iii) un alcohol, (iv) una enamina, (v) un compuesto donante de NO, (vi) una molécula anfipática de cadena larga, (vii) un mejorador de la penetración hidrofóbico

pequeño, (viii) sodio o un derivado del ácido salicílico, (ix) un esterglicerol de ácido acetoacético, (x) un derivado de la ciclodextrina o beta-ciclodextrina, (xi) un ácido graso de cadena media, (xii) un agente quelante, (xiii) un aminoácido o sal del mismo, (xiv) un ácido N-acetilamino o sal del mismo, (xv) una enzima degradante de un determinado componente de membrana, (ix) un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos, o (x) un inhibidor de la síntesis del colesterol, o (xi) cualquier combinación de los agentes que mejoran la penetración de la membrana enumerados en (i) a (x);

(h) un agente modulador de la fisiología de unión del epitelio;

(i) un agente vasodilatador;

(j) un mejorador selectivo de transporte; y

(k) un excipiente estabilizante, transportador, soporte o especies que forman complejos.

50. El uso de las reivindicaciones 44 a 49 en donde el medicamento está comprendido además de al menos dos polioles.

51. El uso de la reivindicación 50 en donde los polioles son lactosa y sorbitol.

52. El uso de las reivindicaciones 44 a 49 en donde el medicamento está comprendido además de un agente quelante.

53. El uso de la reivindicación 22 en donde el agente quelante es ácido etilendiamintetraacético (EDTA).

54. El uso de las reivindicaciones 44 a 53 comprendido además de un agente solubilizante.

55. El uso de la reivindicación 54 en donde el agente solubilizante es una ciclodextrina.

56. El uso de las reivindicaciones 44 a 55 en donde el medicamento está comprendido además de un agente surfactante.

57. El uso de la reivindicación 56 en donde el agente surfactante es didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC).

58. El uso de las reivindicaciones 44 a 57 em donde el agonista del receptor de Y2 del medicamento es un péptido PYY.

59. El uso de la reivindicación 58 en donde el péptido PYY está comprendido de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID números: 1 a 21.

60. El uso de la reivindicación 58 en donde el péptido PYY es PYY(3-36) (SEQ ID número: 2).

61. El uso de la reivindicación 60 en donde el medicamento está comprendido además de un agente solubilizante.

62. El uso de la reivindicación 61 en donde el agente solubilizante es una ciclodextrina.

63. El uso de la reivindicación 62 en donde la ciclodextrina es metil-β-ciclodextrina.

64. El uso de las reivindicaciones 44 a 64 en donde el medicamento está comprendido además de agua.

65. El uso de la reivindicación 64 en donde el medicamento tiene un pH de aproximadamente 3 a 6.

66. El uso de la reivindicación 65 en donde el pH es 5,0± 0,3.

67. El uso de las reivindicaciones 44 a 66 en donde se administran entre 50 µg a 800 µg del péptido fijador al receptor de Y2 al mamífero para tratar la obesidad o promover la pérdida de peso o provocar saciedad en el mamífero.

68. El uso de la reivindicación 67 en donde se administran de 75 µg hasta aproximadamente 400 µg del péptido fijador al receptor de Y2 a un mamífero para tratar la obesidad o promover la pérdida de peso o provocar saciedad en el mamífero.

69. El uso de la reivindicación 68 en donde se administran 100 µg hasta aproximadamente 300 µg del péptido fijador al receptor de Y2 a un mamífero para tratar la obesidad o promover la pérdida de peso o provocar saciedad en el mamífero.

70. El uso de la reivindicación 69 en donde se administran 150 µg hasta aproximadamente 200 µg del péptido fijador al receptor de Y2 al mamífero para tratar la obesidad o promover la pérdida de peso o provocar saciedad en el mamífero.

71. El uso de las reivindicaciones 44 a 70 en donde el péptido fijador al receptor de Y2 es un péptido PYY, un péptido NPY o un péptido PP.

72. El uso de la reivindicación 71 en donde el péptido fijador al receptor de Y2 es un péptido PYY.

73. El uso de la reivindicación 72 en donde el péptido PYY está comprendido de una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID números: 1 a 21.

74. El uso de la reivindicación 73 en donde el péptido PYY es PYY(3-36) (SEQ ID número: 2).

75. La formulación y uso de las reivindicaciones 1 a 75 en donde el agonista del receptor de Y2 es una secuencia humana y el mamífero es un humano.

76. Una formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende un péptido fijador al receptor de Y2, agua y un agente solubilizante en donde la formulación está sustancialmente libre de un estabilizante que es un polipeptido o una proteína.

77. La formulación de la reivindicación 76 en donde dicho agente solubilizante se selecciona del grupo que consiste de hidroxipropilo-β-ciclodextrina, sulfobutiléter-β-ciclodextrina y metil-β-cilodextrina.

80. La formulación acuosa de la reivindicación 76 que comprende además uno o más polioles.

203
200

81. La formulación acuosa de la reivindicación 80 en donde el poliol se selecciona del grupo que consiste de lactosa, sorbitol, trehalosa, sacarosa, manosa y maltosa y derivados y homólogos de los mismos.

82. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 76 a 81 que comprende además un agente surfactante y un agente quelante.

83. La formulación acuosa de la reivindicación 82 en donde el agente surfactante se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 80, PEG, alcohol cetílico, PVP, PVA, alcohol lanolínico, didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC) y monooleato de sorbitán.

84. Una formulación acuosa de péptido fijador al receptor de Y2 que comprende agua, un péptido fijador al receptor de Y2, un agente quelante y uno o más polioles en donde el pH de la formulación es aproximadamente 3 hasta aproximadamente 6,5; y la formulación está sustancialmente libre de un estabilizante que es un polipéptido o una proteína.

85. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 84 en donde el poliol se selecciona del grupo que consiste de lactosa, sorbitol, trehalosa, sacarosa, manosa y maltosa y derivados y homólogos de los mismos.

86. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 84 y 85 comprendida además de un agente solubilizante.

204
201

87. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 86 en donde el agente solubilizante se selecciona del grupo que consiste de hidroxipropilo-β-ciclodextrina, sulfobutiléter-β-ciclodextrina y metil-β-ciclodextrina.

88. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 84 a 87 comprendida además de un agente surfactante.

89. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 88 en donde el agente surfactante se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 80, PEG, alcohol cetílico, PVP, PVA, alcohol lanolínico, didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC) y monooleato de sorbitán.

90. Una formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende un péptido fijador al receptor de Y2, agua, un agente quelante y un agente solubilizante en donde la formulación tiene un pH de 3,0 hasta aproximadamente 6,5; y la formulación está sustancialmente libre de un estabilizante que es un polipéptido o proteína.

91. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 90 en donde el agente solubilizante se selecciona del grupo que consiste de hidroxipropilo-β-ciclodextrina, sulfobutiléter-β-ciclodextrina y metil-β-ciclodextrina.

92. La formulación acuosa de las reivindicaciones 90 y 91 que comprende además uno o más polioles.

200
202

93. La formulación acuosa de la reivindicación 92 en donde el poliol se selecciona del grupo que consiste de lactosa, sorbitol, trehalosa, sacarosa, manosa y maltosa y derivados y homólogos de los mismos.

94. Una formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende un péptido fijador al receptor de Y2, agua, un agente quelante y un agente surfactante en donde la formulación tiene un pH de 3,0 hasta aproximadamente 6,5; y la formulación está sustancialmente libre de un estabilizante que es un polipéptido o proteína.

95. La formulación acuosa de la reivindicación 94 en donde el agente surfactante se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 80, PEG, alcohol cetílico, PVP, PVA, didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC), alcohol lanolínico y monooleato de sorbitán.

96. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 94 y 95 que comprende además un agente solubilizante.

97. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 96 en donde el agente solubilizante se selecciona del grupo que consiste de hidroxipropilo-β-ciclodextrina, sulfobutiléter-β-ciclodextrina y metil-β-ciclodextrina.

98. Una formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende agua, un péptido fijador al receptor de Y2, uno o más polioles y un agente surfactante en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 3,0 hasta aproximadamente 6,5; y la formulación está sustancialmente libre de un estabilizante que es un polipéptido o proteína.

99. La formulación acuosa de la reivindicación 98 en donde el poliol se selecciona del grupo que consiste de lactosa, sorbitol, trehalosa, sacarosa, manosa y maltosa y derivados y homólogos de los mismos.

100. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 98 y 99 en donde el agente surfactante se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, Tween 80, PEG, alcohol cetílico, PVP. PVA, didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC), alcohol lanolínico, y monooleato de sorbitán.

101. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 98 a 101 que comprende además un agente solubilizante y un agente quelante.

102. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 101 en donde el agente solubilizante se selecciona del grupo que consiste de hidroxipropilo-β-ciclodextrina, sulfobutiléter-β-ciclodextrina y metil-β-ciclodextrina.

103. Una formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende agua, un péptido fijador al receptor de Y2, uno o más polioles y un agente solubilizante en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 3,0 hasta aproximadamente 6,5; y la formulación está sustancialmente libre de un estabilizante que es una proteína o polipeptído.

104. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 103 en donde los polioles se seleccionan del grupo que consiste de lactosa, sorbitol, trehalosa, sacarosa, manosa y maltosa y derivados y homólogos de los mismos.

105. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 103 y 104 que comprende además un agente surfactante y un agente quelante.

106. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 105 en donde el agente surfactante se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 80, PEG, alcohol cetílico, PVP, PVA, alcohol lanolínico, didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC), y monooleato de sorbitán.

107. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 103 a 106 en donde el agente solubilizante se selecciona del grupo que consiste de hidroxipropilo-β-ciclodextrina, sulfobutiléter-β-ciclodextrina y metil-β-ciclodextrina.

108. Una formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende agua, un péptido fijador al receptor de Y2, un agente solubilizante y un agente surfactante en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 3,0 hasta aproximadamente 6,5; y la formulación está sustancialmente libre de un estabilizante que es una proteína o polipeptído.

109. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 108 en donde el agente solubilizante se selecciona del grupo que consiste de hidroxipropilo-β-ciclodextrina, sulfobutiléter-β-ciclodextrina y metil-β-ciclodextrina.

110. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 108 y 109 en donde el agente surfactante se selecciona del grupo que consiste de

polisorbato 20, polisorbato 80, PEG, alcohol cetílico, PVP, PVA, alcohol lanolínico, didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC) y monooleato de sorbitán.

111. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 108 a 110 comprendida además de uno o más polioles y un agente quelante.

112. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 111 en donde el poliol se selecciona del grupo que consiste de lactosa, sorbitol, trehalosa, sacarosa, manosa y maltosa y derivados y homólogos o derivados de los mismos.

113. Una formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende agua, un péptido fijador al receptor de Y2, un agente solubilizante, uno o más polioles y un agente surfactante en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 3,0 hasta aproximadamente 6,5.

114. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 113 en donde la formulación está comprendida de dos polioles y un agente quelante.

115. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 113 y 114 en donde el poliol se selecciona del grupo que consiste de lactosa, sorbitol, trehalosa, sacarosa, manosa y maltosa y derivados y homólogos o derivados de los mismos.

116. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 115 en donde los polioles son sorbitol y lactosa.

117. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 113 a 116 en donde el agente solubilizante se selecciona del grupo que consiste de hidroxipropilo-β-ciclodextrina, sulfobutiléter-β-ciclodextrina y metil-β-ciclodextrina.

118. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 117 en donde el agente solubilizante es metil-β-ciclodextrina.

119. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 113 a 118 en donde el agente surfactante se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 80, PEG, alcohol cetílico, PVP, PVA, alcohol lanolínico, didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC) y monooleato de sorbitán.

120. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 119 en donde el agente surfactante es didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC).

121. Una formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 que comprende agua, un péptido fijador al receptor de Y2, y un agente quelante en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 3,0 hasta aproximadamente 6,5; y la formulación está sustancialmente libre de un estabilizante que es una proteína o polipéptido.

122. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 121 comprendida además de un agente solubilizante.

123. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 122 en donde el agente solubilizante se selecciona del grupo que consiste de hidroxipropilo-β-ciclodextrina, sulfobutiléter-β-ciclodextrina y metil-β-ciclodextrina.

124. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 121 a 123 comprendida además de un agente surfactante.

125. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 124 en donde el agente surfactante se selecciona del grupo que consiste de polisorbato 20, polisorbato 80, PEG, alcohol cetílico, PVP, PVA, alcohol lanolínico, didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC) y monooleato de sorbitán.

126. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 121 a 125 comprendida además de uno o más polioles.

127. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 126 en donde el poliol se selecciona del grupo que consiste de lactosa, sorbitol, trehalosa, sacarosa, manosa y maltosa y derivados y homólogos o derivados de los mismos.

128. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 121 a 127 en donde el agente quelante es ácido etilendiamintetraacético (EDTA) o ácido etilenglicol tetraacético (EGTA).

129. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 76 a 128 en donde el péptido fijador al receptor de Y2 es un péptido PYY, un péptido NPY un péptido PP.

130. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 129 en donde el péptido fijador al receptor de Y2 es un péptido PYY comprendido de una

secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID números: 1 a 21, las SEQ ID números: 72, 73 y 74, y las SEQ ID números: 90 a 104.

132. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 129 y 130 en donde el péptido PYY es un péptido PYY(3-36).

133. La formulación acuosa del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 129 a 132 en donde el péptido fijador al receptor de Y2 es un péptido PYY(3-36) comprendido de una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 2, 3 y las SEQ ID NOs: 90 a 105.

134. Una formulación farmacéutica que comprende un péptido fijador al receptor de Y2 libre de endotoxinas apropiada para la administración no infundida.

135. La formulación de la reivindicación 134 que comprende excipientes que mejoran la administración no infundida por vía mucosa.

136. La formulación de la reivindicación 76 en donde dicho péptido fijador al receptor de Y2 se selecciona del grupo que consiste de NPY, PP y PYY.

137. La formulación de la reivindicación 78 en donde dicho péptido es PYY(3-36).

138. La formulación de la reivindicación 77 en donde dicha administración no infundida se lleva a cabo por vía nasal, oral, intestinal, bucal, bronquiopulmonar, vaginal, y/o por las superficies mucosas rectales.

214
209

139. La formulación de la reivindicación 76 que comprende además aproximadamente 0,5 mg/kg de PYY libre de endotoxinas y entre 100 y aproximadamente 200 mg/kg de uno o más transportadores que mejoran la administración mucosa cuando se administra vía oral.

140. La formulación de la reivindicación 76 en donde dicha administración no infundida se lleva a cabo mediante inyección subcutánea, intramuscular y/o intraperitoneal.

141. La formulación de la reivindicación 80 en donde dicha administración es nasal.

142. La formulación de la reivindicación 80 en donde dicha administración es oral.

143. La formulación de la reivindicación 80 en donde dicha administración es pulmonar.

144. Una formulación farmacéutica que comprende un péptido fijador al receptor de Y2 libre de endotoxinas en cantidad suficiente para provocar la pérdida de peso de hasta 2,5 libras (0,9071 kg.) luego de administrarse diariamente por un período de al menos 10 días.

145. La formulación de la reivindicación 85 en donde dicha formulación comprende PYY(3-36) con una concentración de aproximadamente 50 a 250 microgramos por administración.

146. La formulación de la reivindicación 85 en donde dicha administración es por vía nasal.

147. Una formulación del péptido fijador al receptor de Y2, que comprende un péptido fijador al receptor de Y2 y un transportador farmacéuticamente aceptable en donde en un ensayo de penetración de tejido *in vitro*, la formulación de péptido fijador al receptor Y2

tiene una penetración de al menos 1% mayor que una formulación de control que consiste de agua, cloruro de sodio, un agente de control de buffer y el péptido fijador al receptor de Y2.

148. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 147 en donde la formulación tiene una penetración de al menos 2% mayor que una formulación de control en un ensayo de penetración de tejido *in vitro*, en donde la formulación de control consiste de agua, cloruro de sodio, un agente de control de buffer y el péptido fijador al receptor de Y2.

149. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 147 en donde la formulación tiene una penetración de al menos 3% mayor que una formulación de control según se comprobó en un ensayo de penetración de tejido *in vitro*,en donde la formulación de control consiste de agua, cloruro de sodio, un agente de control de buffer y el péptido fijador al receptor de Y2.

150. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 147 en donde la formulación tiene una penetración de al menos 6% mayor que una formulación de control en un ensayo de penetración de tejido *in vitro*,en donde la formulación de control consiste de agua, cloruro de sodio, un agente de control de buffer y el péptido fijador al receptor de Y2.

151. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 147 a 150 en donde la formulación del péptido fijador al receptor de Y2 está comprendida además de al menos un excipiente que se selecciona del grupo que consiste de un agente surfactante, un agente solubilizante, un poliol y un agente quelante.

152. La formulación de la reivindicación 151 en donde el agente surfactante se selecciona del grupo que consiste de didecanoilato de fosfatidilcolina (DDPC), un polisorbato, un éter dodecilo, polisorbato 20, polisorbato 80, PEG, alcohol cetílico, PVP, PVA, alcohol lanolínico, didecanoilato de L-α-fosfatidilcolina (DDPC), monooleato de sorbitán y colato de sodio.

153. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 147 a 152 en donde la formulación está comprendidad de un péptido fijador al receptor de Y2, agua y al menos dos polioles.

154. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 153 en donde los polioles son un azúcar y un alcohol de azúcar.

155. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 154 en donde el azúcar es lactosa y el alcohol de azúcar es sorbitol.

156. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 151 a 155 en donde el agente quelante se selecciona del grupo que consiste de ácido etilendiamintetraacético (EDTA) y ácido etilenglicol tetraacético (EGTA).

157. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 151 a 155 en donde el agente solubilizante se selecciona del grupo que consiste de hidroxipropilo-β-ciclodextrina, sulfobutiléter-β-ciclodextrina y metil-β-ciclodextrina.

158. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 151 a 155 que tiene un pH que varía entre 3,0 hasta aproximadamente 6,5.

159. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 147 a 158 en donde el péptido fijador al receptor de Y2 es un péptido PYY, un péptido NPY o un péptido PP.

160. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 147 a 159 en donde el péptido fijador al receptor de Y2 es un péptido PYY comprendido de una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID números: 1 a 21, SEQ ID números: 72, 73 y 74, y SEQ ID números: 90 a 105.

161. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 159 y 160 en donde el péptido PYY es un péptido PYY(3-36).

162. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 161 en donde el péptido fijador al receptor de Y2, péptido PYY_{3-36}, está comprendido de una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID números: 2, 3 y SEQ ID números: 90 a 105.

163. Una formulación transmucosa de péptido fijador al receptor de Y2 que comprende un péptido fijador al receptor de Y2, capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 5 pmoles o más por litro de plasma cuando se administra 100 µl de la formulación por vía intranasal a dicho mamífero.

164. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 163 en donde la formulación es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 10 pmoles o más por litro de plasma cuando se administra 100 µl de la formulación por vía intranasal a dicho mamífero.

165. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 163 en donde la formulación es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 20 pmoles o más por litro de plasma cuando se administra 100 µl de la formulación por vía intranasal a dicho mamífero.

166. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 163 en donde la formulación es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 40 pmoles o más por litro de plasma cuando se administra 100 µl de la formulación por vía intranasal a dicho mamífero.

167. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 163 en donde la formulación es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 60 pmoles o más por litro de plasma cuando se administra 100 µL de la formulación por vía intranasal a dicho mamífero.

168. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 163 en donde la formulación es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 80 pmoles o más por litro de plasma cuando se administra 100 µL de la formulación por vía intranasal a dicho mamífero.

169. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 163 en donde la formulación es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 100 pmoles o más por litro de plasma cuando se administra 100 µL de la formulación por vía intranasal a dicho mamífero.

170. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 163 en donde la formulación es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 120 pmoles o más por litro de plasma cuando se administra 100 µL de la formulación por vía intranasal a dicho mamífero.

171. La formulación del péptido fijador al receptor de Y2 de la reivindicación 163 end donde la formulación es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 140 pmoles o más por litro de plasma cuando se administra 100 µL de la formulación por vía intranasal a dicho mamífero.

172. El péptido fijador al receptor de Y2 de las reivindicaciones 163 a 172 en donde el mamífero es un humano.

173. El uso de un péptido fijador al receptor de Y2 para producir un medicamento que comprende el péptido fijador al receptor de Y2 en donde el péptido fijador al receptor de de Y2 se administra en forma de spray, en donde dicho spray tiene gotas de un tamaño que varía entre 10 y 100 µm y en donde el spray es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 5 pmoles por litro cuando se administra 100 µl del spray por vía intranasal a un humano.

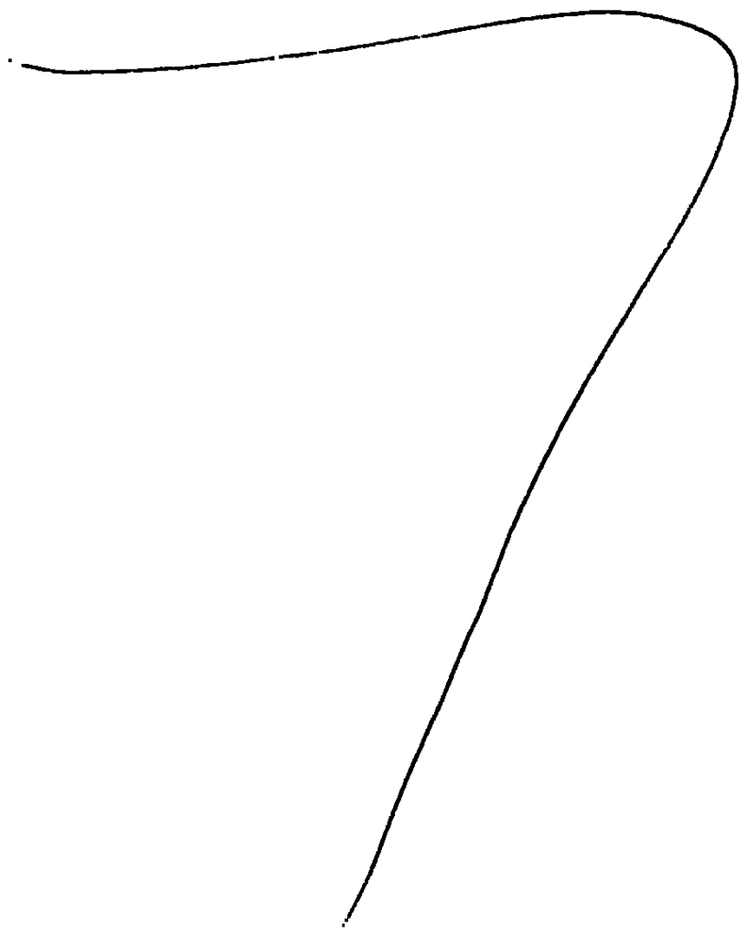
174. El uso de un péptido fijador al receptor de Y2 para producir un medicamento que comprende el péptido fijador al receptor de Y2 en donde el péptido fijador al receptor de Y2 se administra en forma de spray, en donde dicho spray tiene gotas de un tamaño que varía entre 10 y 100 µm y en donde el spray es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 10 pmoles por litro cuando se administra 100 µl del spray por vía intranasal a un humano.

175. El uso de un péptido fijador al receptor de Y2 para producir un medicamento que comprende el péptido fijador al receptor de Y2 en donde el péptido fijador al receptor de de Y2 se administra en forma de spray, en donde dicho spray tiene gotas de un tamaño que varía entre 10 y 100 µm y en donde el spray es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 20 pmoles por litro cuando se administra 100 µl del spray por vía intranasal a un humano.

176. El uso de un péptido fijador al receptor de Y2 para producir un medicamento que comprende el péptido fijador al receptor de Y2 en donde el péptido fijador al receptor de de Y2 se administra en forma de spray, en donde dicho spray tiene gotas de un tamaño que varía entre 10 y 100 µm y en donde el spray es capaz de aumentar la concentración del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 30 pmoles por litro cuando se administra 100 µl del spray por vía intranasal a un humano.

177. El uso de un péptido fijador al receptor de Y2 para producir un medicamento que comprende el péptido fijador al receptor de Y2 en donde el péptido fijador al receptor de de Y2 se administra en forma de spray, en donde dicho spray tiene gotas de un tamaño que varía entre 10 y 100 µm y en donde el spray es capaz de aumentar la concentración

del péptido fijador al receptor de Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 40 pmoles por litro cuando se administra 100 µl del spray por vía intranasal a un humano.



COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA ADMINISTRACIÓN MEJORADA POR VÍA MUCOSA DE PÉPTIDOS FIJADORES AL RECEPTOR DE Y2 Y MÉTODOS PARA TRATAR Y PREVENIR LA OBESIDAD

