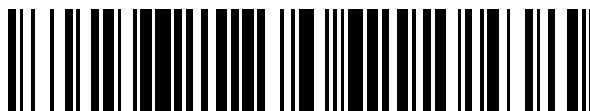


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 626**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/34** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05716551 .6**  
96 Fecha de presentación: **07.04.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1743033**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2007**

54 Título: **GM3 SINTETASA COMO DIANA TERAPÉUTICA EN LAS COMPLICACIONES MICROVASCULARES DE LA DIABETES.**

30 Prioridad:  
**07.05.2004 FR 0404971**  
**17.12.2004 FR 0413530**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.03.2012**

73 Titular/es:  
**MERCK PATENT GMBH**  
**FRANKFURTER STRASSE 250**  
**64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:  
**ELBAWAB, Samer;**  
**MASSON, Elodie;**  
**RUGGIERO, Daniel;**  
**WIERNSPERGER, Nicolas;**  
**LAGARDE, Michel y**  
**TRONCY, Lysiane**

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

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

ES 2 375 626 T3

## DESCRIPCIÓN

Gm3 sintetasa como diana terapéutica en las complicaciones microvasculares de la diabetes

La invención se refiere al uso de inhibidores de la GM3 sintetasa para el tratamiento de las complicaciones microvasculares de la diabetes y a un método de selección de inhibidores de esta enzima, y en el que la complicación microvascular de la diabetes es la nefropatía diabética.

La microangiopatía es una complicación crónica de la diabetes, caracterizada por cambios estructurales y funcionales en los microvasos. La retina y el riñón son los dos objetivos principales del proceso patológico, conduciendo a retinopatía diabética y nefropatía diabética.

La retinopatía diabética es la segunda causa de ceguera en los países desarrollados. Tras unos veinte años de enfermedad, casi todos los pacientes con diabetes de tipo 1 y más del 60% de pacientes con diabetes de tipo 2 sufren de esta complicación microvascular (Fong y col., 2003). Los capilares experimentan cambios estructurales progresivos, como engrosamiento de la membrana basal y pérdida específica de pericitos, y las posteriores modificaciones de la proliferación y función de las células endoteliales. Estos cambios, combinados con isquemia, dañan la pared de los microvasos y favorecen una permeabilidad capilar excesiva, conduciendo a edemas, microaneurismas y hemorragias que suponen un riesgo para la vista (Forrester y col., 1997).

La nefropatía afecta del 50 al 60% de los pacientes con un historial de diabetes de 20 a 30 años. Se considera una causa principal de mortalidad en estos pacientes (Krolewski y col., 1997). Una de las características principales del proceso patológico es la hiperplasia glomerular, que es una consecuencia del engrosamiento de la membrana basal y la expansión del mesangio debido a la hipertrofia de las células mesangiales en crecimiento detenido y debido a la acumulación de proteínas de la matriz extracelular. Estos eventos, combinados con deficiencias hemodinámicas, inducen esclerosis glomerular, filtración glomerular o un nivel modificado de filtración glomerular y microalbuminuria, conduciendo a una insuficiencia renal grave (Wolf y col., 2000).

El riesgo para un sujeto diabético de desarrollar nefropatía se evalúa generalmente comprobando la microalbuminuria. Las medidas preventivas o terapéuticas usadas normalmente para retrasar la aparición y/o progresión de la nefropatía diabética incluyen la monitorización de la glucemia, la administración de antihipertensivos, especialmente inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, la adopción de una dieta baja en proteínas o la administración de hipolipidémicos como estatinas (Ripin y col., 2004).

Dado su impacto en términos económicos y de salud pública, la identificación de nuevas vías de prevención y tratamiento de las complicaciones microvasculares de la diabetes constituye un reto terapéutico muy importante.

Aunque la base celular y molecular de la patogénesis de la retinopatía diabética y la nefropatía diabética no se ha elucidado por completo, la regulación de la proliferación celular y las interacciones célula-célula y célula-matriz parecen jugar un papel importante. Se han propuesto numerosas hipótesis bioquímicas para explicar los mecanismos involucrados en el desarrollo de las complicaciones microvasculares de la diabetes, especialmente la formación de productos finales de glucación avanzada (AGE, por las siglas en inglés de advanced glycation end products) (Singh y col., 2001).

Los azúcares reductores como la glucosa reaccionan no enzimáticamente con los grupos amino de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos vía una serie de reacciones que forman bases de Schiff y productos de Amadori, produciendo AGE al final. La glucación, que depende de la concentración de glucosa, se incrementa en la diabetes. Esto sucede preferentemente con proteínas de vida larga expuestas a la glucosa sanguínea, tales como las proteínas de la matriz extracelular o las proteínas circulantes, modificando de este modo su estructura y su función.

Además, los AGE se pueden unir a receptores de membrana para inducir respuestas celulares vía generación de estrés oxidativo (Lal y col., 2002; Schmidt y col., 1994), la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (Singh y col., 2001; Schmidt y col., 1994) y la expresión de genes diferentes tales como citoquinas proinflamatorias o moléculas de adhesión (Hofmann y col., 1999; Schmidt y col., 1995).

Todas estas modificaciones tienen efectos biológicos importantes que pueden explicar muchos de los cambios observados en las complicaciones microvasculares de la diabetes, especialmente el aumento en la permeabilidad vascular, el aumento en la producción y rigidez de la matriz extracelular y el cambio en las interacciones célula-matriz y en el crecimiento celular (Stitt y col., 2003). De hecho, muchos estudios *in vivo* e *in vitro* han sugerido que los AGE están involucrados en el desarrollo de la retinopatía y la nefropatía asociadas a la diabetes (Stitt y col., 2003; Wautier y col., 2001).

- Los gangliósidos son glucoesfingolípidos que están concentrados en microdominios de la membrana plasmática y se caracterizan por la presencia de ácido siálico en su estructura. Las sililaciones sucesivas de la lactosilceramida producen monosialogangliósidos (GM3), disialogangliósidos (GD3) y trisialogangliósidos (GT3). Estos gangliósidos se convierten después, por la acción secuencial de glucosiltransferasas y sialiltransferasas, en gangliósidos más complejos, formando las series a, b y c, respectivamente (Van Echten y col., 1993). Los gangliósidos son conocidos por jugar un papel importante en el reconocimiento célula-célula y célula-matriz mediante la interacción con los receptores de adhesión como las integrinas o las proteínas de la matriz (colágeno y fibronectina) o con otros glucoesfingolípidos. También los gangliósidos, en particular los de serie a, han sido implicados en la regulación de la proliferación celular vía modulación de la actividad de diferentes factores de crecimiento (Hakomori y col., 1990).
- Se ha publicado que los AGE inducen modificaciones en el metabolismo de los glucoesfingolípidos en pericitos y células endoteliales de los microvasos de la retina (Natalizio y col., 2001). Estos cambios están acompañados especialmente por un aumento en la activación de la GM3 sintetasa (A. Daleme-Natalizio, tesis doctoral en el Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 8 de febrero de 2002).
- Ahora los inventores han mostrado que los gangliósidos están involucrados en los efectos mediados por AGE que conducen a los procesos patológicos RD y ND. Así, los inventores han demostrado que la inhibición por AGE de la proliferación de los pericitos retinianos y las células mesangiales renales (los dos tipos de células involucradas en la retinopatía diabética y la nefropatía diabética, respectivamente) se basa al menos parcialmente en el aumento de la actividad GM3 sintetasa y en la acumulación de gangliósidos de serie a. Un aumento en la actividad GM3 sintetasa también se ha observado en un modelo de ratón diabético al que se han administrado AGE. Estos resultados identifican a la GM3 sintetasa y a los gangliósidos de serie a como dianas para el tratamiento de las complicaciones microvasculares de la diabetes.

#### Definiciones

- La expresión "complicación microvascular de la diabetes" indica una complicación crónica de la diabetes de tipo I o II que se caracteriza por cambios estructurales y funcionales en los microvasos. Estas complicaciones incluyen principalmente la retinopatía diabética, la nefropatía diabética y la neuropatía diabética. La neuropatía periférica afecta a los nervios de las extremidades del cuerpo, siendo una de sus formas más extendidas la pérdida de sensibilidad en los pies. El malestar y el dolor (parestesia e hiperestesia) también son síntomas muy comunes y debilitantes. Esta neuropatía puede causar úlceras en el pie y daños serios de los tejidos, que pueden necesitar amputación.
- Dentro del marco de la presente solicitud de patente, la expresión "GM3 sintetasa" indica la enzima lactosilceramida  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (EC 2.4.99.9), que cataliza la transferencia de un resto de ácido siálico de un dador de ácido siálico al grupo 3-hidroxilo de un resto galactosa de un aceptor de ácido siálico. Preferentemente el dador de ácido siálico es el ácido CMP-N-acetilneuramínico y el aceptor de ácido siálico es un resto galactosa de un glucolípido como la lactosilceramida (LacCer). La reacción catalizada puede ser  $\text{CMP-N-acetilneuraminato} + \beta\text{-D-galactosil-1,4-}\beta\text{-D-glucosilceramida} = \text{Cmp} + \alpha\text{-N-acetilneuraminil-2,3-}\beta\text{-D-galactosil-1,4-}\beta\text{-D-glucosilceramida}$ . Preferiblemente, la GM3 sintetasa según la invención es una GM3 sintetasa humana o una GM3 sintetasa de un mamífero no humano, como un roedor (p. ej., rata o ratón), un felino, un canino, un primate (mono), etc. Por ejemplo, los genes que codifican para las GM3 sintetasas humana y murina han sido depositados respectivamente en la base de datos Genbank con los números de acceso NM\_003896 (SEC ID N°. 1) y NM\_011375 (SEC ID N°. 3). Las secuencias de aminoácidos correspondientes se describen en las secuencias SEC ID N°. 2 y SEC ID N°. 4, respectivamente.

- Dentro del marco de la presente solicitud de patente, un "inhibidor de la GM3 sintetasa" indica un compuesto que: (i) inhibe la actividad y/o la expresión de la GM3 sintetasa *in vitro* y/o *in vivo*; y/o (ii) bloquea la transferencia de un resto de ácido siálico de un dador de ácido siálico a un grupo 3-hidroxilo de un resto galactosa de un aceptor de ácido siálico, especialmente para formar gangliósidos GM3; y/o (iii) bloquea la síntesis intracelular de gangliósidos GM3. La inhibición o bloqueo puede ser parcial o total.

"Gangliósido" se entiende como un glucoesfingolípidos que comprende uno o varios restos de ácido siálico. Más específicamente, los "gangliósidos de serie a" indican gangliósidos que llevan sólo un resto de ácido siálico en la galactosa de la lactosilceramida. Los gangliósidos de serie a incluyen los compuestos GM3 ( $\alpha\text{-N-acetilneuraminil-2,3-}\beta\text{-D-galactosil-1,4-}\beta\text{-D-glucosilceramida}$ ), GM2, GM1, GD1a y GT1a (véase también la Figura 2).

- Aplicación terapéutica

Los inventores han demostrado que los productos finales de glucación avanzada (AGE) involucrados en el desarrollo de las complicaciones microvasculares de la diabetes median sus efectos vía un aumento en la actividad de la enzima GM3 sintetasa.

Por consiguiente, la invención propone un método para el tratamiento de la complicación microvascular de la diabetes en el que se administra al paciente un inhibidor de la expresión o de la actividad del gen de la GM3 sintetasa y en el que la complicación microvascular de la diabetes es la nefropatía diabética.

- 5 La invención también se refiere al uso de un inhibidor de la expresión o de la actividad del gen de la GM3 sintetasa para la fabricación de un fármaco deseado para el tratamiento de una complicación microvascular de la diabetes y en el que la complicación microvascular de la diabetes es la nefropatía diabética.

Dentro del marco de la invención, la expresión "tratamiento" indica el tratamiento preventivo o curativo de una enfermedad, es decir, el acto de revertir, enlentecer o inhibir la progresión, o la prevención del desarrollo de una enfermedad o de uno o varios síntomas asociados a esta enfermedad.

- 10 La expresión "paciente" indica un humano o un mamífero no humano, como un ratón, rata, perro, gato, cerdo o mono, que está afectado o es propenso a verse afectado por una complicación microvascular de la diabetes. Preferiblemente, un paciente en términos de la invención es un sujeto en el que se ha detectado diabetes.

Preferiblemente, el inhibidor es un inhibidor específico de la expresión o la actividad del gen de la GM3 sintetasa, es decir, un inhibidor sustancialmente desprovisto de efecto en genes o proteínas distintos de la GM3 sintetasa.

- 15 En una primera realización, el método o el uso según la invención emplea un inhibidor de la expresión del gen y/o proteína GM3 sintetasa. Un inhibidor de este tipo puede inhibir o reprimir la transcripción del gen y/o la traducción del mensajero transcrito (ARNm). Los expertos en la materia son capaces de escoger la estrategia más adecuada para este propósito.

- 20 Se puede usar una estrategia antisentido para inhibir la expresión de la GM3 sintetasa. Este enfoque puede utilizar, por ejemplo, ácidos nucleicos antisentido o ribozimas que bloquean la transcripción de un ARNm específico, bien enmascarando el ARNm con un ácido nucleico antisentido, bien escindiendo el ARNm con una ribozima. En el contexto de la presente invención, "antisentido" incluye ampliamente interacciones ARN-ARN, interacciones ARN-ADN, ribozimas, ARN de interferencia, aptámeros e inhibición mediada por ARNseH. Una terapia antisentido emplea generalmente un vector, como un vector viral, que lleva la secuencia antisentido, siendo entonces la inhibición generalmente estable ya que el vector se integrará en el genoma. También es posible usar oligonucleótidos antisentido, que logran una inhibición transitoria de la expresión. Una presentación general de la técnica antisentido se puede encontrar en "Antisense DNA and RNA" (Cold Spring Harbor Laboratory, D. Melton, ed., 1988).

Preferiblemente, el inhibidor de la expresión del gen y/o proteína GM3 sintetasa se selecciona por consiguiente del grupo que comprende ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, ARN de interferencia y aptámeros.

- 30 Un "ácido nucleico antisentido" o un "oligonucleótido antisentido" es una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla, la cual cuando se hibrida en condiciones citoplasmáticas con una molécula de ADN o ARN complementaria inhibe la función de esta última. Los ácidos nucleicos antisentido pueden ser codificados por un gen recombinante para su expresión en una célula (véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. nº 5814500 y 5811234), o se pueden preparar mediante síntesis (véase también, por ejemplo, la patente de EE. UU. nº 5780607). Los ácidos nucleicos antisentido de la GM3 sintetasa se pueden diseñar para hibridar específicamente con una secuencia homóloga que codifica para una GM3 sintetasa, p. ej. para hibridar específicamente con la secuencia de la GM3 sintetasa humana mostrada en la SEC ID Nº. 1 o la secuencia de la GM3 sintetasa murina mostrada en la SEC ID Nº. 3.

