

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 580**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2015** **PCT/GB2015/051741**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015** **WO15189641**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2015** **E 15730235 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018** **EP 3154998**

54 Título: **Agentes para mejorar la administración de fármacos**

30 Prioridad:

12.06.2014 GB 201410507

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

21.11.2018

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF BATH (100.0%)

Claverton Down Bath

Bath and North East Somerset BA2 7AY, GB

72 Inventor/es:

MRSNY, RANDALL JAY

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 690 580 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes para mejorar la administración de fármacos

5 Antecedentes de la invención

Las células epiteliales constituyen una barrera para la administración de fármacos. Por ejemplo, la absorción de agentes terapéuticos administrados por vía oral puede estar limitada por el epitelio intestinal, y la absorción de agentes terapéuticos administrados por inhalación puede estar limitada por el epitelio pulmonar. Del mismo modo, la absorción de agentes terapéuticos administrados a otros sitios epiteliales, tales como la cavidad rectal, la cavidad bucal, la cavidad vaginal, la cavidad nasal o la administración tópica a la piel, puede estar limitada de manera similar por una barrera epitelial. Esta barrera presenta un desafío para la administración de una amplia gama de fármacos, incluidas moléculas pequeñas, péptidos, proteínas, vacunas y ácidos nucleicos. Se han realizado varios intentos para mitigar el efecto de la barrera a la absorción del fármaco proporcionada por el epitelio. Sin embargo, muchos de esos intentos implican el uso de agentes que, ya sea deliberadamente o como un efecto colateral involuntario, dañan el epitelio. Tal daño puede dar como resultado el paso descontrolado de materiales a través del epitelio, y que, en posible combinación con señales de peligro inmunológico resultantes del daño celular, puede dar como resultado una inflamación no deseada del epitelio. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar técnicas mejoradas para ayudar al paso de agentes terapéuticos a través de una superficie epitelial, preferiblemente de una manera que sea controlada, temporal y que no produzca daño celular inaceptable (Brayden & Maher (2000) Therapeutic Delivery 1 (1): 5-9).

El desafío a la absorción del fármaco presentado por el epitelio ha dado lugar a que algunos fármacos necesiten ser administrados por rutas distintas a través de un epitelio, por ejemplo mediante inyección subcutánea. Esto trae consigo una serie de desventajas que incluyen la menor aceptabilidad del paciente, menor cumplimiento por parte del paciente y mayores costos asociados con el uso y almacenamiento de formulaciones líquidas, el suministro de dispositivos de inyección y la eliminación de dispositivos de inyección usados de una manera segura y responsable.

El epitelio proporciona una barrera a la absorción de fármacos porque comprende una capa de células que están conectadas entre sí mediante uniones estrechas que proporcionan un cierre hermético contra muchas sustancias pero que pueden abrirse transitoriamente. Existe la necesidad de poder controlar mejor la apertura de unión estrecha para ayudar en la administración de productos terapéuticos. Se han propuesto varias soluciones al problema de abrir uniones estrechas. Estos esfuerzos han llevado a la identificación de dos conjuntos de moléculas: aminoácidos extendidos no nativos, (NEAA) y ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los NEAA han sido desarrollados principalmente por la empresa Emisphere, que han demostrado mejoras marginales en la absorción de fármacos, pero aún no han presentado una solicitud para la aprobación reglamentaria de un nuevo medicamento. Un AGCC, el caprato de sodio se usa en un producto de supositorio rectal aprobado para mejorar la absorción de ampicilina. Sin embargo, se sospecha que el mecanismo de captación mejorada es a través del daño local del epitelio de la mucosa (Maher et al. (2009) Adv. Drug Deliv. Rev. 61: 1427-1449).