Inventores: QUAY *ET AL*

FIGURA 1

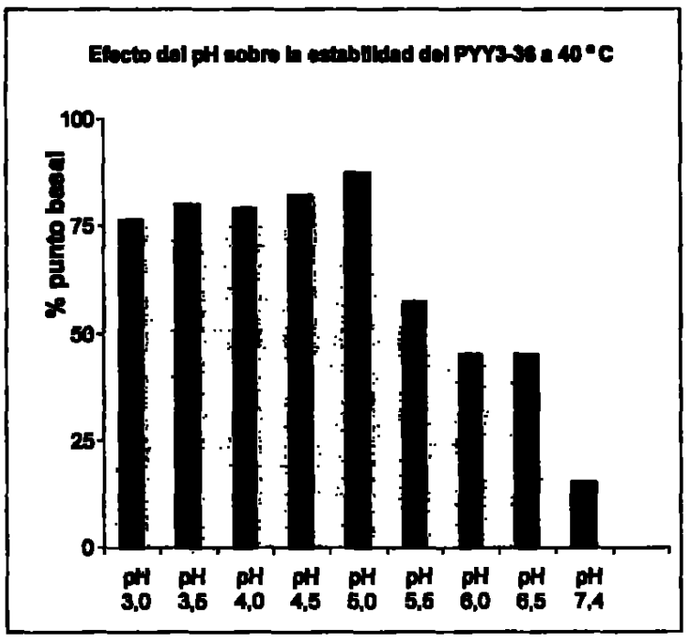


FIGURA 2

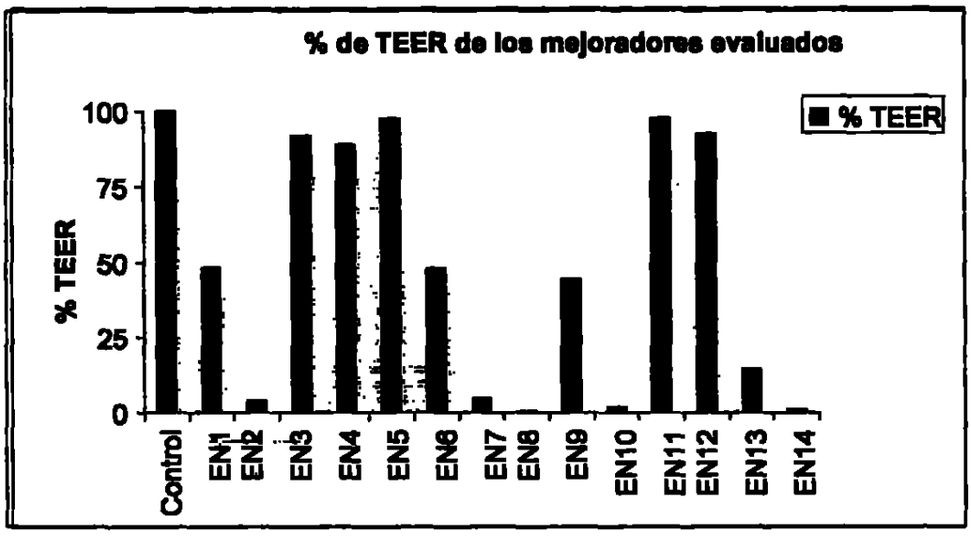


FIGURA 3

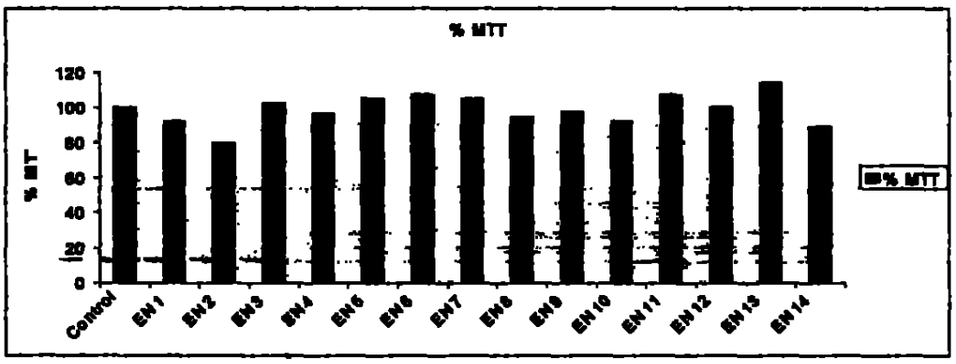


FIGURA 4

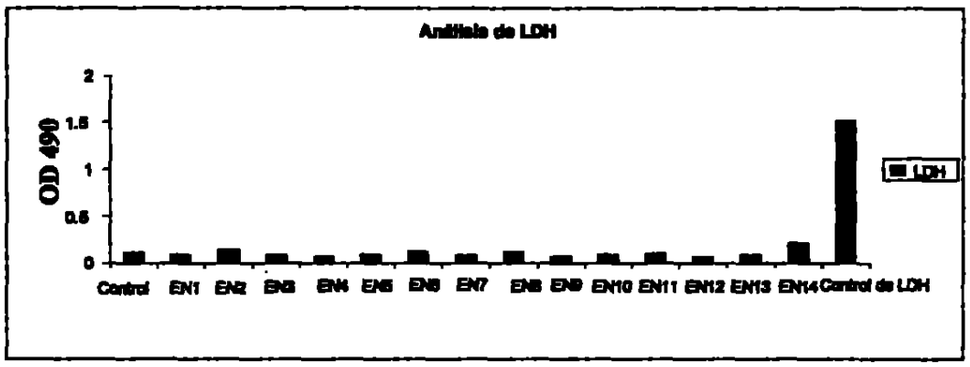


FIGURA 5

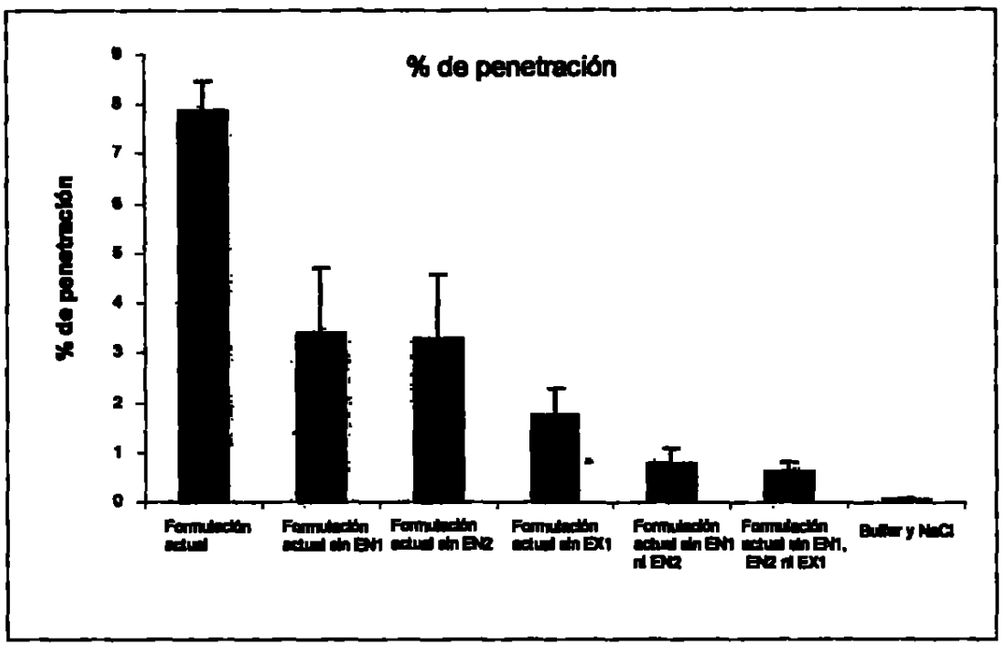


FIGURA 6

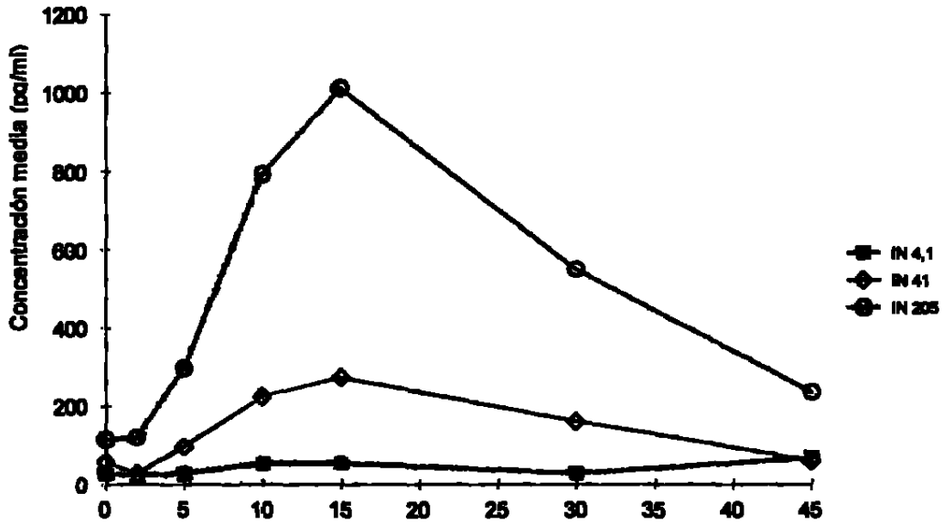


FIGURA 7

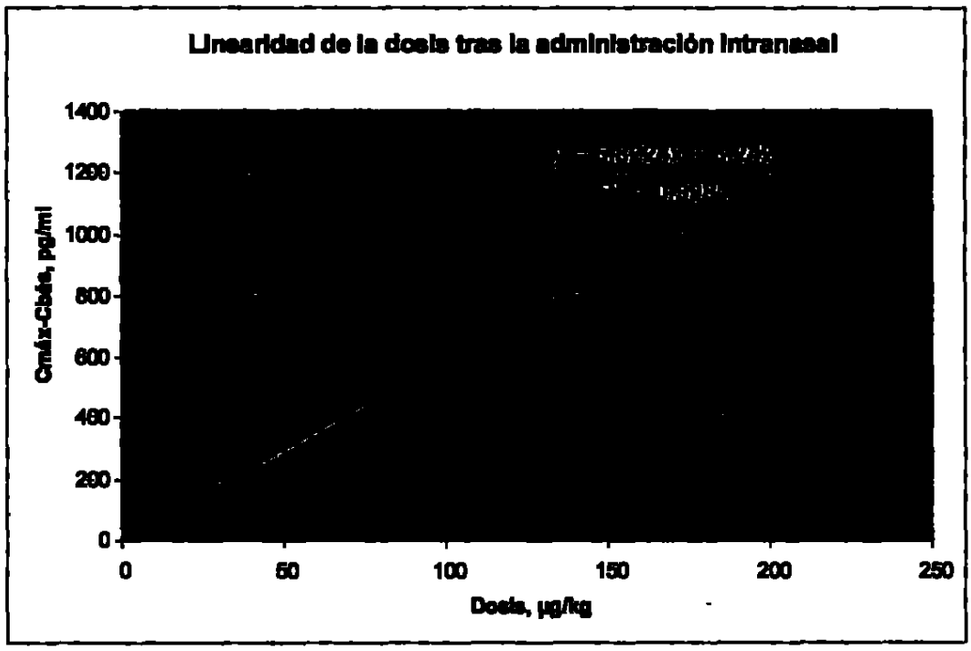


FIGURA 8

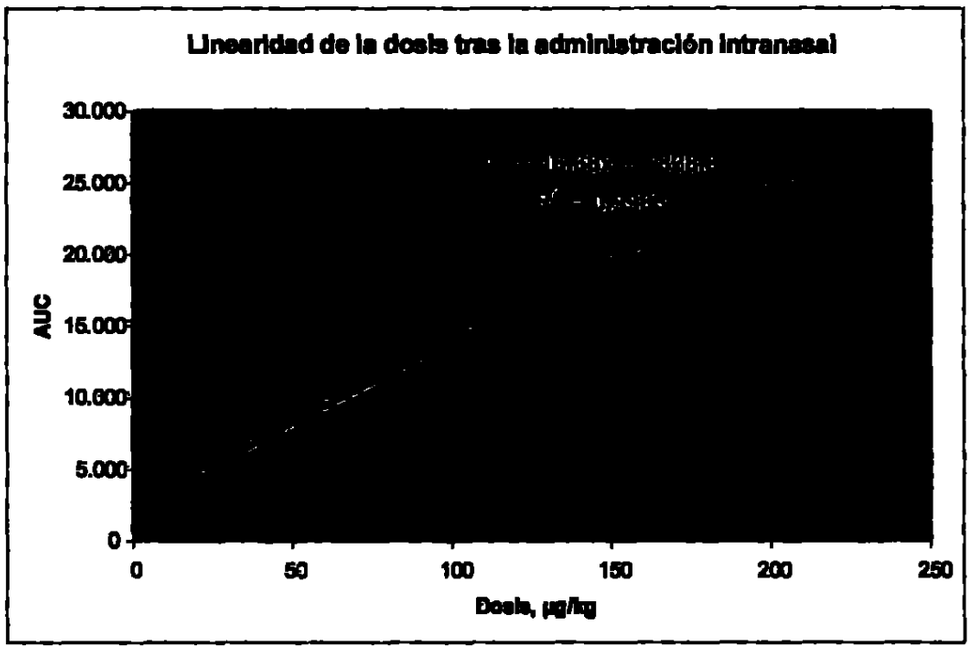


FIGURA 9

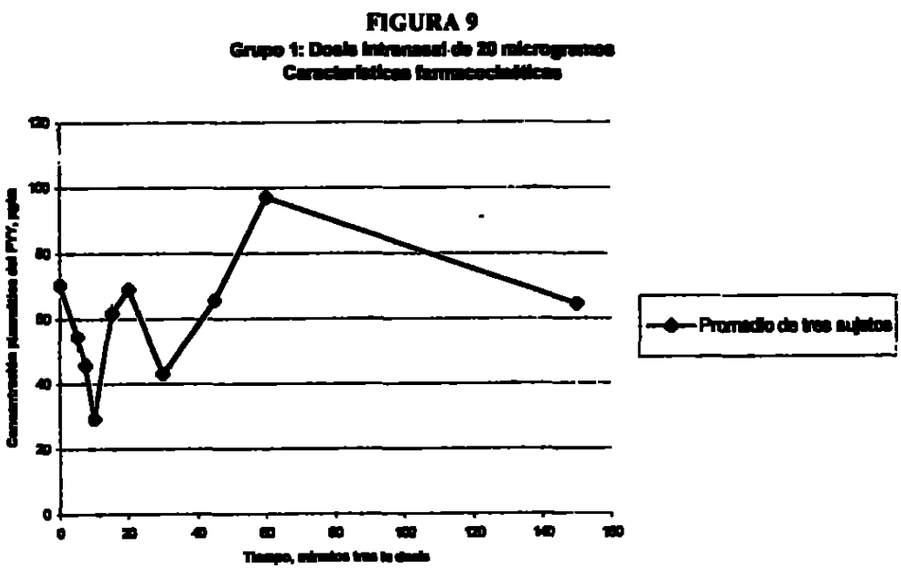


FIGURA 10

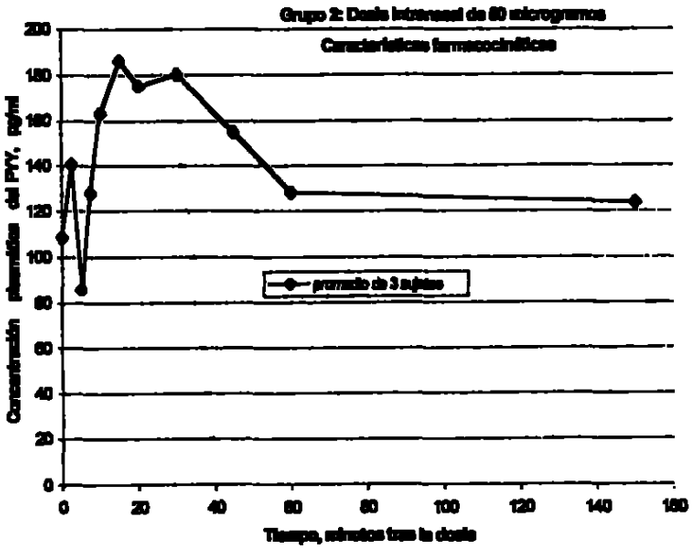


FIGURA 11

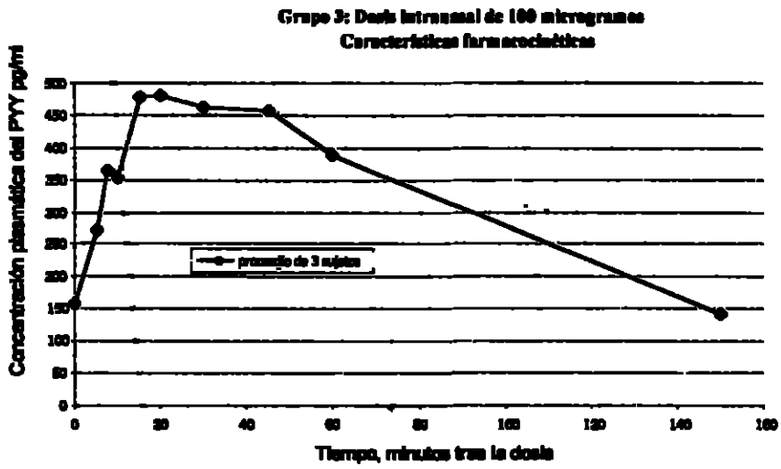
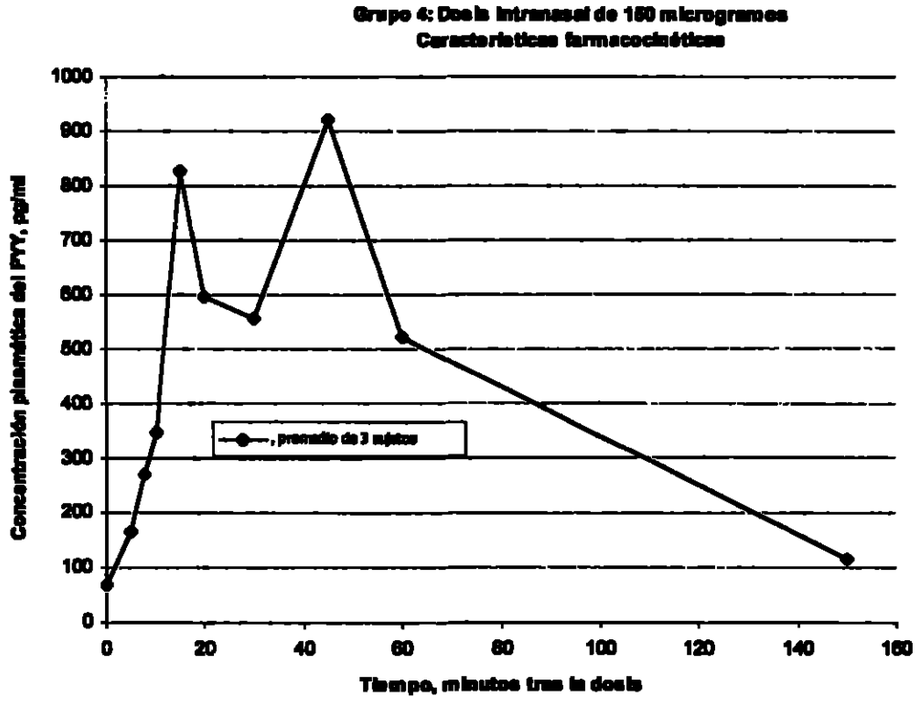


FIGURA 12



Inventores: QUAY *ET AL*

FIGURA 13

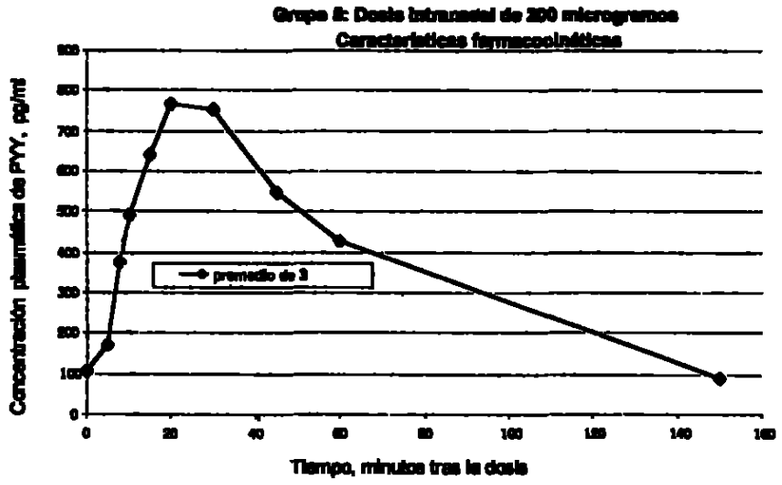
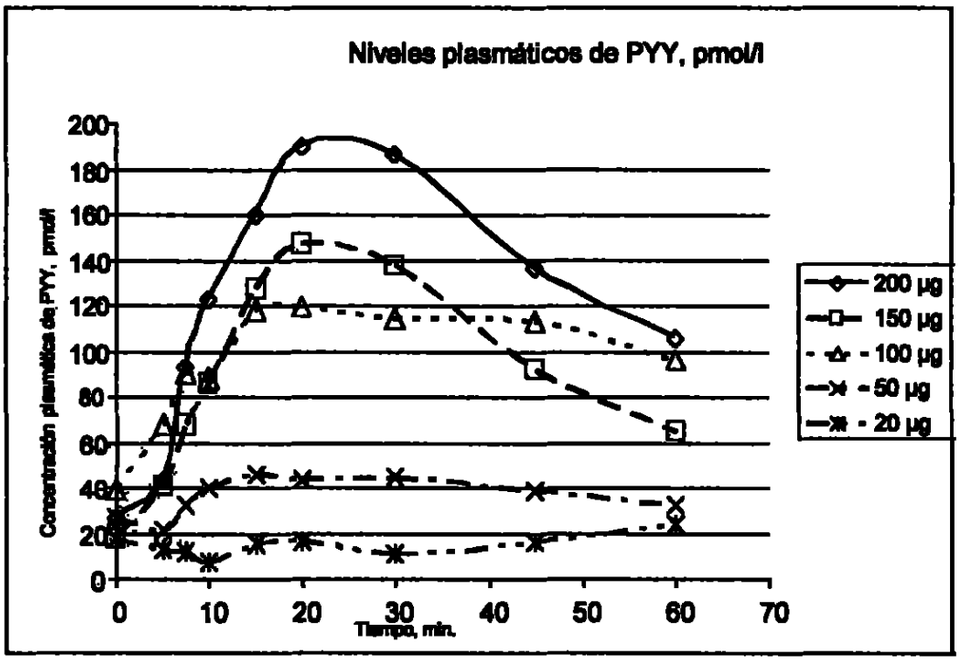


FIGURA 14



COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA ADMINISTRACIÓN MEJORADA POR VÍA MUCOSA DE PÉPTIDOS FIJADORES AL RECEPTOR DE Y2 Y MÉTODOS PARA TRATAR Y PREVENIR LA OBESIDAD

Inventores: QUAY *ET AL*

FIGURA 15

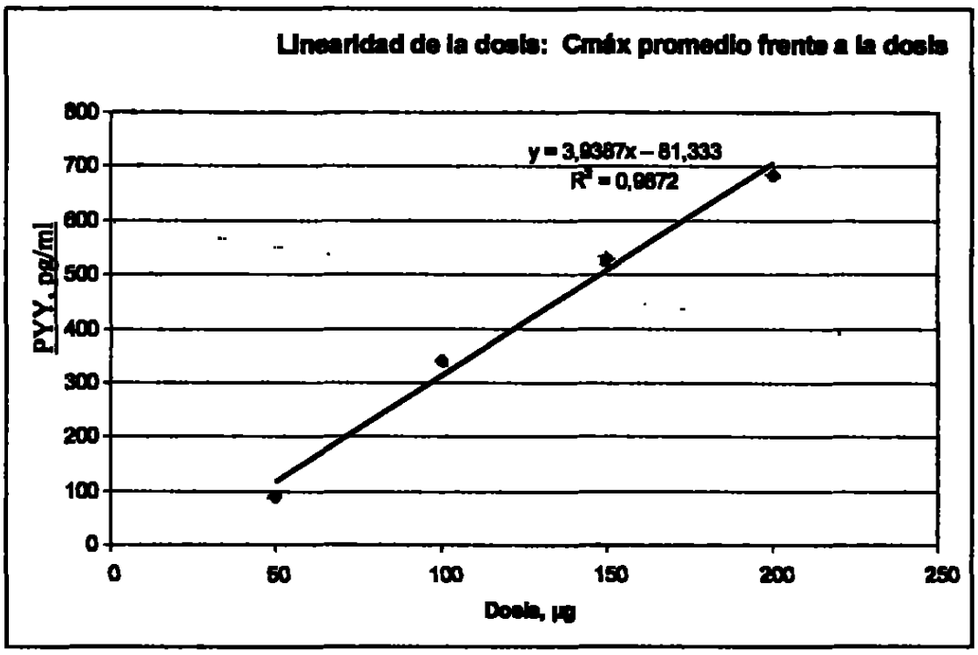


FIGURA 16

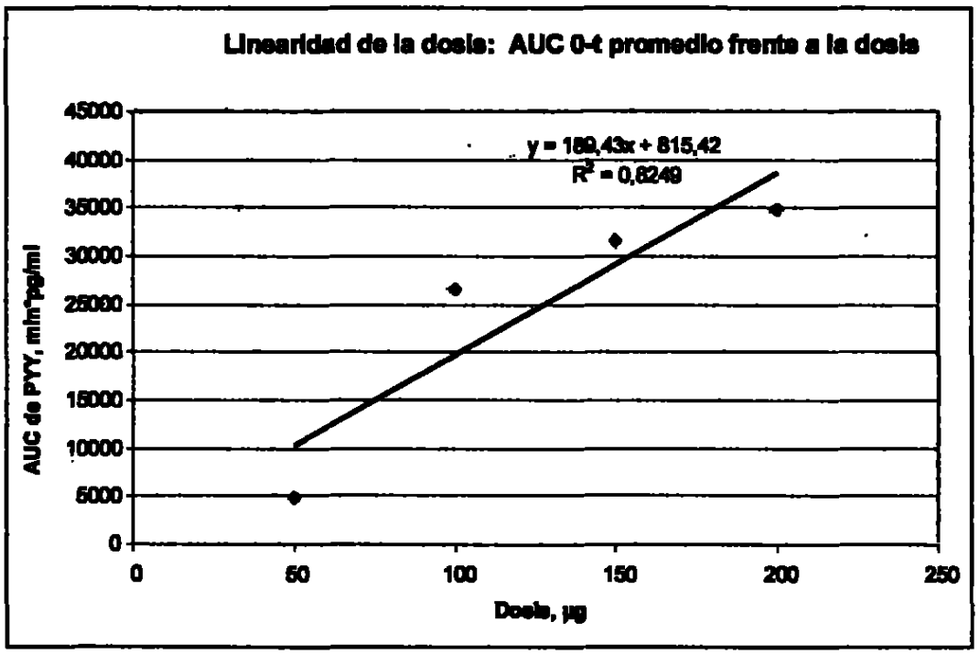


FIGURA 17

Resultados de la Escala Visual Análoga (VAS):

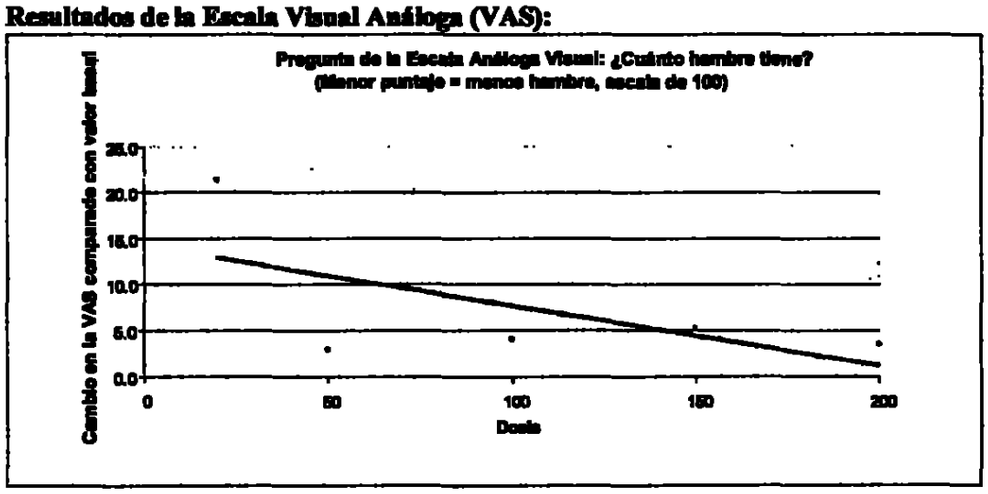


FIGURA 18

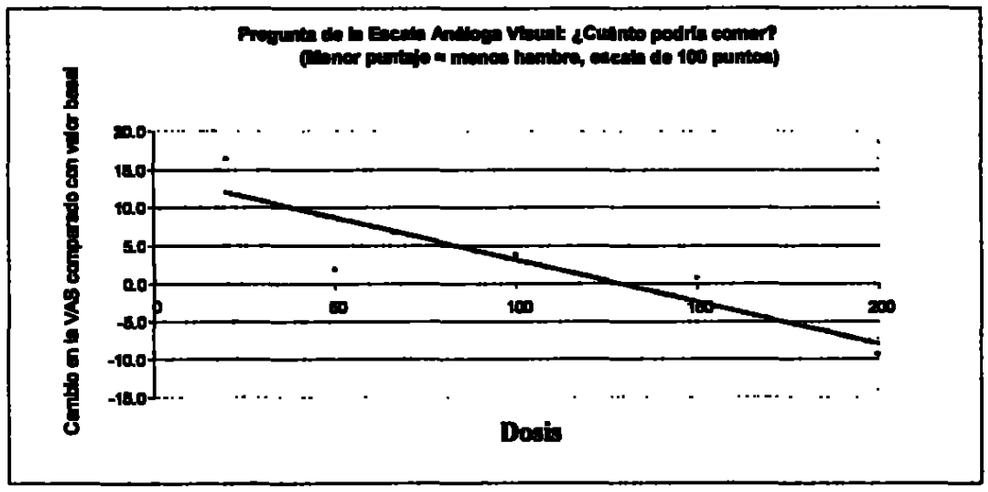


FIGURA 19

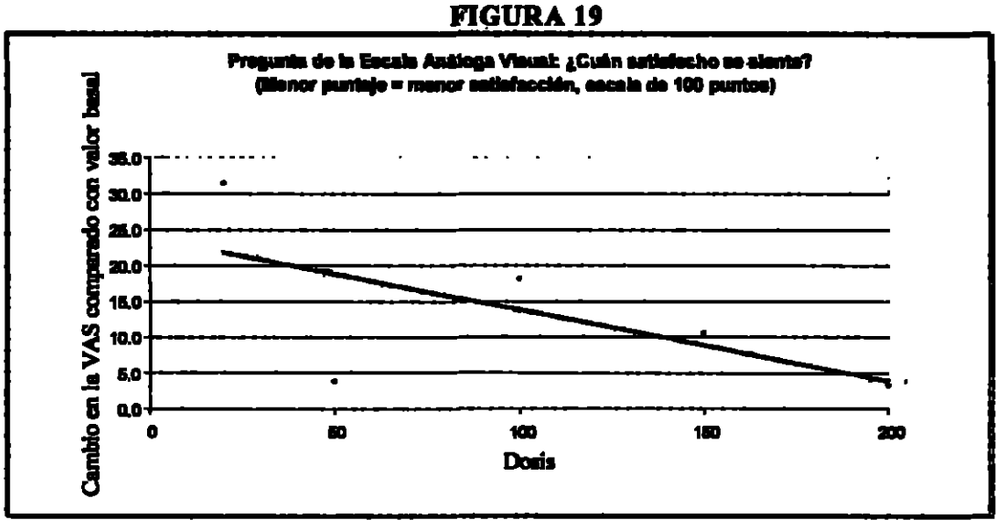
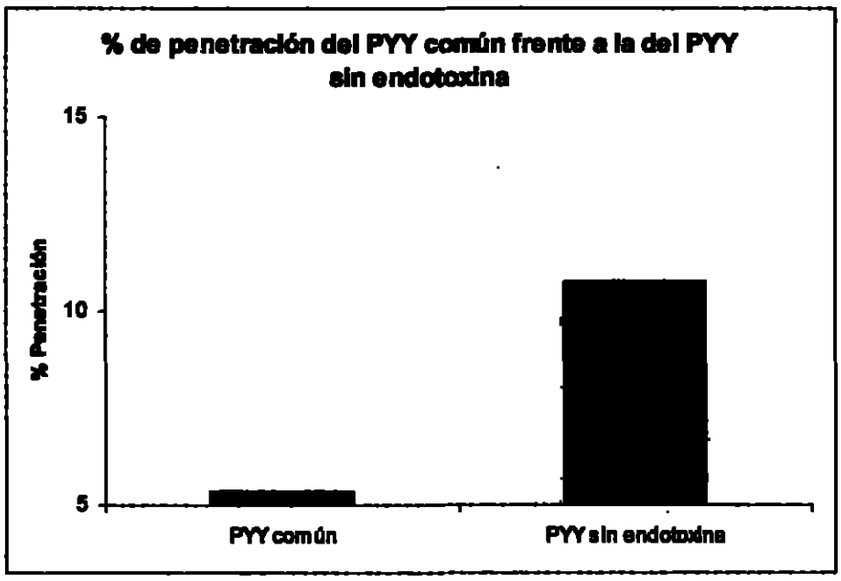


FIGURA 20



OT20 R PCT/PTO 17 DEC 2003

TRANSMITTAL LETTER T THE UNITED STATES RECEIVING FFICE

Rev. December 2003	
International Application No.	PCT/US 03/40538
Attorney Docket No.	02-04PCT

I. Certification under 37 CFR 1.10 (if applicable)

EO902184482US	17 December 2003
Express Mail mailing number	Date of Deposit

I hereby certify that the application/correspondence attached hereto is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to Mail Stop PCT, Commissioner for Patents, PO Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Leslie M. Kodish	Leslie M. Kodish
Signature of person mailing correspondence	Typed or printed name of person mailing correspondence

II. [X] New International Application

TITLE	COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY	Earliest priority date (Day/Month/Year): 17 Dec 2002

SCREENING DISCLOSURE INFORMATION: In order to assist in screening the accompanying international application for purposes of determining whether a license for foreign transmittal should and could be granted and for other purposes, the following information is supplied: (Note: check as many boxes as apply):

A. [ ] The invention disclosed was not made in the United States.

B. [ ] There is no prior U.S. application relating to this invention.

C. [X] The following prior U.S. application(s) contain subject matter which is related to the invention disclosed in the attached international application. (*NOTE: priority to these applications may or may not be claimed on form PCT/RO/101 (Request) and this listing does not constitute a claim for priority.*)

application no.	10/322,266	filed on	17 Dec 2002
application no.	60/518,812	filed on	10 Nov 2003

D. [X] The present international application contains additional subject matter not found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C. above. The additional subject matter is found on pages Throughout the application and [X] DOES NOT ALTER [ ] MIGHT BE CONSIDERED TO ALTER the general nature of the invention in a manner which would require the U.S. application to have been made available for inspection by the appropriate defense agencies under 35 U.S.C. 181 and 37 CFR 5.1. See 37 CFR 5.15.

III. [ ] A Response to an Invitation from the RO/US. The following document(s) is(are) enclosed:

A. [ ] A Request for An Extension of Time to File a Response

B. [ ] A Power of Attorney (General or Regular)

C. [ ] Replacement pages:

pages		of the request (PCT/RO/101)	pages		of the figures
pages		of the description	pages		of the abstract
pages		of the claims			

D. [ ] Submission of Priority Documents

Priority document		Priority document	

E. [ ] Fees as specified on attached Fee Calculation sheet form PCT/RO/101 annex

IV. [ ] A Request for Rectification under PCT 91 [ ] A Petition [X] A Sequence Listing Diskette

V. [ ] Other (please specify):

The person signing this form is the:	[ ] Applicant	Paul G. Lunn
	[X] Attorney/Agent (Reg. No.) 32,743	Typed name of signer
	[ ] Common Representative	Paul G. Lunn
		Signature

PTO-1382 (Rev. 04-2003) U.S. Department of Commerce: Patent and Trademark Office

For receiving Office use only

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

International Application No.	
International Filing Date	
Name of receiving Office and "PCT International Application"	

Applicant's or agent's file reference (*If desired*) (*12 characters maximum*): 02-04PCT

Box No. I TITLE OF INVENTION: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: (*Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.*)

NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC.
3450 MONTE VILLA PARKWAY
BOTHELL, WA 98021-8906
US

Telephone No.: (425) 908-3643
Facsimile No.: (425) 908-3655
Teleprinter No.:
Applicant's registration No. with the Office: 32,743

State (*that is, country*) of nationality: US
State (*that is, country*) of residence: US

This person is applicant for the purpose of: ☒ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (*Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.*)

QUAY, Steven C.
23632 HWY 99 STE. F PMB 454
EDMONDS, WA 98026-9224
US

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (*If this check-box is marked, do not fill in below.*)

Applicant's registration No. with the Office:

State (*that is, country*) of nationality: US
State (*that is, country*) of residence: US

This person is applicant for the purpose of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative

Name and address: (*Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.*)

LUNN, Paul G.
NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC.
3450 MONTE VILLA PARKWAY
BOTHELL, WA 98021-8906
USA

Telephone No.: (425) 908-3643
Facsimile No.: 425-908-3655
Teleprinter No.:
Agent's registration No. with the Office: 32,743

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III **FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not to be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

BRANDT, Gordon
790 KALMIA CT.
ISSAQUAH, WA 98027

This person is:
- [ ] applicant only
- [X] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purpose of:
- [ ] all designated States
- [ ] all designated States except the United States of America
- [X] the United States of America only
- [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

KLEPPE, Mary S.
P.O.BOX 1535
KINGSTON, WA 98346
US

This person is:
- [ ] applicant only
- [X] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purpose of:
- [ ] all designated States
- [ ] all designated States except the United States of America
- [X] the United States of America only
- [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

MACEVILLY, Conor J.
3046 N.W. 60TH STREET
SEATTLE, WA 98107
US

This person is:
- [ ] applicant only
- [X] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purpose of:
- [ ] all designated States
- [ ] all designated States except the United States of America
- [X] the United States of America only
- [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- [ ] applicant only
- [ ] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purpose of:
- [ ] all designated States
- [ ] all designated States except the United States of America
- [ ] the United States of America only
- [ ] the States indicated in the Supplemental Box

- [ ] Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATION OF STATES *Mark the applicable check-boxes below; at least one must be marked.*

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a):

Regional Patent

[X] **AP** ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)* .....

[X] **EA** Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT

[X] **EP** European Patent: AT Austria, BE Belgium, BG Bulgaria, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, CZ Czech Republic, DE Germany, DK Denmark, EE Estonia, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, HU Hungary, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, RO Romania, SE Sweden, SI Slovenia, SK Slovakia, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

[X] **OA** OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GQ Equatorial Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)* .....

National Patent *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):*

[X] AE	United Arab Emirates	[X] HR	Croatia	[X] OM	Oman
[X] AG	Antigua and Barbuda	[X] HU	Hungary	[X] PG	Papua New Guinea
[X] AL	Albania	[X] ID	Indonesia	[X] PH	Philippines
[X] AM	Armenia	[X] IL	Israel	[X] PL	Poland
[X] AT	Austria	[X] IN	India	[X] PT	Portugal
[X] AU	Australia	[X] IS	Iceland	[X] RO	Romania
[X] AZ	Azerbaijan	[X] JP	Japan	[X] RU	Russian Federation
[X] BA	Bosnia and Herzegovina	[X] KE	Kenya		
[X] BB	Barbados	[X] KG	Kyrgyzstan	[X] SC	Seychelles
[X] BG	Bulgaria	[X] KP	Democratic People's Republic of Korea	[X] SD	Sudan
[X] BR	Brazil			[X] SE	Sweden
[X] BY	Belarus	[X] KR	Republic of Korea	[X] SG	Singapore
[X] BZ	Belize	[X] KZ	Kazakhstan	[X] SK	Slovakia
[X] CA	Canada	[X] LC	Saint Lucia	[X] SL	Sierra Leone
[X] CH & LI	Switzerland and Liechtenstein	[X] LK	Sri Lanka	[X] SY	Syrian Arab Republic
[X] CN	China	[X] LR	Liberia	[X] TJ	Tajikistan
[X] CO	Colombia	[X] LS	Lesotho	[X] TM	Turkmenistan
[X] CR	Costa Rica	[X] LT	Lithuania	[X] TN	Tunisia
[X] CU	Cuba	[X] LU	Luxembourg	[X] TR	Turkey
[X] CZ	Czech Republic	[ ] LV	Latvia [through EP]	[X] TT	Trinidad and Tobago
[X] DE	Germany	[X] MA	Morocco		
[X] DK	Denmark	[X] MD	Republic of Moldova	[X] TZ	United Republic of Tanzania
[X] DM	Dominica			[X] UA	Ukraine
[X] DZ	Algeria	[X] MG	Madagascar	[X] UG	Uganda
[X] EC	Ecuador	[X] MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	[X] US	United States of America
[X] EE	Estonia				
[X] ES	Spain	[X] MN	Mongolia	[X] UZ	Uzbekistan
[X] FI	Finland	[X] MW	Malawi	[X] VC	Saint Vincent and the Grenadines
[X] GB	United Kingdom	[X] MX	Mexico	[X] VN	Viet Nam
[X] GD	Grenada	[X] MZ	Mozambique	[X] YU	Serbia and Montenegro
[X] GE	Georgia	[X] NI	Nicaragua	[X] ZA	South Africa
[X] GH	Ghana	[X] NO	Norway	[X] ZM	Zambia
[X] GM	Gambia	[X] NZ	New Zealand	[X] ZW	Zimbabwe

Check-boxes below reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

[X] **AP** Botswana [X] **EC** Egypt [X] **NA** Namibia

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. *(Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)*

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application *(day/month/year)*	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 17/12/2002 17 December 2002	10/322,266	US		
item (2) 7/8/2003 7 August 2003	60/493,226	US		
item (3) 8/09/2003 8 September 2003	60/501;170	US		
item (4) 10/10/2003 10 October 2003	60/510,785	US		
item (5) 04/11/2003 04 November 2003	60/517,290	US		

[X] Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)* identified above as:

[X] all items [ ] item (1) [ ] item (2) [ ] item (3) [ ] item (4) [ ] item (5) [ ] other, see Supplemental Box

* *Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):* .....

.....

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used)*:

ISA / US.....

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)*:

Date *(day/month/year)*	Number	Country *(or regional Office)*
17/12/2002	10/322,266	US

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes No. VIII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)*:		Number of declarations
[ ] Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
[ ] Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
[ ] Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
[ ] Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
[ ] Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No...." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:

(i) If more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;

(ii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;

(iii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;

(iv) If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;

(v) If, in Box No. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;

(vi) If, in Box No. VI, there are more than five earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.

2. If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.

Continuation of Box VI:

Filing date
of earlier application *(day/month/year)*

Item (6) 10/11/03
10 November 2003

Number of earlier application
60/518,812

national application: country or member of WTO
US

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:			This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*:	Number of items
(a) in paper form, the following number of sheets:				
request (including declaration sheets)	:	6		
description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)	:	149		
claims	:	20		
abstract	:	1		
drawings	:	11		
Sub-total number of sheets	:	187		
sequence listings	:	23		
tables related thereto	:	0		
(for both, actual number of sheets (if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)				
Total number of sheets	:	210		
(b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i))				
(i) ☐ sequence listings				
(ii) ☐ tables related thereto				
(c) ☒ also in computer readable form (Section 801(a)(ii))				
(i) ☒ sequence listings				
(ii) ☐ tables related thereto				
Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the – CD-R				
☒ sequence listings				
☐ tables related thereto				
(additional copies to be indicated under item 9(ii) and/or 10(ii), in right column)				
			1. ☒ fee calculation sheet	:1
			2. ☐ original separate power of attorney	:
			3. ☐ original general power of attorney	:
			4. ☒ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:1
			5. ☐ statement explaining lack of signature	:
			6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:
			7. ☐ translation of international application into *(language)*:	:
			8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:CD-R
			9. ☒ sequence listings in computer readable form *(indicate type and number of carriers)*	
			(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application	:
			(ii) ☒ *(only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter*	:
			(iii) ☒ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column	:1
			10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listings *(indicate type and number of carriers)*	
			(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*) only (and not as part of the international application)	:
			(ii) ☐ *(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*)	:
			(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:
			11. ☒ other *(specify)*: Transmittal letter, Return Receipt Postcard, Credit Card Payment form	:

Figure of the drawings which should accompany the abstract: 14

Language of filing of the International application: ENGLISH

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Must be each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Paul G. Lunn

Paul G. LUNN, Agent
Attorney for Applicant, Reg. No. 32,743

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	☐ received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 14(2):	☐ not received:
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

837
234

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
PCT

Applicants: Quay, Et. Al Application No.: Filed: 17 December 2003 Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 *RECEPTOR-BINDING* PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY	Attorney Docket No.: 02-04PCT

Dear Assistant Commissioner for Patents:

SEQUENCE LISTING STATEMENT

I hereby state that the information recorded in computer readable form (CD-R) of the sequence listing, submitted, is identical to the written (printed on paper) sequence listing attached hereby.