- 40 Una "secuencia capaz de hibridar específicamente con una secuencia de ácido nucleico" indica una secuencia que hibrida con una secuencia de ácido nucleico de referencia en condiciones muy rigurosas (Sambrook y col., 1989). Los parámetros que definen las condiciones de rigurosidad dependen de la temperatura a la que se separan el 50% de las hebras complementarias ( $T_m$ ) y de la fuerza iónica. Para las secuencias que comprenden más de 30 bases,  $T_m$  se define mediante la ecuación siguiente:  $T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentración de catión}) - 0,63(\% \text{formamida}) - (600/\text{número de bases})$  (Sambrook y col., 1989). Para secuencias inferiores a 30 bases,  $T_m$  se define mediante la ecuación siguiente:  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ . En condiciones de rigurosidad apropiadas donde las secuencias no específicas no se hibridan, la temperatura de hibridación puede ser preferiblemente de 5 a 10°C inferior a la  $T_m$  y los tampones de hibridación usados son preferiblemente soluciones de elevada fuerza iónica, como solución 6x SSC. Por ejemplo, las condiciones de hibridación altamente rigurosas corresponden a  $T_m$  y condiciones iónicas como las obtenidas con una solución que contiene formamida al 50% y SCC 5x o 6x (NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015 M).

El ácido nucleico antisentido según la invención se puede usar como tal, por ejemplo tras la inyección en el humano o el animal, para inducir protección o para tratar una complicación microvascular de la diabetes. En particular, se pueden inyectar en forma de ADN desnudo según la técnica descrita en la solicitud de patente internacional

WO 90/11092. También se pueden administrar en forma de un complejo con, p. ej., dextrano-DEAE (Pagano y col., 1967), proteínas nucleares (Kaneda y col., 1989) o lípidos (Felgner y col., 1987), en forma de liposomas (Fraleigh y col., 1980) o mediante otros métodos similares.

- 5 Preferiblemente las secuencias de ácido nucleico forman parte de un vector. El uso de un vector permite mejorar la administración del ácido nucleico a las células que se tienen que tratar y mejorar también la estabilidad en estas células, permitiendo un efecto terapéutico prolongado.

El término "vector" indica el vehículo vía el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN en una célula huésped de modo que transforme al huésped y se obtenga la expresión (es decir, la transcripción y la traducción) de la secuencia que se ha introducido. Los vectores incluyen plásmidos, fagos, virus, etc.

- 10 Las "ribozimas" son moléculas de ARN que tienen la capacidad de escindir específicamente otras moléculas de ARN de cadena sencilla de un modo bastante similar a las endonucleasas de restricción de ADN. Las ribozimas fueron descubiertas al demostrar que ciertos ARNm tienen la capacidad de escindir sus propios intrones. Al modificar la secuencia de nucleótidos de estas ribozimas, es posible producir moléculas que reconocen secuencias de nucleótidos específicas en moléculas de ARN y las escinden (Cech, 1989). A causa de su especificidad, sólo se desactivan los ARNm que tienen una secuencia particular.

- 15 La inhibición reversible de la transcripción de la GM3 sintetasa se puede conseguir también usando ARN de interferencia. La técnica del ARN de interferencia (ARNi) impide la expresión de genes usando pequeñas moléculas de ARN, como los "ARN de interferencia pequeños" (ARNip). Esta técnica se beneficia del hecho que el ARN de interferencia es un mecanismo biológico natural de la extinción de genes en la mayoría de las células de numerosos organismos vivos, desde las plantas pasando por los insectos hasta los mamíferos (Sharp, 2001). El ARN de interferencia impide la producción de una proteína funcional a partir de un gen, conduciendo a la destrucción del ARNm intermediario (Bass, 2000; Sharp, 2001). Los ARNip se pueden usar en forma desnuda o incorporados en un vector. Preferiblemente, un ARN de interferencia que bloquea la transcripción de la GM3 sintetasa puede tener la secuencia GGGUUAUUCUGAACAUUUt (SEC ID N° 5).

- 25 También se pueden usar aptámeros para inhibir la transcripción de la GM3 sintetasa. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos que tienen la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas objetivo con elevada afinidad y especificidad. Dichos ligandos se pueden aislar a partir de una biblioteca de secuencias aleatorias mediante un método de selección llamado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), como se describe en Tuerk y Gold (1990). La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener por síntesis de ADN mediante química combinatoria. En dicha biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal (opcionalmente modificado químicamente) correspondiente a una secuencia única. Las posibles modificaciones, aplicaciones y ventajas de esta clase de moléculas han sido revisadas por Jayasena (1999).

- 30 En otra realización, el método o uso según la invención implica el uso de un inhibidor de la actividad de la proteína GM3 sintetasa. Los inhibidores de la actividad GM3 sintetasa se pueden identificar fácilmente por métodos de selección, incluyendo los ensayos celulares o bioquímicos *in vitro*, como se describe en la presente solicitud de patente. Un inhibidor puede ser de naturaleza peptídica, un peptidomimético o un mimético no peptídico (Rubin-Carrez, 2000), como una molécula orgánica pequeña capaz de interferir con la actividad enzimática de la GM3 sintetasa, por ejemplo bloqueando o reduciendo la transferencia de un grupo de ácido siálico de un dador a un aceptor de ácido siálico y/o bloqueando o reduciendo la síntesis de GM3.

- 35 El inhibidor de la GM3 sintetasa también puede ser un anticuerpo, particularmente un inhibidor dirigido contra la GM3 sintetasa humana mostrada en la secuencia SEC ID N° 2 o la GM3 sintetasa murina mostrada en la secuencia SEC ID N° 4. Dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales o fragmentos de los mismos, o anticuerpos quiméricos, especialmente aquellos que se han humanizados o están formando inmunoconjugados.

- 40 Los anticuerpos policlonales se pueden obtener por procedimientos habituales a partir del suero de un animal inmunizado contra una proteína. Por ejemplo, el antígeno usado puede ser un complejo peptídico apropiado como un complejo de GM3 sintetasa unido vía un resto reactivo a una proteína (como la hemocianina de "lapa californiana", KLH, del inglés keyhole limpet haemocyanin) u otro péptido. Los conejos se inmunizan con el equivalente de 1 mg del antígeno peptídico según el procedimiento descrito por Benoit y col. (1982). En intervalos de cuatro semanas los animales se tratan con inyecciones de 200 µg de antígeno y se sangran 10 a 14 días después.
- 45 Tras la tercera inyección, se examina el antisero para determinar su capacidad de unión al antígeno peptídico marcado radiactivamente con yodo, preparado por el método de la cloramina-T y, después, se purifica por cromatografía en una columna de intercambio iónico de carboximetilcelulosa (CMC). Después, las moléculas de anticuerpo son recogidas de los mamíferos y se aíslan a la concentración deseada por métodos bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo usando DEAE Sephadex para obtener la fracción IgG. Para aumentar la especificidad del suero policlonal, los anticuerpos se pueden purificar mediante cromatografía de inmunoafinidad
- 50
- 55

usando polipéptidos inmunizantes en la fase sólida. El anticuerpo se pone en contacto con el polipéptido inmunizante en la fase sólida durante un tiempo suficiente para provocar que el polipéptido experimente una reacción inmune con la molécula de anticuerpo para formar un complejo inmunológico en la fase sólida.

5 Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante el método convencional de fusión de linfocitos y cultivo de hibridomas descrito por Köhler y Milstein (1975). También se conocen otros métodos para la preparación de anticuerpos monoclonales (Harlow y col., 1988). Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar inmunizando a un mamífero (por ejemplo un ratón, rata o conejo, o incluso un humano, etc.) y usando la técnica de fusión de linfocitos para producir hibridomas (Köhler y Milstein, 1975). Hay alternativas a esta técnica tradicional. Es posible, por ejemplo, producir anticuerpos monoclonales expresando un ácido nucleico clonado de un hibridoma. Los anticuerpos se pueden producir también mediante la técnica de despliegue de fagos, introduciendo el ADNc del anticuerpo en vectores, siendo los últimos típicamente fagos filamentosos con bibliotecas de genes V en la superficie del fago (p.ej. fUSE5 para *E. coli*, Scott y Smith, 1990). Los protocolos para construir estas bibliotecas de anticuerpos se describen en Marks y col. (1991).

15 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>. También pueden tomar la forma de inmunoconjugados o anticuerpos marcados.

Los aptámeros constituyen una clase de moléculas que representan una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular.

20 Los inhibidores de la expresión o de la actividad de la GM3 sintetasa se pueden formular con uno o varios excipientes aceptables farmacéuticamente. Como se ha descrito anteriormente, estos inhibidores pueden ser un compuesto sintetizado químicamente, un ARN antisentido o de interferencia o un anticuerpo anti-GM3 sintetasa.

“Excipiente” o “vehículo aceptable farmacéuticamente” se entiende en el sentido de cualquier disolvente, medio de dispersión, retardante de la absorción, etc., que no produce una reacción secundaria, por ejemplo una reacción alérgica, en humanos o animales.

25 La dosis depende naturalmente del principio activo en cuestión, el modo de administración, la indicación terapéutica y la edad y el estado del paciente. La dosis de proteína o anticuerpo es preferentemente de 0,1 a 250 mg/kg al día y de forma particularmente preferible de 1 a 100 mg/kg al día. Cuando las composiciones farmacéuticas comprenden ácidos nucleicos, las dosis de ácido nucleico (secuencia o vector) que se deben administrar también se adaptan en particular conforme al modo de administración, el proceso patológico objetivo y la duración del tratamiento. En general, si se usan virus recombinantes, éstos se formulan y administran como dosis de aproximadamente 10<sup>4</sup> a 10<sup>14</sup> ufc/ml y preferentemente de 10<sup>6</sup> a 10<sup>10</sup> ufc/ml. El término “ufc” (unidad formadora de placas) corresponde a la infectividad de una solución viral y se puede determinar infectando un cultivo celular apropiado y midiendo el número de placas o células infectadas, generalmente tras 48 horas. Las técnicas para la determinación del título de ufc de una solución viral se describen ampliamente en la bibliografía.

35 Si se prevé administración parenteral, más particularmente mediante inyección, las composiciones de la invención que comprenden el/los principio(s) activo(s) toman la forma de soluciones inyectables y suspensiones envasadas en ampollas o botellas para perfusión lenta. La inyección se puede efectuar especialmente por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.

40 En el caso de la administración oral, las composiciones de la invención toman la forma de cápsulas de gelatina, comprimidos efervescentes, comprimidos recubiertos o no recubiertos, sellos, grageas, ampollas o soluciones para ser tomadas por vía oral, microgránulos o formas de liberación prolongada.

45 Las formas para administración parenteral se obtienen de forma convencional mezclando el/los principio(s) activo(s) con tampones, estabilizantes, conservantes, solubilizantes, agentes isotónicos y agentes de suspensión. Usando las técnicas conocidas, estas mezclas se esterilizan posteriormente y después se envasan en forma de inyecciones intravenosas.

Los tampones usados por los expertos en la materia pueden ser aquellos basados en sales de fosfato orgánicas.

Los ejemplos de agentes de suspensión incluyen metil celulosa, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa, goma de acacia y carboximetil celulosa sódica.

50 Además, los estabilizantes útiles según la invención son sulfito sódico y metabisulfito sódico, mientras que los conservantes que se pueden mencionar son p-hidroxibenzoato sódico, ácido sórbico, cresol y clorocresol. Para preparar una solución o suspensión oral, los principios activos se disuelven o suspenden en un vehículo apropiado

con un dispersante, un humectante, un agente de suspensión (p. ej. polivinilpirrolidona), un conservante (como metilparabeno o propilparabeno), un corrector del sabor o un colorante.

- 5 Para preparar microcápsulas, los principios activos se combinan con diluyentes apropiados, estabilizantes apropiados, agentes favorecedores de la liberación prolongada del principio activo o cualquier otro tipo de aditivos para formar un núcleo central que después se recubre con un polímero apropiado (p. ej. una resina soluble en agua o una resina insoluble en agua). Las técnicas conocidas por los expertos en la materia se usan con este propósito.

Las microcápsulas resultantes se formulan entonces opcionalmente en unidades de dosis apropiadas.

También se puede prever la administración por vía ocular.

- 10 En ese caso la composición farmacéutica de la invención toma la forma de una composición oftálmica para la administración local en el ojo, por ejemplo una loción ocular o una crema oftálmica.

- 15 Los inhibidores también se pueden formular como liposomas. Los liposomas están formados por fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas multilaminares de dos capas concéntricas. Estas vesículas generalmente tienen un diámetro de 25 nm a 4  $\mu$ m y se pueden sonicar, teniendo como resultado la formación de vesículas unilaminares más pequeñas, con un diámetro de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en su núcleo.

Los liposomas pueden ser particularmente ventajosos para la administración de un principio activo en un objetivo celular o tisular preciso. Esto se puede realizar mediante la conjugación química de los lípidos a las moléculas diana, como péptidos diana (por ejemplo hormonas) o anticuerpos.

#### Método de selección

- 20 La invención se refiere también a un método *in vitro* de selección o identificación de compuestos útiles en el tratamiento y/o prevención de las complicaciones microvasculares de la diabetes, en el que se evalúa la capacidad de al menos un compuesto de ensayo para inhibir la actividad GM3 sintetasa, siendo un descenso en el nivel de actividad de esta enzima indicativo de un compuesto útil en el tratamiento y/o prevención de las complicaciones microvasculares de la diabetes, y en el que la complicación microvascular de la diabetes es la nefropatía diabética.
- 25 El compuesto de ensayo puede ser de cualquier tipo. Puede ser un compuesto natural o sintético o una mezcla de dichos compuestos. También puede ser una sustancia definida estructuralmente o una sustancia de estructura desconocida, por ejemplo un extracto biológico.

El nivel de actividad de la GM3 sintetasa en presencia del compuesto de ensayo se puede comparar con el nivel de actividad control en ausencia del compuesto de ensayo.

- 30 En una primera realización, el método de selección comprende etapas que consisten en poner al menos un compuesto de ensayo en contacto con una célula que expresa una GM3 sintetasa y determinar la capacidad de dicho compuesto para inhibir, es decir, bloquear o reducir, la síntesis intracelular del gangliósido GM3. Un descenso en el nivel de síntesis del gangliósido GM3 en la célula, comparado con una célula no expuesta al compuesto de ensayo, es indicativo de un compuesto útil en el tratamiento y/o prevención de las complicaciones microvasculares de la diabetes, y en el que la complicación microvascular de la diabetes es la nefropatía diabética.
- 35

- La célula puede ser una célula que exprese la GM3 sintetasa de forma endógena, por ejemplo un pericito retiniano o una célula mesangial renal. La célula también puede ser una célula transfectada de forma estable o transitoria para expresar la GM3 sintetasa, con la ayuda de vectores para la expresión del producto del gen de la GM3 sintetasa. Estas células se pueden obtener introduciendo en células huésped eucariotas o procariotas una secuencia de nucleótidos insertada en un vector que contiene una secuencia codificadora para la GM3 sintetasa y después cultivando dichas células en condiciones que permitan la replicación y/o expresión de la secuencia de nucleótidos transfectada.
- 40

- El vector de ADN, por ejemplo un vector plásmido, que contiene una secuencia codificadora para una GM3 sintetasa se puede introducir en una célula huésped mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. En particular, es posible introducir el vector de ADN en forma desnuda, es decir, sin la ayuda de cualquier tipo de vehículo o sistema que facilitaría la transfección del vector en las células (EP 465 529). Otras técnicas disponibles son la microinyección, la electroporación, la precipitación con fosfato cálcico o la formulación con la ayuda de nanocápsulas o liposomas. Las nanopartículas biodegradables de polialquilcianoacrilato son particularmente ventajosas. En el caso de los liposomas, el uso de lípidos catiónicos favorece la encapsulación de los ácidos
- 45

nucleicos que están cargados negativamente y facilita la fusión con las membranas celulares cargadas negativamente.