Existe un interés particular en la administración oral de insulina, el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y otras moléculas relacionadas para el tratamiento de la diabetes, la obesidad, la supresión del apetito y la mejora del metabolismo de los hidratos de carbono. Tales compuestos necesitan especialmente una vía de administración oral porque típicamente se administran durante meses o años, lo que significa que evitar las inyecciones y su costo potencialmente menor aumentaría significativamente la aceptabilidad del paciente, y también porque en la naturaleza estas hormonas intestinales entran al torrente sanguíneo del sujeto a través de la vena porta hepática y el suministro a través de una barrera intestinal se asemejaría más estrechamente a la administración fisiológica. J. Pathol. 172 (4), abril de 2008, páginas 905-915, describen péptidos de claudina útiles para facilitar la absorción epitelial. La presente invención se basa en el descubrimiento de compuestos útiles para la apertura controlada de uniones estrechas epiteliales.

Resumen de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un péptido que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 1:

$X_4-X_5-X_6-X_7-X_8$ Fórmula 1 (Id. de Sec. nº: 1)

en la que:

X_4 es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu;
 X_5 es un residuo de aminoácido hidrófobo pequeño, por ejemplo Val o Ala;
 X_6 es un residuo de aminoácido cargado positivamente, por ejemplo Lys o Arg;
 X_7 es un residuo de aminoácido hidrófilo, por ejemplo, Tyr, Phe, Thr o Ser; y
 X_8 es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu,

o que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 2

$X_5-X_6-X_7-X_8$ Fórmula 2 (Id. de Sec. nº: 2)

5 en la que:

X_5 es cualquier porción de aminoácido;

X_6 es Tyr;

X_7 es Gln; y

10 X_8 es Tyr,

o comprende una forma retro-inversa de la secuencia de acuerdo con la Fórmula 1 o Fórmula 2 en la que todos los residuos de aminoácidos están en la configuración D y el orden de secuencia peptídica está invertido, en donde el péptido comprende además una secuencia CPP de un péptido que penetra en la célula.

15 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una secuencia que comprende un péptido de acuerdo con la Fórmula 1

$X_4-X_5-X_6-X_7-X_8$ Fórmula 1 (Id. de Sec. nº: 1)

20 en la que:

X_4 es un residuo de aminoácido negativamente cargado, por ejemplo pTyr, Asp o Glu;

X_5 es un residuo de aminoácido hidrófobo pequeño, por ejemplo Val o Ala;

25 X_6 es un residuo de aminoácido cargado positivamente, por ejemplo Lys o Arg;

X_7 es un residuo de aminoácido hidrófilo, por ejemplo, Tyr, Phe, Thr o Ser; y

X_8 es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu,

y/o un péptido que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 2

30 $X_5-X_6-X_7-X_8$ Fórmula 2 (Id. de Sec. nº: 2)

en la que:

35 X_5 es cualquier resto de aminoácido;

X_6 es Tyr;

X_7 es Gln; y

X_8 es Tyr;

40 o en la que la secuencia de acuerdo con la Fórmula 1 y/o la Fórmula 2 está en configuración retro-inversa en la que todos los residuos de aminoácidos están en la configuración D y el orden de la secuencia peptídica está invertido, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto de la invención para uso como medicamento.

50 De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un método para abrir las uniones estrechas de una superficie epitelial que comprende administrar una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto de la invención al epitelio, en donde dicho método se lleva a cabo in vitro.

55 De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona un método para suministrar un agente a través de una superficie epitelial que comprende administrar dicho agente junto con un péptido de acuerdo con un primer aspecto de la invención o como parte de una composición farmacéutica de acuerdo con un segundo aspecto de la invención, en el que dicho método se lleva a cabo in vitro.

Breve descripción de los dibujos

60 Figura 1: Organización de fosfatasa y quinasas que regulan el estado de fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC). La quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), que puede fosforilar MLC, se activa por un aumento en los niveles de calcio citoplásmico (Ca^{2+})-calmodulina. La forma activada de MLCK puede ser inhibida por un pequeño inhibidor peptídico permeable a la membrana de quinasa (PIK). La actividad del complejo de la fosfatasa de cadena ligera de miosina (MLCP) está controlada por dos subunidades reguladoras conocidas como CPI-17 y MYPT1. Las acciones de estas subunidades reguladoras están, a su vez, controladas por las actividades de la proteína quinasa C y la quinasa Rho, respectivamente.