Respectfully Submitted,

16 December 2003
Date

Paul G. Lunn
Patent Counsel
Reg. No. 32,743

Paul G. Lunn, Esq.
Patent Counsel
Nastech Pharmaceutical Company Inc.
3450 Monte Villa Parkway
Bothell, WA 98021

(425) 908-3643 Phone
(425) 908-3655 Fax
www.nastech.com
plunn@nastech.com

PCT

GENERAL POWER OF ATTORNEY

(for several international applications filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.5)

The undersigned person(s):
(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Nastech Pharmaceutical Company Inc.
3450 Monte Villa Parkway
Bothell, WA 98021-8906

hereby appoints (appoint) the following person as: ☑ agent ☐ common representative

Name and address
(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Lunn, Paul G., Reg. No. 32743
Patent Counsel
Nastech Pharmaceutical Company Inc.
3450 Monte Villa Parkway
Bothell, WA 98021-8906
USA

to represent the undersigned before
☑ all the competent International Authorities
☐ the International Searching Authority only
☐ the International Preliminary Examining Authority only

in connection with any and all international applications filed by the undersigned with the following Office Unite States as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

Signature of the applicant *(where there are several persons, each of them must sign; next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs, if such capacity is not obvious from reading this power):*

CEO and President of Nastech Pharmaceutical Company Inc., Applicant / Inventor

Steven C. Quay

Date: May 19, 2003

Form PCT/Model of general power of attorney (for several international applications)(July 1992)

2234

236

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:
PAUL G. LUNN
NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.
3450 MONTE VILLA PARKWAY
BOTHELL, WASHINGTON 98021-8906

PCT

INVITATION TO CORRECT DEFECTS IN THE INTERNATIONAL APPLICATION

(PCT Articles 3(4)(i) and 14(1) and Rule 26)

	Date of mailing *(day/month/year)* 10 Mar 2004
Applicant's or agent's file reference 02-04PCT	REPLY DUE within 1 month/days from the above date of mailing
International application No. PCT/US03/40538	International filing date *(day/month/year)* 17 Dec 2003
Applicant NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.	

PGL 3/16/04

1. ☐ The applicant is hereby invited, within the time limit indicated above, to correct, in the international application as filed, the defects specified on the attached:
   - ☒ Annex A
   - ☐ Annex B1 *(text matter of the international application as filed)*
   - ☐ Annex C1 *(drawings of the international application as filed)*

2. ☐ The applicant is hereby invited, within the time limit indicated above, to correct, in the translation of the international application furnished under Rule 12.3 or 12.4, the defects specified on the attached:
   - ☐ Annex A
   - ☐ Annex B2 *(text matter of the translation of the international application)*
   - ☐ Annex C2 *(drawings of the translation of the international application)*

Additional observations (if necessary):

HOW TO CORRECT THE DEFECTS?

Correction must be submitted by filing a replacement sheet embodying the correction and a letter accompanying the replacement sheet, which shall draw attention to the difference between the replaced sheet and the replacement sheet. A correction may be stated in a letter only if it is of such a nature that it can be transferred from the letter to the record copy without adversely affecting the clarity and direct reproducibility of the sheet onto which the correction is to be transferred (Rule 26.4).

ATTENTION

Failure to correct the defects will result in the international application being considered withdrawn by this receiving Office (see Rule 26.5 for further details).

A copy of this invitation and any attachments has been sent to the International Bureau
☒ and the International Searching Authority

Name and mailing address of the receiving Office	Authorized officer
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450	Latrice Russell
Facsimile No. 703-305-3230	Telephone No. 703-306-5829

Form PCT/RO/106 (January 2003)

NASTECH LEGAL
DOCKETED
DUE 4/10/04

240
237

ANNEX A TO FORM PCT/RO/106

International application No.
PCT/US03/40538

The receiving Office has found the following defects in the international application as filed:

1. As to signature* of the international application (Rules 4.15 and 90.4), the request:
   - a. ☐ is not signed
   - b. ☐ is not signed by all the applicants
   - c. ☐ is not accompanied by the statement referred to in the check list in Box No. VIII of the request explaining the lack of the signature of an applicant for the designation of the United States of America
   - d. ☒ is signed by what appears to be an agent/common representative but:
     - ☐ the international application is not accompanied by a power of attorney appointing him
     - ☒ the power of attorney accompanying the international application was not signed by all the applicants
   - e. ☐ other *(specify)*:

* All applicants must sign, including inventors if they are also applicants (e.g. where the United States of America is designated).

2. As to indications concerning the applicant, the request (Rules 4.4 and 4.5):
   - a. ☐ does not properly indicate the applicant's name *(specify)*:
   - b. ☐ does not indicate the applicant's address
   - c. ☐ does not properly indicate the applicant's address *(specify)*:
   - d. ☐ does not indicate the applicant's nationality
   - e. ☐ does not indicate the applicant's residence
   - f. ☐ other *(specify)*:

3. As to the language of certain elements of the international application, other than the description and claims (Rules 12.1(c) and 26.3*ter*(a) and (c)):
   - a. ☐ the request is not in a language of publication accepted by this receiving Office: (the) language(s) accepted by this receiving Office is/are:
   - b. ☐ the text matter of the drawings is not in the language in which the international application is to be published, which is:
   - c. ☐ the abstract is not in the language in which the international application is to be published, which is:

4. The title of the invention:
   - a. ☐ is not indicated in Box No. I of the request (Rule 4.1(a))
   - b. ☐ is not indicated at the top of the first sheet of the description (Rule 5.1(a))
   - c. ☐ as appearing in Box No. I of the request is not identical with the title heading the description (Rule 5.1(a))

5. As to the abstract (Rule 8):
   - ☐ the international application does not contain an abstract

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:
PAUL G. LUNN
NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.
3450 MONTE VILLA PARKWAY
BOTHELL, WASHINGTON 98021-8906

PCT

NOTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION NUMBER AND OF THE INTERNATIONAL FILING DATE

(PCT Rule 20.5(c))

Date of mailing *(day month year)*	10 Mar 2004
Applicant's or agent's file reference: 02-04PCT	IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.	International filing date *(day month year)*	Priority date *(day month year)*
PCT/US03/40538	17 Dec 2003	17 Dec 2002

Applicant: NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.

Title of the invention: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY

1. The applicant is hereby notified that the international application has been accorded the international application number and the international filing date indicated above.

2. The applicant is further notified that the record copy of the international application:

[x] was transmitted to the International Bureau on 10 Mar 2004

[ ] has not yet been transmitted to the International Bureau for the reason indicated below and a copy of this notification has been sent to the International Bureau*:

[ ] because the necessary national security clearance has not yet been obtained.

[ ] because *(reason to be specified)*:

* The International Bureau monitors the transmittal of the record copy by the receiving Office and will notify the applicant (with Form PCT/IB/301) of its receipt. Should the record copy not have been received by the expiration of 14 months from the priority date, the International Bureau will notify the applicant (Rule 22.1(c)).

3. FOREIGN TRANSMITTAL LICENSE INFORMATION — Completed by: LR

[ ] Additional license for foreign transmittal not required. This subject matter is covered by a license already granted or the equivalent U.S. national application. Refer to that license for information concerning its scope.

[ ] License for foreign transmittal not required, 37 CFR 5.11(e)(1) or 37 CFR 5.11(e)(2). However, a license may be required for additional subject matter. See 37 CFR 5.15(b).

[x] Foreign transmittal license granted, 35 U.S.C. 184; 37 CFR 5.11 on 05 Mar 2004 (date):

[ ] 37 CFR 5.15(a) [x] 37 CFR 5.15(b)

Name and mailing address of the receiving Office	Authorized officer
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450	Latrice Russell
Facsimile No. 703-305-3230	Telephone No. 703-306-5829

Form PCT/RO/105 (July 1992)

4217
239

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

To:
PAUL G. LUNN
NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.
3450 MONTE VILLA PARKWAY
BOTHELL, WASHINGTON 98021-8906

PCT

INVITATION TO CORRECT PRIORITY CLAIM

(PCT Rules 4.10, 26*bis*.1, 26*bis*.2(a) and (b))

	Date of mailing *(day/month/year)* 10 Mar 2004
Applicant's or agent's file reference 02-04PCT	REPLY DUE See item 1
International application No. PCT/US03/40538	International filing date *(day/month/year)* 17 Dec 2003
Applicant NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.	

The applicant is hereby invited, within the time limit indicated below, to correct, by a notice submitted to this receiving Office, defects in the priority claim(s), as indicated in the Annex.

1. Time limit to respond to this Invitation (Rule 26*bis*.1(a)): 10/8/03
   - within 16 months from the (earliest) priority date; or
   - if the (earliest) priority date is changed as a result of the correction or addition of the (earliest) priority claim, within 16 months from that (earliest) priority date so changed,

   whichever expires first, provided that such a notice may, in any event, be submitted until the expiration of four months from the international filing date.

   Failure to respond to this Invitation within the prescribed time limit may result in the priority claim concerned to be considered, for the purposes of the procedure under the PCT, not to have been made (Rule 26*bis*.2(b)).

2. In the case where multiple priorities have been claimed, this invitation relates to the following priority claim(s):

   ITEM (4)

3. A copy of this Invitation is being sent to the International Bureau.

Name and mailing address of the receiving Office Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 703-305-3230	Authorized officer Latrice Russell Telephone No. 703-306-5829

Form PCT/RO/110 (July 1998; reprint January 2000)

243
240

ANNEX TO FORM PCT/RO/110

International application No.
PCT/US03/40538

This receiving Office has found the following defects in the priority claim(s):

1. Failure to Comply with the Requirements of Rule 4.10

a. ☐ National application

- ☐ Missing indication of the filing date of the earlier application.
- ☐ Filing date indicated for the earlier application does not fall within the period of 12 months preceding the international filing date.
- ☐ Missing indication of the number of the earlier application.*
- ☐ Missing indication of the country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, or of the Member of the World Trade Organization that is not party to that Convention, in which the earlier national application was filed.
- ☐ The country indicated is neither a party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property nor a Member of the World Trade Organization.

b. ☐ Regional application

- ☐ Missing indication of the filing date of the earlier application.
- ☐ Filing date indicated for the earlier application does not fall within the period of 12 months preceding the international filing date.
- ☐ Missing indication of the number of the earlier application.*
- ☐ Missing indication of the authority entrusted with the granting of regional patents under the applicable regional patent treaty.
- ☐ The authority indicated as the authority entrusted with the granting of regional patents does not grant regional patents.
- ☐ The priority claim in relation to the ARIPO application does not indicate either at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, or at least one Member of the World Trade Organization, for which the earlier application was filed.

c. ☐ International application

- ☐ Missing indication of the filing date of the earlier application.
- ☐ Filing date indicated for the earlier application does not fall within the period of 12 months preceding the international filing date.
- ☐ Missing indication of the number of the earlier application.*
- ☐ Missing indication of the receiving Office with which it was filed.

2. Inconsistency with the Corresponding Indications in the Priority Document*

a. ☒ Inconsistency with regard to the filing date of the earlier application:

The request indicates: 10 OCT 2003

The priority document indicates: 08 OCT 2003

b. ☐ Inconsistency with regard to the number of the earlier application:

The request indicates:

The priority document indicates:

c. ☐ Inconsistency with regard to the country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or the Member of the World Trade Organization in which the national application was filed:

The request indicates:

The priority document indicates:

d. ☐ Inconsistency with regard to the authority entrusted with the granting of *regional patents* under the applicable regional patent treaty:

The request indicates:

The priority document indicates:

e. ☐ Inconsistency with regard to the receiving Office with which the international application was filed:

The request indicates:

The priority document indicates:

* Even if this defect is not corrected in response to this Invitation, the priority claim concerned will not be considered not to have been made (Rule 26*bis*.2(b)).

Form PCT/RO/110 (Annex) (January 2000)

We had to fix to match up to recorded which was in error

Should not have responded 10/10/03 is correct

5241
241

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE (RO/US)

IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

International Application Number: PCT/US03/40538

Agent's File Reference: 02-04PCT

International Filing Date: 12 DECEMBER 2003

Applicant: Nastech Pharmaceutical Company Inc.

Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY

RESPONSE TO INVITATION TO CORRECT DEFECTS IN THE INTERNATIONAL APPLICATION

To the Commissioner of Patents and Trademarks:

Attention: Latrice Russell, Authorized Officer, RO/US

In response to the Invitation to Correct Defects in the International Application dated 10 March 2004, please make the following change:

Please replace PCT Request PCT/RO/101 sheet no. 4 with the enclosed new sheet 4. Box VI. Priority Claim, item (4) U.S. 60/510,785. We are changing the request to match the U.S.PTO records of 08 OCT 2003.

Enclosed is an Original Power of Attorney form, and Declaration, signed by all four inventors.

Kindly update our company name to reflect no 'comma'. Nastech Pharmaceutical Company Inc,. doesn't have a comma between the word Company and Inc.

245
242

REMARKS

Applicant respectfully requests that these papers be timely filed to correct the defects.

Should there be any questions, please contact the undersigned attorney at

(425) 908-3682, or by email at plunn@nastech.com.

Respectfully Submitted,

5 April 2004
Date

Paul G. Lunn
Agent

Paul G. Lunn, Patent Counsel
Nastech Pharmaceutical Company Inc.
3450 Monte Villa Parkway
Bothell, WA 98021-8906
(425) 908-3643
USA

Enclosures:

- Transmittal
- Replacement sheet for Request sheet 4 (1 page)
- Power of Attorney (1 page)
- Declaration (2 pages)
- Postcard

EXPRESS MAIL CERTIFICATION

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as Express Mail in an envelope addressed to: Latrice Russell, Commissioner for Patents, Mail Stop PCT, P. O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450, Express Mail: EO 803 239 973 US.

Date of Deposit: 05 April 2004

Typed Name: Leslie M. Kodish

Signature: Leslie M. Kodish

Sheet No. .....

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of Inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv))
for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original, ~~first and sole (if only one inventor is listed below)~~ or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US03/40538 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that my residence, mailing address, and citizenship are as stated next to my name.

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application, including the claims of said application. I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4.10, any claim to foreign priority, and I have identified below, under the heading "Prior Applications," by application number, country or Member of the World Trade Organization, day, month and year of filing, any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed.

Prior Applications: U.S. Provisional Application 60/444,032, filed 31 January 2003 . .

I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C.F.R. § 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Name: KLEPPE, Mary S.

Residence: KINGSTON, WA, US
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: P.O.BOX 1535, KINGSTON, WA 98346

Citizenship: US

Inventor's Signature Mary S Kleppe Date 2 April 2004
(If not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26*ter* after the filing of the international application. The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: MACEVILLY, Conor J.

Residence: SEATTLE, WA, US
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 3046 N.W. 60TH ST, SEATTLE, WA 98107

Citizenship: US

Inventor's Signature Conor J MacEvilly Date 2 April 2004
(If not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26*ter* after the filing of the international application. The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

Box No. VIII (iv) **DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)**

The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of Inventorship (Rules 4.17(iv) and 51*bis*.1(a)(iv))
for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the ~~original, first and sole (if only one inventor is listed below) or~~ joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/ US03/40538 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26*ter*).

I hereby declare that my residence, mailing address, and citizenship are as stated next to my name.

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application, including the claims of said application. I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4.10, any claim to foreign priority, and I have identified below, under the heading "Prior Applications," by application number, country or Member of the World Trade Organization, day, month and year of filing, any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed.

Prior Applications: *U.S. Provisional Application 60/444,032, filed 31 January 2003 ..*

I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 *C.F.R. § 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the* prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Name: QUAY, Steven C.

Residence: EDMONDS, WA, US
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 23632 HWY 99 STE. F PMB 454, EDMONDS, WA 98026-9224

Citizenship: US

Inventor's Signature _____ Date 2 April 2004
(if not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26*ter* after the filing of the international application. The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: BRANDT, Gordon

Residence: ISSAQUAH, WA, US
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: 790 KALMIA CT., ISSAQUAH, WA 98027

Citizenship: US

Inventor's Signature Gordon Brandt Date 2 April 2004
(if not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26*ter* after the filing of the international application. The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

[X] This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)" Additional Inventor Signatures

PCT

POWER OF ATTORNEY

(for an international application filed under the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 90.4)

The undersigned applicants (*Names should be indicated as they appear in the request*):

QUAY, Steven C. 23632 Hwy 99 Ste. F PMB Ste. F PMB 454 EDMONDS, WA 98026-9224, US	BRANDT, Gordon 790 KALMIA CT. ISSAQUAH, WA 98027 US	KLEPPE, Mary S. P.O.BOX 1535 KINGSTON, WA 98346 US	MACEVILLY, Conor J. 3046 N.W. 60TH ST SEATTLE, WA 98107 US

hereby appoints (appoint) the following person as: ☑ agent ☐ common representative

Name and address
(*Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.*)

LUNN, Paul G., Reg. No. 32,743
Patent Counsel
Nastech Pharmaceutical Company Inc.
3450 Monte Villa Parkway
Bothell, WA 98021-8906
USA

to represent the undersigned before
☑ all the competent International Authorities
☐ the International Searching Authority only
☐ the International Preliminary Examining Authority only

in connection with the international application identified below:

Title of the invention: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY

Applicant's or agent's file reference: 02-04PCT

International application number: PCT/US03/40538

Filed with the following Office US as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned.

Signature of the applicants (*where there are several applicants, each of them must sign; next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs, if such capacity is not obvious from reading the request or this power*):

Steven C. Quay, Applicant / Inventor — Date: 2 April 2004

Gordon Brandt, Applicant / Inventor — Date: 2 April 2004

Mary S. KLEPPE, Applicant / Inventor — Date: 2 April 2004

Conor J. MACEVILLY, Applicant / Inventor — Date: 2 April 2004

Form PCT/Model of general power of attorney (for several international applications)(July 1992)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application *(day/month/year)*	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 17/12/2002 17 December 2002	10/322,266	US		
item (2) 7/8/2003 7 August 2003	60/493,226	US		
item (3) 8/09/2003 8 September 2003	60/501,170	US		
item (4) 8/10/2003 8 October 2003	60/510,785	US		
item (5) 04/11/2003 04 November 2003	60/517,290	US		

not correct their claims not all

[X] Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purpose of this international application is the receiving Office)* identified above as:

[X] all items [ ] item (1) [ ] item (2) [ ] item (3) [ ] item (4) [ ] item (5) [ ] other, see Supplemental Box

* *Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(i)):* .....

.....

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used)*:

ISA / US.....

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)*:

Date *(day/month/year)*	Number	Country *(or regional Office)*
17/12/2002	10/322,266	US

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes No. VIII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)*:		Number of declarations
[ ] Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor :	
[ ] Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent :	
[ ] Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application :	
[ ] Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) :	
[ ] Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty :	

RECEIVED
APR 12 2004

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

LUNN, Paul, G.
Nastech Pharmaceutical Company Inc.
3450 Monte Villa Parkway
Bothell, WA 98021-8906
United States of America

Date of mailing (day/month/year)	IMPORTANT NOTIFICATION
31 March 2004 (31.03.2004)	
Applicant's or agent's file reference	**International application No.**
02-04PCT	PCT/US2003/040538

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the International application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC. (for all designated States except US)
QUAY, Steven, C. et al (for US)

International filing date	:	17 December 2003 (17.12.2003)
Priority date(s) claimed	:	17 December 2002 (17.12.2002) 07 August 2003 (07.08.2003) 08 September 2003 (08.09.2003) 10 October 2003 (10.10.2003) 04 November 2003 (04.11.2003) 10 November 2003 (10.11.2003)
Date of receipt of the record copy by the International Bureau	:	12 March 2004 (12.03.2004)
List of designated Offices	:	

AP :BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW
EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
EP :AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR
OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National :AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,
EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,
LU,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,
TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Juan CRUZ
Facsimile No. (41-22) 338.88.85	Telephone No. (41-22) 338 8239

Form PCT/IB/301 (April 2002)

006181883

NA
Dec 16/04

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

LUNN, Paul, G.
Nastech Pharmaceutical Company Inc.
3450 Monte Villa Parkway
Bothell, WA 98021-8906
United States of America

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 31 March 2004 (31.03.2004)	
Applicant's or agent's file reference 02-04PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2003/040538	International filing date (day/month/year) 17 December 2003 (17.12.2003)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 17 December 2002 (17.12.2002)
Applicant NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC. et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
17 Dece 2002 (17.12.2002)	10/322,266	US	12 Marc 2004 (12.03.2004)
07 Augu 2003 (07.08.2003)	60/493,226	US	11 Marc 2004 (11.03.2004)
08 Sept 2003 (08.09.2003)	60/501,170	US	11 Marc 2004 (11.03.2004)
10 Nove 2003 (10.11.2003)	60/518,812	US	NR

Only 4 Listed - one Six priority applns.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Juan CRUZ
Facsimile No. (41-22) 338.88.86	Telephone No. (41-22) 338 8239

Form PCT/IB/304 (January 2004) 006181884

TRANSMITTAL LETTER T THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

Date	06 July 2004 (06.07.04)
International Application No.	PCT/US03/40538
Attorney Docket No.	02-04PCT

I. Certification under 37 CFR 1.10 (If applicable)

Sent regular mail	06 July 2004
	Date of Deposit

I hereby certify that the application/correspondence attached hereto is being deposited with the United States Postal Service "First Class Mail service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to Mail Stop PCT, Commissioner for Patents, PO Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Leslie M. Kodish	Leslie M. Kodish
Signature of person mailing correspondence	Typed or printed name of person mailing correspondence

II. ☐ New International Application

TITLE	COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY

Earliest priority date (Day/Month/Year)
17 Dec 2002

SCREENING DISCLOSURE INFORMATION: In order to assist in screening the accompanying international application for purposes of determining whether a license for foreign transmittal should and could be granted and for other purposes, the following information is supplied: (Note: check as many boxes as apply):

A. ☐ The invention disclosed was not made in the United States.

B. ☐ There is no prior U.S. application relating to this invention.

C. ☐ The following prior U.S. application(s) contain subject matter which is related to the invention disclosed in the attached international application. (*NOTE: priority to these applications may or may not be claimed on form PCT/RO/101 (Request) and this listing does not constitute a claim for priority.*)

application no.	10/322,286	filed on	17 Dec 2002
application no.		filed on	

D. ☐ The present international application contains additional subject matter not found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C. above. The additional subject matter is found on pages ____ and ☐ DOES NOT ALTER ☐ MIGHT BE CONSIDERED TO ALTER the general nature of the invention in a manner which would require the U.S. application to have been made available for inspection by the appropriate defense agencies under 35 U.S.C. 181 and 37 CFR 5.1. See 37 CFR 5.15.

III. ☐ A Response to an Invitation from the RO/US. The following document(s) is(are) enclosed:

A. ☐ A Request for An Extension of Time to File a Response

B. ☐ A Power of Attorney (General or Regular)

C. ☐ Replacement pages:

pages		of the request (PCT/RO/101)	pages		of the figures
pages		of the description	pages		of the abstract
pages		of the claims			

D. ☐ Submission of Priority Documents

Priority document		Priority document	

E. ☐ Fees as specified on attached Fee Calculation sheet form PCT/RO/101 annex

IV. ☐ A Request for Rectification under PCT 91 ☐ A Petition ☐ A Sequence Listing Diskette

V. ☒ Other (please specify): Request for International Preliminary Examination DEMAND, Fee Calculation with authorization for charging the deposit account, Transmittal Letter, Return Receipt Postcard.

The person signing this form is the:	☐ Applicant	Paul G. Lunn
	☒ Attorney/Agent (Reg. No.) 32,743	Typed name of signer
	☐ Common Representative	Paul G. Lunn
		Signature

PTO-1382 (Rev. 04-2003) U.S. Department of Commerce: Patent and Trademark Office

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ _____

[redacted]

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty.

For International Preliminary Examining Authority use only	
Identification of IPEA	Date of receipt of DEMAND

Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference
International application No. PCT/US03/40538	International filing date *(day/month/year)* 17 Dec 2003 (17.12.03)	(Earliest) Priority date *(day/month/year)* 17 Dec 2002 (17.12.02)

Title of invention
COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING

Box No. II APPLICANT(S)

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*	Telephone No. 425-908-3643
NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC. 3450 Monte Villa Parkway Bothell, WA 98021-8906 US	Facsimile No. 425-908-3655
	Teleprinter No.
	Applicant's registration No. with the Office 32,743

State *(that is, country)* of nationality: US	State *(that is, country)* of residence: US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*
QUAY, Steven C.
23632 HWY 99, STE F PMB 454
Edmonds, WA 98026-9224
US

State *(that is, country)* of nationality: US	State *(that is, country)* of residence: US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*
BRANDT, Gordon
790 Kalmia Ct
Issaquah, WA 98027
US

State *(that is, country)* of nationality: US	State *(that is, country)* of residence: US

☒ Further applicants are indicated on a continuation sheet.

Sheet No. 2.

International application No.
PCT/US03/40538

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

KLEPPE, Mary S.
P.O. Box 1535
Kingston, WA 98346
US

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
US	US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

MACEVILLE, Conor J.
3046 N.W. 60th Street
Seattle, WA 98107
US

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
US	US

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:

☐ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Sheet No. 3

International application No.
PCT/US03/40538

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is ☒ agent ☐ common representative

and ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.

☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.

☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

LUNN, Paul G. Agent
NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC
3450 Monte Villa Parkway
Bothell, WA 98021-8906

Telephone No.
425-908-3643

Facsimile No.
425-908-3655

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
32,743

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Statement concerning amendments:*

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filed

the description
☒ as originally filed
☐ as amended under Article 34

the claims
☒ as originally filed
☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)
☐ as amended under Article 34

the drawings
☒ as originally filed
☐ as amended under Article 34

2. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.

3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of the applicable time limit under Rule 69.1(d).

4. ☐ The applicant expressly wishes the international preliminary examination to start earlier than at the expiration of the applicable time limit under Rule 54*bis*.1(a).

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: .....

☒ which is the language in which the international application was filed.
☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.
☐ which is the language of publication of the international application.
☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.

Box No. V ELECTION OF STATES

The filing of this demand constitutes the election of all Contracting States which are designated and are bound by Chapter II of the PCT.

Sheet No. 4

International application No.
PCT/US03/40538

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

			For International Preliminary Examining Authority use only: received	not received
1. translation of international application	:	0 sheets	☐	☐
2. amendments under Article 34	:	0 sheets	☐	☐
3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19	:	0 sheets	☐	☐
4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19	:	0 sheets	☐	☐
5. letter	:	0 sheets	☐	☐
6. other *(specify)* 0	:	sheets	☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

1. ☒ fee calculation sheet
2. ☐ original separate power of attorney
3. ☐ original general power of attorney
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
5. ☐ statement explaining lack of signature
6. ☐ sequence listing in computer readable form
7. ☐ tables in computer readable form related to a sequence listing
8. ☒ other *(specify)*: Return receipt postcard

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).

Paul G. LUNN, Agent

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.
   ☐ The applicant has been informed accordingly.
4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.
5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.
6. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of the time limit under Rule 54*bis*.1(a) and item 7 or 8, below, does not apply.
7. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit under Rule 54*bis*.1(a) as extended by virtue of Rule 80.5.
8. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of the time limit under Rule 54*bis*.1(a), the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

LUNN, Paul, G.
Nastech Pharmaceutical Company Inc.
3450 Monte Villa Parkway
Bothell, WA 98021-8906
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED
JUL 13 2004

Date of mailing *(day/month/year)*	
08 July 2004 (08.07.2004)	
Applicant's or agent's file reference	**IMPORTANT NOTICE**
02-04PCT	

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2003/040538	17 December 2003 (17.12.2003)	17 December 2002 (17.12.2002)

Applicant
NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC. et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

   AU, AZ, BY, CH, CN, CO, DZ, EP, HU, JP, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, RU, TM, US

   In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

   AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PG, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

   The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-*bis*)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 08 July 2004 (08.07.2004) under No. WO 2004/056314

4. **TIME LIMITS for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase**

   The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

   In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

   For filing a demand for international preliminary examination, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

   It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nora Lindner
Facsimile No.+41 22 740 14 35	Facsimile No.+41 22 338 89 65

Form PCT/IB/308 (April 2002)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 July 2004 (08.07.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/056314 A2

(51) International Patent Classification[7]: A61K

(21) International Application Number:
PCT/US2003/040538

(22) International Filing Date:
17 December 2003 (17.12.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

10/322,266	17 December 2002 (17.12.2002)	US
60/493,226	7 August 2003 (07.08.2003)	US
60/501,170	8 September 2003 (08.09.2003)	US
60/510,785	10 October 2003 (08.10.2003)	US
60/517,290	4 November 2003 (04.11.2003)	US
60/518,812	10 November 2003 (10.11.2003)	US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC. [US/US]; 3450 Monte Villa Parkway, Bothell, WA 98021-8906 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): QUAY, Steven, C. [US/US]; 23632 Hwy 99, Ste. F PMB 454, Edmonds, WA 98026-9224 (US). BRANDT, Gordon [US/US]; 790 Kalmia Ct., Issaquah, WA 98027 (US). KLEPPE, Mary, S. [US/US]; P.O. Box 1535, Kingston, WA 98346 (US). MACEVILLY, Conor, J. [US/US]; 3046 N.W. 60th Street, Seattle, WA 98107 (US).

(74) Agent: LUNN, Paul, G.; Nastech Pharmaceutical Company Inc., 3450 Monte Villa Parkway, Bothell, WA 98021-8906 (US).

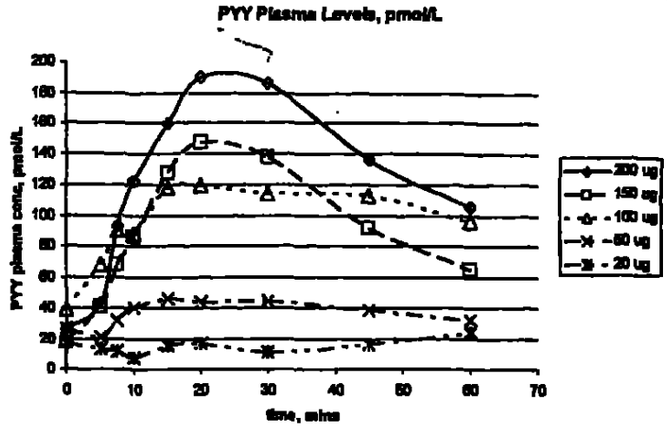
(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM).

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY

RECEIVED
JUL 13 2004



(57) Abstract: Pharmaceutical compositions and methods are described comprising at least one peptide YY compound and one or more intranasal delivery-enhancing agents for enhanced nasal mucosal delivery of the peptide YY, for treating a variety of diseases and conditions in mammalian subjects, including obesity. In one aspect, the intranasal delivery formulations and methods provide enhanced delivery of peptide YY to the blood plasma or central nervous system (CNS) tissue or fluid, for example, by yielding a peak concentration (C_{max}) of the peptide YY in the blood plasma or CNS tissue or fluid of the subject that is 20% or greater compared to a peak concentration of the peptide YY in the blood plasma or CNS tissue or fluid of the subject following administration to the subject of a same concentration or dose of the peptide YY to the subject by subcutaneous injection.

WO 2004/056314 A2

02-0407

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 July 2004 (08.07.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/056314 A3

(51) International Patent Classification[7]: A61K 38/00

(21) International Application Number:
PCT/US2003/040538

(22) International Filing Date:
17 December 2003 (17.12.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

10/322,266	17 December 2002 (17.12.2002)	US
60/493,226	7 August 2003 (07.08.2003)	US
60/501,170	8 September 2003 (08.09.2003)	US
60/510,785	10 October 2003 (10.10.2003)	US
60/517,290	4 November 2003 (04.11.2003)	US
60/518,812	10 November 2003 (10.11.2003)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC. [US/US]; 3450 Monte Villa Parkway, Bothell, WA 98021-8906 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: QUAY, Steven, C. [US/US]; 23632 Hwy 99, Ste. F PMB 454, Edmonds, WA 98026-9224 (US). BRANDT, Gordon [US/US]; 790 Kalmia Ct., Issaquah, WA 98027 (US). KLEPPE, Mary, S. [US/US]; P.O. Box 1535, Kingston, WA 98346 (US). MACEVILLY, Conor, J. [US/US]; 3046 N.W. 60th Street, Seattle, WA 98107 (US).

(74) Agent: LUNN, Paul, G.; Nastech Pharmaceutical Company Inc., 3450 Monte Villa Parkway, Bothell, WA 98021-8906 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:
— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

(88) Date of publication of the international search report:
31 March 2005

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2004/056314 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY

(57) Abstract: *Pharmaceutical compositions and methods are described comprising at least one peptide YY compound and one or more intranasal delivery-enhancing agents for enhanced nasal mucosal delivery of the peptide YY, for treating a variety of diseases and conditions in mammalian subjects, including obesity. In one aspect, the intranasal delivery formulations and methods provide enhanced delivery of peptide YY to the blood plasma or central nervous system (CNS) tissue or fluid, for example, by yielding a peak concentration (C_{max}) of the peptide YY in the blood plasma or CNS tissue or fluid of the subject that is 20% or greater compared to a peak concentration of the peptide YY in the blood plasma or CNS tissue or fluid of the subject following administration to the subject of a same concentration or dose of the peptide YY to the subject by subcutaneous injection.*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/40538

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 38/00
US CL : 514/12; 530/324
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 514/12; 530/324

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
West and STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Morley "An approach to the development of drugs for appetite disorders" Neuropsychobiology, 1989, vol. 21, pp.-22-30	1-177
Y	Morley "Peptide YY (PYY), a potent orexigenic agent" Brain Research, 1985, vol. 341, pp.-200-203	1-177
Y	Lefbowitz " Analysis of neuropeptide Y-induced feeding: dissociation of Y1 and Y2 receptor effects on natural meal patterns" Peptides, 1991, vol. 12, pp.-1251-1260	1-177

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 December 2004 (10.12.2004)	21 JAN 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Roy Teller Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

IN THE INTERNATIONAL BUREAU (WIPO)

IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

International Application Number: PCT/US03/40538
Publication No. WO 2004/056314, published on 08 July 2004
Agent's File Reference: 02-04PCT

International Filing Date: 12 DECEMBER 2003

Applicant: Nastech Pharmaceutical Company Inc.

Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY

REQUEST FOR CORRECTION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION AS PUBLISHED

To the International Bureau of WIPO:

Attention: Nora Lindner, Authorized Officer, WIPO

In response to reviewing, the International Application as published by the International Bureau on 08 July 2004, under No. WO 2004/056314, please make the following change when the application is republished with the search report:

We originally changed Box VI. Priority Claim, on the request item (4) U.S. 60/510,785, per the Request of the RO. We changed the request to match the U.S.PTO records of 08 OCT 2003. However, the U.S.PTO records were in error. We now have a new corrected filing receipt fixing the priority claim filing date to the correct date of 10 OCT 2003. We have attached the front page of the publication showing the requested change in item (30) priority date, and the new corrected filing receipt.

FAXED 7/22/04

REMARKS

Should there be any questions, please contact the undersigned attorney at (425) 908-3682, or by email at plunn@nastech.com.

Respectfully Submitted,

22 July 2004
Date

Paul G. Lunn by LSK as docket,
Paul G. Lunn
Agent

Paul G. Lunn, Patent Counsel
Nastech Pharmaceutical Company Inc.
3450 Monte Villa Parkway
Bothell, WA 98021-8906
(425) 908-3643
USA

Enclosures:

- CORRECTED Filing Receipt for U.S. Application No. 60/510,785, showing the filing date of 10/10/2003.
- front page of the publication showing the requested change in item (30) priority date

FACSIMILE MAIL CERTIFICATION

I hereby certify that this correspondence is being sent by FACSIMILE addressed to: Nora Linder, the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes, 1211 Geneva 20 Switzerland, 41-22-740 14 35. Four total pages are enclosed.