Alternativamente, el vector puede encontrarse en forma de un virus recombinante que comprende, insertada en su genoma, una secuencia de ácido nucleico que codifica una GM3 sintetasa. El vector viral se puede seleccionar preferiblemente a partir de un adenovirus, un retrovirus, particularmente un lentivirus, un virus adenoasociado (AAV), un virus herpes, un citomegalovirus (CMV), un virus vacuna, etc.

La implementación de estas técnicas de expresión recombinante es bien conocida por los expertos en la materia.

Los ejemplos de células huésped incluyen especialmente células de mamíferos como células CHO, COS-7, 293 y MDCK, células de insectos como células SF9, bacterias como *E. coli* y cepas de levaduras.

El nivel de expresión se puede evaluar determinando el nivel de transcripción del gen o el nivel de traducción de la proteína codificada por este gen de la GM3 sintetasa, bien directamente o vía, por ejemplo, un gen indicador.

Los ensayos más comunes para el seguimiento de la transcripción (es decir, la determinación del nivel de transcripción) del gen diana (en este caso el gen de la GM3 sintetasa) o del gen indicador se basan en la técnica de transferencia de ARN. Los ensayos para el seguimiento de la traducción (es decir, la determinación del nivel de traducción) de la proteína GM3 sintetasa o de la proteína indicadora se pueden basar especialmente en técnicas de inmunoensayo o pueden usar técnicas fluorimétricas, luminiscentes u otras técnicas para la detección de proteínas indicadoras (proteína fluorescente verde o GFP (siglas de green fluorescent protein), luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, CAT; etc.).

Las técnicas de inmunoensayo se pueden llevar a cabo según varios formatos bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo mediante ELISA, radioinmunoensayo, en inmunoensayos *in situ*, inmunotransferencia, inmunofluorescencia, etc. Los anticuerpos anti proteína GM3 sintetasa útiles para la detección de la proteína GM3 sintetasa se pueden producir como se describe abajo.

En otra realización, el método de selección comprende etapas que consisten en poner en contacto al menos un compuesto de ensayo con una GM3 sintetasa natural, mutada o recombinante o una GM3 sintetasa de origen biológico y determinar la capacidad de dicho compuesto para inhibir, es decir bloquear o reducir, la transferencia de un resto de ácido siálico de un dador de ácido siálico a un grupo 3-hidroxilo de un resto galactosa de un aceptor de ácido siálico. Un descenso en el nivel de actividad de transferencia de ácido siálico en presencia de dicho compuesto, comparado con el nivel de actividad de transferencia de ácido siálico en ausencia de dicho compuesto, es indicativo de un compuesto que inhibe la GM3 sintetasa y es útil en el tratamiento y/o prevención de las complicaciones microvasculares de la diabetes y en el que la complicación microvascular de la diabetes es la nefropatía diabética.

El nivel de actividad GM3 sintetasa se evalúa ventajosamente poniendo en contacto una GM3 sintetasa con un dador de ácido siálico y un aceptor de ácido siálico en las condiciones apropiadas que permitan la transferencia de ácido siálico del dador al aceptor. En general, "condiciones apropiadas" indica un medio de reacción en el que puede suceder la reacción catalítica. El medio puede incluir, por ejemplo, tampones, agentes oxidantes y/o reductores y cofactores. Generalmente se ajustan el pH, la temperatura y la concentración iónica del medio. Preferiblemente, la actividad GM3 sintetasa se evalúa en un medio tamponado a un pH de entre 6 y 7 y, preferiblemente, de entre 6,5 y 6,7, a una temperatura de entre 35 y 39°C y preferiblemente de 37°C. La reacción se realiza de forma ventajosa en un medio que contiene  $Mn^{2+}$  10 mM, por ejemplo  $MnCl_2$  10 mM. Se han descrito ensayos de actividad GM3 sintetasa especialmente en la solicitud de patente internacional WO 97/47749, la patente US 6555371 o el artículo de Wakarchuk y col. (1996).

Preferiblemente la actividad GM3 sintetasa se evalúa cuantificando la transferencia de ácido siálico de un dador de ácido siálico, como CMP-N-acetilneuraminato, al grupo 3-hidroxilo de un resto galactosa de la lactosilceramida (LacCer) para formar el gangliósido GM3. Un descenso en la desaparición de CMP-N-acetilneuraminato y/o lactosilceramida y/o en la formación de GM3 es indicativo de un compuesto que inhibe la GM3 sintetasa. Por consiguiente, un método según la invención comprende la determinación del nivel de transferencia de ácido siálico del CMP-N-acetilneuraminato a la lactosilceramida en presencia o ausencia del compuesto de ensayo.

Ventajosamente, el dador y/o el aceptor de ácido siálico se marcan de forma detectable. El marcaje se puede realizar mediante cualquier técnica apropiada bien conocida por los expertos en la materia. Ésta puede ser, p. ej. marcaje radioactivo, enzimático, luminiscente o fluorescente o una combinación de estas técnicas.

En la Figura 7 se describe un ensayo de selección preferido según la invención. En este ensayo, la GM3 sintetasa se pone en contacto con ácido [ $^{14}C$ ]-CMP-siálico y con lactosilceramida unida a biotina. La tecnología SPA®



(Amersham Biosciences) se basa en la emisión de partículas  $\beta$  mediante la desintegración de ciertos elementos radioactivos. Si la molécula radioactiva está lo suficientemente cerca de una perla de centelleo SPA, la desintegración radioactiva estimula el grupo de agentes centelleantes en la perla, produciendo una emisión luminiscente. La señal se puede detectar mediante un contador de centelleo y/o una cámara CCD. Por otro lado, en el caso de una molécula radioactiva libre en una solución que contiene perlas SPA, es decir, una molécula radioactiva que no interacciona con las perlas SPA, la emisión  $\beta$  asociada con la desintegración de la molécula radioactiva no tiene energía suficiente para alcanzar una perla SPA y no se genera emisión de luz. En el contexto del presente ensayo, la medición de la señal luminiscente refleja por consiguiente la cantidad de GM3 ya que en el medio de reacción sólo este compuesto se asocia con las perlas SPA vía complejo biotina/estreptavidina y lleva un grupo de ácido siálico radioactivo.

Los ejemplos y figuras que siguen a continuación ilustran la invención sin implicar una limitación.

## FIGURAS

La Figura 1 muestra la inhibición de la proliferación de pericitos (BRP) y células mesangiales renales (RMC) por AGE. Las células se expusieron a BSA 3  $\mu$ M o AGE durante 4 días (RMC) o 7 días (BRP). Después las células se tripsinaron, se contaron usando un hemocitómetro y se determinó la cantidad total de proteínas. Los resultados se muestran como porcentaje del control de BSA y representan la media  $\pm$  EEM de 6 (BRP) o 9 (RMC) experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. \* $p < 0,05$  frente al control de BSA.

La Figura 2 muestra la ruta de biosíntesis del gangliósido modificada en base al artículo de van Echten y col. (1993). Sólo se detectan gangliósidos de las series a y b en BRP y RMC (gangliósidos rodeados).

La Figura 3 ilustra la modulación del perfil de gangliósidos en pericitos y células mesangiales. Los pericitos (A) o las células mesangiales (B) se expusieron a BSA 3  $\mu$ M o AGE durante 4 o 7 días, respectivamente, y después se recogieron. Los gangliósidos se extrajeron, se purificaron, se analizaron por HPTLC y se reveló mediante tinciones con resorcinol, como se describe en la sección "Materiales y métodos". Los resultados se expresan como porcentaje del control de BSA y representan la media  $\pm$  EEM de 6 (BRP) o 9 (RMC) experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. \* $p < 0,05$  frente al control de BSA. En (C) y (D) los gangliósidos se marcaron metabólicamente con 1  $\mu$ Ci/ml de [ $^{14}$ C]-galactosa, se extrajeron, se separaron por HPTLC y se analizaron por autorradiografía. Los resultados se expresan como porcentaje del control de BSA y representan la media  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes.

La Figura 4 muestra el aumento en la actividad GM3 sintetasa provocado por AGE en glomérulos y células aisladas. (A) Las células se trataron con BSA 3  $\mu$ M o AGE durante 4 días (RMC) o 7 días (BRP). La actividad GM3 sintetasa se midió en los homogeneizados celulares como se describe en la sección "Materiales y métodos". La actividad control fue 2,7 y 5,1 pmol/h/mg de proteína en BRP y RMC, respectivamente. Los resultados se expresan como porcentaje del control de BSA y representan la media  $\pm$  EEM de 4 o 5 experimentos independientes. (B) La actividad GM3 sintetasa se midió en homogeneizados altamente purificados de glomérulos de ratones control (db/m) y ratones db/db. La actividad control fue 4,7 pmol/h/mg de proteína. Los resultados se expresan como porcentaje del control y representan la media  $\pm$  EEM de 4-5 animales. \* $p < 0,05$  frente al control de BSA o ratones control.

La Figura 5 ilustra la inhibición de la proliferación celular causada por gangliósidos de serie a exógenos. Los pericitos (A) o las células mesangiales (B) se trataron con complejos gangliósido-BSA durante 4 o 7 días, respectivamente. Al final del tratamiento, se midieron las proteínas totales. Los resultados se expresan como porcentaje del control de BSA y representan la media  $\pm$  EEM de 5-6 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. \* $p < 0,05$  frente al control de BSA.

La Figura 6 muestra que los anticuerpos frente a los gangliósidos de serie a GM2 y GM1 protegen contra los efectos de los AGE. Los pericitos (A) o las células mesangiales (B) se trataron con BSA 3  $\mu$ M o AGE en presencia o ausencia de 5  $\mu$ g por pocillo de anticuerpos policlonales anti-GM2 o anti-GM1. Al final del tratamiento, las células se lavaron y se lisaron, y se midió la cantidad total de proteínas. Los resultados se expresan como porcentaje del control de BSA y representan la media  $\pm$  EEM de 5-6 experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. \* $p < 0,05$  frente a las células tratadas con AGE.

La Figura 7 ilustra la detección de la actividad GM3 sintetasa mediante un ensayo que combina la detección del producto de reacción, el gangliósido GM3, por escintigrafía y luminiscencia. La GM3 sintetasa cataliza la transferencia de ácido siálico marcado del ácido [ $^{14}$ C]-CMP-siálico a lactosilceramida unida a biotina (Biotin-LacCer). Las perlas SPA (del inglés "Scintillation Proximity Assay", Ensayo de proximidad por centelleo, Amersham Biosciences) unidas a estreptavidina se ponen después en contacto con el gangliósido GM3 resultante unido a

biotina y marcado con  $^{14}\text{C}$ . Después se mide la señal SPA resultante de la interacción entre la radioactividad de GM3 y las perlas SPA.

La Figura 8 muestra que la transfección con ARNip de GM3 sintetasa protege a las RMC. Veinticuatro horas después de la transfección de RMC con 400 nM de ARNip de GM3 sintetasa, las células se trataron con BSA 3  $\mu\text{M}$  control o AGE. Al final del tratamiento, se midieron las proteínas totales. Los resultados se expresan como porcentaje del control de BSA y representan la media  $\pm$  EEM de 6 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  frente a las células tratadas con AGE.

La Figura 9 ilustra que las actividades GM3 y GD3 sintetasa y los niveles de GM3 se modulan en el córtex renal del ratón diabético. La actividad GM3 sintetasa (A) y la actividad GD3 sintetasa (B) se midieron en homogeneizados de córtex renal de ratones control (db/m) y ratones diabéticos (db/db). Se muestran los niveles de GM3 (C) en ratones control (db/m) y ratones diabéticos (db/db). En los ratones control, los niveles de GM3 fueron  $66 \pm 9$  ng/ml de proteínas. Los resultados se expresan como un porcentaje del control de BSA y representan la media  $\pm$  EEM de 4-6 animales. \* $p < 0,05$  frente a las células tratadas con AGE.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1 – Materiales y métodos

#### Aislamiento y cultivo celular

Los pericitos retinianos bovinos (BRP, del inglés Bovine retinal pericytes) se aislaron a partir de microvasos retinianos bovinos como se describe previamente (Lecomte y col., 1996). Brevemente, las retinas se obtuvieron por disección en condiciones estériles de ojos bovinos enucleados obtenidos de un matadero local. Después de retirar de la retina las células epiteliales pigmentadas contaminantes, las retinas (2 por placa de cultivo) se cortaron en pequeños trozos y se homogeneizaron en un homogeneizador Dounce en una solución salina equilibrada de Hanks (HBSS oxigenada sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  suplementada con Hepes 10 mM, pH 7,4, solución de antibióticos al 1%, albúmina de suero bovino (BSA, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, Francia) al 0,5%). Los homogeneizados se centrifugaron a 1.000 g durante 5 minutos a 4°C y los restos se resuspendieron en una solución enzimática que contenía collagenasa/dispa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) (1 mg/ml en una solución HBSS oxigenada sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ , Hepes 10 mM, pH 7,4, solución de antibióticos al 1%, ADNasa 20 U/ml y N $\alpha$ -tosillisina clorometil cetona (TLCK) 150 ng/ml, Sigma). Tras la digestión (20 minutos a 37°C), los fragmentos de microvasos se situaron en un filtro de nylon de 40  $\mu\text{m}$  y se depositaron en placas de 6 cm cubiertas con fibronectina. Los cultivos primarios se cultivaron en un DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco, Invitrogen Corporation, N.Y., Estados Unidos), glutamina al 1% y penicilina/estreptomycin al 1% (Sigma) y el medio se cambió cada dos días. Tras el periodo de adhesión, se produjo una excrecencia de pericitos de los microvasos después de 48 horas y las células alcanzaron la confluencia en aproximadamente 10 días. Los cultivos de BRP fueron 100% puros, como se caracterizó por su morfología irregular poligonal con pseudópodos y su crecimiento en células no fijadas y como se evaluó por marcaje positivo tanto para  $\alpha_1$ -actina como para un antígeno glucolípido específico (anticuerpo 3G5) y por marcaje negativo para el factor de von Willebrand expresado en las células endoteliales (Lecomte y col., 1996). Las células se pasaron tratando con tripsina-EDTA (Sigma) (1:3) y el cultivo se continuó con el mismo medio hasta el segundo pase, durante el cual se trataron las BRP.