Figura 2: regulación dinámica de apertura/cierre de unión estrecha (TJ) y fosforilación/desfosforilación de MLC. En el estado nativo, MLCP está activo; esto mantiene MLC en un estado defosforilado y las estructuras TJ en un estado cerrado donde hay flujo paracelular mínimo (entre células epiteliales adyacentes) de solutos. La activación sostenida de MLCK o la supresión de MLCP conducirían a un estado de fosforilación de MLC aumentado y a un aumento en el flujo de soluto paracelular.

Figura 3: los residuos 1-299 de MYPT1 interactúan con PP1 en una superficie, mientras que CPI-17 interactúa con otra cara. Las representaciones en cinta de las estructuras cristalinas describen cómo se prevé que MYPT1 y CPI-17 interactúen en las células del músculo liso. Estas interacciones pueden diferir de las células epiteliales polarizadas.

Figura 4: [A] Curso de tiempo de las acciones de RRVEVKYDRR (péptido 640, Id. de Sec. n°: 3) sobre TEER (resistencia eléctrica trans-epitelial) de monocapas de células Caco-2 a 1 mM y 5 mM frente a control sin péptido. [B] Falta de citotoxicidad peptídica hasta ensayo MMT 5mM, activación de caspasa, etc.

Figura 5: Acciones de RRVEVKYDRR (péptido 640, Id. de Sec. n°: 3) y RKAKYQYRRK (péptido 250, Id. de Sec. n°: 4) frente a un control péptido (todo añadido a 5 mM) sobre TEER [izquierda] y transporte de dextrano 4 kDa marcado con fluoresceína (4FD) [derecho]. Las mediciones se realizaron a 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 120 min. A los 45 min todo el medio apical se reemplazó con 4FD pero no con péptido. A los 70 minutos, todos los medios apicales se rellenaron con 4FD más el mismo péptido presente antes del lavado. Cada valor de punto de tiempo representa la media de dos monocapas de Caco-2; no se realizó un análisis estadístico.

Figura 6: (A) TEER absoluto y (B) % de TEER inicial a través de monocapas de Caco-2 después de la aplicación del péptido 250 o el péptido 640. La flecha representa un punto en el que se lavó el péptido y se reemplazó con PBS. El control es PBS sin péptido. n = 6 para el control y n = 5 para todos los grupos peptídicos. Los datos mostrados son medias $\pm$ SD.

Figura 7: Cantidad acumulada de (A) dextrano 4kDa y (B) dextrano 70kDa que se encontró en el compartimiento basolateral después de la aplicación de dextrano con péptido 250 o péptido 640. n = 6 para el control y n = 5 para todos los grupos peptídicos. Los datos mostrados son medias $\pm$ SD.

Figura 8: (A) % de glucosa en sangre inicial después de la inyección s.c. de insulina en ratas Wistar macho. % de niveles iniciales de glucosa en sangre después de la inyección intra-intestinal de 30 UI/kg de insulina con (B) péptido 250 y (C) péptido 640. n = 3 para todos los conjuntos de datos. Los datos mostrados son medias $\pm$ SD.

Figura 9: La inyección intestinal intraluminal (ILI) de péptidos PIP aumenta transitoriamente el contenido de pMLC y potencia la absorción paracelular de insulina en tejido intestinal de rata no diabética in vivo. (A) Análisis representativo de transferencia de Western semicuantitativa utilizado para evaluar los cambios en la extensión de la cadena ligera de miosina (MLC) fosforilada en Ser¹⁹ (pMLCSer¹⁹) con respecto al contenido total de MLC. (B) La inyección ILI de péptidos PIP aumenta el contenido de pMLC. Proporción de los niveles de MLC respecto los niveles de pMLC-Ser¹⁹ en tejido intestinal de rata en puntos de tiempo seleccionados después de la aplicación apical de péptidos PIP a concentraciones designadas. * p < 0,05. (C) Transporte paracelular de insulina fluorescente (marcada con Cy3) potenciada por péptidos PIP después de la inyección ILI. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul).