Date of facsimile: 22 July 2004

Typed Name: Leslie M. Kodish

Signature: Leslie M. Kodish

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

PCT

(43) International Publication Date
8 July 2004 (08.07.2004)

(10) International Publication Number
WO 2004/056314 A2

(51) International Patent Classification[7]: A61K

(21) International Application Number:
PCT/US2003/040538

(22) International Filing Date:
17 December 2003 (17.12.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

10/322,266	17 December 2002 (17.12.2002)	US
60/493,226	7 August 2003 (07.08.2003)	US
60/501,170	8 September 2003 (08.09.2003)	US
60/510,785	10 October 2003 (08.10.2003)	US
60/517,290	4 November 2003 (04.11.2003)	US
60/518,812	10 November 2003 (10.11.2003)	US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC. [US/US]; 3450 Monte Villa Parkway, Bothell, WA 98021-8906 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): QUAY, Steven, C. [US/US]; 23632 Hwy 99, Ste. F PMB 454,, Edmonds, WA 98026-9224 (US). BRANDT, Gordon [US/US]; 790 Kalmia Ct., Issaquah, WA 98027 (US). KLEPPE, Mary, S. [US/US]; P.O. Box 1535, Kingston, WA 98346 (US). MACEVILLY, Conor, J. [US/US]; 3046 N.W. 60th Street, Seattle, WA 98107 (US).

(74) Agent: LUNN, Paul, G.; Nastech Pharmaceutical Company Inc., 3450 Monte Villa Parkway, Bothell, WA 98021-8906 (US).

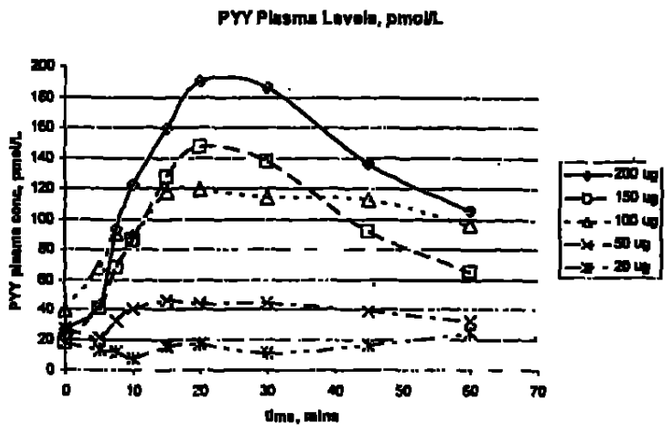
(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

[Continued on next page]

10 October 2003 (10.10.2003)

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY



(57) Abstract: Pharmaceutical compositions and methods are described comprising at least one peptide YY compound and one or more intranasal delivery-enhancing agents for enhanced nasal mucosal delivery of the peptide YY, for treating a variety of diseases and conditions in mammalian subjects, including obesity. In one aspect, the intranasal delivery formulations and methods provide enhanced delivery of peptide YY to the blood plasma or central nervous system (CNS) tissue or fluid, for example, by yielding a peak concentration (C_{max}) of the peptide YY in the blood plasma or CNS tissue or fluid of the subject that is 20% or greater compared to a peak concentration of the peptide YY in the blood plasma or CNS tissue or fluid of the subject following administration to the subject of a same concentration or dose of the peptide YY to the subject by subcutaneous injection.

WO 2004/056314 A2

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPL NO.	FILING OR 371 (c) DATE	ART UNIT	FIL FEE REC'D	ATTY.DOCKET NO	DRAWINGS	TOT CLMS	IND CLMS
60/510,785	10/10/2003		80	03-09P3	1		

CONFIRMATION NO. 3949.

36814
PAUL G. LUNN, ESQ. NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC.
3450 MONTE VILLA PARKWAY
BOTHELL, WA 98021-8906

CORRECTED FILING RECEIPT ←

OC000000013103330

Date Mailed: 06/29/2004

Receipt is acknowledged of this provisional Patent Application. It will not be examined for patentability and will become abandoned not later than twelve months after its filing date. Be sure to provide the U.S. APPLICATION NUMBER, FILING DATE, NAME OF APPLICANT, and TITLE OF INVENTION when inquiring about this application. Fees transmitted by check or draft are subject to collection. Please verify the accuracy of the data presented on this receipt. If an error is noted on this Filing Receipt, please write to the Office of Initial Patent Examination's Filing Receipt Corrections, facsimile number 703-746-9195. Please provide a copy of this Filing Receipt with the changes noted thereon. If you received a "Notice to File Missing Parts" for this application, please submit any corrections to this Filing Receipt with your reply to the Notice. When the USPTO processes the reply to the Notice, the USPTO will generate another Filing Receipt incorporating the requested corrections (if appropriate).

Applicant(s)

Steven C. Quay, Edmonds, WA;
Gordon Brandt, Issaquah, WA;
Mary S. Kleppe, Kingston, WA;
Conor J. MacEvilly, Seattle, WA;

RECEIVED
JUL 0 8 2004

If Required, Foreign Filing License Granted: 01/07/2004

Projected Publication Date: None, application is not eligible for pre-grant publication

Non-Publication Request: No

Early Publication Request: No

** SMALL ENTITY **

Title

Protein-free formulation of peptide YY suitable for intranasal administration

LICENSE FOR FOREIGN FILING UNDER
Title 35, United States Code, Section 184

RECEIVED
JAN 27 2005

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
PAUL G. LUNN
NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.
3450 MONTE VILLA PARKWAY
BOTHELL, WA 98021-8906

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

	Date of Mailing (*day/month/year*) 21 JAN 2005
Applicant's or agent's file reference 02-04PCT	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US03/40538	International filing date (*day/month/year*) 17 December 2003 (17.12.2003)
Applicant NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

   Filing of amendments and statement under Article 19:
   The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

   When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

   Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

   For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

   ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

   ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

   Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 *bis*.1 and 90 *bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

   Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

   In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

   See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Roy Teller Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/220 (April 2002)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 02-04PCT	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US03/40538	International filing date (*day/month/year*) 17 December 2003 (17.12.2003)	(Earliest) Priority Date (*day/month/year*) 17 December 2002 (17.12.2002)
Applicant NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the Report**
   a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
   ☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
   b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:
   ☒ contained in the international application in written form.
   ☒ filed together with the international application in computer readable form.
   ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
   ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
   ☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
   ☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.
2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).
3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).
4. With regard to the title,
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:
5. With regard to the abstract,
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.
6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. ____
   ☐ as suggested by the applicant.
   ☐ because the applicant failed to suggest a figure.
   ☐ because this figure better characterizes the invention.
   ☒ None of the figures

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/40538

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 38/00
US CL : 514/12; 530/324
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 514/12; 530/324

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
West and STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Morley "An approach to the development of drugs for appetite disorders" Neuropsychobiology, 1989, vol. 21, pp.-22-30	1-177
Y	Morley "Peptide YY (PYY), a potent orexigenic agent" Brain Research, 1985, vol. 341, pp.-200-203	1-177
Y	Leibowitz " Analysis of neuropeptide Y-induced feeding: dissociation of Y1 and Y2 receptor effects on natural meal patterns" Peptides, 1991, vol. 12, pp.-1251-1260	1-177

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 December 2004 (10.12.2004)	21 JAN 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Roy Teller Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article," "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended ?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When ? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments ?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

- Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How ? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments ?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

WT/US03/40598
269
PT
260

Neuropsychobiology 1989 21 22–30

© 1989 S. Karger AG, Basel
0302-282X/89/0211-0022$2.75/0

An Approach to the Development of Drugs for Appetite Disorders

John E Morley

Geriatric Research, Education and Clinical Center, Sepulveda VA Medical Center Sepulveda, Calif., USA, Department of Medicine University of California, Los Angeles, Calif USA

Key Words Neuropeptide Corticotropin releasing factor Cholecystokinin Serotonin Anorexia nervosa

Abstract This review covers some modern concepts in the development of drugs to treat appetite disorders Specific attention is paid to the peripheral satiety system and the role of gastrointestinal peptides such as cholecystokinin in the pathogenesis of satiety Alterations in neuropeptide Y and/or peptide YY are suggested to play a role in the pathophysiology of bulimia. Corticotropin-releasing factor is a putative candidate peptide involved in anorexia nervosa. The serotonin reuptake inhibitors fenfluramine and fluoxetene decrease weight in obese subjects Endogenous opioids modulate the choice of palatable foods Anorexia in the old appears to be related to a decrease in opioid feeding drive and an excess of the satiety action of cholecystokinin Other agents involved in weight regulation include those which alter gastric emptying, increase thermogenesis, or modulate fat cell metabolism. It should be stressed that many neurotransmitters that modulate appetite also alter other behaviors, increasing their propensity to produce side effects

The pharmacological treatment of eating disorders remains problematic. Only serotonergic agents, such as fenfluramine and fluoxetene, have proved to have efficacy in the therapy of obesity These agents have not found widespread acceptance and appear to be no more successful than behavior therapy Similarly tricyclic antidepressants improve mood and the rate of weight gain in hospitalized patients with anorexia nervosa Cyproheptadine has also produced variable weight gain in some patients with anorexia nervosa. Tricyclic antidepressants, monoamine oxidase inhibitors, and heterocyclic antidepressants have all had some success in the treatment of bulimic behavior However, in contrast to the highly successful pharmacological therapies that have been developed for depression and schizophrenia the attempts at psychopharmacological manipulation of eating disorders have been disappointing In view of the fact that excellent agonists and antagonists of the classical monoamines are available for clinical usage this relative failure to develop a rational therapy for the eating disorders suggests that the solution to the development of drugs for the treatment of the eating disorders needs to investigate the manipulation of other neurotransmitter systems, such as the neuropeptides.

This review will draw on the newer information from animal studies suggesting a major role for neuropeptides in the control of ingestive behaviors These findings will be integrated with the available information on measurments of neuropeptides in the cerebrospinal fluid (CSF) on patients with eating disorders In attempting to develop drug therapies for eating disorders, the central role of feeding in maintaining the life of the organism needs to be remembered This has led us to suggest that evolution has resulted in the development of a number of failsafe mechanisms to ensure that there are numerous actors waiting in the wings' to ensure that the eating drive is maintained [1] This suggests that adequate treatme of hyperphagic disorders may require combination chemotherapy, with perhaps one drug directed against a monoamine and another against a neuropeptide. The other factor to be taken into account in drug development is that the centrally acting neurotransmitters are

responsible for the regulation of multiple behaviors and obtain their specificity from their anatomical site of action For example, neuropeptide Y produces hyperphagia when injected into the hypothalamus [2] while it enhances memory through a direct action in the hippocampus [3 and unpublished observations]

An Approach to the Pharmacological Manipulation of Obesity

Obesity develops when there is an imbalance between energy intake and energy output Figure 1 suggests a number of potential approaches to the pharmacological management of obesity While increasing taste threshold certainly alters the hedonic qualities of food many patients with hypogeusia manage to maintain a perfectly normal body weight Substances that delay gastric emptying often result in a mild decrease in food intake For example, xylitol both slows gastric emptying and when given as a preload decreases subsequent food intake [4] Chlorocitric acid reduces gastric emptying and leads to a reduction in body weight in rats through a selective reduction in body lipids [5] A preliminary human study has suggested chlorocitric acid will reduce food intake for up to 7 days [6] The exact mechanism of action of chlorocitric acid is not known

An ideal antiobesity agent would be one which allowed the subject to eat as much as he wished but prevented absorption of the food or provided food that tasted good but had minimal caloric value Agents such as saccharine and aspartame represent an approach to replacing sweet tastes with noncaloric sweetener While these agents have found wide acceptability among the general population and have been used as an adjunct in some dietary programs, the evidence that they produce long-term reduction in weight is not available More recently, a noncaloric fat substitute, polyisoxane is undergoing development Its effects on weight gain await long-term testing The development of a number of alpha-glucosidase inhibitors to interfere with carbohydrate absorption has received widespread clinical testing both as weight reduction agents and as adjuncts in reducing the glycemic response to meals Overall, the small benefits obtained by these agents have been offset by the socially unacceptable level of intestinal gas formation [7] Tetrahydrolipistatin, an agent that decreases fat absorption by inhibiting pancreatic lipase, is under active investigation for its cholesterol lowering properties and for its utility as a weight reducing agent [8] Dietary

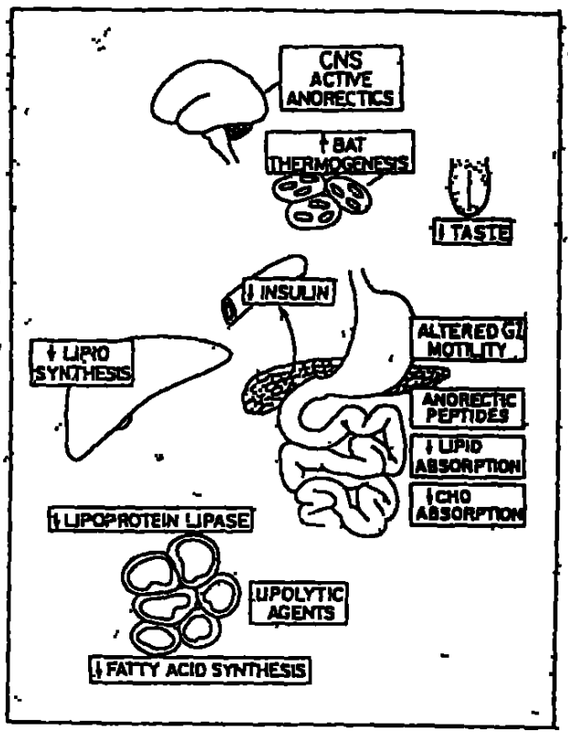


Fig 1 Potential approaches to the development of drugs for the treatment of obesity

fiber plant polysaccharides and lignin that are resistant to hydrolysis by human digestive enzymes have been demonstrated to exert an effect on short-term regulation of food consumption and may prove a useful adjunct in long term dietary therapy of obesity [9] Diethylaminoethyl-dextran, a polycationic derivative of dextran which binds bile acids and produces malabsorption of fats, has also been tried in the treatment of obesity [10]

Agents that reduce energy storage are now also becoming available Cachectin/tumor necrosis factor causes weight loss and reduces the activity of lipogenic enzymes [11] Cachectin also reduces food intake by a direct action on the central nervous system [12] Genetically obese rodents show enhanced fatty acid synthesis, which leads to lipid accumulation in adipose tissue when the rats are fed a high carbohydrate diet [5] Ro 22-0654 suppresses the biosynthesis and oxidation of fatty acids and has been demonstrated to lead to reduced body weight and a selective decrease in body fat levels in obese Zucker rats [5] Besides decreasing fatty acid oxidation, Ro 22-0654 also decreased hepatic lipogenesis [13]

A number of agents are available that enhance energy expenditure The classical agents in this group are thyroid hormones and catecholamines, both of which have excessive cardiovascular morbidity and mortality when used in the management of obesity A number of quasi-selective beta adrenoreceptor agonists (BRL 26830A, Ro 16-8714 and LY 104119) have been developed All these drugs reduce body weight gain and body fat in genetically obese rodents [5] These agents have been shown in preliminary trials to be thermogenic and reduce body weight in some obese humans However, questions remain concerning their true selectivity and at present, insufficient data is available to exclude long-term cardiotoxicity of these agents

In rodents stimulation of brown adipose tissue leads to increased thermogenesis Bullington et al [14] have shown that glucagon directly stimulates brown fat and leads to weight loss Of interest is the fact that, while acute administration of glucagon decreased food intake (see below) long term administration slightly increases food intake while nevertheless leading to weight loss Peptide YY has been shown to produce weight loss when peripherally administered without altering food intake [13] The mechanism of this weight loss has not been explored but it could be hypothesized that it acts synergistically with catecholamines.

It has been hypothesized that decreasing pancreatic insulin secretion will cause weight loss by decreasing lipid synthesis and decreasing food intake Hoffmann-La Roche has developed an inhibitor of thromboxane synthase activity which decreases insulin release and causes weight loss without producing diabetes mellitus in obese rodents [16]. Other agents which could be potentially useful in the management of obesity are anorectic agents These will be discussed in the following sections on the peripheral satiety system and the central neurotransmitters involved in the regulation of appetite

The Peripheral Satiety System

A number of gastrointestinal hormones released during the passage of food through the gut have been shown to decrease food intake Physiological studies have suggested that these agents may act synergistically to produce the satiety response to a single meal Of these agents the best studied is cholecystokinin (CCK) The ability of CCK to decrease food intake was first demonstrated in the early seventies by Gibbs et al [18] in rats Subsequently, it has been demonstrated to decrease feeding in numerous species [see ref 19 for a review] In humans, CCK decreases meal size by 10–20% at doses that do not produce nausea [see ref 20 for a review]

Much controversy has existed concerning whether CCK truly produces satiety or whether the decrease in food intake it produces is an aversive phenomenon Billington et al [21], using the differential satiety method, clearly showed that CCK was not aversive in rats. In addition CCK-octapeptide has been shown to enhance memory at doses that inhibit food intake further suggesting that its effect is not aversive [22] There is now increasing evidence that at least under some circumstances, CCK is a physiological satiety agent. It has been shown that circulating levels of CCK after a meal are equivalent to the concentrations that inhibit food intake [23] A highly selective and potent antagonist of CCK has been shown to enhance feeding in both rats [24] and mice [25]

While CCK slows gastric emptying, this does not appear to be its major mechanism of action CCK sends satiety messages to the brain by activating the ascending vagal fibers [26 27] In addition higher doses of CCK appear to produce their effect independently of the vagus. Tolerance to the appetite-suppressive effects of CCK occurs with prolonged administration [15] West et al [28] have elegantly demonstrated that with prolonged administration CCK continues to suppress meal size but that the animals eat more meals to maintain their food intake – that is behavioral rather than pharmacological tolerance develops to CCK. This tolerance makes the development of CCK analogs as long-term anorectic agents somewhat problematic.

Mitchell et al [29] found that bulimic patients were resistant to the anorectic effects of CCK during a binge. Geraciotti and Liddle [30] reported that patients with bulimia nervosa do not have normal satiety in response to a meal and that in these subjects the CCK response to a meal is significantly impaired. Preliminary data suggested that treatment of bulimic patients with tricyclic antidepressants resulted in an increase in the postprandial CCK response and an increase in the satiety response Whether the altered CCK release represents the chicken (a pathophysiological role in bulimia) or the egg (secondary to chronic stomach overdistension) remains to be investigated.

A number of other gastrointestinal hormones also decrease feeding after pharmacological administration. Some of these are clearly vagally dependent such as glu

cagon and somatostatin, while others are vagally independent, e g., bombesin [27] Preliminary studies in our laboratory suggest that bombesin and its mammalian analog, gastrin-releasing peptide, produce their effect, in part, through the release of CCK and in part, by other mechanisms Glucagon, CCK and somatostatin act in an additive manner to decrease the size of a single meal A combination of gastrointestinal hormone analogs may provide a useful approach to short-term appetite reduction

Central Appetite Stimulants

The centrally active appetite stimulants are listed in table 1 Of particular importance is the fact that these agents appear to exert differential effects on macronutrient ingestion Norepinephrine represents the prototypic central appetite stimulant. Norepinephrine produces its appetite stimulant effect within the paraventricular nucleus (PVN) through alpha 2-noradrenergic receptors [31] This monoamine acts to increase meal size rather than meal frequency and causes preferential ingestion of carbohydrate rich foods with some generalization to fats [32] Tricyclic antidepressants appear to stimulate food intake by activating the noradrenergic system in the PVN [33] Norepinephrine appears to regulate feeding by inhibiting the release of an inhibitor within the PVN

At present there is little evidence for a role of norepinephrine in eating disorders Kaye et al [34] reported that CSF levels of norepinephrine were similar in underweight patients with anorexia nervosa and normal controls Long term recovered anorexic patients did, however have low CSF norepinephrine levels Whether or not this finding suggests a genetically programmed abnormality in norepinephrine regulation in patients with anorexia nervosa remains to be determined

Over the last decade, endogenous opioids have been demonstrated to play an important role in the regulation of ingestive behaviors [35] Endogenous opioids predominantly regulate the intake of foods with a high fat content [36] The endogenous opioid that is predominantly involved in increasing feeding is the kappa receptor agonist dynorphin [37] The dynorphin kappa opioidergic feeding system produces its effect with n the PVN [38] In addition mu opioids increase feeding in the amygdala [39]

Studies in humans have shown that naloxone and other opioid antagonists decreate feeding over a single meal [see ref 19 for a review]. However, attempts to treat obesity with long-acting opioid antagonists have failed [40] Unlike CCK, naloyone does decrease the size of the binge in bulimic patients [29]. However, despite an open study which suggested that naltrexone may be useful in therapy of bulimia [41], we had a relatively poor response to long-term naltrexone used at a lower dose in a double-blind study [42] Whether the development of selective kappa antagonists will result in more useful anorectic agents remains to be determined. In rats, the selective kappa opioid antagonist nor binaltorphine has been shown to decrease feeding when administered to food-deprived animals [43]

The role of endogenous opioids in anorexia nervosa is controversial. An early study suggested that opioid antagonism enhanced weight gain in patients with anorexia nervosa possibly by inhibiting the effect of peripheral beta endorphin on lipolysis [44] Studies of CSF levels of pro-opiomelanocortin related peptides in the CSF of patients with anorexia nervosa have found that levels of beta-endorphin are either reduced [45] or unchanged [46] The study finding reduced activity studied lower weight anorectics than the study in which the beta-endorphin values were unchanged In contrast, total CSF opioid activity in anorectic patients was found to be elevated when it was measured by a radioreceptor assay [47] Whether this was due to increased dynorphin levels remains to be determined. Peripherally circulating beta-endorphin levels are elevated in patients with anorexia nervosa [48] Overall these studies would suggest that there is the expected increase in kappa opioids to starvation in patients with anorexia nervosa This would suggest that central opioid feeding systems do not play a major role in the pathophysiology of anorexia nervosa Whether the elevated peripheral beta-endorphin causes an increase in lipolysis, thus aggravating the weight loss present in anorectics, remains to be determined

Table 1 The effect of centrally acting neurotransmitters on macronutrient selection

Effect on feeding	Mainly CHO	CHO > fat	CHO = fat	Mainly fat
Increase	neuropeptide Y	norepinephrine	galanin	dynorphin
Decrease			serotonin ? CRF	

CHO = Carbohydrate

Neuropeptide Y and peptide YY are potent orexigenic agents [49–52] Neuropeptide Y specifically increases carbohydrate ingestion [49 50] The effects of these agents are independent of the norepinephrine effects on food intake Tolerance does not appear to develop to the effects of neuropeptide Y [53] or peptide YY [52] and both agents produce weight gain Peptide YY also produces massive distension of the stomach The massive hyperphagia associated with specific glucose intake of these neuropeptides has led to the suggestion that they may be involved in the pathophysiology of bulimia A number of other neurotransmitters increase feeding. Galanin produces its orexigenic effects on both carbohydrate and fat intake [54] Gamma amino-butyric acid enhances food intake when injected into the ventromedial hypothalamus and decreases food intake when injected into the lateral hypothalamus [55]

Agents that enhance feeding after central administration produce weight loss when administered peripherally For example norepinephrine [56] peptide YY [52] and opiates [35] all produce weight loss when administered chronically peripherally Teleologically it makes sense that agents which produce energy mobilization should cause an increase in food-seeking behavior Obviously if this should be a general rule the development of pharmacological agents to manipulate weight will be fraught with difficulty

Serotonin: A Model Anorectic Neurotransmitter

Serotonin represents a model anorectic neurotransmitter Not only does it decrease food intake by a direct action within the PVN [31] but it also increases thermogenesis and/or locomotion [57] The anorectic effect of serotonin is mediated by serotonin 1_B receptors Serotonin 1_A receptors induce hyperphagia, possibly by acting on a presynaptic receptor to reduce synaptic serotonin [58 59] While serotonin has classically been suggested to decrease predominantly carbohydrate intake, this clearly represents more salesmanship than reality with the evidence clearly suggesting an effect both on carbohydrate and fat intake [60]

Evidence for a physiological role of serotonin in humans comes from a 7-year-old girl with argininosuccinic aciduria and severe anorexia [61] Reduction of *L*-tryptophan in her diet resulted in the reversal of her anorexia 5-Hydroxyindole acetic acid levels in her CSF were directly related to tryptophan and inversely to caloric intake

The serotonin reuptake inhibitors fenfluramine and fluoxetene have been demonstrated to decrease weight in obese subjects [62 63] In underweight patients with anorexia nervosa, CSF levels of the serotonin metabolite 5 hydroxyindoleacetic acid have been shown to be decreased [64] This suggests that serotonin is not involved in the pathophysiology of the anorexia of anorexia nervosa. Cyproheptadine, a serotonin antagonist, has been used with borderline success at increasing appetite in patients with anorexia nervosa [65] A double-blind, placebo-controlled trial has shown that fenfluramine decreases bulimic binges [65] and an open trial has suggested the effectiveness of fluoxetene in bulimia [66] The evidence that serotonin is involved in appetite regulation is overwhelming. Whether it produces its effects on appetite directly or through activation of corticotropin-releasing factor remains to be determined

Corticotropin-Releasing Factor and Anorexia nervosa

Corticotropin-releasing factor (CRF) has been demonstrated to be a potent inhibitor of feeding when administered intracerebroventricularly in both rats [67] and mice [68] CRF also produces an increase in grooming [67] The behavioral effects of CRF have been localized to the PVN, utilizing local microinjection techniques [69]. Both the CRF antagonist alpha helical CRF (9–41) [70, 71] and anti CRF gamma globulin [71] have been demonstrated to reverse the anorexia produced by restraint stress These findings suggest a physiological role for CRF in the anorexia produced by severe stressors The effect of CRF on feeding is partially reduced by adrenal demedullation suggesting a role for the peripheral release of epinephrine or other adrenomedullary hormones in producing the CRF-induced anorexia [72].

The neurotransmitters regulating CRF release have now been studied in some detail Serotonin has been demonstrated to release CRF both in vitro and in vivo [73 74] Low glucose levels have been demonstrated to increase CRF release from hypothalamic cultures in vitro [75] This CRF release in response to hypoglycemia is inhibited by the serotonin antagonist cyproheptadine [75] Although more controversial, other studies have suggested that norepinephrine inhibits CRF release from the hypothalamus [76] and norepinephrine induced feeding is inhibited by concomitant release of CRF [77] This suggests that norepinephrine-induced feeding may be mediated by inhibition of CRF release Somatostatin is released by CRF [78] in turn it inhibits both CRF

induced anorexia [71] and restraint induced anorexia [71] This provides evidence for a short-loop feedback system in appetite regulation A potential long loop feedback system is related to the fact that CRF releases corticosterone which, in turn facilitates norepinephrine-induced eating [79] Some of these relationships are summarized in figure 2

Arase et al [80] demonstrated that a continuous infusion of CRF produced weight loss While the weight loss was in part due to decreased food intake, it was also due to increased thermogenesis CRF increased sympathetic activity and activation of brown adipose tissue Overall these studies support a role for CRF in the pathogenesis of stress-induced anorexias

Two studies have demonstrated elevated levels of CRF in the CSF of patients with anorexia nervosa [81 82] The CSF CRF levels tended to return to normal levels during short term weight restoration [82] These increased CSF CRF levels are compatible with the activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis seen in patients with anorexia nervosa [83] CRF also decreases luteinizing hormone levels [84] and slows gastric emptying [85] Both of these phenomena are also seen in patients with anorexia nervosa The development of intermittent bingeing episodes in patients with bulimia nervosa could be related to the homeostatic mechanisms shown in figure 2 leading to increases in norepinephrine and/or neuropeptide Y The available animal and human studies strongly suggest that CRF plays a role in the pathogenesis of anorexia nervosa The development of clinically useful CRF antagonists could prove important in the pharmacological management of this disorder

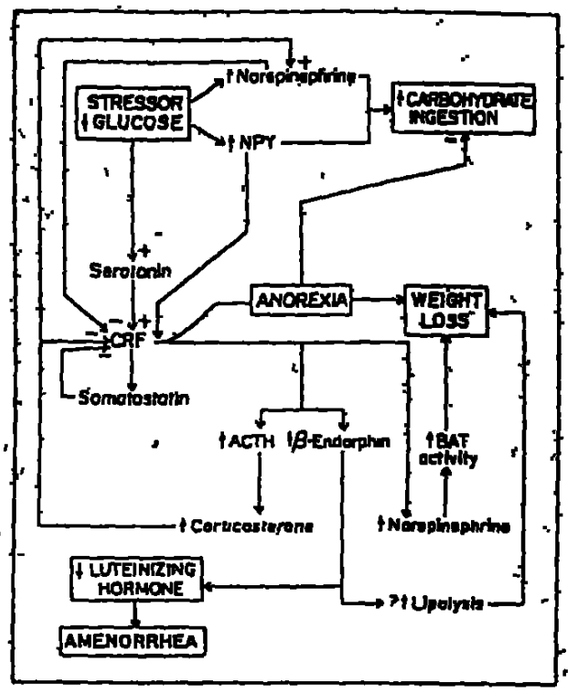


Fig. 2. Role of CRF in the pathophysiology of anorexia nervosa NPY = Neuropeptide Y ACTH = adrenocorticotropin; BAT = brown adipose tissue

Eating Disorders Associated with Aging

There is increasing evidence that eating disorders are extremely prevalent in the older population [see ref 86 for a review] Malnutrition occurs commonly in older individuals in approximately one third of cases, the anorexia producing the weight loss is categorized as idiopathic [87] A number of cases of true anorexia nervosa (or perhaps, preferably, tardive anorexia) have been reported in older individuals [88]

Some of the anorexia associated with aging is due to the decreased ability of older individuals to enjoy the hedonic qualities of food secondary to altered taste and smell However animal studies have shown that there is a true anorexia associated with aging Older animals appear to lose their opioid feeding drive [89, 90] In addition Silver et al [91] have shown that CCK has an enhanced satiety effect in older animals and circulating CCK levels are elevated in older subjects [92] This suggests a potential role for CCK antagonists in the treatment of some older anorexic subjects with complaints of early satiety

Conclusion

The development of drugs to treat eating disorders is fraught with difficulty Not only is the control of ingestive behavior multifactorial, but many of the neurotransmitters also modulate other behaviors, increasing the potential for side effects Nevertheless, there are a number of available drugs and some exciting theoretical possibilities which should prove to be excellent psychopharmacological therapies for eating disorders. Table 2 lists some of the drugs that appear to have the most potential in the management of obesity, bulimia and anorexia nervosa

Table 2. The future of the psychopharmacology of eating disorders

Obesity		Bulimia		Anorexia nervosa	
drug	mechanism of action	drug	mechanism of action	drug	mechanism of action
Available					
Tetrahydrolipistatin	decrease intestinal absorption	fluoxetine	central anorectic and antidepressant	cyproheptadine	serotonin antagonist
ABRL 26830A	increased energy utilization				
Fluoxetine	central anorectic				
Fenfluramine	central anorectic				
Theoretical					
Peptide YY agonist	increased energy utilization	neuropeptide Y antagonist	central anorectic	CRF antagonist	central orexigenic
Peripheral opioid agonists	increased energy utilization	kappa opioid antagonist	central anorectic		
Kappa opioid antagonist	central anorectic				
Gastrointestinal peptide agonists (used in rotation)	peripheral anorectic				

References

1 Morley JE. The neuroendocrine control of appetite: The role of the endogenous opiates cholecystokinin, TRH gamma-amino butyric acid and the diazepam receptor. Life Sci 1980;27:355–368

2 Morley JE, Levine AS, Gosnell BA, et al: Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. Am J Physiol 1987;252:R599–R609

3 Flood JF, Hernandez EN, Morley JE. Modulation of memory processing by neuropeptide Y. Brain Res 1987;421:280–290

4 Shafer RB, Levine AS, Marlette JM, et al: Effects of xylitol on gastric emptying and food intake. Am J Clin Nutr 1987;45:744–747

5 Sullivan AC, Hogan S, Triscari J: New developments in pharmacological treatments for obesity. Ann NY Acad Sci 1987;499:269–276

6 Heshka S, Nauss-Karol C, Nyman A, et al: Effects of chloroquinate on body weight in obese men on a metabolic ward. Nutr Behav 1985;2:233–239

7 Schmidt DD, Frommer W, Junge WB: Alpha-glucondase inhibitors: New complex oligosaccharides of microbial origin. Naturwissenschaften 1977;64:535–542

8 Hogan S, Fleury A, Hadvary P, et al: Studies on the antiobesity activity of tetrahydrolipistatin, a potent and selective inhibitor of pancreatic lipase. Int J Obesity 1987;11(suppl 3):35–42

9 Blundell JE, Burley VJ: Satiation, satiety and the action of fibre on food intake. Int J Obesity 1987;11(suppl 1):9–25

10 Carella M: Use of DEAE-D in the treatment of obesity. In: Obesity 1987;11(suppl 3):225–227

11 Beutler B, Cerami A: Cachectin: More than a tumor necrosis factor. N Engl J Med 1987;316:379–385

12 Plata-Salaman CR, Oomura Y, Kai Y: Tumor necrosis factor and interleukin-1β: Suppression of food intake by direct action in the central nervous system. Brain Res 1988;448:106–114

13 Yamamoto M, Fukuda N, Ritcari J, et al: Decreased hepatic production of very low density lipoproteins following activation of fatty acid oxidation by Ro 22-0654. J Lipid Res 1985;26:1196–1204

14 Billington CJ, Bartness TJ, Briggs J, et al: Glucagon stimulation of brown adipose tissue growth and thermogenesis. Am J Physiol 1987;252:R160–R165

15 Morley JE, Flood JF: An investigation of tolerance to the actions of leptogenic and anorexigenic drugs in mice. Life Sci 1987;41:2157–2165

16 Triscari J, Sullivan AC: A pharmacotherapeutic approach to the regulation of hyperinsulinemia and obesity. Int J Obesity 1987;11(suppl 3):43–51

17 Sjodin L: Effects of secretin, cholecystokinin and caerulein on gastric secretion in response to sham feeding in dogs. Acta Physiol Scand 1972;85:110–117

18 Gibbs J, Young RC, Smith GP: Cholecystokinin decreases food intake in rats. J Comp Physiol Psychol 1973;84:488–495

19 Morley JE, Levine AS, Bartness TJ, et al: Species differences in the response to cholecystokinin. Ann NY Acad Sci 1985;448:413–416