Las células mesangiales renales de rata (RMC, del inglés renal mesangial cells) se obtuvieron de glomérulos purificados de ratas Wistar macho jóvenes (Charles River, l'Arbresle, Francia). Brevemente, fragmentos de córtex se aislaron de riñones de rata acabados de extraer en condiciones estériles. Los trozos pequeños se forzaron mecánicamente a través de una malla de 230  $\mu\text{m}$  con tampón HBSS. Los glomérulos, pasados a través de esta malla, se forzaron entonces a través de una malla de 73,7  $\mu\text{m}$ . Finalmente, se colocaron en una malla de 70  $\mu\text{m}$  y se pusieron en placas de 6 cm cubiertas con fibronectina (4 placas para 2 glomérulos renales) en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 20%, glutamina al 1% y penicilina/estreptomycin al 1%. Tras el periodo de fijación, después de tres semanas se produjo la excrecencia de RMC desde los glomérulos y después las células se cultivaron hasta el quinto pase para eliminar las células epiteliales y endoteliales residuales. Las RMC se caracterizan por criterios morfológicos (forma de estrella, forma de mecha cuando son confluentes) y por marcaje positivo con vimentina,  $\alpha$ -actina de músculo liso y antígeno Thy-1. Después se cultivaron las células en DMEM suplementado con suero fetal de ternero al 15%, glutamina al 1% y penicilina/estreptomycin al 1%. Se usaron entre el quinto y el decimoquinto pase.

#### Aislamiento de glomérulos de ratón

Se obtuvieron glomérulos altamente purificados de ratones diabéticos (db/db) o control (db/m) de once semanas de edad (Charles River) por la técnica de perfusión de perlas magnéticas, como se describe en Takemoto y col.

(Takemoto y col., 2002). Brevemente, se prefundió a los ratones a través del corazón con una solución de Dynabeads (Dyna, Compiègne, Francia) y después se extrajeron los riñones, se cortaron finamente y se digirieron con colagenasa (Roche Diagnostics). Tras la filtración, se retuvieron por magnetismo los glomérulos que habían acumulado perlas en sus capilares y después se lavaron dos veces antes de la homogeneización. Esta técnica proporciona preparaciones puras de glomérulos con un bajo grado de contaminación del tejido.

#### Aislamiento de córtices renales de ratón

Se aislaron fragmentos de córtex renal de riñones de ratones diabéticos (db/db) o control (db/m) de once semanas de edad (Charles River). Brevemente, los animales se anestesiaron y sacrificaron, y se extrajeron los riñones. Después, los fragmentos de córtex renal se obtuvieron por disección y se homogeneizaron mecánicamente con un homogeneizador Dounce en tampón Hepes 25 mM que contenía EDTA 1 mM y 10 µl/ml de inhibidores de proteasas.

#### Preparación de AGE

Se prepararon AGE incubando albúmina de suero bovino (concentración final de 7,2 mg/ml) (Sigma) con metilglioxal 100 mM (Sigma) a 37°C durante 50 horas. La albúmina de suero bovino (BSA) se incubó en las mismas condiciones en ausencia de metilglioxal y se usó como preparación control (BSA control). Los AGE y la BSA control se purificaron en columnas PD10 de Sephadex G25 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) para eliminar las sales y los carbonilos sin reaccionar y después se esterilizaron por filtración y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

#### Tratamiento con AGE

Los AGE y la BSA control (concentración final de 3 µM) se añadieron al medio de cultivo 24 horas tras la inoculación. Cada tipo de célula se trató durante un pase (aproximadamente 7 días para BRP y 4 días para RMC). El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada dos días.

#### Medición del crecimiento celular

Al final de tratamiento, las células se recogieron con tripsina y los restos celulares se lavaron dos veces con una solución salina tamponada con fosfato (PBS en hielo) (Sigma). Para cada muestra se contó una alícuota de células usando un hemocitómetro para determinar el número de células. Se usó otra alícuota para medir las proteínas por la técnica de Bradford.

#### Análisis de gangliósidos

Para el marcaje metabólico de los gangliósidos, se añadieron 0,2 µCi/ml o 1 µCi/ml de [<sup>14</sup>C(U)]-D-galactosa (329,5 mCi/mmol) (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) al medio de cultivo durante la noche para los experimentos de marcaje con una actividad altamente específica (experimento de medición de GM2 y GM1). Las células (5-8 x 10<sup>5</sup> pericitos o 12-20 x 10<sup>5</sup> células mesangiales) se recogieron después por tripsinación y se lavaron tres veces en PBS. Los gangliósidos se extrajeron de los restos celulares por el método descrito por Bouchon y col. (Bouchon y col., 1990), modificado por Natalizio y col. (Natalizio y col., 2002). Brevemente, los restos celulares se dispersaron en 2 ml de cloroformo (C)/metanol (M) (1:1, v/v), se mezclaron vigorosamente y se extrajeron durante la noche a 4°C. Tras la centrifugación, los restos se extrajeron dos veces con 2 ml del mismo disolvente. Los extractos mezclados de los lípidos totales se secaron por evaporación y se separaron con la ayuda de una solución de C/M/PBS 1 mM (10:10:7, v/v/v). Las fases superiores, que contenían los gangliósidos, se desalaron después en una columna de gel de sílice C18 (Waters Corporation, Milford, MA) y se analizaron por HPTLC (Merck, Darmstadt, Alemania). Las placas se revelaron con C/M/CaCl<sub>2</sub> al 0,2% (55:45:10, v/v/v). Los gangliósidos se visualizaron por autorradiografía usando una pantalla de fósforo y un Storm 820 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, Estados Unidos) y por marcaje con resorcinol (tinción específica para gangliósidos: resorcinol al 0,3% (Sigma), CuSO<sub>4</sub> al 0,03%, HCl al 30%) usando un Image Master VDS-CL (Amersham Pharmacia Biotech). La cuantificación se realizó usando un Image Quant (Molecular Dynamics). Como GT1b estaba ausente de los perfiles de gangliósidos tanto de BRP como de RMC, se añadió a las muestras como un patrón interno antes de la extracción de lípidos.

#### Medición de la actividad GM3 sintetasa

Al final del tratamiento, las células se lavaron con PBS, se incubaron durante 20 minutos a 4°C en 50 µl de tampón de lisis (cacodilato sódico 20 mM, pH 6,6 (Sigma), Triton X-100 al 0,2%, EDTA 1 mM, 10 µl/ml de inhibidores de proteasas, Calbiochem, La Jolla, California, Estados Unidos) y se recogieron por raspado. Se mezclaron cuatro placas de BRP (aproximadamente 2-3 x 10<sup>6</sup> células) y tres placas de RMC (aproximadamente 3-6 x 10<sup>6</sup> células). Los lisados celulares se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos y las proteínas del sobrenadante se usaron para

medir la actividad GM3 sintetasa. Los restos glomerulares se homogeneizaron mecánicamente con una jeringa en Hepes 25 mM que contenía EDTA 1 mM y 10 µl/ml de inhibidores de proteasas. Los homogeneizados se centrifugaron entonces a 1.000 g durante 2 minutos y el sobrenadante postnuclear se usó para medir la actividad GM3 sintetasa. Se usaron cantidades equivalentes de proteínas para cada muestra (aproximadamente 500 µg para las células y 100 µg para los glomérulos) para realizar el ensayo. Las muestras se mezclaron con un volumen igual de tampón de reacción que contenía concentraciones finales de lactosilceramida 0,1 mM (Matreya, Biovalley, Marne la Vallée, Francia), 4 µCi/ml de ácido [siálico-4,5,6,7,8,9-<sup>14</sup>C]-CMP-siálico (325,2 mCi/mmol) (PerkinElmer Life Sciences), ácido siálico-CMP 100 µM (Sigma), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Triton X-100 al 0,2% y cacodilato sódico 100 mM, pH 6,6. Tras la agitación, las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 50 minutos. Las reacciones se pararon cargando las muestras en columnas de gel de sílice 60 (Merck) para separar el exceso de sustratos de los productos. Tras lavar las columnas con agua, se eluyeron los gangliósidos con C/M (1:1, v/v) y el disolvente se secó bajo una atmósfera de nitrógeno. Finalmente, los gangliósidos se separaron por cromatografía de capa fina (Merck) y los productos de reacción se revelaron por autorradiografía. La actividad GM3 sintetasa se expresó en pmol de GM3 producido/h/mg de proteína.

#### 15 Tratamiento con gangliósidos exógenos

Para evaluar el efecto de los gangliósidos exógenos en la proliferación de BRP y RMC, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos. Los glucolípidos exógenos GM3, GM2, GM1 y GD1a, la glucosilceramida y la lactosilceramida (Matreya) se añadieron al medio de cultivo completo en una concentración final de 50 µM en forma de complejos con BSA en una relación 1:1 en DMEM/ Hepes 10 mM, pH 7,4. Al final del tratamiento las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron durante 30 minutos a 37°C en 50 µl de un tampón de lisis Ripa (PBS 10 mM, NP40 al 1% (Pierce, Perbio Science, Brebières, Francia), desoxicolato sódico al 0,5%, SDS al 0,1%, 10 µl/ml de inhibidores de proteasas). Como el número de células en nuestros experimentos se correlacionó con las concentraciones de proteína total (véase también la Fig. 1), las proteínas totales se midieron usando el ensayo de proteínas BCA (Pierce) para evaluar la proliferación celular.

#### 25 Tratamiento con anticuerpos anti-gangliósidos de serie a

Para bloquear los efectos potenciales de los gangliósidos de serie a, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos y se trataron con AGE 3 µM o BSA control en presencia o ausencia de 50 µg/ml de anticuerpo policlonal anti-GM2 (Calbiochem) o anticuerpo policlonal anti-GM1 (Matreya). Al final del tratamiento las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron en 50 µl de tampón de lisis Ripa y las proteínas se midieron para cuantificar la proliferación celular.

#### Transfección de RMC con un ARNip de GM3 sintetasa

Para bloquear la actividad GM3 sintetasa, se cultivaron RMC en placas de cultivo de 6 pocillos hasta el 30% de confluencia y después se transfectaron con un ARN de interferencia (ARNip) específico para la GM3 sintetasa, el cual se diseñó frente a una secuencia de ADNc de rata (Ambion, Huntingdon, Reino Unido) usando un reactivo de oligofectamina (Invitrogen Corporation). La secuencia antisentido de la GM3 sintetasa usada fue GGGUUAUUCUGAACAUUUtt (SEC ID N°. 5). En experimentos preliminares se llevó a cabo un estudio dosis-respuesta transfectando las células con concentraciones crecientes de ARNip (0-800 nM). Después de 72 horas de transfección, se midió la actividad GM3 sintetasa en homogeneizados de células transfectadas. Después se evaluó la proliferación en las células transfectadas con el ARNip. Para este propósito, 24 horas tras la transfección con ARNip 400 nM, las células se trataron con el control de BSA 3 µM o AGE (3 días). Después las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con un tampón de lisis Ripa y las proteínas se midieron para evaluar la proliferación celular.

#### Análisis estadístico

Los datos se expresan como media ± EEM y se presentan como porcentaje de los controles. En las células estudiadas se usó la prueba de los rangos de Wilcoxon para evaluar la significación de la diferencia entre los grupos. La prueba de la *t* de Student se usó para la actividad GM3 sintetasa en los experimentos en ratones. *p* < 0,05 se consideró estadísticamente significativa.

### Ejemplo 2 – Resultados

#### 1 –Los AGE inhiben la proliferación de pericitos y de células mesangiales

Para comparar el efecto de AGE en la proliferación de pericitos y células mesangiales se trataron las células con BSA o AGE a una concentración de 3 µM durante 4 a 7 días. El recuento de células mostró que los AGE reducían el

número de pericitos y células mesangiales un 33 y un 40% respectivamente (Fig. 1). Las proteínas totales también se midieron y se encontró que habían disminuido en correlación con el número de células. Estos resultados demuestran que los AGE tienen efectos adversos similares en la proliferación tanto de pericitos como de células mesangiales y permitieron a los inventores elucidar los mecanismos comunes implicados en la respuesta a AGE en ambos tipos de células.

## 2 –Los AGE aumentan los gangliósidos de serie a en pericitos y células mesangiales

Los resultados previos de los inventores sugirieron que los AGE podrían modular el perfil de gangliósidos en las células microvasculares de la retina (Natalizio y col., 2001). Los perfiles de gangliósidos se analizaron en BRP y RMC en respuesta al control de BSA o a los AGE. El perfil de gangliósidos es específico del tipo de células. En las condiciones control, los gangliósidos principales en los pericitos fueron los gangliósidos de serie a GM3 (63% del total de gangliósidos detectados) y GM1 (9%) y el gangliósido de serie b GD3 (28%). El perfil en las células mesangiales difirió en la cantidad más pequeña de GD3 (5%) y, en el caso de la serie a, por la presencia de GD1a (20%), siendo todavía GM3 el gangliósido principal (75%).

Se observó un aumento en los gangliósidos de serie a y un descenso en los gangliósidos de serie b en ambos tipos de células tratadas con AGE (Fig. 3). En los pericitos, los gangliósidos de serie a GM3 y GM1 aumentaron aproximadamente un 40%, mientras que el gangliósido de serie b GD3 se redujo un 24% (Fig. 3A). En las células mesangiales GM3 aumentó un 33% mientras que GD3 se redujo un 30%; los niveles de GD1a no se vieron afectados (Fig. 3B). Se obtuvieron resultados similares por autorradiografía tras el marcaje con galactosa. Como los gangliósidos de serie a GM2 en BRP y GM2 y GM1 en RMC eran difíciles de detectar por marcaje con resorcinol, las células se marcaron con [<sup>14</sup>C]-D-galactosa de alta actividad específica y después los gangliósidos se analizaron en las células control y en las células tratadas con AGE. Los resultados mostraron que GM2 aumentó un 55% en BRP (Fig. 3C) y que GM2 y GM1 aumentaron del 25 al 35% en RMC (Fig. 3D). Estos resultados indicaron que los AGE inducen modificaciones similares a los perfiles de gangliósidos tanto en pericitos como en células mesangiales. Éstos también sugieren que el aumento en gangliósidos de serie a puede ser un mecanismo común en el que se basa la reducción de la proliferación celular.

## 3 –Los AGE aumentan la actividad GM3 sintetasa en pericitos y células mesangiales

En un intento de explicar el mecanismo responsable del aumento observado en los gangliósidos de serie a, la actividad de GM3 sintetasa, la enzima limitante para la síntesis de gangliósidos de serie a, se midió en las células control y en las células tratadas. Los resultados presentados en la Figura 4 muestran que el tratamiento con AGE aumentó la actividad GM3 sintetasa en un factor de aproximadamente 1,8 en los pericitos y de aproximadamente 1,5 en las células mesangiales, muy probablemente al aumentar la velocidad máxima de la reacción enzimática. Estos resultados sugieren que los AGE ejercen mecanismos comunes en RMC y BRP regulando la GM3 sintetasa.