Figura 10: Los péptidos PIP 250 y 640 potencian la captación de insulina humana con diferentes cinéticas desde la luz intestinal de ratas no diabéticas. (A) Perfiles de concentración de tiempo de insulina en muestras de suero de sangre recogida de la vena porta después de la inyección ILI de péptidos PIP con 30 UI/kg de insulina. El ANOVA de una vía muestra conjuntos de datos significativamente diferentes entre sí (p < 0,01). Las pruebas posteriores de Bonferroni muestran que la insulina con el péptido 250 (p < 0,01) y la insulina con el péptido 640 (p < 0,05) fueron significativamente diferentes de la insulina solamente. (B) Perfiles de concentración de tiempo de insulina en muestras de suero recogidas de la vena de la cola después de la inyección ILI de péptidos PIP con 30 UI/kg de insulina. No hubo diferencias significativas entre los grupos cuando se compararon utilizando ANOVA de una vía (C) Perfiles de concentración de tiempo de insulina en muestras de suero de sangre recogida de la cola y venas porta de ratones no diabéticos después de una inyección SC de 3 UI/kg de insulina humana. Los datos son medias $\pm$ SD para n = 3 para cada grupo de tratamiento.

Figura 11: Los péptidos PIP 250 y 640 potencian la captación de insulina humana con diferentes cinéticas desde la luz intestinal de ratas no diabéticas. (A) Perfiles de concentración de tiempo de insulina en muestras de suero de sangre recogida de la vena porta después de la inyección ILI de péptidos PIP con 30 UI/kg de insulina. El ANOVA de una vía muestra conjuntos de datos significativamente diferentes entre sí (p < 0,01). Las pruebas posteriores de Bonferroni muestran que la insulina con el péptido 250 (p < 0,01) y la insulina con el péptido 640 (p < 0,05) fueron significativamente diferentes de la insulina solamente. (B) Perfiles de concentración de tiempo de insulina en muestras de suero recogidas de la vena de la cola después de la inyección ILI de péptidos PIP con 30 UI/kg de insulina. No hubo diferencias significativas entre los grupos cuando se compararon utilizando ANOVA de una vía (C) Perfiles de concentración de tiempo de insulina en muestras de suero de sangre recogida de la cola y venas porta

de ratones no diabéticos después de una inyección SC de 3 UI/kg de insulina humana. Los datos son medias $\pm$ SD para $n = 3$ para cada grupo de tratamiento.

Definiciones

Sales y solvatos

Las sales y solvatos de péptidos de la invención son preferiblemente aquellos en los que el contraión o disolvente asociado es farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, las sales y solvatos que tienen contraiones no farmacéuticamente aceptables o disolventes asociados están dentro del alcance de la presente invención, por ejemplo, para uso como compuestos intermedios.

Actividad de péptidos

Los péptidos relacionados con todos los aspectos de la invención son preferiblemente activos en su capacidad para potenciar el transporte paracelular. Esto puede medirse de acuerdo con uno de los métodos detallados en este documento (especialmente en los Ejemplos).

Sales y solvatos

Las sales adecuadas de acuerdo con la invención incluyen las formadas con ácidos o bases orgánicos o inorgánicos. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, clórico, tartárico, acético, fosfórico, láctico, pirúvico, acético, trifluoroacético, succínico, perclórico, fumárico, maleico, glicólico, láctico, salicílico, oxaloacético, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico e isetiónico. Otros ácidos tales como oxálico, aunque en sí mismos no son farmacéuticamente aceptables, pueden ser útiles como compuestos intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables con bases incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos, por ejemplo sales de potasio y sodio, sales de metales alcalinotérreos, por ejemplo sales de calcio y magnesio, y sales con bases orgánicas, por ejemplo, diciclohexilamina y N-metil-D-glucomina.