20 Morley JE, Neuropeptide regulation of appetite and weight Endocr Rev 1987 8 256–287
21 Billington CJ Levine AS Morley JE Are peptides truly satiety agents? A method of testing for neurohumoral satiety effects. Am J Physiol 1983 245 R920–R929
22 Flood JF Smith GE Morley JE. Modulation of memory processing by cholecystokinin Dependence on the vagus nerve. Science 1987 236 832–834
23 Smith GP, Greenberg D Falusco JD et al Plasma levels of cholecystokinin produced by satiating doses of exogenous CCK-8 Proc Soc Neurosci Abstr 1985 11 557
24 Hewson G Leighton GE Hill RG et al. The cholecystokinin receptor antagonist L364 718 increases food intake in the rat by attenuation of the action of endogenous cholecystokinin Br J Pharmacol 1988 9, 79–84
25 Silver AJ Flood JF Song AM et al Evidence for a physiological role for cholecystokinin in the regulation of food intake in mice. Am J Physiol 1989 in press
26 Smith GP Jerome C Gibbs J Abdominal vagotomy does not block the satiety effect of bombesin in the rat. Peptides 1981 2 409–411
Morley JE Levine AS Kneip J et al The effect of vagotomy on the satiety effects of neuropeptides and naloxone Life Sci 1982 30 1943–1947,
28 West DB Fey D Woods SC Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free feeding rats. Am J Physiol 1984 246 R776–R787
29 Mitchell JE. Laine DE Morley JE et al Naloxone but not CCK-8 attenuates binge-eating in patients with the bulimia syndrome Biol Psychiatry 1988 23 1399–1406
0 Geracioti TD Liddle RA Impaired cholecystokinin secretion in bulimia nervosa N Engl J Med 1988 319 683–688
1 Leibowitz SF Neurochemical systems of the hypothalamus Control of feeding and drinking behavior and water electrolyte excretion in Morgane PJ Panksepp J (eds): Handbook of the Hypothalamus. New York. Raven Press 1980 vol 3 pp 299–437
32 Leibowitz SF Brown O Trettor JR et al Norepinephrine clonidine and tricyclic antidepressants selectively stimulate carbohydrate ingestion through noradrenergic system of the paraventricular nucleus. Pharmacol Biochem Behav 1985 23 541–550
3 Morley JE, Blundell JE. The neurobiological basis of eating disorders Some formulations. Biol Psychiatry 1988 23 53–78
34 Kaye WH Ebert MH Raleigh M et al Abnormalities in CNS monoamine metabolism in anorexia nervosa. Arch Gen Psychiatry 1984 41 350–355
35 Morley JE Levine AS Yim GK, et al Opioid modulation of appetite Neurosci Biobehav Rev 1983 7 281–305
36 Rosmos DR Gosnell BA Morley JE et al Effects of kappa opiate agonists cholecystokinin and bombesin on intake of diets varying in carbohydrate to fat ratio in rats. J Nutr 1987 117 976–985
37 Morley JE, Levine AS Dynorphin-(1 13) induces spontaneous feeding in rats. Life Sci 1981 29 1901–1905
38 Gosnell BA, Morley JE Levine AS Opioid induced feeding. Localization of sensitive brain sites Brain Res 1986 369 177–184
39 Gosnell BA Involvement of μ opioid receptors in the amygdala in the control of feeding Neuropharmacology 1988 27 319–326
40 Mitchell JE Morley JE Levine AS, et al High-dose naltrexone therapy and dietary counselling for obesity Biol Psychiat 1987, 22 35–42
41 Jonas JM, Gold MS Naltrexone reverses bulimic symptoms. Lancet 1988 1 807
42 Mitchell J Jennings J Christenson G, et al: A placebo-controlled double-blind crossover study of naltrexone hydrochloride in outpatients with normal weight bulimia. J Clin Psychopharmacol 1989 9 94–97
43 Levine AS Grace M Welch W et al The kappa opioid antagonist, nor-binaltorphine decreases starvation and opioid-induced feeding. Proc Soc Neurosci 1988 14 761A
44 Moore R Mills IH Forster A. Naloxone in the treatment of anorexia nervosa. Effect on weight gain and lipolysis. J R Soc Med 1981 74 129–131
45 Kaye WH Berrettini WH Gwirtsman HE, et al: Reduced cerebrospinal fluid levels of immunoreactive pro-opiomelanocortin-related peptides (including beta-endorphin) in anorexia nervosa. Life Sci 1987 41 2147–2155
46 Gerner RH Sharp B CSF beta-endorphin-immunoreactivity in normal schizophrenic depressed manic and anorexic subjects. Brain Res 1982 237 244–247
47 Kaye WH Pickar D Naber D et al Cerebrospinal fluid opioid activity in anorexia nervosa. Am J Psychiatry 1982 139 643–645
48 Panerai AE. Cavagnini F Invitti C et al. Plasma beta-endorphin and beta-lipotropin in anorexia nervosa in Ferrari E, Brambilla F (eds): Disorders of Eating Behavior A Psychoneuroendocrine Approach Oxford Pergamon Press 1986 pp 219–228
49 Clark JJ Kalra PS Crawley WR. et al Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. Endocrinology 1984 115 427–429
50 Stanley BG Leibowitz SF Neuropeptide Y Stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. Life Sci 1984 33 2635–2642
51 Levine AS Morley JE Neuropeptide Y A potent inducer of consummatory behavior in rats. Peptides 1984,5 1025–1030.
52 Morley JE Levine AS Grace M et al Peptide YY (PYY): A potent orexigenic agent. Brain Res 1985 341 200–203
53 Stanley BG Kyrkouli SE, Lampert S et al. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: A powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity Peptides 1986;7 1189–1192.
54 Kyrkouli SE Stanley BG Leibowitz SF Galanin. Stimulation of feeding induced by medial hypothalamic injection of this novel peptide Eur J Pharmacol 1986 122 159–160.
55 Morley JE, Levine AS Kneip J Muscimol-induced feeding: A model to study the hypothalamic regulation of appetite. Life Sci 1981 29 1213–1218
56 Bartness TJ Billington CJ Levine AS et al. Insulin and metabolic efficiency in rats II Effects of NE and cold exposure. Am J Physiol 1986 251 R1118–R1125
57 Cossons D Qualitative similarities of serotonin-depleting mid brain lesions to vagotomy in altering weight gain in different models of obesity in Cioffi LA James WPT von Italie TB (eds) The Body Weight Regulatory System Normal and Disturbed Mechanisms New York Raven Press 1981 pp 19–23
58 Dourish CT Huston PH Kenneth GA et al 8-OH DPAT induced hyperphagia Its neural basis and possible therapeutic relevance Appetite 1986 7(suppl) 127–138

59 Bendotti C Samanin R 8 Hydroxy 8-(Di n-propylamine) tetralin (8-OH DPAT) elicits eating in free feeding rats by acting on central serotonin neurons. Eur J Pharmacol 1986,121 147–154

60 Orthen-Gambill N Kanarek RB Differential effects of amphetamine and fenfluramine on dietary self-selection in rats. Pharmacol Biochem Behav 1982,16 303–309

61 Hyman SL, Coyle JT Parke JC et al. Anorexia and altered serotonin metabolism in a patient with argininosuccinic aciduria. J Pediatr 1986 108 705–709

62 Stewart IC, Donald P Munro JF Neuropharmacological treatment of obesity in Ferran E, Brambilla F (eds) Disorders of Eating Behavior A Psychoneuroendocrine Approach. Oxford Pergamon Press 1986 pp 295–303

63 Ferguson JM Feighner JP Fluoxetene-induced weight loss in overweight non-depressed humans. Int J Obes 1987 11(suppl 3): 163–170

64 Kaye WH Gwirtsman HE, George DT et al: CSF 5-HIAA concentrations in anorexia nervosa. Reduced values in underweight subjects normalize after weight gain. Biol Psychiatry 1988 23 102–105

65 Robinson PH Checkley SA Russel GFM Suppression of eating by fenfluramine in patients with bulimia nervosa. Br J Psychiatry 1985 146.169–176

66 Freeman CPL Hampson M Fluoxetene as a treatment for bulimia nervosa. Int J Obes 1987 11(suppl 3) 163–170

67 Morley JE, Levine AS Corticotropin releasing factor grooming and ingestive behavior Life Sci 1982 31 1459–1464

68 Rosenthal MJ Morley JE. CRF and age related differences in behavior of mice Neurobiol Aging 1988 in press

69 Krahn DD Gosnell BA Levine AS et al. Behavioral effects of corticotropin releasing factor Localization and characterization of central effects Brain Res 1988 443 63–69

70 Krahn DD Gosnell BA Grace M et al CRF antagonist partially reverses CRF and stress-induced effects on feeding. Brain Res Bull 1986 17 285–289

71 Shibasaki T Yamauchi N Kato Y et al. Involvement of corticotropin releasing factor in restraint stress-induced anorexia and reversion of the anorexia by somatostatin in the rat. Life Sci 1988 43 1103–1110

72 Gosnell BA Morley JE Levine AS Adrenal modulation of the inhibitory effect of corticotropin releasing factor on feeding. Peptides 1983 4 807–812

73 Nakagami Y Suda T Yajima F et al Effects of serotonin cyproheptadine and reserpine on corticotropin releasing factor release from rat hypothalamus in vitro Brain Res 1986 386 232–238

74 Ganong WF Neurotransmitters and pituitary function. Regulation of ACTH secretion Fed Proc 1980;39.2923–2930

75 Widmaier EP Plotsky PM Sutton SW et al. Regulation of corticotropin-releasing factor secretion in vitro by glucose Am J Physiol 1988 255 E287–E292

76 Buckingham JC Corticotropin releasing factor Pharmacol Rev 1980 31 253–274

77 Levine AS Rogers B Kneip J et al Effect of centrally administered corticotropin releasing factor (CRF) on multiple feeding paradigms Neuropharmacology 1983,22 337–339

78 Rivier C Vale W Involvement of corticotropin-releasing factor and somatostatin in stress-induced inhibition of growth hormone secretion in the rat. Endocrinology 1985 117 2478–2482

79 Jhanwar-Uniyal M Roland CR, Leibowitz SF Diurnal rhythm of alpha-2 noradrenergic receptors in the paraventricular nucleus and other brain areas Relation to circulating corticosterone and feeding behavior Life Sci 1985,38.473–482

80 Arase K, York DA Shimizu H et al: Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats Am J Physiol 1989,255 E255–E259

81 Hotta M Shibasaki T Masuda A, et al. The responses of plasma adrenocorticotropin and cortisol to corticotropin-releasing hormone (CRH) and cerebrospinal fluid immunoreactive CRH in anorexia nervosa patients. J Clin Endocrinol Metab 1986.62 319–321

82 Kaye WH Gwirtsman HE George DT et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in anorexia nervosa: Relation to state of nutrition, adrenal function and intensity of depression. J Clin Endocrinol Metab 1987 64 203–208

83 Beaumont PJV The endocrinology of anorexia nervosa. Med J Aust 1983 ii.225–228

84 Rivier C Rivier J Vale W Stress-induced inhibition of reproductive functions Role of endogenous corticotropin-releasing factor Science 1986.231 607–609

85 Tache Y Maeda Hagiwara M Turkelson CM Central nervous system action of corticotropin-releasing factor to inhibit gastric emptying in rats Am J Physiol 1987.253 G241–G245

86 Morley JE Silver AJ Anorexia in the elderly Neurobiol aging 1988 9 9–16

87 Morley JE Nutritional status of the elderly Am J Med 1986.81 679–695

88 Hsu LKG Zimmer B Eating disorders in old age. Int J Eating Disord 1988 7 133–138

89 Gosnell BA Levine AS Morley JE. The effects of aging on opioid modulation of feeding in rats. Life Sci 1983 32.2711–2719

90 Kavaliers M Hirst M The influence of opiate agonists on day-night feeding rhythms in young and old mice Brain Res 1984 326 160–167

91 Silver AJ Flood JF Morley JE Effect of gastrointestinal peptides on ingestion in young and old mice. Peptides 1988;9.221–226

92 Khalil T Walker JP Wiener I et al Effect of aging on gallbladder contraction and release of cholecystokinin-33 in humans. Surgery 1985 98 423–429

John E. Morley MD
VA Medical Center
GRECC (11E)
16111 Plummer Street
Sepulveda CA 91343 (USA)

PCT/US03/40538

228
275

Brain Research 341 (1985) 200–203
Elsevier

BRE 20993

Peptide YY (PYY), a potent orexigenic agent

JOHN E MORLEY ALLEN S LEVINE MARTHA GRACE and JULIE KNEIP

Neuroendocrine Research Laboratory VA Medical Center Minneapolis and the Departments of Medicine and Food Science and Nutrition University of Minnesota Minneapolis-St Paul MN (U S A)

(Accepted April 2nd 1985)

Key words peptide YY — bulimia — drinking — food intake

Peptide YY (PYY) enhances feeding and drinking more potently than does neuropeptide Y after central administration Chronic administration of PYY every 6 h for 48 h causes massive food ingestion Tolerance to this effect of PYY does not appear to develop. This data suggests that PYY is one of the most potent orexigenic substances yet to be identified PYY may play a role in the pathogenesis of bulimic syndromes.

Recently a novel polypeptide peptide YY (PYY) was isolated from the porcine intestine[17] This peptide consists of 36 amino acid residues and has structural similarities with pancreatic polypeptide and neuropeptide Y (NPY)[3] PYY contains a tyrosine at both the amine and carboxy terminal A number of peptides isolated from the gastrointestinal tract and brain have been found to modulate food intake[9 11 13] Clark et al [1] found that injection of NPY into the third ventricle of ovariectomized rats increased food intake We confirmed this observation in intact male rats and found that it also potently increased drinking[3] Of particular interest was the fact the NPY increased feeding in 24-h starved rats As NPY belongs to the same family as PYY we decided to compare the effects of these two peptides on ingestive behaviors We report here that PYY is a more potent orexigenic agent than NPY and that multiple administration of PYY over 48 h causes massive hyperphagia

In the first series of experiments we compared the effect of PYY NPY and rat pancreatic polypeptide (RPP) on food and water ingestion following central administration Forty male Sprague–Dawley rats (weighing 250–275 g) housed in individual cages under controlled temperature (21–23 °C) and light (12 h dark/12 h light) conditions were implanted with cannulae in the right lateral ventricle[11] During all experiments food and water were available ad libitum prior to testing As can be seen in Fig 1 (a and b) central administration of PYY caused a greater increase in food and water intake than did NPY RPP failed to increase food intake This latter finding differs from that of Clark et al [1] who found that human pancreatic polypeptide caused a small but significant increase in food intake in ovariectomized rats Because of the potent effect of PYY we decided to establish a full dose response using 29 new rats tested on a single day As can be seen PYY increased feeding and drinking at a dose of 1 0 μg intracerebroventricularly but not at 0 5 or 0 1 μg (Fig 2a) During this experiment we also recorded the behaviors exhibited by the rats receiving the 5-μg dose of PYY and the saline vehicle for the first 2 h after injection PYY significantly increased the time spent eating drinking and moving while decreasing the time spent resting (Fig 2b) The latency to eat following PYY was 11 ± 1 min compared to 120 ± 0 min for saline ($P < 0.01$) This behavioral profile was similar to that previously reported for NPY[1,3]

To test whether the increase in drinking seen with PYY was an obligatory increase secondary to food ingestion 19 of the animals tested in the second ex

Correspondence J E Morley Present address GRECC VA Medical Center 16111 Plummer Street Sepulveda CA 91343 U S A

0006-8993/85/$03 30 © 1985 Elsevier Science Publishers B V (Biomedical Division)

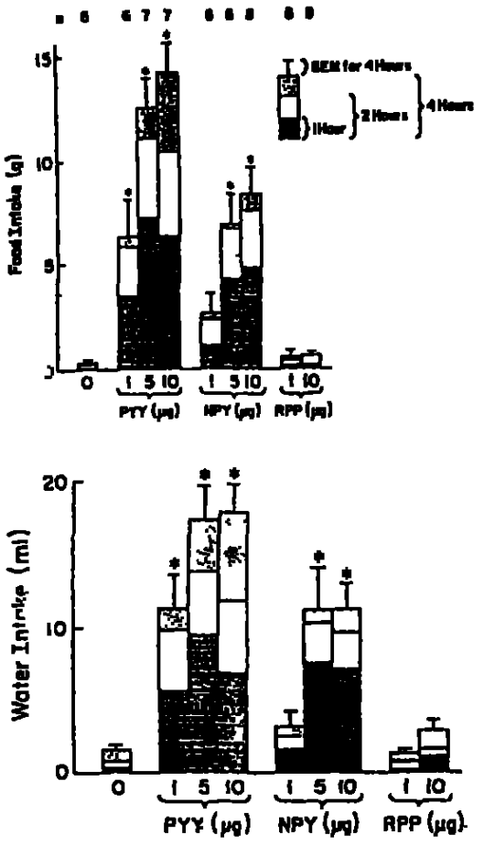


Fig. Comparison of the effect of peptide YY (PYY) neuropeptide Y (NPY) and rat pancreatic polypeptide (RPP) on (a) food intake and (b) water intake. 0 = saline condition. All peptides were purchased from Peninsula Laboratories, San Carlos, CA. Animals were utilized on two occasions using a crossover design such that no animal received the same treatment on the second occasion. All injections (5 μl volume) were made i.c.v. between 09.00 and 10.00 h. Food and water intake was measured by presenting the rats with a preweighed amount of food and water and weighing food and water at 1, 2 and 4 h. Food and water spillage was collected in plastic weighing boats under each rat and included in the calculation of intake. All comparisons were made using an Analysis of Variance followed by the least-significant test. Food and water values are expressed as mean with the S.E.M. shown only for the 4 h value. $P < 0.05$ for all time points compared to saline injected animals. The amounts of food ingested at 1, 2 and 4 h after all doses of PYY were significantly greater ($P < 0.05$) than the amounts ingested after equivalent doses of PNY.

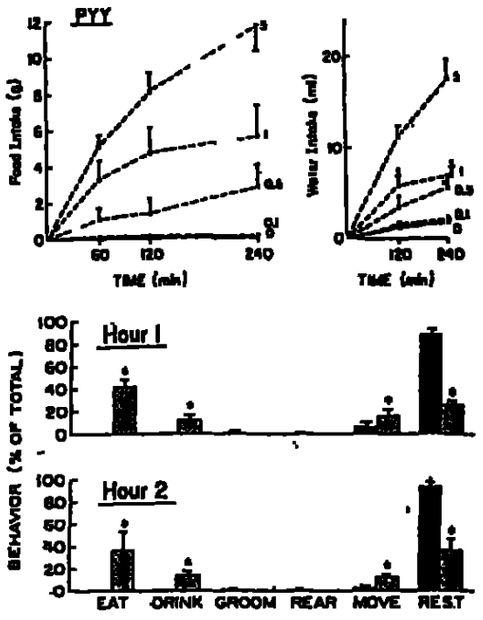
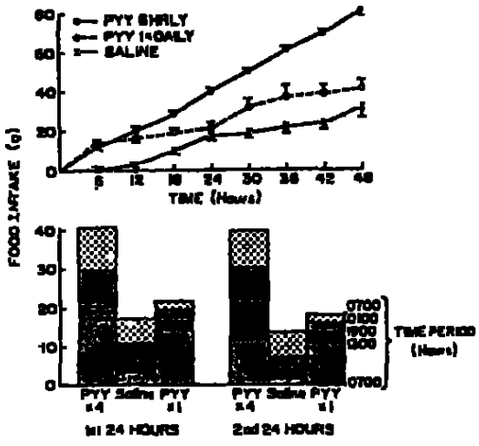


Fig. 2. A time course and dose–response of the effects of i.c.v. PYY on food and water intake. Methods were as for Fig. 1. Results (representing cumulative food intake) are expressed as the mean ± S.E.M. for each time point. Doses on the left side of the figures are in μg/5 μl i.c.v. $P < 0.05$ compared to 0 dose, $n = 5$ for all doses except 1 μg where $n = 4$. Results for 0.01 μg dose are not shown as they were indistinguishable from 0.1 μg and 0 doses. B. effect of central administration of PYY (5 μg) on a variety of behaviors ($n = 5$/group). $P < 0.05$ compared to controls. Behaviors were recorded for 2 h as previously described by us[11]. Briefly, following the injection of 5 μg of NPY a trained observer, blind to the treatments examined each rat every minute for 2 h and listed the behaviors in which the rat was engaged (eating (Eat), drinking (Drink), grooming (Groom), rearing (Rear), moving (Move) and resting (Rest)). The data were recorded as the number of behaviors/h and then transformed to % of the time period. Hatched bars represent PYY treatment and solid bars represent control group.

periment were given PYY (5 μg) or saline intracerebroventricularly (i.c.v.) with only water available, the chow being removed immediately prior to the injection. PYY caused a small but significant increase in water at 2 h (saline ($n = 9$) 0.77 ± 0.25 ml; PYY ($n = 10$) 1.94 ± 0.46 ml; $P < 0.05$) but not at 4 h (saline 1.44 ± 0.22 ml and PYY 3.59 ± 0.99, not significant). Thus like NPY[3] PYY enhances water intake in the absence of food although greater amounts of water were consumed when rats had access to food.

In view of the potent effects of PYY on food intake, we decided to test whether multiple injections of PYY would continue to increase food intake or whether tolerance would develop to PYY. For this



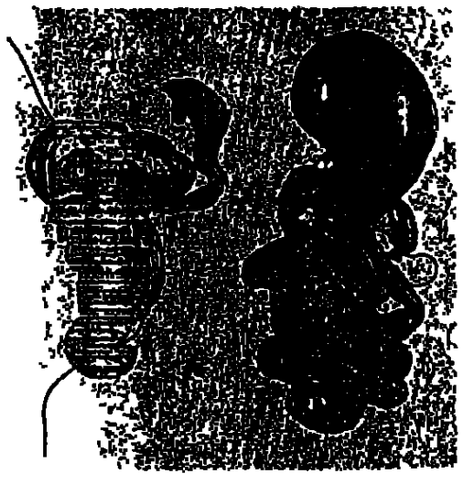


Fig 3 A effect of multiple PYY (10 μg/5 μl i c v) injections on food intake General methods were as for Fig. 1 $P < 0.05$ compared to saline-injected With the exception of 6 and 12 h time points PYY 6-hourly was significantly greater than the values obtained with the one time daily PYY injection Upper panel gives cumulative food intake over 48 h Lower panel gives 6-h food intakes for each time period B gastrointestinal tract from rat receiving PYY (10 μg) every 6 h for 48 h (right) and control rat receiving saline (left) Gross distension of the gastrointestinal tract of the rat receiving PYY is clearly demonstrated

experiment we used 18 male Sprague–Dawley rats with a cannula in the lateral ventricle The rats were divided into 3 groups of 6 animals each One group received saline injections (5 μl i c v) every 6 h for 48 h and a second group received PYY (10 μg in 5 μl saline i c v) every 6 h for 48 h A third group received PYY (10 μg in 5 μl saline i c v) at 07 00 h on both days and 3 saline injections (5 μl i c v) at the remaining 3 time points Multiple injections of PYY caused a marked increase in food intake (80.5 ± 2 4 g compared to 31 1 ± 4 6 in the saline group, $P < 0.01$) over the 48 h time period (Fig 3a) Food intake was significantly increased in the PYY group at each 6-h time point compared to the saline group (Fig. 3a) In the groups receiving PYY once a day at 07 00 h 48-h food intake was also markedly less (40 1 ± 5.3 g in 48 h $P < 0.01$) than in the group receiving PYY every 6 h There was no significant difference in the 6-h food intake between the group which received PYY for the fifth time on the morning of the second day and the group receiving PYY for only the second time and none of the food intakes in the 6-h period (07 00–13 00 h) differed between the first and second days in the animals receiving PYY (Fig 3a) These data suggest that tolerance does not develop to the PYY effect on food intake

Similar data were obtained for the effect of PYY on water intake Animals receiving the 8 saline injections drunk 47 6 ± 4 3 ml of water compared to 121 1 ± 11 8 ml in the animals receiving 8 PYY injections ($P < 0.01$) The rats receiving two PYY injections drank 67 2 ± 11 4 ml The multiple PYY injection regimen significantly increased drinking after all 8 injections compared to the saline-injected group

Body weights were measured before and at the end of the 48 h injection period The animals receiving multiple PYY injections gained 31,2 ± 2 9 g whereas the rats receiving multiple saline injections lost weight (−19 7 ± 6 3 g $P < 0.01$) This weight loss was presumably due to the stress of multiple i c v injections Stress can either cause an increase or decrease in food intake and body weight gain depending on the type of stressor [15] The group that received only two PYY injections also lost weight (−24 7 ± 5 8) In an attempt to determine the cause of the weight gain in the PYY group we sacrificed two animals from this group and two animals from the saline group Of the rats receiving PYY, rat 37 had gained 44 g and his gut (from stomach to anus) weighed 76 8 g and rat 43 gained 27 g and his gut weighed 68 5 g Of the saline injected animals rat 51 had lost 36 g and his gut weighed 16 9 g and rat 41 had lost 32 g and his gut weighed 22 9 g (Fig 3b) Thus

the majority of the weight difference in the PYY injected animals was due to gut fill Of particular interest is the fact that it has been suggested that gastric distension may play a major role in satiety[6] Fig 3b and the food intakes of the PYY injected animals attest to the fact that central factors can override physiological satiety signals from the periphery

In the non-sacrificed rats we followed the food intake patterns after the cessation of the injections For the 24 h period after the injections the animals which had received the PYY every 6 h ingested less food (9 ± 2 38 g/24 h) compared to the saline injected animals (24 8 ± 1 8 $P < 0$ 05) However by 24 h there was no significant difference in food intake (PYY animals 21 ± 2 4 g/24 h compared to saline 24 5 ± 2 9 g/24 h)

The studies reported here suggest that PYY is one of the most potent orexigenic agents yet to be described Most peptides that modulate food intake do so by decreasing food intake[13,14] Among the peptides only the opioid peptides have been consistently reported to increase feeding[16] The magnitude of increased food intake following central administration of opioid peptides is far less than that seen following either PYY or NPY[4,7,8,10,12,18] It would appear that consideration should be given to the possibility that either PYY or the closely related NPY plays a role in the pathophysiology of bulimia

We acknowledge the excellent secretarial assistance of J Tallman The studies reported here were supported by the Medical Research Funds of the Veterans Administration

1 Clark J J Kalra P S Crowley W R and Kalra S P Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats *Endocrinology* 115 (1984) 427–429
2 Donohoe T P Stress-induced anorexia implications for anorexia nervosa *Life Sci* 34 (1984) 203–218
3 Esson P C and DeQuidt M E NPY—A new member of the pancreatic polypeptide family *Trends Neurosci* 7 (1984) 31–35
4 Leibowitz S F and Hor L Endorphinergic and alpha noradrenergic systems in the paraventricular nucleus effects on eating behavior *Peptides* 3 (1982) 421–428
5 Levine A S and Morley J E Neuropeptide Y a potent inducer of consummatory behavior in rats *Peptides* In press
6 McHugh P R The control of gastric emptying *J auton nerv Syst* 9 (1983) 221–231
7 McKay L D Kenney N J Edens N K Williams R H and Woods S C Intracerebroventricular beta-endorphin increases food intake of rats *Life Sci* 29 (1981) 1429–1434
8 McLean S and Hoebel B G Feeding induced by opiates injected into the paraventricular hypothalamus *Peptides* 4 (1983) 287–292
9 Morley J E The neuroendocrine control of appetite the role of endogenous opiates cholecystokinin TRH gamma amino butyric acid and the diazepam receptor *Life Sci* 27 (1980) 355–368
10 Morley J E and Levine A S Dynorphin-(1–13) induces spontaneous feeding in rats *Life Sci* 29 (1981) 1901–1903
11 Morley J E and Levine A S Corticotropin releasing factor grooming and ingestive behavior *Life Sci* 31 (1982) 1459–1464
12 Morley J E and Levine A S The central control of appetite *Lancet* 1 (1983) 398–401
13 Morley J E and Levine A S Involvement of dynorphin and the kappa opioid receptor in feeding *Peptides* 4 (1983) 797–801
14 Morley J E and Levine A S Pharmacology of eating behavior *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 25 (1985) 127–146
15 Morley J E Levine A S Yim G K W and Lowy M T Opioid modulation of appetite *Neurosci Biobehav Rev* 7 (1983) 281–305
16 Morley J E Levine A S and Rowland N E Stress-induced eating *Life Sci* 32 (1983) 2169–2182
17 Tatemoto K and Mutt V Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature (Lond.)* 285 (1980) 417–418
18 Tepperman F S and Hirst M Effects of intrahypothalamic injection of D Ala D Leu -enkephalin on feeding and temperature in the rat *Europ J Pharmacol* 96 (1983) 243–249

PCT/US03/40538
282
279

Peptides, Vol. 12, pp. 1251–1260, © Pergamon Press plc, 1991. Printed in the U.S.A.

Analysis of Neuropeptide Y-Induced Feeding: Dissociation of Y_1 and Y_2 Receptor Effects on Natural Meal Patterns

S. F. LEIBOWITZ AND J. T. ALEXANDER

The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021

Received 25 July 1991

LEIBOWITZ, S. F. AND J. T. ALEXANDER. *Analysis of neuropeptide Y-induced feeding: Dissociation of Y_1 and Y_2 receptor effects on natural meal patterns.* PEPTIDES 12(6) 1251–1260, 1991.—To differentiate NPY receptor subtypes, Y_1 and Y_2, in terms of their impact on feeding behavior the intact molecule NPY(1-36) and the 3 fragments, NPY(2-36), the Y_1 agonist [Leu^{31},Pro^{34}]NPY and the Y_2 agonist NPY(13-36), were injected (100 pmol/0.3 μl) into the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of freely feeding rats. A computer-automated data acquisition system was employed in these experiments to permit a detailed analysis of feeding over the 12-h nocturnal cycle, in minute accumulated on pure macronutrient diets. The results demonstrate that: 1) NPY(1-36) potentiates feeding behavior primarily carbohydrate ingestion, by increasing the size and duration of the first meal after injection, rather than by affecting meal number or feeding rate, suggesting that NPY acts through modulation of satiety. The potentiation of carbohydrate intake occurs in association with a suppression of protein intake, which is strongest during the second meal after injection and which further increases the proportion of carbohydrate in the diet. No changes in fat ingestion are seen. 2) NPY(2-36), with the N-terminal tyrosine residue deleted, is equally potent to NPY(1-36) in potentiating carbohydrate intake and increasing meal size; however, it is less selective than NPY(1-36), producing an additional, smaller increase in consumption of protein. 3) The stimulatory effect of these peptides on carbohydrate intake and meal size is similarly observed with somewhat reduced potency, after PVN injection of the selective Y_1 agonist [Leu^{31},Pro^{34}]NPY which like NPY(1-36), also reduces protein intake. 4) The Y_2 receptor agonist NPY(13-36), causes a decrease in the ingestion of carbohydrate, a smaller decline in protein intake, and a reduction in meal size. It is proposed that hypothalamic Y_1 receptors mediate the stimulatory effect of NPY on carbohydrate intake and meal size while Y_2 receptors have the opposite effect of suppressing carbohydrate intake, possibly by altering presynaptic release of transmitters known to influence nutrient ingestion.

Neuropeptide Y Feeding behavior Hypothalamus Carbohydrate Protein Meal patterns Diet selection Macronutrients Neuropeptide Y receptors

NEUROPEPTIDE Y (NPY) which belongs to the pancreatic polypeptide-fold family of regulatory peptides containing 36 amino acids is believed to perform a neurotransmitter or neuromodulator role in both the central and peripheral nervous systems (4). In the brain, NPY may be involved in the control of feeding behavior, memory processes and circadian rhythms, and in the peripheral nervous system, NPY functions as a transmitter in sympathetic nerves where it acts with norepinephrine in the control of vascular tone.

Results from in vitro structure-activity studies (29,40) have indicated that the C-terminal segment of NPY with its amide group is of primary importance for the biological activity of the peptide, as amino acid C-terminal deletions make the peptide inactive. However, also important for NPY binding to brain receptors is the extreme N-terminal segment (amino acids 1–4), as well as the pancreatic polypeptide-fold which serves a structural role in bringing N- and C-terminal residues together for optimal receptor recognition and activation.

Specific binding sites for NPY appear to exist in at least two forms designated Y_1 and Y_2 receptors (29, 30, 40, 42). Evidence suggests that the Y_1 receptors are predominantly postsynaptic whereas the Y_2 receptors may also exist presynaptically to inhibit the process of neurotransmitter release. The distinction between these receptor subtypes is based on the binding and effects of long C-terminal amino acid fragments of NPY, especially the fragment NPY(13-36) which only binds to Y_2 receptors. The Y_1 receptors were initially characterized as receptors that bind the entire NPY molecule, requiring the interaction of both the N- and C-terminal regions, and not the long C-terminal fragments. However, a recent report (10) has described an NPY analog, [Leu^{31},Pro^{34}]NPY, with the substitution of two amino acids in the C-terminal random chain, which binds exclusively to Y_1 receptors.

The purpose of this present report is to investigate the potential role of these NPY receptor subtypes in the control of feeding, a behavior known to be stimulated by NPY (7, 22, 35). In this study, NPY(1-36) and the 3 fragments, NPY(2-36), the Y_1 agonist [Leu^{31},Pro^{34}]NPY and the Y_2 agonist NPY(13-36), were examined after injection into the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of freely feeding rats. Given the complexity of feeding behavior and, thus, potentially complex functions served by the NPY receptors, a computer-automated apparatus was employed in these experiments to permit a detailed minute-to-minute analysis of multiple behavioral measures related to

385
280

TABLE 1

PEPTIDE EFFECTS ON THE FIRST MEAL AFTER PVN INJECTION*

	NPY(1-36)			NPY(2-36)			[Leu^{31},Pro^{34}]NPY			NPY(13-36)		
	Sal	Peptide	Diff	Sal	Peptide	Diff	Sal	Peptide	Diff	Sal	Peptide	Diff
Nutrient Intake (kcal)												
Carbohydrate	5.7	15.9	+10.0§	5.7	20.0	+14.3§	8.4	10.9	+2.5†	4.5	2.3	−2.2†
Protein	1.8	2.8	+1.0	0.1	5.1	+5.0†	3.8	2.6	−0.2	2.3	1.1	−2.1†
Fat	0.7	1.4	+0.7	0.3	4.8	+4.5§	0.4	1.2	+0.8	2.2	4.3	+1.1
Total	8.1	19.9	+11.8†	6.0	29.9	+23.8§	9.6	13.6	+6.0†	11.0	7.7	−3.3
Feeding Time (min)												
Carbohydrate	7.0	22.9	+15.9†	11.0	35.2	+24.2†	8.5	19.2	+10.7	8.6	3.4	−5.2§
Protein	2.6	5.9	+3.3	0.3	6.2	+5.9	10.3	6.7	−3.6	5.4	1.9	−3.5§
Fat	0.4	1.3	+0.9	0.3	3.8	+3.5§	0.5	1.5	+1.0	2.0	2.5	+0.5
Total	10.0	30.0	+20.0†	11.7	45.2	+33.5†	19.5	27.3	+8.0	16.0	8.7	−8.1§
Meal Duration (min)	12.9	15.9	+23.0*	14.3	31.0	+16.7§	22.7	22.7	0.0	21.8	10.7	−11.1†

*Values reflect difference scores between NPY and saline vehicle. Comparisons are significant at †$p<0.05$ and §$p<0.01$

meal patterns. Based on the finding that the intact NPY molecule preferentially stimulates ingestion of the nutrient, carbohydrate (33), animals in this study were also maintained on pure macronutrient diets, to allow a complete analysis of their nutrient selection patterns. Further, the long duration of NPY's action on food intake (33) has encouraged us to examine behavior over the entire nocturnal feeding cycle, to provide an analysis of the temporal sequence of events. The ultimate goal of these detailed meal pattern studies, in freely feeding and self-selecting animals, is to advance our understanding of the role of NPY, as well as its receptor subtypes, in the control of the natural feeding process.