## 4 –Los gangliósidos de serie a exógenos inhiben la proliferación de pericitos y de células mesangiales

Los inventores estudiaron si la adición exógena de gangliósidos de serie a afectaría a la proliferación de pericitos y células mesangiales. Las células se trataron durante un pase (7 días para BRP y 4 días para RMC) con gangliósidos 50 µM y, como control, con los precursores de glucosilceramida y lactosilceramida no sililados. La Figura 5 muestra que GM2, GM1 y GD1a inhibieron con más eficacia la proliferación de los pericitos y las células mesangiales (aproximadamente del 15 al 30%). GM3 inhibió débilmente la proliferación de pericitos pero no tuvo un efecto significativo en las células mesangiales. La glucosilceramida y la lactosilceramida usadas como control no tuvieron efecto. Estos resultados indican que los gangliósidos de serie a inhiben la proliferación de pericitos y células mesangiales. En particular, GM2 y GM1 aumentan en BRP y RMC en respuesta a AGE y disminuyen la proliferación de ambos tipos de células; por consiguiente, estos gangliósidos de serie a podrían ser los mediadores comunes del efecto de AGE.

## 5 –Los anticuerpos anti-gangliósido de serie a protegen a los pericitos y a las células mesangiales frente a la inhibición de la proliferación causada por AGE

Para estudiar si GM2 y GM1 median los efectos de AGE se trataron las células con AGE en presencia de anticuerpos anti-GM1 y anti-GM2. En las células control tratadas con BSA la proliferación no difería en presencia o ausencia de los anticuerpos anti-gangliósido. El tratamiento de las células con AGE en presencia de anticuerpos anti-GM2 y anti-GM1 impidió parcialmente la disminución en la proliferación de pericitos y células mesangiales (Fig. 6). En vista de los efectos de los gangliósidos exógenos estas observaciones sugieren que los gangliósidos de serie a, particularmente GM1 y GM2, son mediadores comunes de la inhibición de la proliferación inducida por AGE en pericitos y células mesangiales.

## 6 –La actividad GM3 sintetasa aumenta en los glomérulos de ratones diabéticos

Para evaluar el efecto de un entorno diabético en la actividad GM3 sintetasa *in vivo*, se midió la actividad enzimática en glomérulos altamente purificados de un modelo de ratón diabético db/db. Los resultados presentados en la Figura 4B muestran que la actividad GM3 sintetasa aumentó un 50% en los glomérulos de células diabéticas, comparado con los controles (db/m).

5      7 –Un ARNip de la GM3 sintetasa protege parcialmente de los efectos inducidos por AGE

Para elucidar con más detalle el papel de los gangliósidos de serie a en la mediación de los efectos de los AGE, se transfectaron RMC con ARNip de la GM3 sintetasa. Los experimentos preliminares mostraron que el ARNip inhibía eficazmente la actividad GM3 sintetasa en RMC. Después se midió la proliferación de las células transfectadas y las células tratadas. Como se muestra en la Figura 8, los efectos de los AGE en la proliferación de RMC se inhiben parcialmente en las células transfectadas con ARNip de GM3 sintetasa. Estos resultados demuestran claramente la intervención de los gangliósidos en la mediación de los efectos de los AGE. La naturaleza parcial de los efectos se puede explicar por el hecho de que: (i) los efectos de los AGE fueron menos potentes que en los experimentos previos, dado que las células se trataron hasta un nivel de confluencia más avanzado para aumentar la eficacia de la transfección y (ii) la actividad GM3 sintetasa se inhibió a sólo un 50%.

15      8 –Las actividades GM3 y GD3 sintetasa y los niveles de GM3 se modifican en el córtex renal de ratones diabéticos

Para evaluar *ex vivo* el efecto de un entorno diabético en la ruta biosintética de los gangliósidos, las actividades GM3 y GD3 sintetasa se midieron en homogeneizados de córtex renal del modelo de ratón diabético db/db. Los resultados presentados en las Figuras 9A-B muestran que la actividad GM3 sintetasa aumentó un 80%, mientras que la actividad GD3 sintetasa se redujo un 50% en los córtices renales de ratones diabéticos, comparados con los controles (db/m). También se analizaron los gangliósidos y mostraron un aumento, aunque no significativo estadísticamente, en los niveles de GM3 en el córtex renal de ratones diabéticos db/db (Figure 9C). Por consiguiente, en conjunto estos resultados demuestran el sentido fisiopatológico de los resultados obtenidos en RMC y BRP tratadas con AGE.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MERCK SANTE  
INSERM

<120> GM3 sintetasa como diana terapéutica en las complicaciones .i-  
microvasculares de la diabetes

<130> BFF 04P0578

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 2362  
<212> ADN A  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (278)..(1366)  
<223>

<400> 1  
ctgagcgggg gagcggcggc cccagctga atgggcgcga gagcggcgct gggggcgggt 60  
gggggcgcgg ggtaccgggc tggcggcgg ccggcgcccc ctcattagta tgcggacgaa 120  
ggcggcgggc tgcgcggagc ggcgtccct gcagccgcgg accgaggcag cggcggcacc 180  
tgccggccga gcaatgcaa gtgagtacac ctatgtgaaa ctgagaagtg attgctcgag 240  
gccttccctg caatggtaca cccagctca aagcaag atg aga agg ccc agc ttg 295  
Met Arg Arg Pro Ser Leu  
1 5  
tta tta aaa gac atc ctc aaa tgt aca ttg ctt gtg ttt gga gtg tgg 343  
Leu Leu Lys Asp Ile Leu Lys Cys Thr Leu Leu Val Phe Gly Val Trp  
10 15 20  
atc ctt tat atc ctc aag tta aat tat act act gaa gaa tgt gac atg 391  
Ile Leu Tyr Ile Leu Lys Leu Asn Tyr Thr Thr Glu Glu Cys Asp Met  
25 30 35  
aaa aaa atg cat tat gtg gac cct gac cat gta aag aga gct cag aaa 439  
Lys Lys Met His Tyr Val Asp Pro Asp His Val Lys Arg Ala Gln Lys  
40 45 50  
tat gct cag caa gtc ttg cag aag gaa tgt cgt ccc aag ttt gcc aag 487  
Tyr Ala Gln Gln Val Leu Gln Lys Glu Cys Arg Pro Lys Phe Ala Lys  
55 60 65 70  
aca tca atg gcg ctg tta ttt gag cac agg tat agc gtg gac tta ctc 535  
Thr Ser Met Ala Leu Leu Phe Glu His Arg Tyr Ser Val Asp Leu Leu  
75 80 85

ES 2 375 626 T3

cct ttt gtg cag aag gcc ccc aaa gac agt gaa gct gag tcc aag tac	583
Pro Phe Val Gln Lys Ala Pro Lys Asp Ser Ser Glu Ala Glu Ser Lys Tyr	
90 95 100	
gat cct cct ttt ggg ttc cgg aag ttc tcc agt aaa gtc cag acc ctc	631
Asp Pro Pro Phe Gly Phe Arg Lys Phe Ser Ser Lys Val Gln Thr Leu	
105 110 115	
ttg gaa ctc ttg cca gag cac gac ctc cct gaa cac ttg aaa gcc aag	679
Leu Glu Leu Leu Pro Glu His Asp Leu Pro Glu His Leu Lys Ala Lys	
120 125 130	
acc tgt cgg cgc tgt gtg gtt att gga agc gga gga ata ctg cac gga	727
Thr Cys Arg Arg Cys Val Val Ile Gly Ser Gly Gly Ile Leu His Gly	
135 140 145 150	
tta gaa ctg ggc cac acc ctg aac cag ttc gat gtt gtg ata agg tta	775
Leu Glu Leu Gly His Thr Leu Asn Gln Phe Asp Val Val Ile Arg Leu	
155 160 165	
aac agt gca cca gtt gag gga tat tca gaa cat gtt gga aat aaa act	823
Asn Ser Ala Pro Val Glu Gly Tyr Ser Ser Glu His Val Gly Asn Lys Thr	
170 175 180	
act ata agg atg act tat cca gag ggc gca cca ctg tct gac ctt gaa	871
Thr Ile Arg Met Thr Tyr Pro Glu Gly Ala Pro Leu Ser Asp Leu Glu	
185 190 195	
tat tat tcc aat gac tta ttt gtt gct gtt tta ttt aag agt gtt gat	919
Tyr Tyr Ser Asn Asp Leu Phe Val Ala Val Leu Phe Lys Ser Val Asp	
200 205 210	
ttc aac tgg ctt caa gca atg gta aaa aag gaa acc ctg cca ttc tgg	967
Phe Asn Trp Leu Gln Ala Met Val Lys Lys Glu Thr Leu Pro Phe Trp	
215 220 225 230	
gta cga ctc ttc ttt tgg aag cag gtg gca gaa aaa atc cca ctg cag	1015
Val Arg Leu Phe Thr Trp Lys Gln Val Ala Glu Lys Ile Pro Leu Gln	
235 240 245	
cca aaa cat ttc agg att ttg aat cca gtt atc atc aaa gag act gcc	1063
Pro Lys His Phe Arg Ile Leu Asn Pro Val Ile Ile Lys Glu Thr Ala	
250 255 260	
ttt gac atc ctt cag tac tca gag cct cag tca agg ttc tgg ggc cga	1111
Phe Asp Ile Leu Gln Tyr Ser Glu Pro Gln Ser Arg Phe Trp Gly Arg	
265 270 275	
gat aag aac gtc ccc aca atc ggt gtc att gcc gtt gtc tta gcc aca	1159
Asp Lys Asn Val Pro Thr Ile Gly Val Ile Ala Val Val Leu Ala Thr	
280 285 290	
cat ctg tgc gat gaa gtc agt ttg gcg ggt ttt gga tat gac ctc aat	1207
His Leu Cys Asp Glu Val Ser Leu Ala Gly Phe Gly Tyr Asp Leu Asn	
295 300 305 310	
caa ccc aga aca cct ttg cac tac ttc gac agt caa tgc atg gct gct	1255
Gln Pro Arg Thr Pro Leu His Tyr Phe Asp Ser Gln Cys Met Ala Ala	
315 320 325	



# ES 2 375 626 T3

atg aac ttt cag acc atg cat aat gtg aca acg gaa acc aag ttc ctc 1303  
Met Asn Phe Gln Thr Met His Asn Val Thr Thr Glu Thr Lys Phe Leu  
330 335 340

tta aag ctg gtc aaa gag gga gtg gtg aaa gat ctc agt gga ggc att 1351  
Leu Lys Leu Val Lys Glu Gly Val Val Lys Asp Leu Ser Gly Gly Ile  
345 350 355

gat cgt gaa ttt tga acacagaaaa cctcagttga aaatgcaact ctaactctga 1406  
Asp Arg Glu Phe  
360

gagctgtttt tgacagcctt cttgatgtat ttctccatcc tgcagatact ttgaagtgc 1466

gctcatgttt ttaactttta atttaaaaaac acaaaaaaaaa ttttagctct tcccactttt 1526

tttttcctat ttatttgagg tcagtgtttg tttttgcaca ccattttgta aatgaaactt 1586

aagaattgaa ttggaaagac ttctcaaaga gaattgtatg taacgatgtt gtattgattt 1646

ttaagaaagt aatttaattt gtaaaacttc tgctcgttta cactgcacat tgaatacagg 1706

taactaattg gaaggagagg ggaggtcact cttttgatgg tggccctgaa cctcattctg 1766

gttccctgct gcgctgcttg gtgtgacca cggaggatcc actcccagga tgacgtgctc 1826

cgtagctctg ctgctgatac tgggtctgcg atgcagcggc gtgaggcctg ggctgggttg 1886

agaaggtcac aacccttctc tgttggtctg ctttctgctg aaagactcga gaaccaacca 1946

gggaagctgt cctggaggtc cctggtcgga gagggacata gaatctgtga cctctgacaa 2006

ctgtgaagcc accctgggct acagaaacca cagtcttccc agcaattatt acaattcttg 2066

aattccttg ggatttttta ctgcccttcc aaagcactta agtgtagat ctaacgtggt 2126

ccagtgtctg tctgagggtga cttaaaaaat cagaacaaaa cttctattat ccagagtcac 2186

gggagagtac accctttcca ggaataatgt tttgggaaac actgaaatga aatcttccca 2246

gtattataaa ttgtgtattt aaaaaaaga aacttttctg aatgcctacc tggcggtgta 2306

taccaggcag tgtgccagtt taaaaagatg aaaaagaata aaaacttttg aggaac 2362

<210> 2

<211> 362

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Arg Pro Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Leu Lys Cys Thr Leu  
1 5 10 15

Leu Val Phe Gly Val Trp Ile Leu Tyr Ile Leu Lys Leu Asn Tyr Thr  
20 25 30

# ES 2 375 626 T3

Thr Glu Glu Cys Asp Met Lys Lys Met His Tyr Val Asp Pro Asp His  
 35 40 45

Val Lys Arg Ala Gln Lys Tyr Ala Gln Gln Val Leu Gln Lys Glu Cys  
 50 55 60

Arg Pro Lys Phe Ala Lys Thr Ser Met Ala Leu Leu Phe Glu His Arg  
 65 70 75 80

Tyr Ser Val Asp Leu Leu Pro Phe Val Gln Lys Ala Pro Lys Asp Ser  
 85 90 95

Glu Ala Glu Ser Lys Tyr Asp Pro Pro Phe Gly Phe Arg Lys Phe Ser  
 100 105 110

Ser Lys Val Gln Thr Leu Leu Glu Leu Leu Pro Glu His Asp Leu Pro  
 115 120 125

Glu His Leu Lys Ala Lys Thr Cys Arg Arg Cys Val Val Ile Gly Ser  
 130 135 140

Gly Gly Ile Leu His Gly Leu Glu Leu Gly His Thr Leu Asn Gln Phe  
 145 150 155 160

Asp Val Val Ile Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val Glu Gly Tyr Ser Glu  
 165 170 175

His Val Gly Asn Lys Thr Thr Ile Arg Met Thr Tyr Pro Glu Gly Ala  
 180 185 190

Pro Leu Ser Asp Leu Glu Tyr Tyr Ser Asn Asp Leu Phe Val Ala Val  
 195 200 205

Leu Phe Lys Ser Val Asp Phe Asn Trp Leu Gln Ala Met Val Lys Lys  
 210 215 220

Glu Thr Leu Pro Phe Trp Val Arg Leu Phe Phe Trp Lys Gln Val Ala  
 225 230 235 240

Glu Lys Ile Pro Leu Gln Pro Lys His Phe Arg Ile Leu Asn Pro Val  
 245 250 255

Ile Ile Lys Glu Thr Ala Phe Asp Ile Leu Gln Tyr Ser Glu Pro Gln

# ES 2 375 626 T3

260	265	270
Ser Arg Phe Trp Gly Arg Asp Lys Asn Val Pro Thr Ile Gly Val Ile 275 280 285		
Ala Val Val Leu Ala Thr His Leu Cys Asp Glu Val Ser Leu Ala Gly 290 295 300		
Phe Gly Tyr Asp Leu Asn Gln Pro Arg Thr Pro Leu His Tyr Phe Asp 305 310 315 320		
Ser Gln Cys Met Ala Ala Met Asn Phe Gln Thr Met His Asn Val Thr 325 330 335		
Thr Glu Thr Lys Phe Leu Leu Lys Leu Val Lys Glu Gly Val Val Lys 340 345 350		
Asp Leu Ser Gly Gly Ile Asp Arg Glu Phe 355 360		

<210> 3  
 <211> 2221  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (151)..(1314)  
 <223>