Los expertos en la técnica de la química orgánica apreciarán que muchos compuestos orgánicos pueden formar complejos con disolventes en los que se hacen reaccionar o de los que se precipitan o cristalizan. Tales complejos se conocen como "solvatos". Por ejemplo, un complejo con agua se conoce como "hidrato". La presente invención proporciona solvatos de compuestos de la invención.

Síntesis de péptidos

Los péptidos de la invención se pueden preparar mediante cualquier técnica adecuada para preparar péptidos, que incluyen, pero no se limitan a, metodología convencional, por ejemplo, síntesis a partir de aminoácidos individuales, especialmente síntesis por etapas usando un sintetizador de péptidos automático; modificación de péptidos nativos; o técnicas de fabricación recombinantes.

Aunque es posible que los péptidos de la invención se administren solos, es preferible que estén presentes en una composición farmacéutica. Por consiguiente, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden tomar la forma de una formulación farmacéutica como se describe a continuación.

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas relacionadas con la invención incluyen aquellas adecuadas para inhalación oral, parenteral (que incluye polvos de partículas finas o neblinas que pueden generarse por medio de varios tipos de dosis medidas, aerosoles presurizados, nebulizadores o insufladores), rectales y tópicos (incluida la administración dérmica, transdérmica, transmucosa, bucal, sublingual e intraocular), aunque la ruta más adecuada puede depender, por ejemplo, de la afección y el trastorno del receptor.

Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Todos los métodos incluyen la etapa de poner el ingrediente activo en asociación con un vehículo farmacéutico que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos y luego, si es necesario, dando forma al producto en la formulación deseada.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, que contienen cada uno una cantidad

predeterminada del ingrediente activo; como polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo también se puede presentar como un bolo, electuario o pasta. Diversos vehículos farmacéuticamente aceptables y su formulación se describen en tratados de formulación estándar, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin. Ver también Wang, Y. J. y Hanson, M. A., Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report No. 10, Supp. 42: 2S, 1988.

Un comprimido se puede hacer mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, lubricador, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o marcarse opcionalmente y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en el mismo. Los presentes compuestos pueden, por ejemplo, administrarse en una forma adecuada para liberación inmediata o liberación prolongada. La liberación inmediata o liberación prolongada se puede lograr mediante el uso de composiciones farmacéuticas adecuadas que comprenden los presentes compuestos. Los compuestos se pueden formular, para administración oral, con agentes de administración o vehículos que facilitan el transporte de macromoléculas terapéuticas y compuestos altamente cargados a través de las membranas celulares, especialmente en el intestino delgado. Dichos agentes de administración o vehículos pueden además inhibir la degradación enzimática de péptidos durante el paso a través del tracto gastrointestinal (GI) y/o la formulación puede incluir agentes adicionales que protegen contra dicha degradación. Los presentes compuestos también se pueden administrar liposomalmente.

Las composiciones ilustrativas para administración oral incluyen suspensiones que pueden contener, por ejemplo, celulosa microcristalina para generar volumen, ácido alginico o alginato de sodio como agente de suspensión, metilcelulosa como potenciador de la viscosidad, y edulcorantes o agentes aromatizantes tales como los conocidos en el arte; y comprimidos de liberación inmediata que pueden contener, por ejemplo, celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio y/o lactosa y/u otros excipientes, aglutinantes, diluyentes, disgregantes, diluyentes y lubricantes tales como los conocidos en la técnica. El péptido de la invención también puede administrarse a través de la cavidad oral mediante administración sublingual y/o bucal. Los comprimidos moldeados, comprimidos o comprimidos liofilizados son formas ejemplares que pueden usarse. Las composiciones ejemplares incluyen aquellas que formulan el(los) presente(s) compuesto(s) con diluyentes de disolución rápida tales como manitol, lactosa, sacarosa y/o ciclodextrinas. También se incluyen en tales formulaciones los excipientes de alto peso molecular tales como celulosas (avicel) o polietilenglicoles (PEG). Dichas formulaciones también pueden incluir un excipiente para ayudar a la adhesión de la mucosa, tales como hidroxipropil celulosa (HPC), hidroxipropil metil celulosa (HPMC), carboximetil celulosa sódica (SCMC), copolímero de anhídrido maleico (por ejemplo, Gantrez) y agentes para controlar la liberación tal como copolímero poliacrílico (por ejemplo, Carbopol 934). También se pueden agregar lubricantes, deslizantes, aromatizantes, colorantes y estabilizadores para facilitar su fabricación y uso.