Results obtained to date, in animals maintained on a single mixed diet, suggest that NPY acts primarily via Y_1-type receptors to potentiate food intake (8, 9, 13, 15, 23, 24). This conclusion has been based primarily on the finding that C-terminal NPY fragments, at least during the brief measurement period examined in these reports, failed to produce the feeding response seen with the parent molecule. This is supported by a preliminary report of a feeding response induced by the selective Y_1 agonist [Leu^{31},Pro^{34}]NPY (15). The results of the present study, described in preliminary form at the annual meeting of the Society for Neuroscience (3), are in agreement with this conclusion and indicate further that the NPY receptor subtypes, Y_1 and Y_2, possibly located in the hypothalamus, may have differential functions in modulating nutrient ingestion and meal patterns across the natural feeding cycle.

METHOD

Subjects

Adult male Sprague-Dawley rats (n=48), obtained from the Charles River laboratory, were used in these studies. The animals, weighing 350–375 g at the time of surgery, were individually housed in stainless steel feed-module cages (43×22×19 cm) in a temperature-controlled room (22±2°C) illuminated on a 12:12 h light/dark schedule, with lights off at 1530 h.

Diets

The animals were maintained on a free-feeding, self-selection paradigm and were provided with separate sources of protein, carbohydrate and fat, to allow them to alter separately intake of each of these nutrients while maintaining proper growth (39). The protein diet (3.7 kcal/g) consisted of 93% casein (National Casein Co.) mixed with 4% minerals (U.S.P. XIV Salt Mixture Briggs, I.C.N. Pharmaceuticals), 2.97% vitamins (Vitamin Diet Fortification Mixture, I.C.N. Pharmaceuticals), and 0.03% cystine (L-cystine-hydrochloride, I.C.N. Pharmaceuticals). The carbohydrate diet (3.7 kcal/g) was composed of 28% dextrin, 28% corn starch (I.C.N. Pharmaceuticals), 37% sucrose (Domino) mixed with 4% minerals and 3% vitamins. The fat diet (7.7 kcal/g) consisted of 35% lard (Armour) mixed with 6% minerals and 6% vitamins. These diets were placed in separate glass jars on scales situated next to openings in front of the cage. The placement of these food jars was changed daily to prevent position preferences. Water was available to the animals ad lib from a water bottle protruding through an opening at the back of the cage. Introduction of fresh diet and jar rotation were scheduled daily approximately 5 h before the onset of the dark cycle (10:00 and 11:00 a.m.), to ensure minimal disturbance to the animals at the start of the active dark cycle.

Stereotaxic Surgery

After a two-week adaptation period, subjects were stereotaxically implanted, under Metofane anesthesia, with a chronic 23 gauge stainless steel cannula aimed at the PVN. This site has been shown to be highly responsive to NPY injection (33) and to contain NPY receptor binding sites (22). With the incisor bar 3.3 mm below the interaural line, the stereotaxic coordinates used were: +0.8 mm anterior to the interaural, −0.4 lateral to the midsagittal sinus and −6.9 mm ventral to the skull surface. The injector extended 1.5 mm beyond the length of the cannula to reach the dorsomedial surface of the PVN. Animals were given one week to recover before initiation of testing.

Apparatus

A computer-automated data acquisition system was used to take measurements of nutrient intake throughout the 12-h nocturnal feeding cycle. This system, described in detail elsewhere (31), permits continuous recording from multiple inputs, uses a personal computer, Ohaus Port-O-Gram electronic balances, commercially available communication hardware, and custom software. The scales were connected to an IBM XT computer,

housed in a separate room to allow remote monitoring and collection of data with minimal disturbance to the animals. The computer was programmed to record each rat's display every minute throughout the dark cycle. This information was compiled into data files and subsequently organized into hourly intervals. Individual bouts of eating were analyzed and the data organized into complete meals, using prescribed criteria (28).

Drugs

Porcine NPY(1–36) and its fragments, [Leu^{31},Pro^{34}]NPY and NPY(13–36), were purchased from Peninsula Laboratories (Belmont, CA). NPY(2–36) was a gift from Richelieu Biotechnologies Inc. (Dr. Serge St.-Pierre). Each peptide was dissolved in 0.9% sterile isotonic saline in a concentration of 100 pmol/0.3 μl.

Test Procedures

Throughout the experiment, measurements of 12-h nutrient intake and body weight were taken 3 times/week to ensure that the rats were consuming stable and adequate amounts of total diet (>70 kcal) to permit normal body weight gain (>2.5 g/day), as well as adequate amounts of each diet (>15 kcal or 15% of total diet) but not extreme amounts of any one diet (>50% of total diet). On the basis of these criteria, 11 of the initial group of 49 rats (22%) exhibited abnormal baseline feeding patterns and, thus, were eliminated from the study. Of these 11 rats, 2 had unstable day-to-day measurements; 4 consumed insufficient amounts of either the carbohydrate diet or of all diets; 4 exhibited extreme preferences for the fat diet (>50% of total diet, compared to 20–30% for the majority of rats); and 1 showed below normal body weight gain.

One week after surgery, the animals were given a pretest with PVN injection of NPY(1–36) (100 pmol/0.3 μl), compared to saline vehicle (0.3 μl), with resultant intake measured 1 h after injection. Essentially all of the animals (34/38, 90%) exhibited a feeding stimulatory response to NPY, with a preferential increase in carbohydrate intake as previously described (33). The remaining 4 rats, which were omitted from this study, showed either no change in food intake after NPY injection (n=3) or an atypical increase in fat intake with no change in carbohydrate intake (n=1). The 34 responsive rats were placed into the computer apparatus and were randomly assigned to one of 4 groups for tests with either NPY(1–36) (n=8), NPY(2–36) (n=7), [Leu^{31},Pro^{34}]NPY (n=6), or NPY(13–36) (n=13).

Over the next 1–2 weeks, each animal received saline or peptide injections 10–15 minutes before the onset of the dark cycle (3:30 p.m.), at a time when NPY has been shown to produce its maximal effect (38). Measurements of nutrient intake were recorded every minute over the next 12 h. Each animal was given approximately 2 saline and 2 peptide tests, with the latter separated by at least 72 h. To allow adequate time for recovery from the effects of the peptide, no test was conducted on the day following the peptide injection. On some occasions, data records had to be excluded due to malfunction of the electronic balances; computer breakdown; food spillage; collection disturbances at any point of the 12-h cycle; highly abnormal baseline feeding patterns; or failure of the animals to exhibit any feeding-stimulatory effect after peptide injection. Each animal was tested until it yielded 1 acceptable, 12-h meal pattern for the saline vehicle test and 1 for the peptide test.

At the end of the experiment, all rats were sacrificed using an overdose of pentobarbital anesthesia. They were perfused intracardially with isotonic saline followed by 10% buffered formalin. Brains were cut in 100 μm coronal sections, stained with cresyl violet and histologically analyzed for cannula placement using the atlas of Paxinos and Watson (26) as a reference. In all 34 rats tested, the tip of the cannula implant was found to be located either within the PVN or along the border (<0.3 mm) of this nucleus.

Data Analysis

The data for intake of each nutrient are organized and described in 3 separate categories: 1) cumulative hourly kcal intake across the 12-hour nocturnal feeding cycle (Figs. 1 and 3–6); 2) kcal intake during the first 3 h of the feeding period (Fig. 2), with each nutrient also examined in terms of its % of total diet, that is, the proportion of total kcal accounted for by the nutrient (in the text, the term nutrient "concentration" is used to indicate the fraction of total intake self-selected by the rats from the particular nutrients); and 3) parameters of the first meal after injection (Table 1), in terms of kcal intake, feeding time (actual time spent consuming the food), and meal duration (total length of meal including pauses between bouts of feeding). As described elsewhere (31), a meal was characterized as a minimum intake of 1.0 kcal and was separated from other meals by an intermeal interval of at least 10 minutes.

The data collected after peptide versus saline injection were statistically evaluated using one-way or two-way analysis of variance, with the data for the 3 diets examined separately and the main effect of drug analyzed across the 12 time points. Significant effects were followed by comparisons between means using Duncan's New Multiple Range test. In a few cases, Student's *t*-tests were used to compare specific effects.

RESULTS

Neuropeptide Y(1–36)

Cumulative hourly measurements of caloric intake over the normal 12-h feeding cycle demonstrated that PVN injection of NPY(1–36), relative to the saline baseline, produced a strong and selective increase in carbohydrate intake, $F(1,168)=26.8$, $p<0.001$ (Fig. 1). This effect was accompanied by a significant suppression of protein consumption, $F(1,168)=4.70$, $p<0.05$, no alteration in fat intake, $F(1,168)=1.95$, $p>0.05$, and a small potentiation of total kcal intake, $F(1,168)=5.37$, $p<0.05$. No significant time × drug interactions were detected for any of the 3 diets.

While these changes in nutrient ingestion were evident across the entire 12-h period after NPY(1–36) administration (Fig. 1), the dynamic phase of this peptide's action occurred primarily during the first 3 h after injection. During this 3-h interval (Fig. 2), measurements of nutrient intake revealed a selective potentiation of carbohydrate intake (+12.1 kcal) and a small decrease in protein intake (−3.1 kcal), along with little change in fat consumption and an increase in total caloric intake (+9.6 kcal). (See Fig. 2 for statistical analyses of these effects.) This pattern of change in caloric intake of each diet was associated with significant alterations in the nutrient composition (%) of the rat's total diet during this 3-h period, with the concentration of carbohydrate in the diet increasing from 47% after saline to 77% after peptide ($p<0.05$) and the concentration of protein selected declining from 40% to 15% ($p<0.05$). No change in fat concentration was observed.

Neuropeptide Y(2–36)

After injection into the PVN, the fragment NPY(2–36), with the N-terminal tyrosine deleted, also produced a dramatic in-

880
282

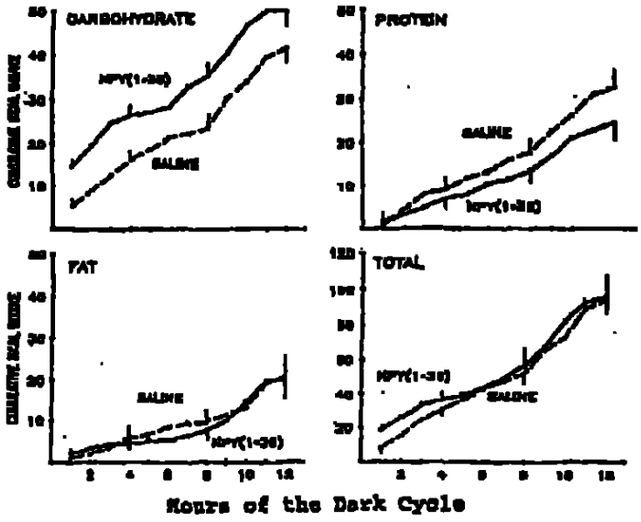


FIG. 1. Cumulative kcal intake over the 12-h nocturnal cycle after PVN injection of saline vehicle or neuropeptide Y(1–36), in animals maintained on pure macronutrient diets. NPY(1–36) significantly increased intake of carbohydrate ($p<0.001$) and total kcal intake ($p<0.05$) while decreasing protein intake ($p<0.05$).

crease in consumption of the carbohydrate diet over the 12-h feeding cycle, $F(1,144)=52.7$, $p<0.001$ (Fig. 2), an effect similar in magnitude to that produced by NPY(1–36) (Fig. 1). The action of NPY(2–36) was also similar to NPY(1–36) in causing little change in fat ingestion, $F(1,144)=1.93$, $p>0.05$, and a reliable increase in total kcal intake, $F(1,144)=28.89$, $p<0.001$. However, a primary difference between these two peptides became evident in their influence on protein consumption over the 12-h cycle. In contrast to the significant reduction in protein intake seen with the parent NPY molecule (Fig. 1), NPY(2–36) produced a small increase in the consumption of this nutrient, $F(1,144)=4.70$, $p<0.05$ (Fig. 3), which, in combination with the enhanced carbohydrate intake, yielded an increase in total kcal significantly greater ($p<0.05$) than that observed with NPY(1–36). As with NPY(1–36), no significant interactions between the main effects of time and drug were obtained for any of the diets.

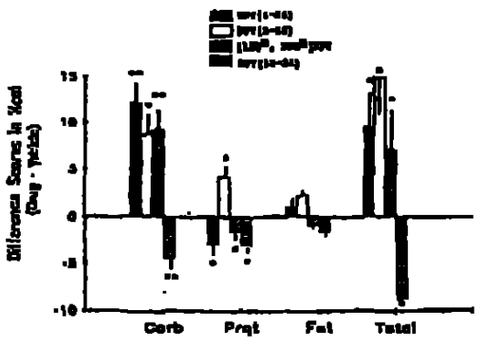


FIG. 2. Peptide-induced changes in kcal intake, as reflected in difference scores (drug-vehicle), during first 3 h of the dark cycle. Animals were maintained on macronutrient diets, carbohydrate (carb), protein (prot) and fat. Differences are significant at $p<0.05$ (*) or $p<0.01$ (**).

The 3-h measurements (Fig. 2) for NPY(2–36) revealed an increase in carbohydrate intake (+2.8 kcal) similar in magnitude to that produced by NPY(1–36). They also demonstrated the additional enhancement of protein ingestion (+4.1 kcal), which is significantly smaller ($p<0.001$) than the increase observed in carbohydrate intake and in clear distinction to the suppressive effect induced by NPY(1–36). This potentiation of both carbohydrate and protein intake after NPY(2–36), along with a small increase in fat intake, yielded an enhancement of 3-h total kcal intake (+15.0 kcal) that showed a tendency to be larger than the effect seen with NPY(1–36) (+9.5 kcal, $p<0.10$). It also yielded diet composition scores (% of total diet) which failed to show any increase in the concentration of carbohydrate selected in the diet [60% after saline versus 62% after NPY(2–36)]. This lack of selectivity contrasts with the reliable increase in carbohydrate preference, accompanied by a decrease in protein intake, observed after NPY(1–36) in this 3-h interval.

[Leu^{31},Pro^{34}]Neuropeptide Y

The results obtained with PVN injection of the selective Y_1 receptor agonist [Leu^{31},Pro^{34}]NPY (Fig. 4) demonstrate a reliable increase in cumulative carbohydrate intake across the 12-h feeding period, $F(1,120)=17.59$, $p<0.001$. This effect was strongest during the first 6 h after peptide administration, when

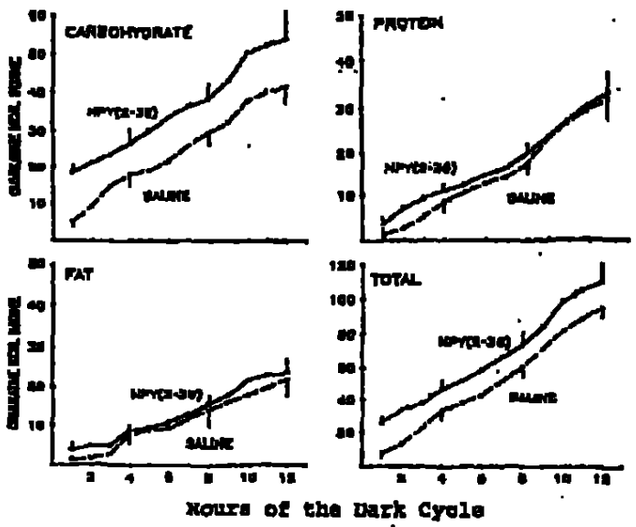


FIG. 3. Cumulative food intake over the 12-h nocturnal cycle after PVN injection of saline vehicle or neuropeptide Y(2-36) with the N-terminal tyrosine deleted. In animals maintained on pure macronutrient diets, NPY(2-36) reliably increased carbohydrate ($p<0.001$), protein ($p<0.05$), and total food intake ($p<0.001$).

it was similar in magnitude to the effect of NPY(1-36) (Fig. 1) and NPY(2-36) (Fig. 3). After the 7th h, however, the effectiveness of [Leu^{31},Pro^{34}]NPY was significantly reduced ($p<0.05$) relative to that of the other two peptides. As with NPY(1-36),

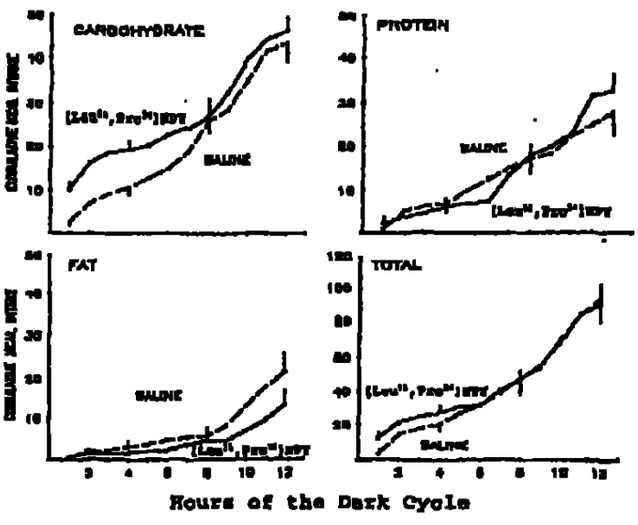


FIG. 4. Cumulative food intake over the 12-h nocturnal cycle after PVN injection of saline vehicle or [Leu^{31},Pro^{34}]neuropeptide Y, a selective Y_1 agonist. In animals maintained on pure macronutrient diets, [Leu^{31},Pro^{34}]NPY significantly increased carbohydrate intake ($p<0.001$) and decreased fat intake ($p<0.001$).

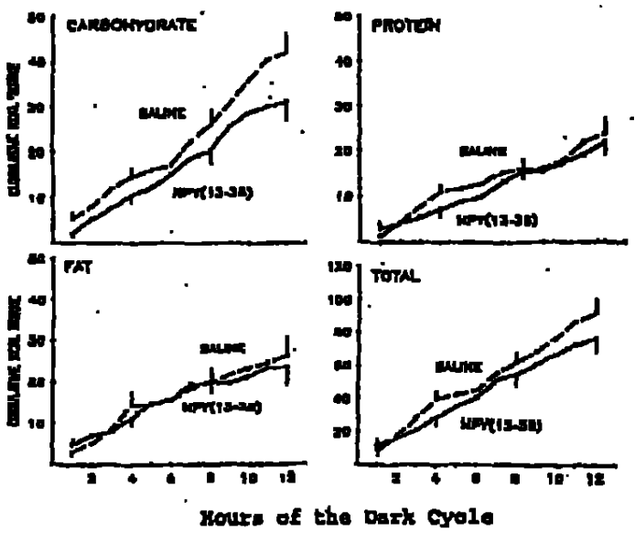


FIG. 3. Cumulative food intake over the 12-h nocturnal cycle after PVN injection of saline vehicle or the C-terminal fragment, neuropeptide Y(13–36), in animals maintained on pure macronutrient diets. NPY(13–36) significantly increased carbohydrate intake ($p<0.001$), protein intake ($p<0.02$), and total food intake ($p<0.01$).

this potentiation of carbohydrate intake occurred in association with a suppression of protein consumption, which once again was significant over the first 6 h of the nocturnal cycle, $F(1,60)=4.16$, $p<0.05$, but not across the entire 12 h, $F(1,120)=0.28$, $p>0.05$. The converse occurred in the case of fat intake (Fig. 4), which remained unchanged during the first few h after injection but was significantly reduced over the second 6 h of the nocturnal period, $F(1,60)=23.86$, $p<0.001$, yielding a significant interaction between the main effects, $F(1,108)=1.99$, $p<0.05$. This is in contrast to NPY(1–36) and NPY(2–36), which failed to alter ingestion of this nutrient at any time of the 12-h cycle. The significant potentiation of total food intake seen with these two peptides was not evident after stimulation with [Leu^{31},Pro^{34}]NPY, $F(1,120)=2.52$, $p>0.05$.

During the first 3 h of the feeding cycle (Fig. 2), [Leu^{31}, Pro^{34}]NPY reliably potentiated carbohydrate intake (+9.2 kcal), similar to NPY(1–36) and NPY(2–36), and significantly suppressed intake of protein (−1.6 kcal), as did NPY(1–36). During this interval, [Leu^{31},Pro^{34}]NPY failed to alter fat consumption; however, it reliably potentiated total kcal intake (+7.0 kcal), although to a lesser extent ($p<0.05$) than NPY(2–36). As a consequence of this peptide's selective increase in carbohydrate intake, in association with a suppression of protein ingestion, the carbohydrate concentration of the rats' total diet greatly increased (from 32% after saline to 72% after peptide, $p<0.001$), protein preference declined (from 35% to 23%, $p<0.01$), while fat concentration remained unaltered. Thus, similar to NPY(1–36) but in contrast to NPY(2–36), a selective increase in the kcal intake, as well as in the relative preference for the carbohydrate diet, was detected after PVN administration of this Y_1 receptor agonist, [Leu^{31},Pro^{34}]NPY.

Neuropeptide Y(13–36)

The effect of PVN injection of the C-terminal fragment NPY(13–36), a selective Y_2 receptor agonist, on nutrient ingestion over the 12-h feeding cycle was found to be very different from that exhibited by the other three peptides that activate the Y_1 receptor subtype. As demonstrated by the 12 hourly cumulative measurements (Fig. 3), this compound, relative to prior baseline, failed to exhibit a stimulatory effect on either carbohydrate intake or total food consumption. Instead, this C-terminal fragment actually reduced total food consumption over the 12-h period, $F(1,225)=6.76$, $p<0.01$, due primarily to a significant decrease in carbohydrate intake, $F(1,225)=20.1$, $p<0.001$, and a somewhat smaller decline in protein consumption, $F(1,225)=6.22$, $p<0.02$. Fat ingestion remained unaffected, $F(1,225)=1.24$, $p>0.05$, and no significant time × dose interaction was detected for any of the nutrients.

The 3-h measurements (Fig. 2) reflect these alterations in carbohydrate intake (−4.3 kcal), protein intake (−3.1 kcal), and total kcal intake (−8.8 kcal). The subtle composition (%) of the total diet consumed in this 3-h period was also altered by NPY(13–36), which significantly suppressed the concentration of carbohydrate from 36% to 29% ($p<0.04$). A smaller decline in dietary protein concentration (from 23% to 19%) failed to reach statistical significance.

Meal Pattern Analyses

Examination of the individual meals exhibited by the rats during the first 3 h of the dark period generally revealed 2 distinct and complete meals. Analyses of these two meals showed that both the latency to onset of the first meal after vehicle injection (normally within 15 min of dark onset), as well as the interval between meal 1 and meal 2 (35 ± 4.6 min), remained unchanged after peptide stimulation. Moreover, it became apparent that the main effects of the peptides occurred primarily during the first meal after injection, with a few delayed responses apparent in the second meal and only sporadic changes in subse-

quent meals over the 12-h feeding cycle. Thus the focus of this analysis is on the first meal of the feeding cycle, with the data presented in Table 1, and the few peptide-induced changes observed in the second meal are described in the text.

Consistent with the hourly measurements (see Figs. 1–3), the 3 peptides, NPY(1–36), NPY(2–36) and [Leu^{31},Pro^{34}]NPY, produced similar changes in the carbohydrate component of the first meal, namely, a significant potentiation of the amount of carbohydrate ingested and of the time spent consuming this nutrient (Table 1). As a consequence of this effect, total meal size and, for NPY(1–36) and NPY(2–36), total feeding time and duration of this first meal were reliably enhanced. None of these peptides had any effect on the rate of carbohydrate feeding (kcal/min feeding time). The reduced potency indicated above for [Leu^{31},Pro^{34}]NPY relative to the other peptides is also seen here during the first meal, when this Y_1 agonist produced a smaller increase in carbohydrate intake and failed to alter total feeding time and meal duration (Table 1). Moreover, this peptide's effects appeared to be somewhat delayed, with 30% of the animals exhibiting a potentiation of carbohydrate only during the second meal and the entire group showing a reliable increase in carbohydrate intake (+6.0, $p<0.05$) and carbohydrate feeding time (+12.4 min, $p<0.05$) during this second meal.

In terms of the protein and fat components of the first meal (Table 1), no changes from saline baseline scores were detected for NPY(1–36) and [Leu^{31},Pro^{34}]NPY, which selectively altered the carbohydrate constituent. However, in the second meal, both peptides were found to suppress consumption of protein, both kcal intake (−2.5 kcal, $p<0.10$, for NPY(1–36); −2.1 kcal, $p<0.05$, for [Leu^{31},Pro^{34}]NPY) and time spent consuming this nutrient (−4.2 min, $p<0.10$, for NPY(1–36); −6.8 min, $p<0.05$, for [Leu^{31},Pro^{34}]NPY), while no other changes in either fat intake or total meal size and duration were detected. Consistent with its effect on hourly nutrient intake across the 12-h cycle (Fig. 3), the fragment NPY(2–36) produced a different pattern from the other two peptides. It caused a small but significant increase in both the protein and fat components of this first meal (Table 1), effects that were reliably smaller ($p<0.001$) than the stimulation of carbohydrate intake. Once again, this more general stimulatory effect of NPY(2–36) on the intake of all 3 nutrients yielded a considerably stronger increase in the total size and duration of this meal (Table 1). No significant changes in the second meal were observed with this peptide.

Analyses of the first meal after injection of the selective Y_2 agonist NPY(13–36) revealed a change opposite to that of the other peptides, namely, a significant decline in the size of its carbohydrate component and in the amount of time spent ingesting this nutrient (Table 1). Similar changes were observed with the protein component of this meal, yielding a significant decline in the duration of this meal. There were no alterations in this meal's fat component. During the second meal, only the carbohydrate constituent was significantly altered; this included a reliable decrease in kcal intake (−2.0 kcal, $p<0.05$) and feeding time (−4.5 min, $p<0.05$) for this specific nutrient, which resulted in similar changes in the scores for total kcal intake (−6.7 kcal, $p<0.05$), feeding time (−11.0 min, $p<0.05$), and meal duration (−12.2 min, $p<0.05$).

In most cases, significant changes in meals subsequent to these first two meals after peptide stimulation were not seen. Moreover, no alterations in the total number of meals consumed across the 12-h cycle were detected with any of the peptides. These results indicate, once again, that the dynamic phase of these compounds' action is during the first 2–3 h after injection, although their impact is sustained into the later h of the feeding cycle apparently precluding any compensatory adjustments in feeding behavior. Only in the case of [Leu^{31},Pro^{34}]NPY was there a delayed response subsequent to the second meal after injection. The decrease in fat consumption exhibited by this peptide during the second half of the feeding cycle (Fig. 4) became evident during the fourth meal (6th h) of the feeding cycle (−1.0 kcal, $p<0.05$) and continued in each meal until the end of this 12-h period.

DISCUSSION

Primary Effect of NPY(1–36) on Carbohydrate Intake and Meal Size

Consistent with previous studies (23,38), PVN injection of NPY(1–36) in naturally feeding animals selectively increased carbohydrate intake at the onset of the dark cycle meal, as a consequence of this action, potentiated total food consumption. Computer-assisted analyses across the 12-h natural feeding cycle showed this effect to be manifested primarily during the first 2–3 h after injection, although still apparent as long as 12 h later with, surprisingly, no signs of the animals' recovery from peptide stimulation. The effects of NPY on meal parameters were seen primarily in the first meal after NPY(1–36) injection, when there was a dramatic increase in the size, duration, and carbohydrate component of this meal, with no change in its protein or fat content. This potentiation of the size and length of the first meal, similarly reported by Stanley and Thomas (37), occurred in the absence of any changes in the number of meals consumed or in the rate of the feeding process. This may reflect a primary action of NPY on hypothalamic mechanisms controlling satiety, rather than on systems that initiate new meals or determine the pace of on-going behavior (9,20). This primary action of NPY on carbohydrate ingestion was followed by a different effect in the second meal, namely, a suppression of protein intake, which was sustained over the entire 12-h feeding period. A consequence of this secondary effect appeared to be an even stronger increase in the proportion of carbohydrate in the total diet.

Importance of the N-Terminal Tyrosine Residue of NPY

The tyrosine residue in position 1 of NPY(1–36) does not appear to be critical for the activation of the NPY receptor subtype which mediates the stimulatory effect of this peptide family on carbohydrate intake and meal size. Thus far, NPY(2–36) increased carbohydrate intake during the first meal after injection and exhibited a potentiation of this nutrient across the 12-h nocturnal cycle. Both the magnitude and pattern of this fragment's effects on ingestion of this nutrient were essentially identical to those obtained with NPY(1–36), suggesting that they act through similar receptor systems to stimulate carbohydrate intake. While NPY(2–36) has been found in other bioassay or receptor binding systems to have reduced potency relative to NPY(1–36) [see (1, 6, 27)], biochemical studies within specific hypothalamic nuclei, e.g., the PVN, will need to be conducted to determine the binding properties and metabolism of this fragment at local target sites.

Whereas NPY(1–36) and NPY(2–36) act similarly in terms of their impact on carbohydrate ingestion, a clear difference between these compounds became apparent in the analyses of protein intake, which revealed a suppressive effect with NPY(1–36) in contrast to a potentiation with NPY(2–36). Although this effect of NPY(2–36) was reliably smaller than its stimulation of carbohydrate ingestion, it was sufficient to interfere with this peptide's ability to increase specifically the proportion of carbohydrate in the diet relative to the other two nutrients. Thus it is possible that the degree of selectivity of NPY's action on carbohydrate intake, in terms of kcal intake as well as its relative concentration in the diet, depends on the intact peptide molecule

and can be substantially disturbed with deletion of the N-terminal tyrosine. This loss of nutrient selectivity with NPY(2–36), resulting in a greater potentiation of total caloric intake, may explain the stronger feeding response attributed to this analog in previous studies with a single mixed diet (13, 15, 24, 27).

Y_1 Receptor Activation Stimulates Carbohydrate Intake

In this present study, the Y_1 receptor agonist, [Leu^{31}, Pro^{34}]NPY, was found to have a selective stimulatory effect on carbohydrate intake and to act similarly to NPY(1–36) in terms of its impact on meal size and feeding time. This is in contrast to the selective Y_2 agonist, NPY(13–36), which failed to produce this response. This provides strong evidence for the hypothesis that Y_1 receptors are critical for the carbohydrate stimulatory action of these peptides. This agrees with the conclusions of recent investigations, in animals maintained on a single mixed diet, which show that an increase in meal food consumption can be observed with [Leu^{31},Pro^{34}]NPY (15) but not other injection of various C-terminal NPY fragments (8, 9, 13, 15, 23, 24). In the present study, [Leu^{31},Pro^{34}]NPY was found to be less potent than the intact NPY(1–36). In terms of the magnitude and duration of its effect on carbohydrate ingestion and total caloric intake, as well as of the proportion of animals responsive to this compound. Thus it appears that the intact NPY molecule may be required to elicit a maximal carbohydrate feeding response, either to provide the necessary stability for full peptide function or to allow for the full range of multiple receptor activation.

Y_2 Receptor Activation Inhibits Carbohydrate Intake

The Y_2 receptor agonist NPY(13–36), in contrast to Y_1 stimulation, was found to have an inhibitory effect on the ingestion of carbohydrate and to cause a reduction in meal size. This suggests the possibility that Y_1 and Y_2 receptors may have opposing actions in the control of carbohydrate intake. Consistent with these findings is the evidence of other investigators who have observed opposite effects of Y_1 and Y_2 receptor stimulation on blood pressure (2, 6, 11), locomotor activity (12), and corticosterone release (11).

This latter finding of differential peptide effects on circulating corticosterone (CORT) levels is particularly significant in light of the evidence relating this steroid to the stimulation of carbohydrate intake (16), as well as to the action of NPY in the PVN (21, 34, 41). It is known that PVN NPY(1–36) injection stimulates the release of CORT (21,41), which in turn is found to potentiate carbohydrate ingestion (16); this is in contrast to the Y_2 agonist NPY(13–36), which appears to inhibit CORT release (11), an effect that results in a reduction of carbohydrate intake (16). This link between NPY and circulating CORT, in addition to the dependence of NPY-stimulated feeding on this steroid (34), may provide a possible physiological explanation for the antagonist effects of Y_1 and Y_2 receptor stimulation on carbohydrate intake.

Impact of Y_1 and Y_2 Receptor Activation on Protein and Fat Intake

The findings of the present study reveal an additional effect of NPY on the ingestion of a different nutrient, namely, protein. Both NPY(1–36) and [Leu^{31},Pro^{34}]NPY, which are known to activate Y_1 receptors, produced a suppression of protein intake. While this suppressive effect became statistically significant only after a 60-min delay period, during the second meal when spontaneous protein intake (after vehicle injection) started to rise, there was some evidence for this effect during the first h, specifically in rats that showed a measurable amount of protein intake at this time. The effectiveness of [Leu^{31},Pro^{34}]NPY in eliciting protein consumption suggests that this phenomenon may be mediated via Y_1 receptors. Moreover, an additional consequence of this effect, namely, a further increase in the relative proportion of carbohydrate in the diet, suggests that it may be related to the primary stimulatory action of these peptides on carbohydrate ingestion.

A suppression of protein intake was also detected with the Y_2 agonist, NPY(13–36), with a shorter latency (<15 min, during meal 1) than that detected with the Y_1 agonist (>60 min, during meal 2). With both agonists, further work is needed to determine whether these effects on protein consumption are primary, conjunctive in nature, or consequent to these peptides' actions on carbohydrate ingestion. Brain systems controlling intake of these two nutrients and their relative proportion are known to be closely linked (5).

In the present study, NPY was found to have little impact on the ingestion of fat. This was true for the parent molecule, as well as for NPY(2–36) and the C-terminal fragment NPY(13–36). The only significant change observed in fat intake was detected with the Y_1 agonist [Leu^{31},Pro^{34}]NPY, which inhibited ingestion of this nutrient after a long latency and subsequent to its action on carbohydrate and protein intake. The significance of this phenomenon, and of its unique temporal characteristics, remains to be determined. It is in distinct contrast to the potentiating effect chronic NPY injections are found to have on fat intake in animals that exhibit a strong natural preference for this nutrient (32). As described in the Method section, the animals examined in the present study, which are typical of male Sprague-Dawley rats weighing 300–400 g (31), consumed standard amounts of each diet (>15 kcal/12 h) and exhibited no strong preferences for any particular nutrient (Figs. 1–5). In these animals, NPY and its fragments failed to potentiate ingestion of this nutrient.

Possible Physiological Role of NPY and Its Receptor Subtypes in Feeding

Recent evidence suggests that Y_1 receptors are predominantly postsynaptic, having direct action on biological systems, whereas the Y_2 receptors may exist presynaptically to influence endogenous neurotransmitter release and indirectly modulate physiological responses (14, 29, 40). It has also been proposed that Y_2 receptor stimulation may be involved in terminating or terminating the effect of the parent NPY compound on Y_1 receptors, possibly via short C-terminal fragments generated endogenously by NPY hydrolysis (40). These neurochemical properties of this peptide system may also apply to the role of endogenous NPY, perhaps in the PVN, in the control of carbohydrate ingestion.

Specifically, NPY via postsynaptic Y_1 receptors may potentiate the size of a carbohydrate meal through inhibition of a satiety mechanism located in the PVN (20), and this action may occur predominantly at the start of the dark cycle (19,37). The purpose of the C-terminal fragments produced from the parent molecule may then be to terminate this action when sufficient carbohydrate has been ingested. The possibility that these fragments may act via presynaptic Y_2 receptors, through their action on the release of endogenous monoamines, is supported by evidence linking NPY to α_2-noradrenergic and serotonergic systems in the hypothalamus (19).