<400> 3	
tcttttgcgat accccaggcc cagcgggctcc tccccagccc tgcgacgccg gacgcgcctg	60
ctaggggaca cgggcggagg gtcgcggccc ctggctgcct acatgggagc ccccgggcag	120
ctgcgcaggt gtggacgcgg cgctgcggca atg cca agt gag ttc acc tct gca	174
Met Pro Ser Glu Phe Thr Ser Ala	
1 5	
aag ctg aga agt gat tgc tca agg acc tcc ctg caa tgg tac acc cga	222
Lys Leu Arg Ser Asp Cys Ser Arg Thr Ser Leu Gln Trp Tyr Thr Arg	
10 15 20	
acc cag cac aag atg aga aga ccc agc ttg tta ata aaa gac atc tgc	270
Thr Gln His Lys Met Arg Arg Pro Ser Leu Leu Ile Lys Asp Ile Cys	
25 30 35 40	
aag tgc acg ttg gtt gca ttt gga gtc tgg ctc ctg tac atc ctc att	318
Lys Cys Thr Leu Val Ala Phe Gly Val Trp Leu Leu Tyr Ile Leu Ile	
45 50 55	

ES 2 375 626 T3

ttg aat tac acc gct gaa gaa tgt gac atg aaa aga atg cac tat gtg Leu Asn Tyr Thr Ala Glu Glu Cys Asp Met Lys Arg Met His Tyr Val 60 65 70	366
gac cct gac cgg ata aag aga gct cag agc tat gct cag gaa gtc ttg Asp Pro Asp Arg Ile Lys Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Glu Val Leu 75 80 85	414
cag aag gaa tgt cgg ccc agg tac gcg aag acg gct atg gct ctg tta Gln Lys Glu Cys Arg Pro Arg Tyr Ala Lys Thr Ala Met Ala Leu Leu 90 95 100	462
ttt gag gac agg tac agc atc aac ttg gag cct ttt gtg cag aag gtc Phe Glu Asp Arg Tyr Ser Ile Asn Leu Glu Pro Phe Val Gln Lys Val 105 110 115 120	510
ccc acg gcc agt gaa gct gag ctc aag tat gac ccg cct ttt gga ttc Pro Thr Ala Ser Glu Ala Glu Leu Lys Tyr Asp Pro Pro Phe Gly Phe 125 130 135	558
cgg aag ttc tcc agt aaa gtc cag agc ctc ttg gat atg ctg ccc gaa Arg Lys Phe Ser Ser Lys Val Gln Ser Leu Leu Asp Met Leu Pro Glu 140 145 150	606
cat gac ttt tct gaa cac ttg aga gcc aag gcc tgc aag cgc tgt gtg His Asp Phe Ser Glu His Leu Arg Ala Lys Ala Cys Lys Arg Cys Val 155 160 165	654
gtt gtt ggg aac ggg ggc atc ctg cac gga cta gag ctg ggt cac gcc Val Val Gly Asn Gly Gly Ile Leu His Gly Leu Glu Leu Gly His Ala 170 175 180	702
ctc aac cag ttc gat gtg gta ata agg ttg aac agt gcg cca gtt gag Leu Asn Gln Phe Asp Val Val Ile Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val Glu 185 190 195 200	750
ggt tac tct gaa cac gtt ggg aat aaa act act ata agg atg act tac Gly Tyr Ser Glu His Val Gly Asn Lys Thr Thr Ile Arg Met Thr Tyr 205 210 215	798
cca gag ggt gcg cca ctg tcg gac gtt gaa tac tac gcc aat gat ttg Pro Glu Gly Ala Pro Leu Ser Asp Val Glu Tyr Tyr Ala Asn Asp Leu 220 225 230	846
ttc gtt act gtt tta ttt aag agt gtt gat ttc aag tgg ctt caa gca Phe Val Thr Val Leu Phe Lys Ser Val Asp Phe Lys Trp Leu Gln Ala 235 240 245	894
atg gta aaa aat gaa agc ctg ccc ttt tgg gtt cgc ctc ttc ttt tgg Met Val Lys Asn Glu Ser Leu Pro Phe Trp Val Arg Leu Phe Phe Trp 250 255 260	942
aag caa gtg gca gaa aaa gtc cca ctc cag cca aag cac ttc agg att Lys Gln Val Ala Glu Lys Val Pro Leu Gln Pro Lys His Phe Arg Ile 265 270 275 280	990
ttg aac cca gtt atc atc aaa gaa act gcc ttc gac atc ctt cag tac Leu Asn Pro Val Ile Ile Lys Glu Thr Ala Phe Asp Ile Leu Gln Tyr 285 290 295	1038

# ES 2 375 626 T3

```

tca gag cct cag tca aga ttc tgg ggc cat gat aag aac atc ccc acg      1086
Ser Glu Pro Gln Ser Arg Phe Trp Gly His Asp Lys Asn Ile Pro Thr
          300                      305                      310

atc ggc gtc att gcc gtt gtc ttg gct aca cat ctg tgt gat gaa gtc      1134
Ile Gly Val Ile Ala Val Val Leu Ala Thr His Leu Cys Asp Glu Val
          315                      320                      325

agc ctg gca ggc ttt ggc tac gac ctc agt caa ccc agg acc cct ctg      1182
Ser Leu Ala Gly Phe Gly Tyr Asp Leu Ser Gln Pro Arg Thr Pro Leu
          330                      335                      340

cac tac ttt gac agt cag tgc atg ggc gcc atg cac tgg cag gtc atg      1230
His Tyr Phe Asp Ser Gln Cys Met Gly Ala Met His Trp Gln Val Met
          345                      350                      355                      360

cac aat gtg acc aca gag acc aag ttc ctc ctg aag ctc ctc aag gag      1278
His Asn Val Thr Thr Glu Thr Lys Phe Leu Leu Lys Leu Leu Lys Glu
          365                      370                      375

ggc gtg gtg gag gac ctc agc ggc ggc atc cac tga gaactcggaa      1324
Gly Val Val Glu Asp Leu Ser Gly Gly Ile His
          380                      385

cacggcacaac ctcaccacagc accgcagctg agagcgtggt gagcagcctc cacagggact      1384

tcaccctgca gctgcttcga tgtgcagcta gtgttttcaa actccacatt ttttttaaaa      1444

aaggaaaaga aagaacaaca gcaacaacaa aagctctgct ctgtgcacct cttcgtccta      1504

tttatattgaa gtcagtgttg gattttgcac agttttgtaa gttaattotta agaattgggat      1564

tggaaggact tttcaaagag aattgtatag tttattgttt ttttaaggag taatttaatt      1624

tgcagaaaact gtacacacgt actctgctca ggtgttgagg tgggaggaga ggggcttctg      1684

gccctggat gatggctgtg atgcccgata ctggggctctg ctgctctgtt tggtagaact      1744

gatggcagag aaacttcctg cctccaggat aaagggctta ctcatcacct ctggcagctg      1804

ctagacaagt tcataacccc tttctgctag tccatctgcc agctggctcg caggactcag      1864

gcagggcagc tgtcccgag gctgctggtt ggtgagccac tgtcagctga gcgccgtgat      1924

gttgccccag ggtggaagaa gccacacttc ctacactgtc agggcacttt taaacttctg      1984

gaggggtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgttca      2044

ttctgccctt ccaaatcatc taagtgttat ttaaggcact ctgctgtttg tatgagatgg      2104

ctcatagata ttatgacaaa gcctttgtta tccaggccat ggaagagga aaaagaaaag      2164

aaagagagaa aagaataaaa gcttttgagg agcccctgtg atttcctgaa aaaaaaa      2221