Los excipientes que se pueden incluir son, por ejemplo, proteínas, tales como albúmina de suero humano o preparaciones de plasma. Si se desea, la composición farmacéutica también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

Las composiciones ejemplares para aerosol nasal o administración por inhalación incluyen soluciones en solución salina, que pueden contener, por ejemplo, alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes tales como los conocidos en la materia. Convenientemente en composiciones para aerosol nasal o administración por inhalación, el compuesto de la invención se administra en forma de una presentación en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, por ejemplo lactosa o almidón. En un ejemplo específico, no limitante, un compuesto de la invención se administra como un aerosol desde una válvula de dosis medida, a través de un adaptador de aerosol también conocido como un actuador. Opcionalmente, también se incluye un estabilizador, y/o se incluyen partículas porosas para el suministro pulmonar profundo (por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos N° 6.447.743).

Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un enema de retención o un supositorio con los vehículos habituales tales como manteca de cacao, ésteres de glicéridos sintéticos o polietilenglicol. Dichos vehículos son típicamente sólidos a temperaturas ordinarias, pero se licúan y/o se disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco.

Las formulaciones para administración tópica en la boca, por ejemplo bucal o sublingualmente, incluyen pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base aromatizada tal como sacarosa y goma arábiga o tragacanto, y pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia. Las composiciones ejemplares para administración tópica incluyen un vehículo tópico tal como Plastibase (aceite mineral gelificado con polietileno).

Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis eficaz, como se ha mencionado anteriormente, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo.

Debe entenderse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica con respecto al tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Los péptidos de la invención también se administran adecuadamente como sistemas de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de sistemas de liberación sostenida de la invención incluyen materiales poliméricos adecuados, por ejemplo, matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas; materiales hidrófobos adecuados, por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable; o resinas de intercambio iónico; y derivados escasamente solubles del compuesto de la invención, por ejemplo, una sal escasamente soluble. Los sistemas de liberación sostenida pueden administrarse por vía oral; rectalmente parenteralmente intrasistémicamente; intravaginalmente; intraperitonealmente; tópicamente, por ejemplo, como un polvo, ungüento, gel, gota o parche transdérmico; bucalmente; o como un aerosol oral o nasal.

Las preparaciones para administración pueden formularse de forma adecuada para proporcionar una liberación controlada de los compuestos de la invención. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de partículas que comprenden uno o más polímeros biodegradables, polímeros gelificantes y/o bioadhesivos polisacáridos, polímeros anfífilicos, agentes capaces de modificar las propiedades de interfaz de las partículas de los péptidos de la invención. Estas composiciones presentan ciertas características de biocompatibilidad que permiten una liberación controlada de la sustancia activa. Véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.700.486.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido o composición farmacéutica de la invención se puede administrar como una única dosis de pulso, como una dosis de bolo, o como dosis de pulso administradas a lo largo del tiempo. De este modo, en dosis de pulso, se proporciona una administración en bolo de un péptido o composición de la invención, seguido por el lapso de tiempo tras una segunda administración en bolo. En ejemplos específicos, no limitativos, las dosis de pulso de un compuesto de la invención se administran durante el transcurso de un día, durante el curso de una semana o durante el transcurso de un mes.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el desarrollo de estrategias para abrir la ruta paracelular entre células adyacentes en un epitelio controlando la apertura y el cierre dinámicos de uniones estrechas mediante el uso de un mecanismo de control endógeno. Las estrategias relacionadas con la provisión de compuestos peptídicos diseñados de novo para dirigirse a objetivos celulares específicos y para tener acción específica sobre esos objetivos.