While a number of effects observed with NPY(1–36) in the PVN are similarly seen after PVN injection of norepinephrine (NE), these two neurochemicals are found to act independently through their respective postsynaptic receptor sites (19). How-

ever, in light of the evidence that NPY(1–36), as well as its C-terminal fragments, reduces the release of NE presumably via the activation of presynaptic Y_2 receptors (17, 43, 44), it is possible that selective Y_2 receptor agonists may produce their behavioral effects through their impact on NE. This possibility is supported by the results obtained here with PVN NPY(13–36) injection, which decreased carbohydrate intake and the proportion of this nutrient in the diet, and by the extensive evidence linking PVN NE to the stimulation of carbohydrate intake (18). An additional mechanism in the PVN, namely, serotonin, has also been linked to both carbohydrate and protein intake and found to enhance the ratio of protein/carbohydrate (19). Since C-terminal NPY fragments also inhibit the release of serotonin (25), it is possible that NPY(13–36) suppresses protein intake through a reduction in this transmitter.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by USPHS grant MH 43422. We wish to thank Dr. Serge St.-Pierre (Richelieu Biotechnologies Inc.) for his generous supply of NPY(2–36).

REFERENCES

1. Aben, J.; Under, A.; Axdell, R.; Tam, J. P.; Hardtl, T. Synthetic fragments and analogs of NPY are ligands at NPY receptors in the rat cerebral cortex. In: Mutt, V.; Hakfelt, T.; Fuxe, K.; Lundberg, J. M., eds. Neuropeptide Y. New York: Raven Press; 1989:137–142.
2. Aguirre, J. A.; Fuxe, K.; Agnati, L. F.; von Euler, G. Centrally injected neuropeptide Y (13–36) produces vasopressor effects and antagonizes the vasodepressor action of neuropeptide Y (1–36) in the awake male rat. Neurosci. Lett. 111:3–8; 1990.
3. Alexander, J. T.; Dietz, C. B.; Brannon, G.; Lichowitz, S. F. Analysis of neuropeptide Y-induced feeding: Dissociation of Y_1 and Y_2 receptor effects on meal patterns. Soc. Neurosci. Abstr. 17in press; 1991.
4. Allen, J. M.; Kenig, J. L., eds. Central and peripheral significance of neuropeptide Y and its related peptides. Ann. NY Acad. Sci. 611; 1990.
5. Anderson, G. H.; Li, E. T. S.; Glanville, N. T. Brain mechanisms and the quantitative and qualitative aspects of food intake. Brain Res. Bull. 12:167–173; 1984.
6. Beinfeld, J. M.; Spiner, M. A.; Scott, N. A.; Brown, M. R.; Rivier, J. E. Biologically active neuropeptide Y analogs. Ann. NY Acad. Sci. 611:27–34; 1990.
7. Clark, J. T.; Kalra, P. S.; Crowley, W. R.; Kalra, S. P. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. Endocrinology 115:427–429; 1984.
8. Dacho, W.; Tribout, J.; Vincent, G.; Nataljean, T.; Taylor, J.; Kaiser, E. T. Synthesis and biological evaluation of pNPY fragments. Int. J. Pept. Protein Res. 32:496–505; 1988.
9. Floyd, J. F.; Mosley, J. E. Dissociation of the effects of neuropeptide Y on feeding and memory: Evidence for pre- and postsynaptic mediation. Peptides 10:963–966; 1989.
10. Fuhlendorff, J.; Gether, U.; Aakerlund, L.; Langeland-Johansen, N.; Thorgeirsson, K.; Melberg, S. G.; Olsen, U. B.; Thastrup, O.; Schwartz, T. W. [Leu^{31},Pro^{34}]Neuropeptide Y: A specific Y_1 receptor agonist. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:182–186; 1990.
11. Fuxe, K.; Aguirre, J. A.; Agnati, L. F.; von Euler, G.; Hedlund, P.; Cortes, R.; Zoli, M.; Bjelke, B.; Ferreth, P. Neuropeptide Y and central cardiovascular regulation. Ann. NY Acad. Sci. 611:111–132; 1990.
12. Hellig, M.; Wahlestedt, C.; Widerlov, E. Neuropeptide Y (NPY)-induced suppression of activity in the rat: Evidence for NPY receptor heterogeneity and for interaction with α_2-adrenoceptors. Eur. J. Pharmacol. 177:209–213; 1988.
13. Jolicoeur, F. B.; Michaud, J.-N.; Menard, D.; Fournier, A. In vivo anorectic activity study supports the existence of heterogeneous neuropeptide Y receptors. Brain Res. Bull. 26:309–313; 1991.
14. Jorgensen, J. Ch.; Fuhlendorff, J.; Schwartz, T. W. Structure-function studies on neuropeptide Y and pancreatic polypeptide—evidence for two PP-fold receptors in rat deferens. Eur. J. Pharmacol. 184:103–114; 1990.
15. Kalra, S. P.; Kalra, A.; Kalra, P. S.; Crowley, W. R. Hypothalamic neuropeptide Y: A circuit in the regulation of gonadotropin secretion and feeding behavior. Ann. NY Acad. Sci. 611:273–283; 1990.
16. Kumar, S. A.; Lichowitz, S. F. Impact of some corticosteroid administration on feeding and macronutrient self-selection patterns. Am. J. Physiol. 254:R222–R228; 1988.
17. Kyrkouli, S. E.; Stanley, B. G.; Leibowitz, S. F. Neuropeptide Y: Comparisons with norepinephrine in relation to feeding behavior. Ann. NY Acad. Sci. 611:277–288; 1990.
18. Leibowitz, S. F. Hypothalamic paraventricular nucleus: Interaction of α_2-noradrenergic system and circulating hormones and nutrients in relation to energy balance. Neurosci. Biobehav. Rev. 12:101–109; 1988.
19. Leibowitz, S. F. Hypothalamic neuropeptide Y in relation to energy balance. Ann. NY Acad. Sci. 611:284–301; 1990.
20. Leibowitz, S. F.; Hammer, N. J.; Chang, K. Hypothalamic paraventricular lesions produce overeating and obesity in the rat. Physiol. Behav. 27:1031–1040; 1981.
21. Leibowitz, S. F.; Hoebel, C.; Spencer, L.; Tempel, D. Neuropeptide Y, epinephrine, and norepinephrine in the paraventricular nucleus: Stimulation of feeding and the release of corticosterone, vasopressin and glucose. Brain Res. Bull. 21:905–912; 1988.
22. Levine, A. S.; Morley, J. E. Neuropeptide Y: A potent inducer of consummatory behavior in rats. Peptides 5:1025–1029; 1984.
23. McLaughlin, C. L.; Tso, J. S.; Regan, G. F.; Baile, C. A. Full amino acid sequence of centrally administered NPY required for maximal food intake response. Physiol. Behav. 49:521–525; 1991.
24. Magdalin, W.; Stanley, B. G.; Fournier, A.; Leibowitz, S. F. A structure-activity analysis of neuropeptide Y-induced eating behavior. Soc. Neurosci. Abstr. 15:895; 1989.
25. Michel, M. C.; Schilidow, E.; Fink, K.; Beinfeld, J. E.; Gothert, M.; Williams, R. N.; Daly, R. N.; Hieble, J. P.; Rivier, J. E.; Maraskly, R. J. Distribution of NPY receptors in vitro and in vivo. I. NPY-(18–36) discriminates NPY receptor subtypes in vitro. Am. J. Physiol. 259:E131–E139; 1990.
26. Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. Orlando: Academic Press; 1986.
27. Quirion, R.; Martel, J.-C.; Dumont, Y.; Cuello, A.; Jolicoeur, F.; St-Pierre, S.; Fournier, A. Neuropeptide Y receptors: Autoradiographic distribution in the brain and structure-activity relationships. Ann. NY Acad. Sci. 611:58–72; 1990.
28. Rogers, P. J.; Blundell, J. E. Meal patterns and food selection during the development of obesity in rats fed a cafeteria diet. Neurosci. Biobehav. Rev. 5:441–453; 1984.
29. Schwartz, T. W.; Fuhlendorff, J.; Kjems, L. L.; Kristensen, M. S.; Vorwald, M.; O'Hare, M.; Emmanuelsky, J. L.; Bjorkstein, B. Signal epitopes in the three-dimensional structure of neuropeptide Y interaction with Y_1, Y_2, and pancreatic polypeptide receptors. Ann. NY Acad. Sci. 611:35–47; 1990.
30. Sheikh, S. P.; Malmaeus, K.; Schwartz, T. W. Y_1 and Y_2 receptors for neuropeptide Y and related peptides. FEBS Lett. 243:209–214; 1989.
31. Sisk-Penney, G.; Ian, C.; Brannon, G.; Cohn, T.; May, R.; Hing, A.; Leibowitz, S. F. Self-selecting albino rats exhibit differential preferences for pure macronutrient diets: Characterization of these sub-populations. Physiol. Behav. 50in press; 1991.
32. Stanley, B. G.; Anderson, K. C.; Grayson, M. K.; Leibowitz, S. F. Repeated hypothalamic stimulation with neuropeptide Y increases daily carbohydrate and fat intake and body weight gain in female rats. Physiol. Behav. 46:173–177; 1989.
33. Stanley, B. G.; Daniel, D. R.; Chin, A. S.; Leibowitz, S. F. Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. Peptides 6:1205–1211; 1985.
34. Stanley, B. G.; Lanthier, D.; Chin, A. S.; Leibowitz, S. F. Sup-

E91
288

pression of neuropeptide Y-elicited eating by adrenalectomy or hypophysectomy: Reversal with corticosterone. Brain Res. 501:53–58; 1989.
35. Stanley, B. G.; Leibowitz, S. F. Neuropeptide Y: Stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. Life Sci. 35:2635–2642; 1984.
36. Stanley, B. G.; Leibowitz, S. F. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: A powerful stimulant of feeding behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3940–3943; 1985.
37. Stanley, B. G.; Thomas, W. J. Patterns of eating behavior elicited by neuropeptide Y injected into the medial perihormonal hypothalamus. Soc. Neurosci. Abstr. 16:772; 1990.
38. Tempel, D. L.; Leibowitz, S. F. Diurnal variations in the feeding responses to norepinephrine, neuropeptide Y and galanin in the PVN. Brain Res. Bull. 25:321–325; 1990.
39. Tempel, D. L.; Rice-Penner, G.; Dwyer, D.; Leibowitz, S. F. Nocturnal patterns of macronutrient intake in freely feeding and food-deprived rats. Am. J. Physiol. 254:R541–R548; 1988.
40. Wahlestedt, C.; Grundemar, L.; Hakanson, R.; Heilig, M.; Shen, G. H.; Zukowska-Grojec, Z.; Reis, D. J. Neuropeptide Y receptor subtypes, Y1 and Y2. Ann. NY Acad. Sci. 611:7–26; 1990.
41. Wahlestedt, C.; Skagerberg, G.; Ekman, R.; Heilig, M.; Sundler, F.; Hakanson, R. Neuropeptide Y (NPY) in the area of the hypothalamic paraventricular nucleus: Evidence for a NPY preterminal axon and cell system. Neuroscience 27:833–842; 1989.
42. Wahlestedt, C.; Yanaihara, N.; Hakanson, R. Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. Regul. Pept. 13:307–318; 1986.
43. Westfall, T. C.; Chye, K.; Chalcraft, A.; Henderson, K.; Del Valle, K.; Cochran-Tolvey, M.; Hess, L. In vivo effects of neuropeptide Y at the vascular neuroeffector junction. Ann. NY Acad. Sci. 611:143–154; 1990.
44. Yukimasa, N.; Schlatzinger, D. H.; Goldstein, M. The effect of neuropeptide Y (NPY) on stimulation-evoked release of [^{3}H]norepinephrine (NE) from rat hypothalamic and cerebral cortical tissue. Eur. J. Pharmacol. 143:263–266; 1987.

FOR THE NATIONAL PHASE PATENT OFFICES

SAMPLE PRELIMINARY AMENDMENT
Please amend per your Patent Office procedures

Dear Sir:

We noted a typographical error in the word 'Phospharidycholine', which needs to be corrected to the correct spelling of the word 'Phosphatidylcholine'.
Please amend the International Application as filed

☒ Amendments to the Description begin on page 1 of this paper. Please submit replacement pages if required.

☒ Amendments to the Claims are reflected in the listing of the claims which begins on page 5 of this paper. We have also filed an Amendment under Article 19 to amend the claims with the International Bureau of WIPO. Please determine if you need to also edit the claims, or only the Description.

Amendment to the Description/Specifications: correction of typographical error to the correct spelling of phosphatidylcholine:

On page 8, please edit line [13], amend the text as follows:

A satisfactory surface-active agent is selected from the group consisting of L-α-~~phospharidycholine~~ phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC), polysorbate 20 (Tween 20), polysorbate 80 (Tween 80), polyethylene glycol (PEG), cetyl alcohol, polyvinylpyrolidone (PVP), polyvinyl alcohol (PVA), lanolin alcohol, and sorbitan monooleate.

On page 43, please edit line no. [34] with the following rewritten paragraph:

Certain surface-active agents are readily incorporated within the mucosal delivery formulations and methods of the invention as mucosal absorption enhancing agents. These agents, which may be coordinately administered or combinatorially formulated with Y2 receptor-binding peptide proteins, analogs and mimetics, and other biologically active agents disclosed herein, may be selected from a broad assemblage of known surfactants. Surfactants, which generally fall into three classes: (1) nonionic polyoxyethylene ethers; (2) bile salts such as sodium glycocholate (SGC) and deoxycholate (DOC); and (3) derivatives of fusidic acid such as sodium taurodihydrofusidate (STDHF). The mechanisms of action of these various classes of surface-active agents typically include solubilization of the biologically active agent. For proteins and peptides which often form aggregates, the surface active properties of these absorption promoters can allow interactions with proteins such that smaller units such as surfactant coated monomers may be more readily maintained in solution. Examples of other surface-active agents are L-α-~~Phospharidycholine~~ Phosphatidylcholine Didecanoyl (DDPC) polysorbate 80 and polysorbate 20.These monomers are presumably more

On page 110, please edit Table No. [6] in the third row:

Table 6

Reagent	Grade	Vendor	mg/mL	%
Cholorbutanol, anhydrous	NF	Spectrum	5.0	0.50
Methyl-β-Cyclodextrin		Sigma	45	4.5
L-α-~~Phospharidycholine~~ Phosphatidylcholine Didecanoyl		Sigma	1	0.1

On page 110, please edit Table No. [7] in the third row:

Table 7

Reagent	Grade	Vendor	mg/ml	%
Cholorbutanol, anhydrous	NF	Spectrum	5.0	0.50
Methyl-β-Cyclodextrin		Sigma	45	4.5
L-α-Phospharidycholine Phosphatidylcholine Didecanoyl		Sigma	1	0.1

On page 122, please edit Table No. [8b] in the third row:

Example 8b
PYY Human Administration and Weight Loss

The following PYY Nasal formulation was made.

Reagent	Grade	Vendor	Cat #	Lot #	F.W.	mg/ml	%
Cholorbutanol, anhydrous	NF	Spectrum	CH123	RI1646	177.46	2.5	0.25
Methyl-β-Cyclodextrin		Sigma	C-4555	81K1179		45	4.5
L-□-Phospharidycholine Didecanoyl		Sigma	P-7081	55H8377	565.7	1	0.1

On page 147, please edit Table No. [12] in the third row:

Reagent	Grade	Vendor	mg/mL	%
Cholorbutanol, anhydrous	NF	Spectrum	5.0	0.50
Methyl-β-Cyclodextrin		Sigma	45	4.5
L-α-Phospharidycholine Phosphatidylcholine Didecanoyl		Sigma	1	0.1

On page 148, please edit Table No. [13] in the third row:

Table 13

Reagent	Grade	Vendor	mg/ml	%
Cholorbutanol, anhydrous	NF	Spectrum	5.0	0.50
Methyl-β-Cyclodextrin		Sigma	45	4.5
L-α-Phospharidycholine Phosphatidylcholine Didecanoyl		Sigma	1	0.1

On page 149, please edit Table No. [14] in the third row:

Table 14

Reagent	Grade	Vendor	mg/mL	%
Chlorbutanol, anhydrous	NF	Spectrum	5.0	0.50
Methyl-β-Cyclodextrin		Sigma	45	4.5
L-α-Phosphatidylcholine Phosphatidylcholine Didecanoyl		Sigma	1	0.1

On page 149, please edit Table No. [15] in the third row:

Table 15

Reagent	Grade	Vendor	mg/ml	%
Chlorbutanol, anhydrous	NF	Spectrum	5.0	0.50
Methyl-β-Cyclodextrin		Sigma	45	4.5
L-α-Phosphatidylcholine Phosphatidylcholine Didecanoyl		Sigma	1	0.1

Amendment to the Claims; correction of typographical error to the correct spelling of Phosphatidylcholine. This listing of claims will replace the claims in the application. Please submit replacement pages if necessary. This step may not be necessary if WIPO accepts our Amendment under Article 19.

WHAT IS CLAIMED IS:

17. The formulation of claim 16 wherein the surfactant is L-α-~~phospharidycholine~~ phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC).

57. The use of claim 56 wherein the surfactant is L-α-~~phospharidycholine~~ phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC).

IN THE INTERNATIONAL BUREAU

IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

International Application Number: PCT/US2003/040538

International Filing Date: 17 December 2003 (17.12.2003)

Applicant: Nastech Pharmaceutical Company Inc.

Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY

Our File No. 02-04PCT

International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
Switzerland

AMENDMENT TRANSMITTAL LETTER

Dear Sir:

Enclosed is:

1. An amendment for the above-identified PCT Application under article 19, 2 sheets.
2. 2 replacement claims sheets for the PCT Application.

Respectfully Submitted,

3 February 2005
Date

Paul G. Lunn
Agent for Applicant

Paul G. Lunn, Patent Counsel
Nastech Pharmaceutical Company Inc.
3450 Monte Villa Parkway, Bothell, WA 98021-8906
Tel. (425) 908-3643
Fax: (425) 908-3653
Plunn@nastech.com

I hereby certify that this Correspondence is being deposited with Federal Express in an envelope, label is addressed to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes, 1211 Geneva 20, Switzerland, on the date of _____February 2005.

Jeffrey L. Granger

IN THE INTERNATIONAL BUREAU

IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

International Application Number: PCT/US2003/040538

International Filing Date: 17 December 2003 (17.12.2003)

Applicant: Nastech Pharmaceutical Company Inc.

Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCED MUCOSAL DELIVERY OF Y2 RECEPTOR-BINDING PEPTIDES AND METHODS FOR TREATING AND PREVENTING OBESITY

Our File No. 02-04PCT

AMENDMENT UNDER ARTICLE 19

To the International Bureau of WIPO:

In response to the International Search Report dated 21 January 2005, we would like to amend the claims of the International Application under Rule 46.

☒ Amendments to the Claims 17 and 57, please amend the claims as follows:

17. The formulation of claim 16 wherein the surfactant is L-α-~~phospharidycholine~~ phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC).

57. The use of claim 56 wherein the surfactant is L-α-~~phospharidycholine~~ phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC).

We noted a typographical error in the word 'Phospharidycholine', which we want to correct to 'Phosphatidylcholine'. This was an inadvertent error. Please substitute this set of claims for the original set dated 17 December 2003. Enclosed are two new replacement pages 152 and 157.

REMARKS

We respectfully request that you please consider these new pages when you examine the application. They are being delivered by Federal Express prior to the two month deadline. We look forward to receiving the Written Opinion, PCT Rule 66 and the International Preliminary Examination Report.

Respectfully Submitted,

3 February 2005
Date

Paul G. Lunn, Patent Counsel
Reg. No. 32,743

Paul G. Lunn, Patent Counsel
Nastech Pharmaceutical Company Inc.
3450 Monte Villa Parkway, Bothell, WA 98021-8906
Tel. (425) 908-3643
Fax: (425) 908-3653
Plunn@nastech.com

Enclosures:
Claims Replacement pages (2 sheets)
Transmittal Form

synthesis, or (x) an inhibitor of cholesterol synthesis; or (xi) any combination of the membrane penetration enhancing agents recited in (i)-(x);

(h) a modulatory agent of epithelial junction physiology;

(i) a vasodilator agent;

(j) a selective transport-enhancing agent; and

(k) a stabilizing delivery vehicle, carrier, support or complex-forming species.

10. The formulation of claims 1-9 wherein the formulation is further comprised of at least two polyols.

11. The formulation of claim 10 wherein the polyols are lactose and sorbitol.

12. The formulation of claims 1-11 further comprised of a chelating agent.

13. The formulation of claim 12 wherein the chelating agent is ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA).

14. The formulation of claims 1-13 further comprised of a solubilizing agent.

15. The formulation of claim 14 wherein the solubilizing agent is a cyclodextrin.

16. The formulation of claims 1-15 further comprised of a surfactant.

17. The formulation of claim 16 wherein the surfactant is L-α-phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC).

18. The formulation of claims 1-17 wherein the Y2 receptor agonist is a PYY peptide.

19. The formulation of claim 18 wherein the PYY peptide is comprised of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-21.

50. The use of claims 44-49 wherein the medicament is further comprised of at least two polyols.

51. The use of claim 50 wherein the polyols are lactose and sorbitol.

52. The use of claims 44-49 wherein the medicament is further comprised of a chelating agent.

53. The use of claim 22 wherein the chelating agent is ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA).

54. The use of claims 44-53 further comprised of a solubilizing agent.

55. The use of claim 54 wherein the solubilizing agent is a cyclodextrin.

56. The use of claims 44-55 wherein the medicament is further comprised of a surfactant.

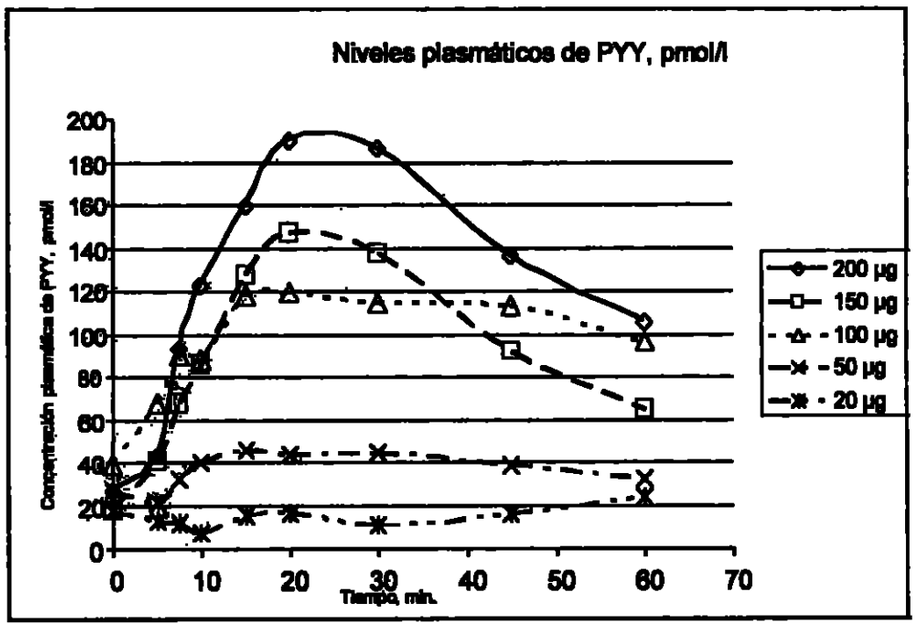
57. The use of claim 56 wherein the surfactant is L-α- phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC).

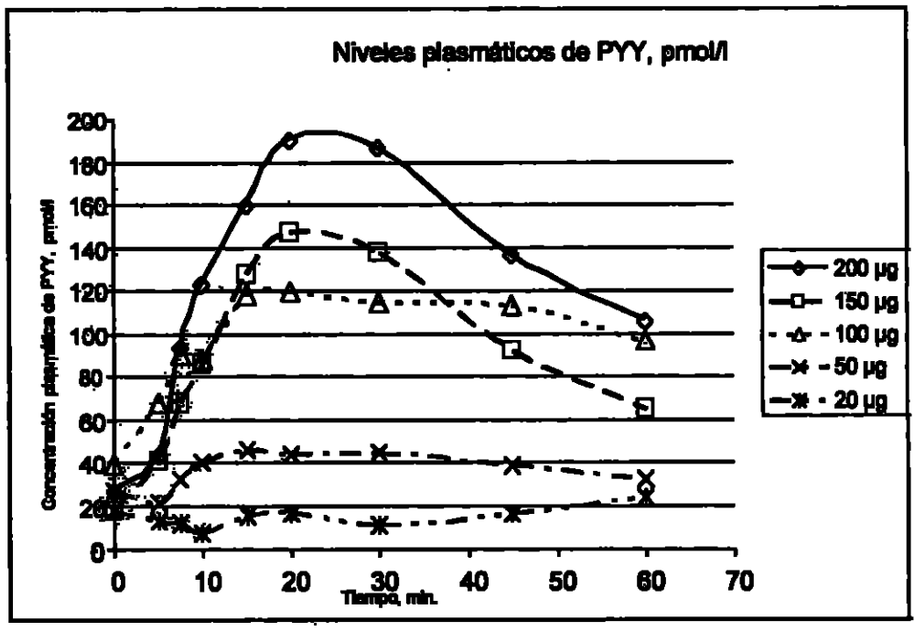
58. The use of claims 44-57 wherein the Y2 receptor agonist in the medicament is a PYY peptide.

59. The use of claim 58 wherein the PYY peptide is comprised of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-21.

60. The use of claim 58 wherein the PYY peptide is PYY3-36 (SEQ ID NO: 2).

61. The use of claim 60 wherein the medicament is further comprised of a solubilizing agent.


Niveles plasmáticos de PYY, pmol/l
Concentración plasmática de PYY, pmol/l
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Tiempo, min.
200 µg
150 µg
100 µg
50 µg
20 µg


Niveles plasmáticos de PYY, pmol/l
Concentración plasmática de PYY, pmol/l
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Tiempo, min.
200 µg
150 µg
100 µg
50 µg
20 µg

305
300

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 2005-36-16 15:38:32
Tramite : 911 PAT PATENT 279 FASE PRCI 411 PRESENTAC
Dependencia : 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN ✓ MODELO DE UTILIDAD	( )	(✓)
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	( )	(✓)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	( )	(✓)
- Descripción de la invención.	( )	(✓)
- Dibujos de ser estos pertinentes. ←	( )	(✓)
Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )
DISEÑO INDUSTRIAL ( )		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta	( )	( )
- la solicitud.		
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )
ESQUEMA DE TRAZADO ( )		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	( )	( )
Representación gráfica del esquema de trazado	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas.	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )

Firma Responsable: Claudia M Neva C.

Fecha:

304
301

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RUBIO CAMACHO HUMBERTO

REFERENCIA	Radicación No.	5 58645
	Solicitud internacional	US2003/040538
	Fecha inicio fase nacional	17/07/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	6923

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la traducción de las reivindicaciones tal como fueron presentadas. (Numeral 5.2.5, capítulo quinto del título décimo de la Circular Única de la SIC). Por cuanto las aportadas con la solicitud presentan deficiencias en su numeración.

2. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

4. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continua en la página siguiente...

302

305

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.:5 58645

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior AGOTAMIENTO fue notificado por fijación en lista de fecha 12 ABR. 2005
adpa1

HUMBERTO RUBIO & CIA.
ABOGADOS
Carrera 7 No. 74-64 Oficina 506
Teléfonos 313 24 08 – 313 24 10 – 313 24 23 – 313 17 99
Fax: (571) 313 16 – 47 – (571) 313 23 67
Email: rubiolaw@cablc.net.co
Apartado Aéreo 21848
Bogotá, D.C. - Colombia

506
303

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05058645 00000002 Folios: 3
Fecha (AMD): 2005-08-12 15:54:53
Tracite : 811 PCT-PATENT 379 FASE NACI 329 COMPLEME
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señor
SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

REF: Expediente No. **05-058.645**
Patente de Invención: **"COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA ADMINISTRACIÓN MEJORADA POR VÍA MUCOSA DE PEPTIDOS FIJADORES AL RECEPTOR DE Y2 Y METODOS PARA TRATAR Y PREVENIR LA OBESIDAD"**
Titular: **NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC.**

DESTINO: 09

HUMBERTO RUBIO CAMACHO, mayor de edad, domiciliado en Bogotá, D.C., identificado con la cédula de ciudadanía número 17.192.062 de Bogotá, abogado titulado con Tarjeta Profesional No. 50.007 del Consejo Superior de la Judicatura, actuando en carácter de **APODERADO** de la Sociedad **NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY INC.**, domiciliada en Bothell, Washington, Estados Unidos de América; encontrándome dentro del término legal; me permito anexar:

1.- Copia del Reporte de Examen Preliminar Internacional, junto con **anexos** y su respectiva **traducción** al Idioma Español, conforme lo señalado por el Art. 36.2.b del Tratado de PCT.

Teniendo en cuenta lo anterior, solicito respetuosamente continuar con el correspondiente trámite.

Del Señor Superintendente,

HUMBERTO RUBIO CAMACHO
C.C. 17.192.062 de Bogotá
T.P. 50.007 Consejo Superior de la Judicatura.
COD. 4134

05/1962-01/pl.-
cpfm.-

02-04PCT

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
PAUL G. LUNN
NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.
2350 MONTE VILLA PARKWAY
BOTHELL, WA 98021-8906

PCT

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)

RECEIVED
MAY 25 2005
NASTECH LEGAL

Applicant's or agent's file reference	Date of Mailing (day/month/year) 23 MAY 2005 REPLY DUE within 1 month/days from the above date of mailing

International application No.	International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
PCT/US03/40538	17 December 2003 (17.12.2003)	17 December 2002 (17.12.2002)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(7): A61K 38/00 and US Cl.: 514/12; 530/324

Applicant

NASTECH PHARMACEUTICAL COMPANY, INC.

1. This written opinion is the first (first, etc.) drawn by this International Preliminary Examining Authority.

2. This opinion contains indications relating to the following items:

- [X] I Basis of the opinion
- [ ] II Priority
- [ ] III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- [ ] IV Lack of unity of invention
- [X] V Reasoned statement under Rule 66.2 (a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- [ ] VI Certain documents cited
- [ ] VII Certain defects in the international application
- [ ] VIII Certain observations on the international application

3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension. See rule 66.2(d).

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4.
For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4 *bis*.
For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

4. The Final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: 17 April 2005 (17.04.2005).

Name and mailing address of the IPEA/US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Ray Tellez Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/IPEA/408 (cover sheet)(July 1998)

NASTECH LEGAL
DOCKETED
DUE 6/23/05

WRITTEN OPINION

International application No.
PCT/US03/40338

I. Basis of the opinion

1. With regard to the elements of the international application:*

☒ the international application as originally filed

☒ the description:
pages 1-149, as originally filed
pages NONE, filed with the demand
pages NONE, filed with the letter of _____.

☒ the claims:
pages 150-170, as originally filed
pages NONE, as amended (together with any statement) under Article 19
pages NONE, filed with the demand
pages NONE, filed with the letter of _____.

☒ the drawings:
pages 1-11, as originally filed
pages NONE, filed with the demand
pages NONE, filed with the letter of _____.

☒ the sequence listing part of the description:
pages 1-23, as originally filed
pages NONE, filed with the demand
pages NONE, filed with the letter of _____.

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule23.1(b)).

☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).

☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination(under Rules *55.2 and/or 55.3*).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the written opinion was drawn on the basis of the sequence listing:

☒ contained in the international application in printed form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages NONE _____

☐ the claims, Nos. NONE _____

☐ the drawings, sheets/fig NONE _____

5. ☐ This opinion has been drawn as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

** Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed."*

International application No.
PCT/US03/40338

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. STATEMENT

Novelty (N)	Claims 1-177	YES
	Claims NONE	NO
Inventive Step (IS)	Claims NONE	YES
	Claims 1-177	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims 1-177	YES
	Claims NONE	NO

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS

Claims 1-177 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Morley (Neuropsychobiology, 1989, vol. 21, pp-23-30) in view of Morley (brain Research, 1985, vol. 341, pp- 200-203. The instant invention is drawn to a transmucosal Y2 receptor binding peptide component of the peptide YY.

Morley teaches alterations in neuropeptide Y *and/or* peptide YY, see, i.e., for example, abstract and pp-27-28. Morley discloses peptide YY, a 36 amino acid residue, see, i.e., for example, abstract and pp-200-203.
Claims 1-177 as inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over the prior art as applied in the immediately preceding paragraph and further in view of Lelkowitz et al. (Peptides, 1991, vol. 12, pp-1251-1260).
Lelkowitz teaches analysis of neuropeptide Y induced feeding from discussion of Y1 and Y2 receptor, see, i.e., for example, abstract and pp- 1251- 1260.

If not expressly taught, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time the claimed invention was made to make result-effective adjustments in conventional working parameters (e.g., a transmucosal delivery) as a mere matter of judicious selection and routine optimization, based upon the beneficial teachings provided by the cited references. Thus the claimed invention as a whole is prima facie obvious over the cited references, especially in the absence of evidence to the contrary.

Claims 1-177 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

WRITTEN OPINION

International application No.
PCT/IB03/40338

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

TIME LIMIT:
The time limit set for response to a Written Opinion may not be extended. 37 CFR 1.484(d). Any response received after the expiration of the time limit set in the Written Opinion will not be considered in preparing the International Preliminary Examination Report.

1. A use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity or controlling eating in a patient, wherein mucosal administration of at least 50 µg of said peptide in said medicament raises plasma concentrations of said peptide in the subject by at least 5 pmole/l.

2. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 1, wherein administration of the medicament induces satiety.

3. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 1, wherein administration of the medicament induces loss of hunger.

4. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 1, wherein administration of the medicament induces loss of appetite.

5. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 1, wherein administration of the medicament is oral.

6. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 1, wherein administration of the medicament is bucal.

7. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 1, wherein administration of the medicament is intranasal.

8. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 1, wherein administration of the medicament decreases food intake.

9. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 1, wherein administration of the medicament promotes weight loss.

10. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 1, wherein administration of the medicament treats obesity.

11. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 1, wherein administration of the medicament prevents the onset or progression of obesity.

12. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 1, wherein administration of the medicament treats diabetes.

342
309

13. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 7, wherein about 50 μL to about 200 μL of the medicament is administered intranasally.

14. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 13, wherein about 3 μg – 10 μg peptide/kg body weight is administered.

15. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 13, wherein 50 μg to 800 μg peptide is administered.

16. A use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a mammal, wherein a time to maximum plasma concentration, T_{max}, of said peptide following mucosal administration of said medicament to the mammal is less than 30 minutes.

17. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 16, wherein T_{max} is about 20 minutes.

18. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 16, wherein mucosal administration of said peptide has an elimination half life of about 55 minutes.

19. A use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in mammals, wherein a C_{max} greater than 300 pg/ml results from a single mucosal administration of said medicament.

20. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 19, wherein the C_{max} is greater than 75 pmole/l.

21. A use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in mammals, wherein exposure of a mucosal epithelial cell layer to said medicament decreases electrical resistance across said layer by at least 100-fold.

22. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 21, wherein said mucosal epithelial cell layer is a monolayer of bronchial cells.

23. A use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in mammals, wherein exposure of a mucosal epithelial cell layer to said medicament increases permeation of the peptide across said layer at least 30-fold over simple buffer solutions.

24. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 23, wherein said mucosal epithelial cell layer is a monolayer of bronchial cells.