```

```

<210> 4
<211> 387
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

# ES 2 375 626 T3

<400> 4

Met Pro Ser Glu Phe Thr Ser Ala Lys Leu Arg Ser Asp Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Thr Ser Leu Gln Trp Tyr Thr Arg Thr Gln His Lys Met Arg Arg Pro  
20 25 30

Ser Leu Leu Ile Lys Asp Ile Cys Lys Cys Thr Leu Val Ala Phe Gly  
35 40 45

Val Trp Leu Leu Tyr Ile Leu Ile Leu Asn Tyr Thr Ala Glu Glu Cys  
50 55 60

Asp Met Lys Arg Met His Tyr Val Asp Pro Asp Arg Ile Lys Arg Ala  
65 70 75 80

Gln Ser Tyr Ala Gln Glu Val Leu Gln Lys Glu Cys Arg Pro Arg Tyr  
85 90 95

Ala Lys Thr Ala Met Ala Leu Leu Phe Glu Asp Arg Tyr Ser Ile Asn  
100 105 110

Leu Glu Pro Phe Val Gln Lys Val Pro Thr Ala Ser Glu Ala Glu Leu  
115 120 125

Lys Tyr Asp Pro Pro Phe Gly Phe Arg Lys Phe Ser Ser Lys Val Gln  
130 135 140

Ser Leu Leu Asp Met Leu Pro Glu His Asp Phe Ser Glu His Leu Arg  
145 150 155 160  
Ala Lys Ala Cys Lys Arg Cys Val Val Val Gly Asn Gly Gly Ile Leu  
165 170 175

His Gly Leu Glu Leu Gly His Ala Leu Asn Gln Phe Asp Val Val Ile  
180 185 190

Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val Glu Gly Tyr Ser Glu His Val Gly Asn  
195 200 205

Lys Thr Thr Ile Arg Met Thr Tyr Pro Glu Gly Ala Pro Leu Ser Asp  
210 215 220

Val Glu Tyr Tyr Ala Asn Asp Leu Phe Val Thr Val Leu Phe Lys Ser  
225 230 235 240

# ES 2 375 626 T3

Val Asp Phe Lys Trp Leu Gln Ala Met Val Lys Asn Glu Ser Leu Pro  
245 250 255

Phe Trp Val Arg Leu Phe Phe Trp Lys Gln Val Ala Glu Lys Val Pro  
260 265 270

Leu Gln Pro Lys His Phe Arg Ile Leu Asn Pro Val Ile Ile Lys Glu  
275 280 285

Thr Ala Phe Asp Ile Leu Gln Tyr Ser Glu Pro Gln Ser Arg Phe Trp  
290 295 300

Gly His Asp Lys Asn Ile Pro Thr Ile Gly Val Ile Ala Val Val Leu  
305 310 315 320

Ala Thr His Leu Cys Asp Glu Val Ser Leu Ala Gly Phe Gly Tyr Asp  
325 330 335

Leu Ser Gln Pro Arg Thr Pro Leu His Tyr Phe Asp Ser Gln Cys Met  
340 345 350

Gly Ala Met His Trp Gln Val Met His Asn Val Thr Thr Glu Thr Lys  
355 360 365

Phe Leu Leu Lys Leu Leu Lys Glu Gly Val Val Glu Asp Leu Ser Gly  
370 375 380

Gly Ile His  
385

<210> 5  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> ARN de interferencia

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (20)..(21)  
<223> n = t 5-metiluridina

<400> 5

ggguuauucu gaacauguun n

21

## REFERENCIAS

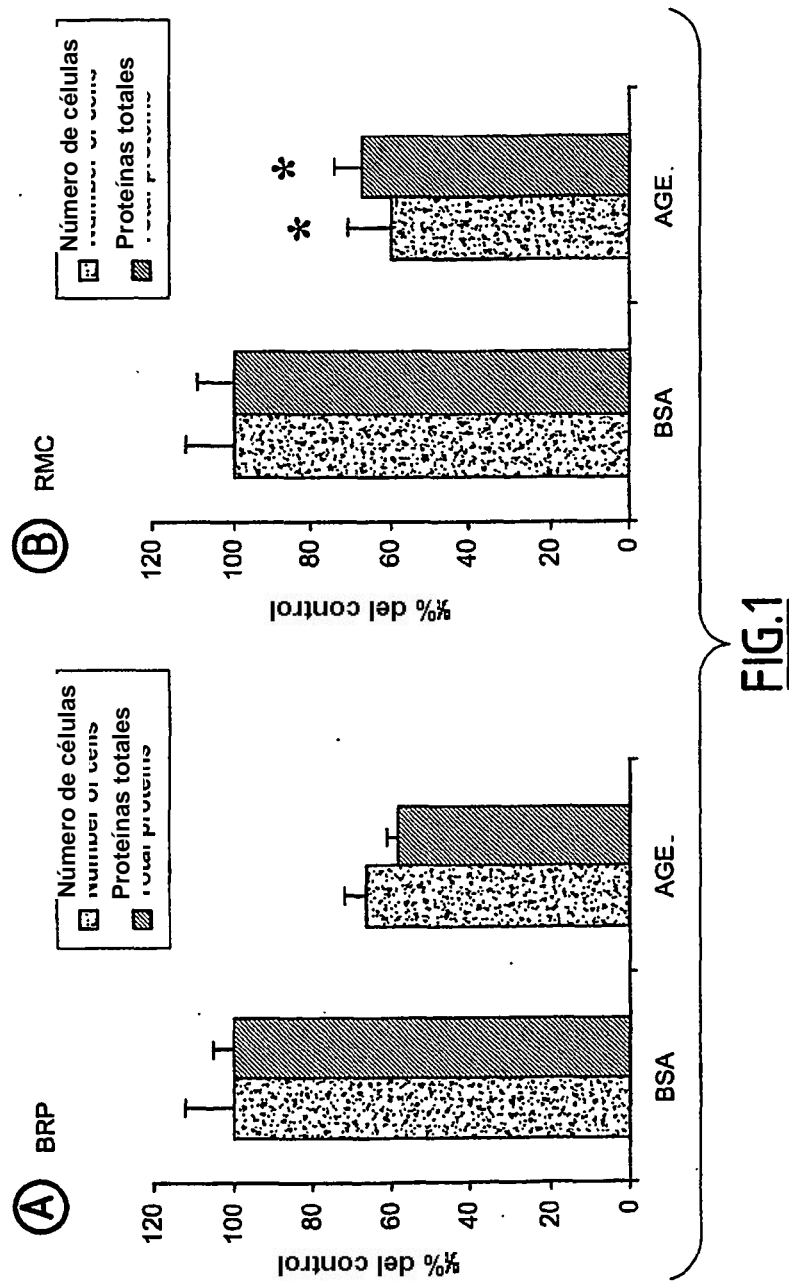
- Bass, Cell, 2000, 101, 235-238
- Benoit y col. (1982) PNAS USA, 79, 917-921
- Bouchon y col. (1990) Biochim. Biophys. Acta, 1051, 1-5
- 5 Cech T.R. (1989) RNA as an enzyme. Biochem. Int., 18, 7-14
- Felgner P.L., Ringold G.M. (1989) Cationic liposome-mediated transfection. Nature, 337, 387-8
- Fong y col. (2003) Diabetes Care, 26, 226-229
- Forrester y col. (1997) Pathogenesis of diabetic retinopathy and cataract. En Textbook of diabetes, Pickup J., Williams G., Eds Oxford, 45.1-45.19
- 10 Fraley R., Subramani S., Berg P., Papahadjopoulos D. (1980) Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. J. Biol. Chem., 255, 10431-5
- Harlow E. y col. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York
- Hakomori y col. (1990) J. Biol. Chem., 265, 18713-18716
- Hatanaka Y. y col. (1996) Synthesis and characterisation of a carbene-generating biotinylated lactosylceramide analog as a novel chromogenic photoprobe for GM3 synthase. Chem. Pharm. Bull. (Tokio), 44(5), 1111-4
- 15 Hofmann y col. (1999) Cell, 97, 889-901
- Inokuchi J. y col. (1998) A synthetic ceramide analog (L-PDMP) up-regulates neuronal function. Ann. NY Acad. Sci., 845, 219-24
- Jayasena (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. Clin. Chem., 45(9), 1628-50
- 20 Kaneda Y., Iwai K., Uchida T. (1989) Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. Science, 243, 375-8
- Krolewski y col. (1997) Clinical features and epidemiology of diabetic nephropathy. En Textbook of diabetes, Pickup J., Williams G., Eds Oxford, 53,153,13
- 25 Köhler y Milstein (1975) Nature, 256, 495-497
- Lal y col. (2002) Kidney Int., 61, 2006-2014
- Hakomori y col. (1996) J. Biol. Chem., 66, 2160-2167
- Marks y col. (1991) J. Mol. Biol., 222, 581-597
- Natalizio y col. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun., 281, 78-83
- 30 Pagano J.S., McCutchan J.H., Vaheri A. (1967) Factors influencing the enhancement of the infectivity of poliovirus ribonucleic acid by diethylaminoethyl-dextran. J. Virol., 1, 891-7
- Rippin J.D., Barnett A.H., Bain S.C. (2004) Cost-effective strategies in the prevention of diabetic nephropathy. Pharmacoeconomics, 22(1), 9-28