Estudios recientes han sugerido que los eventos de inflamación crónica que ocurren en superficies mucosas simples, tales como las del intestino y las vías respiratorias, están asociadas con el aumento de la permeabilidad de las barreras epiteliales en estos lugares (4, 13). Se determinó que la base para este aumento de la permeabilidad era un aumento en el estado de fosforilación de la unión de la unión estrecha (TJ) a la proteína citosólica conocida como cadena ligera de miosina (MLC). Este mecanismo se verificó mediante la identificación y la prueba in vivo de un péptido permeable a la membrana de nueve aminoácidos que inhibía selectivamente la fosforilación de MLC. El conocimiento del mecanismo endógeno de la regulación intestinal de la fosforilación de MLC se usó para diseñar dos clases de péptidos para alterar selectivamente las acciones de las proteínas de la subunidad 1 de la fosfatasa de miosina (MYPT1) o del inhibidor de 17KDa de la proteína fosfatasa 1 potenciada por la L-quinasa (CPI-17). Estas dos proteínas funcionan para reducir la fosforilación de MLC y la presente invención se refiere a la inhibición transitoria de su función para aumentar transitoriamente la permeabilidad paracelular de un epitelio. Las dos proteínas diana regulan la fosforilación de MLC a diferentes velocidades y al proporcionar agentes y métodos dirigidos selectivamente a esas dos proteínas diferentes, es posible controlar finalmente el curso temporal de la apertura y el cierre de las uniones estrechas.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una secuencia que comprende un péptido de acuerdo con la Fórmula 1:

X₄-X₅-X₆-X₇-X₈ Fórmula 1 (Id. de Sec. nº: 1)

en la que:

X₄ es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu;

X₅ es un residuo de aminoácido hidrófobo pequeño, por ejemplo Val o Ala;
 X₆ es un residuo de aminoácido cargado positivamente, por ejemplo Lys o Arg;
 X₇ es un residuo de aminoácido hidrófilo, por ejemplo, Tyr, Phe, Thr o Ser; y
 X₈ es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu.

o que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 2

X₅-X₆-X₇-X₈ Fórmula 2 (Id. de Sec. nº: 2)

en la que:

X₅ es cualquier residuo de aminoácido;
 X₆ es Tyr;
 X₇ es Gln; y
 X₈ es Tyr;

o que comprende una forma retro-inversa de la secuencia de acuerdo con la Fórmula 1 o Fórmula 2 en la que todos los residuos de aminoácidos están en la configuración D y el orden de la secuencia peptídica está invertido, en el que el péptido comprende además una secuencia de péptido CPP penetradora de células.

La Fórmula 1 define una secuencia que se dirige a las interacciones PP1-CP1-17. La Fórmula 2 define una secuencia que se dirige a las interacciones PP1-MYPT1. La característica unificadora de ambas secuencias es que ambas actúan para reducir la fosforilación de MLC y, por lo tanto, su inhibición conduce a un aumento de la fosforilación de MLC y a la apertura de las uniones estrechas de un epitelio.

De acuerdo con algunas realizaciones de todos los aspectos de la invención, la característica funcional de reducir la fosforilación de MLC puede ser una característica de la invención reivindicada.

Secuencias de Fórmula 1

Los péptidos de acuerdo con la fórmula 1 inhiben las interacciones PP1-CP1-17. De acuerdo con algunas realizaciones de los diversos aspectos de la invención de acuerdo con la secuencia abarcada por la Fórmula 1 en la que

X₄ es pTyr, Asp o Glu;
 X₅ es Val o Ala;
 X₆ es Lys o Arg;
 X₇ es Tyr, Phe, Thr o Ser; y
 X₈ es pTyr, Asp o Glu.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X₄ es Asp o Glu;
 X₅ es Val o Ala;
 X₆ es Lys o Arg;
 X₇ es Tyr, Phe o Thr; y
 X₈ es Asp o Glu.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X₄ es Asp o Glu;
 X₅ es Val;
 X₆ es Lys;
 X₇ es Tyr; y
 X₈ es Asp o Glu.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X₄ es Glu;
 X₅ es Val;
 X₆ es Lys;
 X₇ es Tyr; y
 X₈ es Asp.