25. A use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in mammals, wherein mucosal administration of said medicament raises plasma concentrations of said peptide without causing an occurrence of adverse side effects such as nausea or light-headedness.

26. A use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in mammals, wherein the medicament is comprised of a solubilizing agent, a chelating agent, one or more polyols and said PYY peptide.

27. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 26, wherein the medicament is further comprised of a surface active agent.

28. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 26, wherein the solubilizing agent is a methyl-β-cyclodextrin.

29. The use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 27, wherein the surface-active agent is L-α-phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC).

30. A use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient, wherein the medicament is comprised of a solubilizing agent, a chelating agent, a polyol and a PYY peptide wherein the PYY peptide is comprised of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 3 and SEQ ID NOs: 90-105.

31. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 30, wherein the medicament is comprised of at least two polyols.

32. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 31 wherein the polyols are selected from the group consisting of sucrose, mannitol, sorbitol, lactose, L-arabinose, D-erythrose, D-ribose, D-xylose, D-mannose, trehalose, D-galactose, lactulose, cellobiose, gentibiose, glycerin and polyethylene glycol.

33. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 32, wherein the polyols are lactose and sorbitol.

34. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 30 wherein the chelating agent is ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) or ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA).

35. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 34, wherein the chelating agent is EDTA.

36. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 30 wherein the solubilizing agent is selected from the group consisting of a cyclodextran, hydroxypropyl-β-cyclodextran, sulfobutylether-β-cyclodextran and methyl-β-cyclodextrin.

37. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 36 wherein the solubilizing agent is a cyclodextrin.

38. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 30 wherein the composition is further comprised of a surface-active agent.

39. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 38 wherein the surface-active agent is selected from the group consisting of nonionic polyoxyethylene ether, bile salts such, sodium glycocholate (SGC), deoxycholate (DOC), derivatives of fusidic acid, sodium taurodihydrofusidate (STDHF), L-α-phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC), polysorbate 80 and polysorbate

20, a polyethylene glycol (PEG), cetyl alcohol, polyvinylpyrolidone (PVP), a polyvinyl alcohol (PVA), lanolin alcohol, and sorbitan monooleate.

40. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 39 wherein the surface-active agent is DDPC.

41. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 30 wherein the composition is an aqueous PYY composition further comprised of water.

42. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 41 wherein pH of the aqueous PYY composition is from about 3 to about 6.

43. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 42 wherein the pH of the aqueous PYY composition is 5.0± 0.3.

44. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient of claim 30 wherein the PYY peptide is comprised of PYY(3-36) (SEQ ID NO: 2).

45. A use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in a patient, wherein the medicament is comprised of a PYY peptide and one or more of the group consisting of a polyol, a solubilizing agent, and a chelating agent, wherein the PYY peptide is comprised of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 3 and SEQ ID NOs: 90-105.

46. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 45, wherein administration of the medicament induces satiety.

47. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 45, wherein administration of the medicament induces loss of hunger.

48. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 45, wherein administration of the medicament induces loss of appetite.

3/16
3/13

49. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 45, wherein administration of the medicament is oral.

50. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 45, wherein administration of the medicament is bucal.

51. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 45, wherein administration of the medicament is intranasal.

52. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 45, wherein administration of the medicament decreases food intake.

53. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 45, wherein administration of the medicament promotes weight loss.

54. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 45, wherein administration of the medicament treats obesity.

55. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 45, wherein administration of the medicament prevents the onset or progression of obesity.

56. The use of PYY peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity of claim 45, wherein administration of the medicament treats diabetes.

57. A transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation capable of raising the concentration of the Y2 receptor-binding peptide in the plasma of a mammal by at least 5 pmole per liter of plasma or more when a dose containing at least 50 μg of the Y2 receptor-binding agonist is administered transmucosally to said mammal.

58. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claim 57, wherein the Y2 receptor-binding peptide is selected from the group consisting of peptide YY (PYY), neuropeptide Y (NPY) and pancreatic peptide (PP).

59. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claims 57 and 58 further comprised of at least one mucosal delivery-enhancing agent selected from the group consisting of:

a. a solubilization agent;
b. a charge-modifying agent;
c. a pH control agent;
d. a degradative enzyme inhibitory agent;
e. a mucolytic or mucus clearing agent;
f. a ciliostatic agent;
g. a membrane penetration-enhancing agent selected from (i) a surfactant, (ii) a bile salt, (iii) a phospholipid additive, mixed micelle, liposome, or carrier, (iv) an alcohol, (v) an enamine, (vi) a NO donor compound, (vii) a long-chain amphipathic molecule (viii) a small hydrophobic penetration enhancer; (ix) sodium or a salicylic acid derivative; (x) a glycerol ester of acetoacetic acid (xi) a cyclodextrin or beta-cyclodextrin derivative, (xii) a medium-chain fatty acid, (xiii) a chelating agent, (xiv) an amino acid or salt thereof, (xv) an N-acetylamino acid or salt thereof, (xvi) an enzyme degradative to a selected membrane component, (xvii) an inhibitor of fatty acid synthesis, or (xviii) an inhibitor of cholesterol synthesis; or (xix) any combination of the membrane penetration enhancing agents recited in (i)-(xix);
h. a modulatory agent of epithelial junction physiology;
i. a vasodilator agent;
j. a selective transport-enhancing agent; and
k. a stabilizing delivery vehicle, carrier, support or complex-forming species.

60. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claim 57 wherein the formulation is an intranasal formulation.

61. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claims 57-60 wherein the formulation is further comprised of at least two polyols.

62. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claim 61 wherein the polyols are lactose and sorbitol.

63. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claims 57-90 further comprised of a chelating agent.

64. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claim 63 wherein the chelating agent is ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA).

65. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claims 57-64 further comprised of a solubilizing agent.

66. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claim 65, wherein the solubilizing agent is a cyclodextrin.

67. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claims 57-66, further comprising a surfactant.

68. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claim 67 wherein the surfactant is L-α-phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC).

69. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claim 57 wherein the Y2 receptor-binding peptide is PYY3-36.

70. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claim 68 wherein the formulation is further comprised of water.

71. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claim 69 wherein the formulation has a pH of about of about 3 to about 6.

72. The transmucosal Y2 receptor-binding peptide formulation of claim 70 wherein the pH is 5.0± 0.3.

73. A peptide YY (PYY) composition comprised of a solubilizing agent, a chelating agent, a polyol and a PYY peptide wherein the PYY peptide is comprised of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 3 and SEQ ID NOs: 90-105.

74. The PYY composition of claim 73 wherein the PYY composition is comprised of at least two polyols.

75. The PYY composition of claim 73 wherein the polyols are selected from the group consisting of sucrose, mannitol, sorbitol, lactose, L-arabinose, D-erythrose, D-

ribose, D-xylose, D-mannose, trehalose, D-galactose, lactulose, cellobiose, gentibiose, glycerin and polyethylene glycol.

76. The PYY composition of claim 74 wherein the polyols are lactose and sorbitol.

77. The PYY compostion of claim 73 wherein the chelating agent is ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) or ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA).

78. The PYY composition of claim 77 wherein the chelating agent is EDTA.

79. The PYY composition of claim 72 wherein the solubilizing agent is selected from the group consisting of a cyclodextran, hydroxypropyl-β-cyclodextran, sulfobutylether-β-cyclodextran and methyl-β-cyclodextrin.

80. The PYY composition of claim 78 wherein the solubilizing agent is a cyclodextrin.

81. The PYY composition of claim 72 wherein the composition is further comprised of a surface-active agent.

82. The PYY composition of claim 80 wherein the surface-active agent is selected from the group consisting of nonionic polyoxyethylene ether, bile salts such, sodium glycocholate (SGC), deoxycholate (DOC), derivatives of fusidic acid, sodium taurodihydrofusidate (STDHF), L-α-phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC), polysorbate 80 and polysorbate 20, a polyethylene glycol (PEG), cetyl alcohol, polyvinylpyrolidone (PVP), a polyvinyl alcohol (PVA), lanolin alcohol, and sorbitan monooleate.

83. The PYY composition of claim 81 wherein the surface-active agent is DDPC.

84. The PYY composition of claim 72 wherein the composition is an aqueous PYY composition further comprised of water.

85. The PYY composition of claim 83 wherein pH of the aqueous PYY composition is from about 3 to about 6.

86. The PYY composition of claim 85 wherein the pH of the aqueous PYY composition is 5.0± 0.3.

87. The PYY composition of claim 72 wherein the PYY peptide is comprised of PYY(3-36) (SEQ ID NO: 2).

88. A PYY composition comprised of methyl-β-cyclodextrin, EDTA, lactose, sorbitol, DDPC and a PYY peptide wherein the PYY peptide is comprised of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 3 and SEQ ID NOs: 90-105.

89. The PYY composition of claim 88 wherein the PYY peptide is comprised of PYY(3-36) (SEQ ID NO: 2).

90. An aqueous PYY(3-36) formulation capable of raising the concentration of the PYY(3-36) in the plasma of a patient by at least 5 pmole per liter of plasma when a dose containing at least 50 μg of PYY(3-36) is administered transmucosally to said mammal.

91. The PYY(3-36) formulation of claim 90, wherein about 50 to about 200 μL of the formulation is administered intranasally to said patient.

92. An aqueous PYY(3-36) formulation comprising PYY(3-36) and a solubilizing agent wherein the formulation is substantially free of a stabilizer that is a polypeptide or a protein.

93. The PYY(3-36) formulation of claim 91, further comprising a chelating agent, one or more polyols, and a pH 3.0 to about pH 6.5.

94. The PYY(3-36) formulation of claim 92, further comprising a surface-active agent.

95. The PYY(3-36) formulation of claim 93, wherein the formulation is about pH 5.0.

96. The PYY(3-36) formulation of claim 93, wherein the formulation is endotoxin-free.

97. The PYY(3-36) formulation of claim 92, wherein the formulation is comprised of at least two polyols.

98. The PYY(3-36) formulation of claim 96, wherein the polyols are selected from the group consisting of sucrose, mannitol, sorbitol, lactose, L-arabinose, D-erythrose, D-

ribose, D-xylose, D-mannose, trehalose, D-galactose, lactulose, cellobiose, gentibiose, glycerin and polyethylene glycol.

99. The PYY(3-36) formulation of claim 97, wherein the polyols are lactose and sorbitol.

100. The PYY(3-36) formulation of claim 92, wherein the chelating agent is ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) or ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA).

101. The PYY(3-36) formulation of claim 100, wherein the chelating agent is EDTA.

102. The PYY(3-36) formulation of claim 92, wherein the solubilizing agent is selected from the group consisting of a cyclodextran, hydroxypropyl-β-cyclodextran, sulfobutylether-β-cyclodextran and methyl-β-cyclodextrin.

103. The PYY(3-36) formulation of claim 101, wherein the solubilizing agent is a cyclodextrin.

104. The PYY(3-36) formulation of claim 92, wherein the surface-active agent is selected from the group consisting of nonionic polyoxyethylene ether, bile salts such, sodium glycocholate (SGC), deoxycholate (DOC), derivatives of fusidic acid, sodium taurodihydrofusidate (STDHF), L-α-phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC), polysorbate 80 and polysorbate 20, a polyethylene glycol (PEG), cetyl alcohol, polyvinylpyrolidone (PVP), a polyvinyl alcohol (PVA), lanolin alcohol, and sorbitan monooleate.

105. The PYY(3-36) formulation of claim 103, wherein the surface-active agent is DDPC.

106. The PYY(3-36) formulation of claim 92, wherein the formulation is further comprised of a preservative selected from the group consisting of chlorobutanol and benzalkonium chloride.

107. The PYY(3-36) formulation of claim 105, wherein the preservative is chlorobutanol.

108. The PYY(3-36) formulation of claim 103 or 107, wherein about 50 to about 200 μL of the formulation is administered intranasally.

109. The PYY(3-36) formulation of claim 92, wherein following mucosal administration of said formulation a time to maximum plasma concentration, T_{max}, of said peptide is less than 30 minutes.

110. The PYY(3-36) formulation of claim 109, wherein T_{max} is about 20 minutes.

111. The PYY(3-36) formulation of claim 109, wherein mucosal administration of said formulation raises plasma concentrations of said peptide has an elimination half life of about 55 minutes.

112. A use of PYY(3-36) peptide in the manufacture of a medicament for treating obesity in mammals, wherein a C_{max} greater than 300 pg/ml results from a single mucosal administration of said medicament.

113. The PYY(3-36) formulation of claim 112, wherein the C_{max} is greater than 75 pmole/l.

114. The PYY(3-36) formulation of claim 112, wherein exposure of a mucosal epithelial cell layer to said formulation decreases electrical resistance across said layer by at least 100-fold.

115. The PYY(3-36) formulation of claim 114, wherein said mucosal epithelial cell layer is a monolayer of bronchial cells.

116. The PYY(3-36) formulation of claim 112, wherein exposure of a mucosal epithelial cell layer to said formulation increases permeation of the peptide across said layer at least 30-fold over simple buffer solutions.

117. The PYY(3-36) formulation of claim 116, wherein permeation of the peptide across said layer at least 100-fold over simple buffer solutions.

118. The PYY(3-36) formulation of claim 117, wherein said mucosal epithelial cell layer is a monolayer of bronchial cells.

119. The PYY(3-36) formulation of claim 112, wherein the stability of the peptide in the formulation is at least 96% over one month at either 5 °C or 25 °C.

120. A peptide YY (PYY) composition comprised of a PYY peptide, and a stabilizer other than a polypeptide or protein, wherein the PYY peptide is comprised of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 3 and SEQ ID NOs: 90-105.

121. A PYY(3-36) formulation comprised of water, a Y2 receptor-binding peptide, one or more polyols and a surface-active agent wherein the formulation has a pH of about 3.0 to about 6.5, and the formulation is substantially free of a stabilizer that is a polypeptide or protein.

122. The aqueous formulation of claim 120 wherein the polyol is selected from the group consisting of lactose, sorbitol, trehalose, sucrose, mannose and maltose and derivatives and homologs thereof.

123. The PYY(3-36) formulation of claims 120-121 wherein the surface-active agent is selected from the group consisting of nonionic polyoxyethylene ether, bile salts such, sodium glycocholate (SGC), deoxycholate (DOC), derivatives of fusidic acid, sodium taurodihydrofusidate (STDHF), L-α-phosphatidylcholine didecanoyl (DDPC), polysorbate 80 and polysorbate 20, a polyethylene glycol (PEG), cetyl alcohol, polyvinylpyrolidone (PVP), a polyvinyl alcohol (PVA), lanolin alcohol, and sorbitan monooleate.

124. The PYY(3-36) formulation of claim 120-122 further comprising a solubilizing agent and a chelating agent.

125. The PYY(3-36) formulation of claim 123 wherein the solubilizing agent is selected from the group consisting of hydroxypropyl-β-cyclodextran, sulfobutylether-β-cyclodextran and methyl-β-cyclodextrin.

126. A PYY composition comprised of water, sodium citrate, citric acid, methyl-β-cyclodextrin, EDTA, lactose, sorbitol, DDPC and PYY(3-36) (SEQ ID NO: 2), wherein the formulation has a pH of about 5.0± 0.3.

127. The PYY composition of claim 126 further comprised of a preservative selected from the group consisting of chlorobutanol and benzalkonium chloride.

128. The composition of claim 127 wherein the preservative is chlorobutanol.

129. A PYY composition comprised of water, chlorobutanol, sodium citrate, citric acid, methyl-β-cyclodextrin, EDTA, lactose, sorbitol, DDPC and PYY(3-36) (SEQ ID NO: 2), wherein the formulation has a pH of about 5.0± 0.3.

1. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad o controlar la acción de comer en un paciente, en donde la administración por vía mucosa de por lo menos 50 µg de dicho péptido en dicho medicamento aumenta la concentración de dicho péptido en el plasma del paciente en por lo menos 5 pmol/l.

2. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la administración del medicamento provoca saciedad.

3. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la administración del medicamento provoca la pérdida del hambre.

4. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la administración del medicamento provoca la pérdida del apetito.

5. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la administración del medicamento es por vía oral.

6. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la administración del medicamento es vía bucal.

7. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la administración del medicamento es intranasal.

8. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la administración del medicamento disminuye el consumo de alimentos.

9. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la administración del medicamento provoca pérdida de peso.

10. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la administración del medicamento trata la obesidad.

11. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la administración del medicamento previene el principio o progresión de la obesidad.

12. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la administración del medicamento trata la diabetes.

13. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 7,en donde alrededor de 50 µL hasta alrededor de 200 µL del medicamento es administrado intranasalmente.

14. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 13, en donde alrededor de 3 µg – 10 µg de péptido/kg de peso corporal es administrado.

15. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 13, en donde 50 µg hasta 800 µg del péptido es administrado.

16. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para tratar la obesidad en un mamífero, en donde seguido a una administración vía mucosa de dicho medicamento se alcanza una concentración máxima en el plasma de dicho péptido en un tiempo, T_{max}, menor que 30 minutos.

17. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para tratar la obesidad de acuerdo a la reivindicación 16, en donde T_{max} es alrededor de 20 minutos.

18. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 16,. en donde la administración es por vía mucosa de dicho péptido y aumenta la concentración en el plasma de dicho péptido teniendo una vida media de eliminación de alrededor 55 minutos.

19. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en mamíferos, en donde resulta una C_{max} más grande que 300 pg/ml de una única administración vía mucosa de dicho medicamento.

20. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 19, en donde la C_{max} es más grande que 75 pmol/l.

21. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en mamíferos, en donde la exposición de una capa de células epiteliales de la mucosa a dicho medicamento disminuye la resistencia eléctrica a través de dicha capa en por lo menos 100 veces.

22. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 21, en donde dicha capa de células epiteliales de la mucosa es una monocapa de células bronquiales.

23. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en mamíferos, en donde la exposición de una capa de células epiteliales de la mucosa a dicho medicamento aumenta la penetración del péptido a través de dicha capa en por lo menos 30 veces con soluciones de buffer simples.

24. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 23, en donde dicha capa de células epiteliales de la mucosa es una monocapa de células bronquiales.

25. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en mamíferos, en donde la administración vía mucosa de dicho medicamento aumenta la concentración plasmática de dicho péptido sin provocar la presencia de efectos laterales adversos tales como náusea o mareo leve.

325

26. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en mamíferos, en donde el medicamento consta de un agente solubilizante, un agente quelante, uno o más polioles y dicho péptido PYY.

27. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 26, en donde el medicamento además comprende un agente tensoactivo.

28. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 26, en donde el agente solubilizante es una metil-β-ciclodextrina.

29. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 27, en donde el agente tensoactivo es L-α-fosfatidilcolina didecanoil (DDPC).

30. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente, en donde el medicamento comprende un agente solubilizante, un agente quelante, un poliol y un péptido PYY en donde el péptido consta de una secuencia de aminoácidos seleccionados desde el grupo consistente en SEQ ID NOs: 2, 3 y SEQ ID NOs: 90-105.

31. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 30, en donde el medicamento consta de por lo menos dos polioles.

32. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 31, en donde los polioles son seleccionados desde el grupo consistente en sacarosa, manitol, sorbitol, lactosa, L-arabinosa, D-eritrosa, D-ribosa, D-xilosa, D-manosa, trealosa, D-galactosa, lactulosa, celobiosa, gentibiosa, glicerina y polietilenglicol.

33. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 32, en donde los polioles son lactosa y sorbitol.

34. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 30, en donde el agente quelante es ácido es etilendiamintetraacético (EDTA) o ácido etilenglicoltetraacético (EGTA).

35. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 34, en donde el agente quelante es EDTA.

36. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 30, en donde el agente solubilizante es seleccionado desde el grupo consistente de un ciclodextrano, hidroxipropil-β-ciclodextrano, sulfobutilether-β-ciclodextrano y metil-β-ciclodextrina.

37. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 36, en donde el agente solubilizante es una ciclodextrina.

38. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 30, en donde la composición además comprende un agente tensoactivo.

39. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 38, en donde el agente tensoactivo es seleccionado desde el grupo consistente en éter polioxietileno no iónico, sales semejantes a las biliares, glicolato de sodio (SGC), deoxicolato (DOC), derivados de ácido fusídico, taurodihidrofusidato de sodio (STDHF), L-α-fosfatidilcolina didecanoil (DDPC), polisorbato 80 and polisorbato 20, un polietilenglicol (PEG), alcohol cetílico, polivinilpirrolidona (PVP), un alcohol polivinílico (PVA), alcohol de lanolina, y monooleato de sorbitán.

40. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 38, en donde el agente tensoactivo es DDPC.

41. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 30, en donde la composición es una composición de PYY acuosa, que contiene agua.

42. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 41, en donde el pH de la composición acuosa de PYY es de alrededor 3 hasta alrededor 6.

43. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 41, en donde el pH de la composición acuosa de PYY es 5.0± 0.3.

44. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente de acuerdo a la reivindicación 30, en donde el péptido PYY consta de PYY(3-36) (SEQ ID NO: 2).

45. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en un paciente, en donde el medicamento consta de un péptido PYY y uno o más del grupo compuesto por un poliol, un agente solubilizante, y un agente quelante, en donde el péptido PYY comprende una secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo consistente de SEQ ID NOs: 2, 3 y SEQ ID NOs: 90-105.

46. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 45, en donde la administración del medicamento provoca saciedad.

47. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 45, en donde la administración del medicamento provoca la pérdida del hambre.

48. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 45, en donde la administración del medicamento provoca la pérdida del apetito.

49. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 45, en donde la administración del medicamento es vía oral.

50. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 45, en donde la administración del medicamento es bucal.

51. .Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 45, en donde la administración del medicamento es intranasal.

52. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 45, en donde la administración del medicamento disminuye el consumo de alimentos.

53. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 45, en donde la administración del medicamento provoca pérdida de peso.

54. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 45, en donde la administración del medicamento trata la obesidad.

55. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 45, en donde la administración del medicamento previene el principio o progresión de la obesidad.

56. Uso del péptido PYY en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad de acuerdo a la reivindicación 45, en donde la administración del medicamento trata la diabetes.

57. Una formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 capaz de aumentar la concentración del péptido ligando del receptor Y2 en el plasma de un mamífero en al menos 5 pmoles por litro de plasma o más cuando se administra por vía

transmucosa una dosis que contiene por lo menos 50 µg del agonista del ligando del receptor Y2 a dicho mamífero

58. .La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a la reivindicación 57, en donde el péptido ligando del receptor Y2 es seleccionado del grupo consistente en péptido YY (PYY), neuropéptido Y (NPY) y péptido pancreático (PP).

59. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a la reivindicación 57 y 58 que además comprenda un agente que aumente la entrega a través de la mucosa seleccionado desde el grupo consistente en:

a. un agente solubilizante;
b. un agente modificador de carga;
c. un agente de control de pH;
d. un agente inhibidor de la degradación enzimática;
e. un agente mucolítico o un agente clarificador de moco;
f. un agente ciliostático;
g. un agente que aumente la penetración a través de la membrana elegido desde (i) un surfactante, (ii) una sal biliar, (iii) un aditivo fosfolipídico, micelas mixtas, liposoma, o un transportador, (iv) un alcohol, (v) una enamina, (vi) un compuesto donante de NO, (vii) una molécula de cadena larga anfipática (viii) un agente que aumente levemente la penetración hidrofóbica; (ix) un derivado de ácido salicílico o sodio; (x) un éster glicerol de ácido acetoacético (xi) un derivado de ciclodextrina o beta-ciclodextrina, (xii) un ácido graso de cadena media, (xiii) un agente quelante, (xiv) un aminoácido o sal del mismo, (xv) un ácido N-acetilamino o la sal del mismo, (xvi) una enzima que degrade un componente de membrana seleccionado, (xvii) un inhibidor de la síntesis de ácido graso, o (xviii) un inhibidor de la síntesis de colesterol; o (xix) cualquier combinación de los facilitadores de penetración de membrana citados en (i)-(xix);
h. un agente modulador de la fisiología de unión epitelial;
i. un agente vasodilatador;

j. un agente que aumente el transporte selectivo; y
k. un vehículo, transportador o soporte que estabilice la entrega o especies formadoras de complejos.

60. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a la reivindicación 57 , en donde la formulación es una formulación intranasal.

61. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a las reivindicaciones 57-60 , en donde la formulación además comprende por lo menos dos polioles.

62. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a la reivindicación 61 en donde los polioles son lactosa y sorbitol.

63. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a las reivindicaciones 57-60 además comprende un agente quelante.

64. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a la reivindicación 63 en donde el agente quelante es ácido etilendiamino tetracético (EDTA).

65. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a las reivindicaciones 57-64 además comprende un agente solubilizante.

66. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a la reivindicación 65 en donde el agente solubilizante es ciclodextrina.

67. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a las reivindicaciones 57-66 además comprende un surfactante.

68. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a la reivindicación 67 en donde el surfactante es L-α-fosfatidilcolina didecanoil (DDPC).

69. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a la reivindicación 57 en donde el péptido ligando del receptor Y2 es PYY3-36.

70. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a la reivindicación 68 en donde la formulación además comprende agua.

71. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a la reivindicación 69 en donde la formulación tiene un pH de alrededor 3 hasta alrededor 6.

72. La formulación transmucosa de péptido ligando del receptor Y2 de acuerdo a la reivindicación 70 en donde el pH es 5.0± 0.3.

73. Una composición de péptido YY (PYY) que comprende un agente solubilizante, un agente quelante, un poliol, y un péptido PYY en donde el péptido PYY comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada desde el grupo consistente en SEQ ID NOs: 2, 3 y SEQ ID NOs: 90-105.

74. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 73 en donde la composición PYY comprende por lo menos dos polioles.

75. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 73 en donde los polioles son seleccionados desde el grupo consistente en sacarosa, manitol, sorbitol, lactosa, L-arabinosa, D-eritrosa, D-ribosa, D-xilosa, D-manosa, trealosa, D-galactosa, lactulosa, celobiosa, gentibiosa, glicerina y polietilenglicol.

76. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 74 en donde los polioles son lactosa y sorbitol.

77. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 73 en donde el agente quelante es ácido etilendiamin tetraacético (EDTA) o ácido etilenglicol tetraacético (EGTA)

78. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 77 en donde el agente quelante es EDTA.

79. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 72 en donde el agente solubilizante es seleccionado desde el grupo consistente en ciclodextrano, hidroxipropil-β-ciclodextrano, sulfobutiléter-β-ciclodextrano y metil-β-ciclodextrina.

80. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 78 en donde el agente solubilizante es una ciclodextrina.

81. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 72 en donde la composición además comprende un agente tensoactivo.

82. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 80 en donde el agente tensoactivo es seleccionado desde el grupo consistente en éter polioxietileno no iónico, sales semejantes a las biliares, glicolato de sodio (SGC), deoxicolato (DOC), derivados de ácido fusídico, taurodihidrofusidato de sodio (STDHF), L-α-fosfatidilcolina didecanoil (DDPC), polisorbato 80 and polisorbato 20, un polietilenglicol (PEG), alcohol cetílico, polivinilpirrolidona (PVP), un alcohol polivinílico (PVA), alcohol de lanolina, y monooleato de sorbitán.

83. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 81 en donde el agente tensoactivo es DDPC.

84. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 72 en donde la composición es una composición acuosa de PYY, comprende además agua.

85. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 83 en donde el pH de la composición acuosa PYY es desde alrededor 3 hasta alrededor 6.

86. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 85 en donde el pH de la composición acuosa PYY es 5.0± 0.3.

87. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 72 en donde el péptido PYY consta de PYY(3-36) (SEQ ID NO: 2).

88. Una composición PYY que comprende metil-β-ciclodextrina, EDTA, lactosa, sorbitol, DDPC y un péptido PYY en donde el péptido consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada desde el grupo consistente en SEQ ID NOs: 2, 3 y SEQ ID NOs: 90-105.

89. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 88 en donde el péptido PYY consta de PYY(3-36) (SEQ ID NO: 2).

90. Una formulación acuosa de PYY(3-36) capaz de aumentar la concentración de PYY(3-36) en el plasma de un paciente en por lo menos 5 pmol por litro de plasma cuando una dosis que contiene por lo menos 50 µg de PYY(3-36) es administrada transmucosalmente a dicho mamífero.

91. La formulación PYY(3-36) de acuerdo a la reivindicación 90, en donde alrededor de 50 hasta alrededor 200 µL de la formulación es administrada intranasalmente a dicho paciente.

92. Una formulación acuosa de PYY(3-36) comprendiendo PYY(3-36) y un agente solubilizante en donde la formulación está sustancialmente libre de un estabilizador que es un polipéptido o una proteína.

93. La formulación de PYY(3-36) de acuerdo a la reivindicación 91, además comprende un agente quelante, uno o más polioles, y posee un pH 3.0 hasta alrededor un pH 6.5.

94. La formulación de PYY(3-36) de acuerdo a la reivindicación 92, además comprende un agente tensoactivo.

95. La formulación de PYY(3-36) de acuerdo a la reivindicación 93, en donde la formulación posee un pH de alrededor 5.0.

96. La formulación de PYY(3-36) de acuerdo a la reivindicación 93, en donde la formulación está libre de endotoxina.

97. La formulación de PYY(3-36) de acuerdo a la reivindicación 93, en donde la formulación consta de por lo menos dos polioles.

98. La formulación de PYY(3-36) de acuerdo a la reivindicación 96, en donde los polioles son seleccionados desde el grupo consistente en sacarosa, manitol, sorbitol, lactosa, L-arabinosa, D-eritrosa, D-ribosa, D-xilosa, D-manosa, trealosa, D-galactosa, lactulosa, celobiosa, gentibiosa, glicerina y polietilenglicol.

99. La formulación de PYY(3-36) de acuerdo a la reivindicación 97, en donde los polioles son lactosa y sorbitol.

334

100. La formulación de PYY(3-36) de acuerdo a la reivindicación 92, en donde el agente quelante es ácido etilendiamintetraacético (EDTA) o ácido etilenglicol tetraacético (EGTA).

101. La formulación de PYY(3-36) de acuerdo a la reivindicación 100, en donde el agente quelante es EDTA.

102. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 92 en donde el agente solubilizante es seleccionado desde el grupo consistente en ciclodextrano, hidroxipropil-β-ciclodextrano, sulfobutiléter-β-ciclodextrano y metil-β-ciclodextrina.

103. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 101 en donde el agente solubilizante es ciclodextrina.

104. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 92 en donde el agente tensoactivo es seleccionado desde el grupo consistente en éter polioxietileno no iónico, sales semejantes a las biliares, glicolato de sodio (SGC), deoxicolato (DOC), derivados de ácido fusídico, taurodihidrofusidato de sodio (STDHF), L-α-fosfatidilcolina didecanoil (DDPC), polisorbato 80 and polisorbato 20, un polietilenglicol (PEG), alcohol cetílico, polivinilpirrolidona (PVP), un alcohol polivinílico (PVA), alcohol de lanolina, y monooleato de sorbitán.

105. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 103 en donde el agente tensoactivo es DDPC.

106. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 92 en donde la formulación además consta de un preservante seleccionado del grupo consistente en clorobutanol y cloruro de benzalconio.

107. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 105 en donde el preservante es clorobutanol.

108. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 103 o 107 en donde alrededor de 50 hasta alrededor 200 µL de la formulación es administrada intranasalmente.

335

109. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 92, en donde seguido a una administración vía mucosa de dicha formulación se alcanza una concentración máxima en el plasma de dicho péptido en un tiempo, T_{max}, menor que 30 minutos.

110. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 109, en donde T_{max} es de alrededor 20 minutos.

111. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 109, en donde la administración es por vía mucosa de dicha formulación y aumenta la concentración en el plasma de dicho péptido teniendo una vida media de eliminación de alrededor 55 minutos.

112. Uso del péptido PYY(3-36) en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad en mamíferos, en donde resulta una C_{max} más grande que 300 pg/ml de una única administración por vía mucosa de dicho medicamento.

113. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 112, en donde la C_{max} es más grande que 75 pmol/l.

114. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 112, en donde la exposición de una capa epitelial de la mucosa a dicha formulación disminuye la resistencia eléctrica a través de dicha capa por lo menos 100 veces.

115. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 114, en donde dicha capa de células epiteliales de la mucosa es una monocapa de células bronquiales.

116. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 112, en donde la exposición de una capa de células epiteliales de la mucosa a dicha formulación aumenta la penetración del péptido a través de dicha capa por lo menos 30 veces sobre soluciones buffer simples.

117. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 116, en donde la penetración del péptido a través de dicha capa es por lo menos 100 veces sobre soluciones buffer simples.

118. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 117, en donde dicha capa de células epiteliales de la mucosa es una monocapa de células bronquiales.

119. La formulación PYY (3-36) de acuerdo a la reivindicación 112, en donde la estabilidad del péptido en la formulación es por lo menos 96% durante un mes ya sea a 5 °C o 25 °C.

120. Una composición peptídica YY (PYY) que consta de un péptido, y un estabilizador distinto a un polipéptido o proteína, en donde el péptido consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada desde el grupo consistente en SEQ ID NOs: 2, 3 y SEQ ID NOs: 90-105.

121. Una formulación PYY(3-36) que comprende agua, un péptido ligando del receptor Y2, uno o más polioles y un agente superficial activo en donde la formulación posee un pH de alrededor 3,0 hasta alrededor 6,5, y la formulación está sustancialmente libre de un estabilizador que es un polipéptido o proteína.

122. La formulación acuosa de acuerdo a la reivindicación 120 en donde el poliol es seleccionado desde el grupo consistente en lactosa, sorbitol, trealosa, sacarosa, manosa y maltosa y derivados u homólogos de ellos mismos.

123. La formulación acuosa PYY(3-36) de acuerdo a las reivindicaciones 120-121 en donde el agente tensoactivo es seleccionado desde el grupo consistente en éter polioxietileno no iónico, sales semejantes a las biliares, glicolato de sodio (SGC), deoxicolato (DOC), derivados de ácido fusídico, taurodihidrofusidato de sodio (STDHF), L-α-fosfatidilcolina didecanoil (DDPC), polisorbato 80 and polisorbato 20, un polietilenglicol (PEG), alcohol cetílico, polivinilpirrolidona (PVP), un alcohol polivinílico (PVA), alcohol de lanolina, y monooleato de sorbitán.

124. La formulación PYY(3-36) de acuerdo a las reivindicaciones 120-122, además comprende un agente solubilizante y un agente quelante

125. La formulación PYY(3-36) de acuerdo a la reivindicación 123 en donde el agente solubilizante es seleccionado desde el grupo consistente en hidroxipropil-β-ciclodextrano, sulfobutiléter-β-ciclodextrano y metil-β-ciclodextrina.

126. Una composición PYY que comprende agua, citrato de sodio, ácido cítrico, metil-β-ciclodextrina, EDTA, lactosa, sorbitol, DDPC y PYY(3-36) (SEQ ID NO: 2), en donde la formulación tiene un pH de alrededor 5.0± 0.3.

127. La composición PYY de acuerdo a la reivindicación 126, además consta de un preservante seleccionado desde el grupo consistente en clorobutanol y cloruro de benzalconio.

128. La composición de acuerdo a la reivindicación 127 en donde el preservante es clorobutanol.

129. Una composición PYY que comprende agua, clorobutanol, citrato de sodio, ácido cítrico, metil-β-ciclodextrina, EDTA, lactosa, sorbitol, DDPC y PYY(3-36) (SEQ ID NO: 2), en donde la formulación posee un pH de alrededor 5.0± 0.3.