- Rubin-Carrez C. (2000). Les mimes peptidiques (Péptidos miméticos). Le technoscope, Biofutur, vol. 199
- 35 Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.



- Schmidt y col. (1994) *Arterioscler. Thromb.*, 14, 1521-1528
- Schmidt y col. (1995) *J. Clin. Invest.*, 96, 1395-1403
- Sharp, *Genes Dev.*, 2001, 15, 485, 49
- Singh y col. (2001) *Diabetologia*, 44, 129-146
- 5 Scott J.K. y Smith G.P., *Science*, 1990, 249, 386-390
- Stitt y col. (2003) *Exp. Mol. Pathol.*, 75, 95-1088
- Takemoto y col. (2002) *Am. J. Pathol.*, 161, 799-805
- Tuerk C. y Gold L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 3, 249, 505-10
- 10 Van Echten y col. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 5341-5344
- Wakarchuk y col. (1996) Functional relationships of the genetic locus encoding the glycosyltransferase enzymes involved in expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.*, 271(32), 19166-73
- Wautier y col. (2001) *Diabetes Metab.*, 27, 535-542
- 15 Wolf y col. (2000) *Kidney Int. Supl.*, 77, S59-S66

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor de la GM3 sintetasa para la fabricación de un fármaco destinado al tratamiento de una complicación microvascular de la diabetes, en el que el inhibidor se selecciona del grupo consistente en ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, ARN de interferencia, aptámeros y un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la GM3 sintetasa humana y en el que la complicación microvascular de la diabetes es la nefropatía diabética.  
5
2. Uso según la reivindicación 1 en el que el inhibidor es un inhibidor de la expresión del gen o proteína GM3 sintetasa.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 2, en el que el inhibidor es una secuencia de ácido nucleico antisentido que hibrida específicamente con la secuencia SEC ID No. 1 en condiciones muy rigurosas.
- 10 4. Uso según la reivindicación 1 en el que el inhibidor es un inhibidor de la actividad GM3 sintetasa.
5. Método *in vitro* para la selección o identificación de compuestos útiles en el tratamiento y/o prevención de complicaciones microvasculares de la diabetes, en el que se evalúa la capacidad de al menos un compuesto de ensayo para inhibir la actividad GM3 sintetasa, siendo una disminución en el nivel de la actividad GM3 sintetasa indicativa de un compuesto útil en el tratamiento y/o prevención de complicaciones microvasculares de la diabetes y en el que la complicación microvascular de la diabetes es la nefropatía diabética.  
15
6. Método según la reivindicación 5, comprendiendo dicho método de selección etapas que consisten en poner al menos un compuesto de ensayo en contacto con una célula que expresa una GM3 sintetasa y determinar la capacidad de dicho compuesto para inhibir la síntesis intracelular de gangliósidos GM3, siendo una disminución en el nivel de síntesis de gangliósidos GM3 en la célula indicativa de un compuesto útil en el tratamiento y/o prevención de complicaciones microvasculares de la diabetes, en el que la complicación microvascular de la diabetes es la nefropatía diabética.  
20
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones de la 5 a la 6, comprendiendo dicho método de selección etapas que consisten en poner al menos un compuesto de ensayo en contacto con una GM3 sintetasa y determinar la capacidad de dicho compuesto para inhibir la transferencia de un resto de ácido siálico de un dador de ácido siálico a un grupo 3-hidroxilo de un resto galactosa de un aceptor de ácido siálico, siendo una disminución en el nivel de actividad de transferencia de ácido siálico indicativa de un compuesto que inhibe la GM3 sintetasa y es útil en el tratamiento y/o prevención de complicaciones microvasculares de la diabetes, en el que la complicación microvascular de la diabetes es la nefropatía diabética.  
25
8. Método según la reivindicación 7, en el que se determina el nivel de transferencia de ácido siálico de CMP-N-acetilneuraminato a lactosilceramida.  
30
9. Método según la reivindicación 7 u 8, en el que el dador y/o aceptor de ácido siálico se marcan de forma detectable.



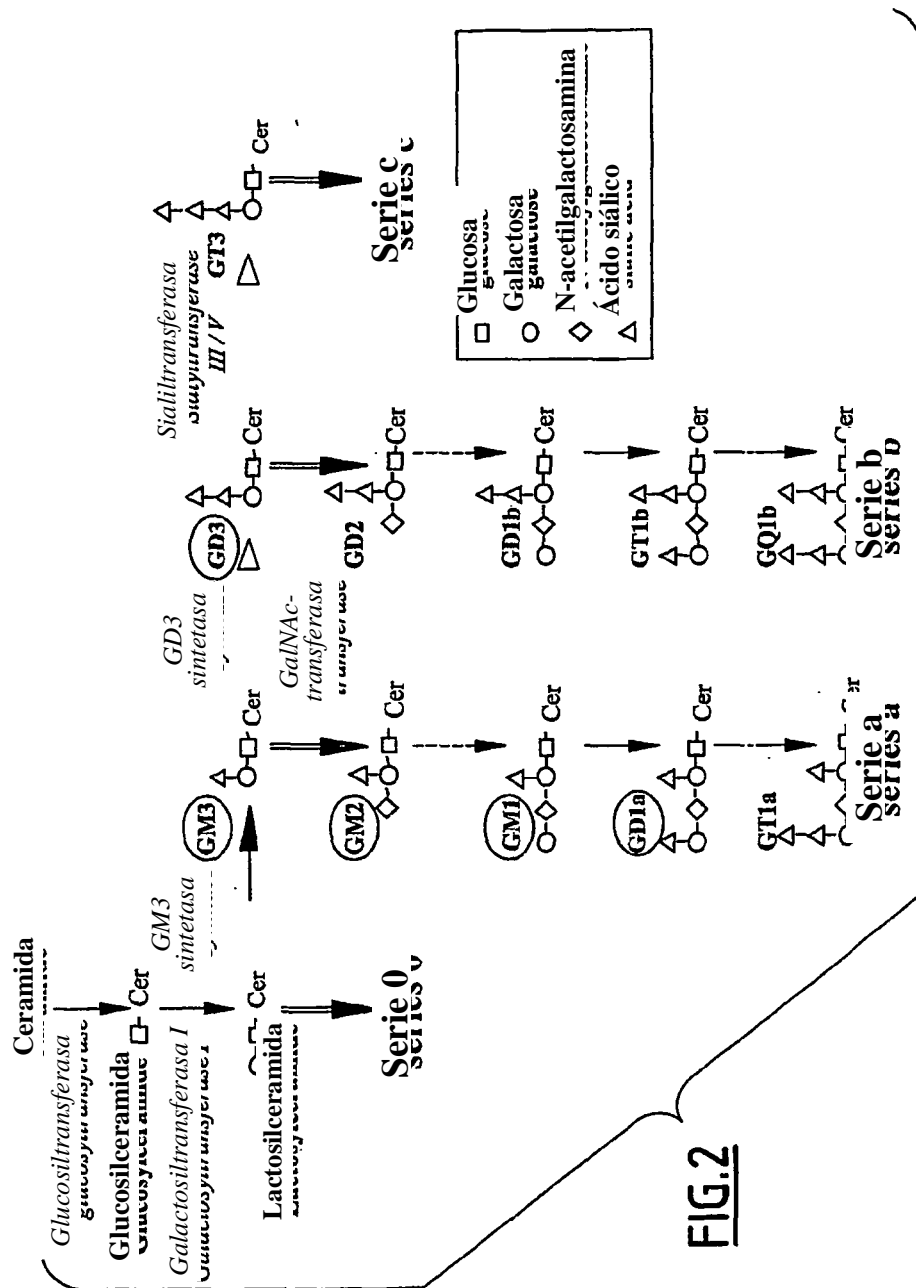
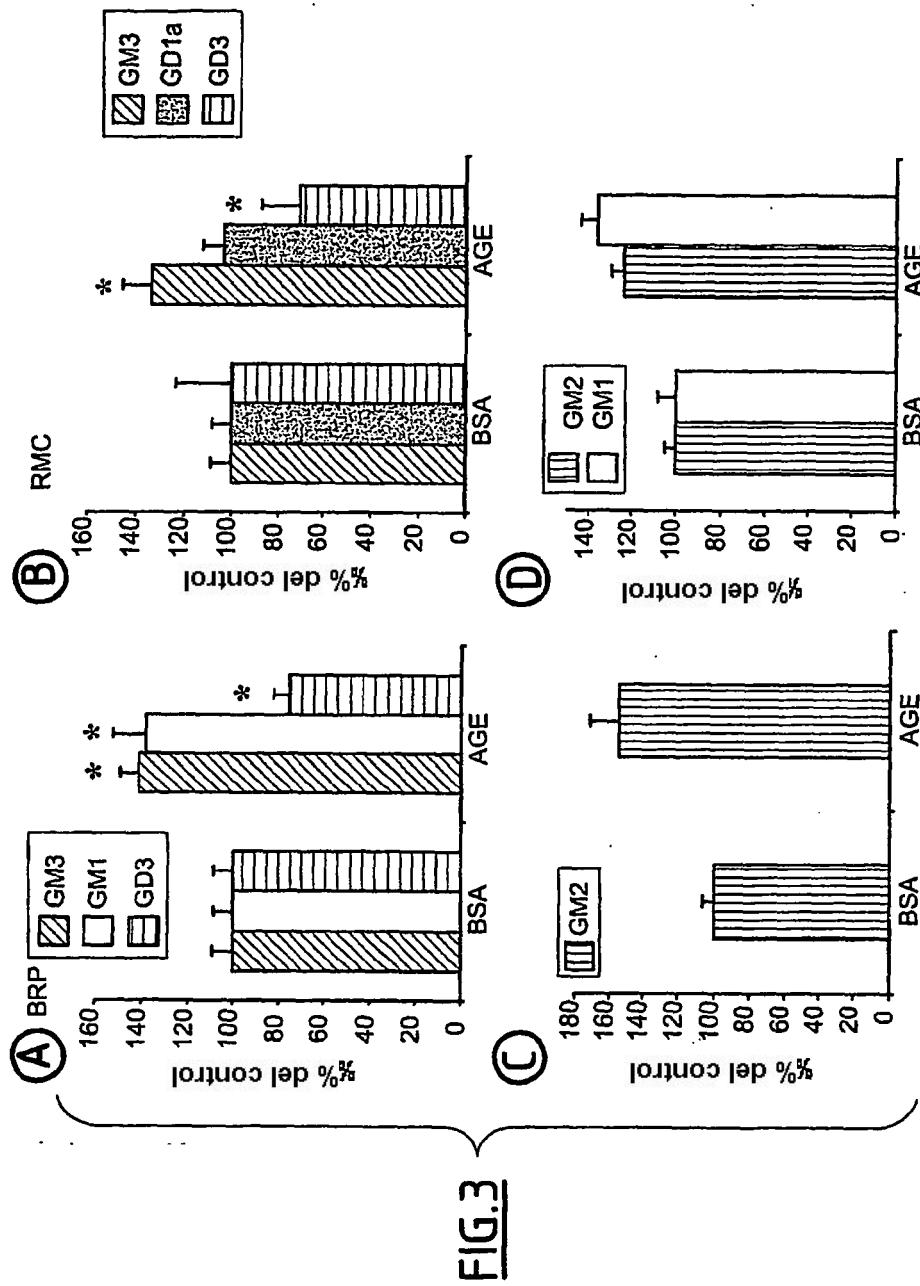
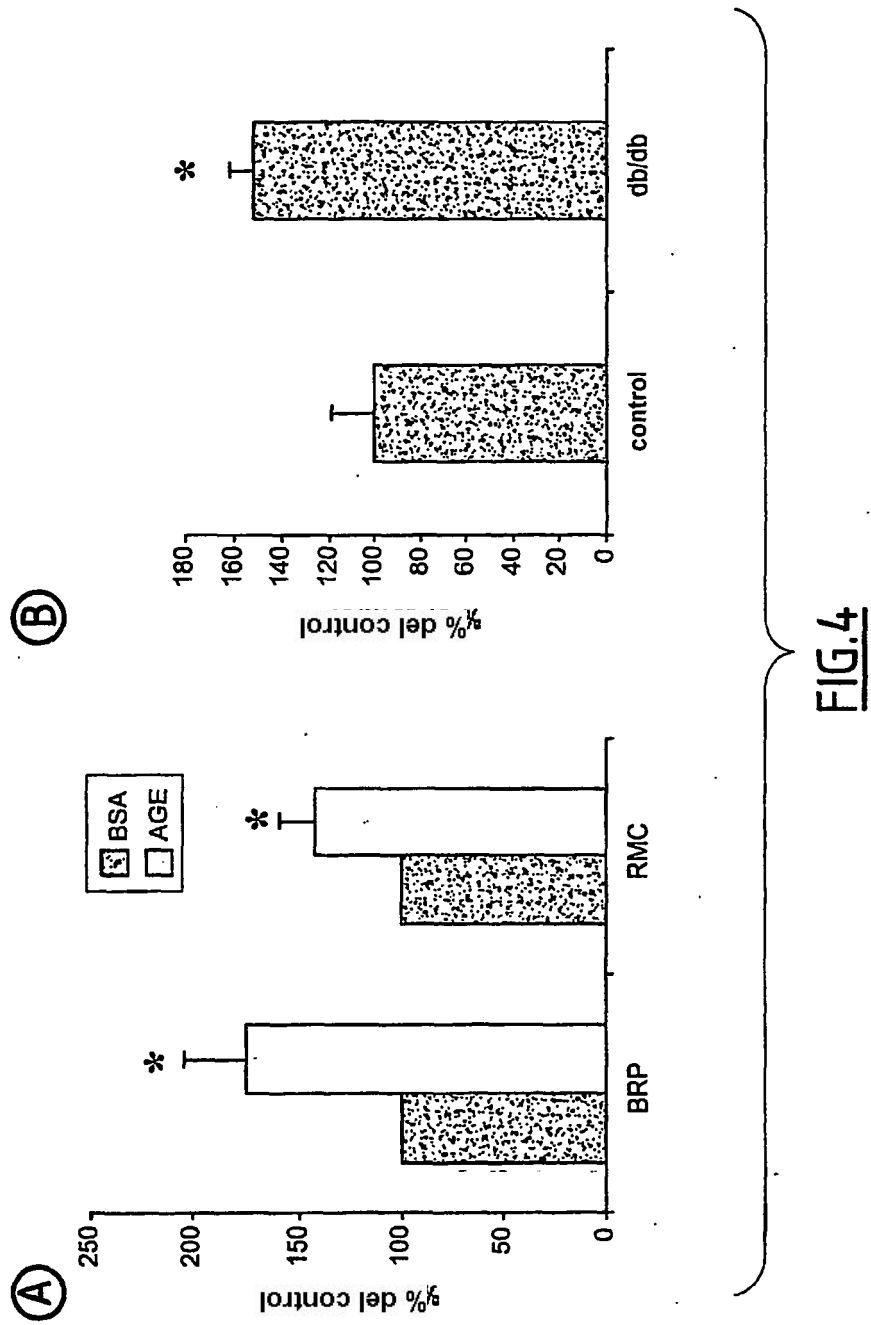
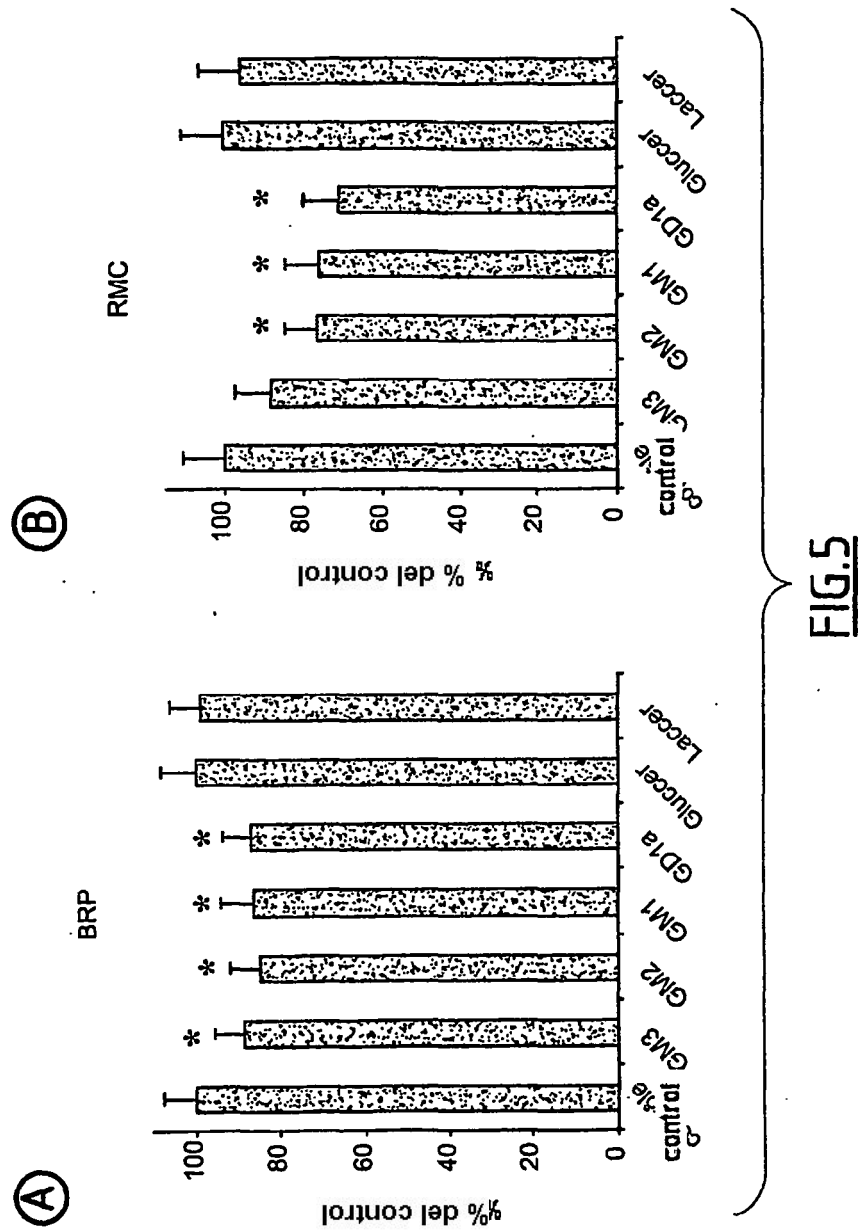
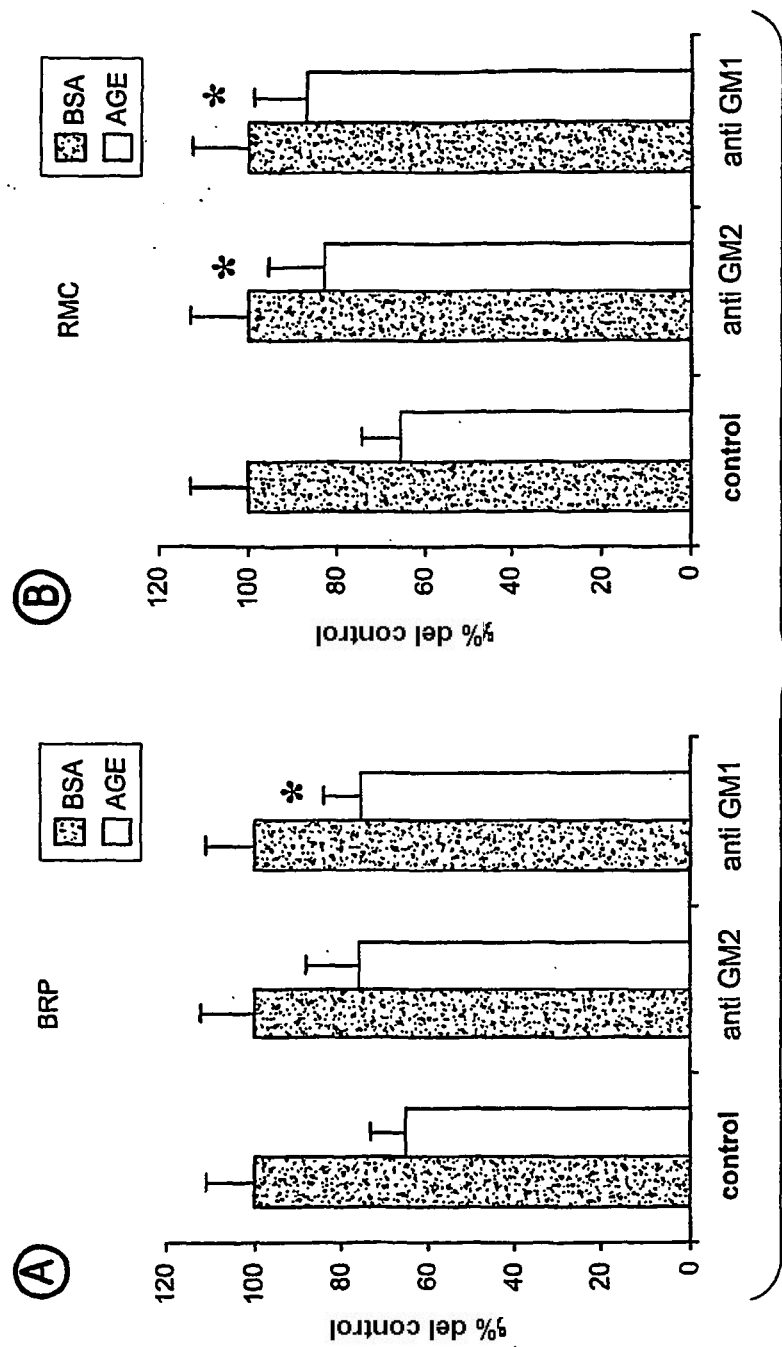


FIG.2



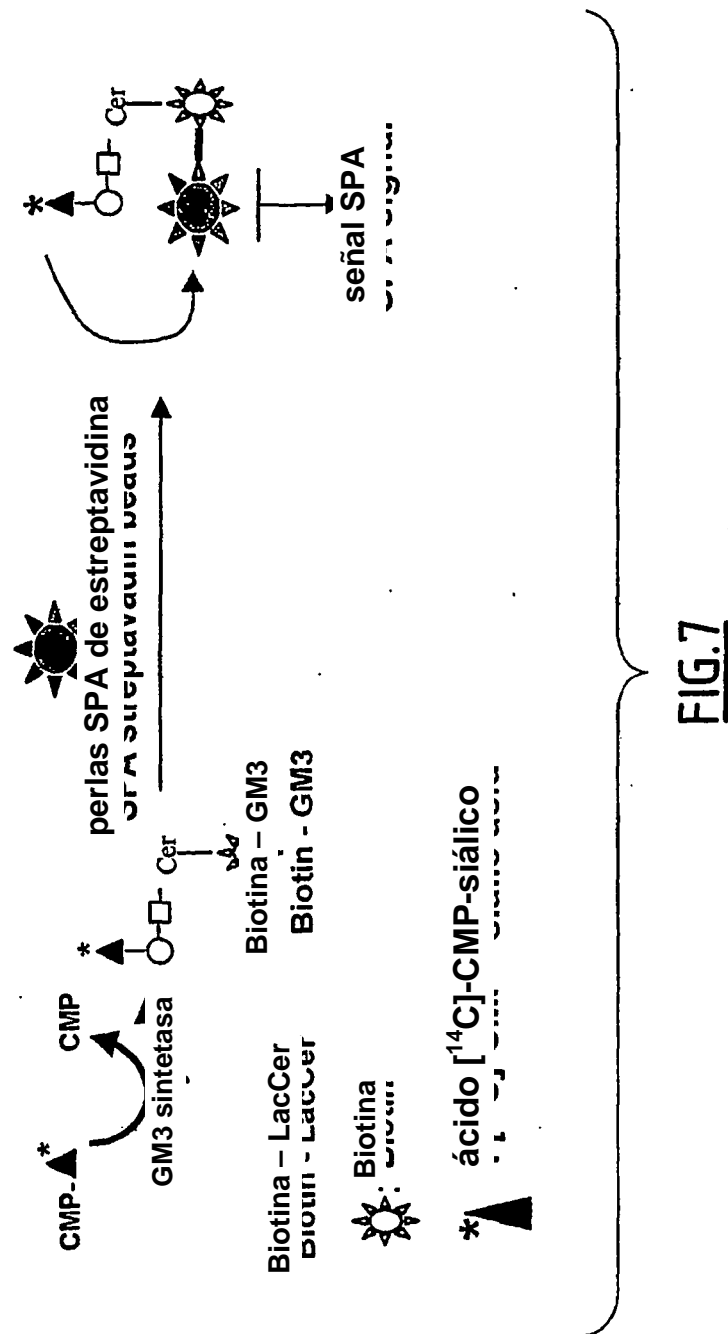






**FIG.6**





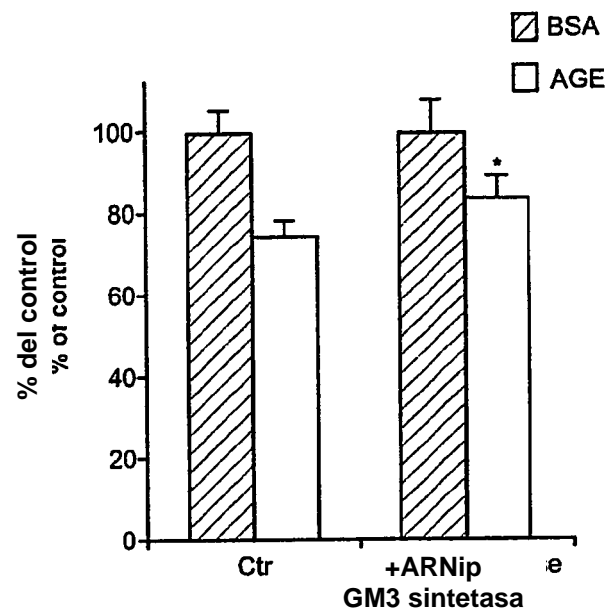


FIG.8

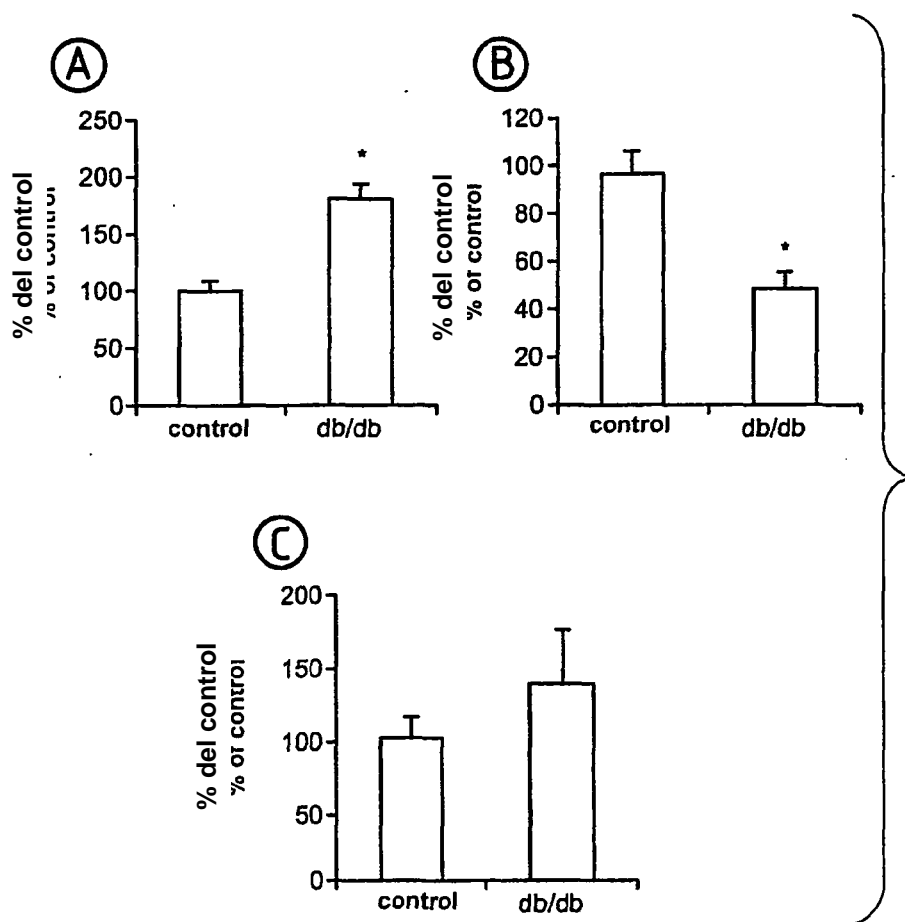


FIG.9