Las secuencias de acuerdo con diversas realizaciones de la Fórmula 1 definen el motivo objetivo de PP1-CP1-17. Para funcionar eficazmente en todas las realizaciones según el primer aspecto de la invención y algunas

realizaciones según otros aspectos de la invención, un péptido que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 1, también contiene una secuencia de CPP de péptido que penetra en la célula para asegurar su administración en el citosol de las células epiteliales donde tiene su objetivo.

5 De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, una secuencia de acuerdo con la Fórmula 1 es

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ (Id. de Sec. nº: 5), o $X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ (Id. de Sec. nº: 6), o $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8$ (Id. de Sec. nº: 7), más preferiblemente $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ (Id. de Sec. nº: 5) (Fórmula 1a)

10 en la que:

X_1 es hasta 10 residuos de aminoácidos cargados positivamente;
 X_2 es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 X_3 es un residuo de aminoácido hidrofóbico o está ausente;
 X_4 es un residuo de aminoácido cargado negativamente;
 X_5 es un residuo de aminoácido hidrófobo pequeño;
 X_6 es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 X_7 es un residuo de aminoácido hidrofóbico;
 X_8 es un residuo de aminoácido cargado negativamente;
 X_9 es un residuo de aminoácido de carga positiva; y
 X_{10} es hasta 10 residuos de aminoácidos cargados positivamente; o en el que todos los residuos de aminoácidos están en la configuración D y el orden de la secuencia peptídica está invertido.

25 De acuerdo con ciertas realizaciones de las fórmulas alternativas dadas inmediatamente antes, en relación con todos los aspectos de la presente invención,

X_1 es hasta 10 residuos de aminoácidos de carga positiva;
 X_2 es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 X_3 es Val, Ala, Leu o Ile;
 X_4 es pTyr, Asp o Glu;
 X_5 es Val o Arg;
 X_6 es Lys o Arg;
 X_7 es Tyr, Phe, Thr o Ser;
 X_8 es pTyr, Asp o Glu;
 X_9 es un residuo de aminoácido cargado positivamente; y
 X_{10} es hasta 10 residuos de aminoácidos cargados positivamente; o todos los residuos de aminoácidos están en la configuración D y el orden de las secuencias peptídicas se invierte.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X_1 es hasta 10 residuos de Lys o Arg;
 X_2 es Lys o Arg;
 X_3 es Ala o Val;
 X_4 es pTyr, Asp o Glu;
 X_5 es Val o Arg;
 X_6 es Lys o Arg;
 X_7 es Tyr, Phe Thr o Ser;
 X_8 es pTyr, Asp o Glu;
 X_9 es Lys o Arg; y
 X_{10} es hasta 10 residuos de Lys o Arg.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X_1 es Lys o Arg;
 X_2 es Lys o Arg;
 X_3 es Ala o Val;
 X_4 es Asp o Glu;
 X_5 es Val;
 X_6 es Lys; X_7 es Tyr;
 X_8 es Asp o Glu;
 X_9 es Lys o Arg; y
 X_{10} es Lys o Arg.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X_1 es Lys o Arg;

X₂ es Lys o Arg;
X₃ es Val;
X₄ es Glu;
X₅ es Val;
X₆ es Lys;
X₇ es Tyr;
X₈ es Asp;
X₉ es Lys o Arg; y
X₁₀ es Lys o Arg.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀

es Arg₁-Arg₂-Val₃-Glu₄-Val₅-Lys₆-Tyr₇-Asp₈-Arg₉-Arg₁₀ (Id. de Sec. n°: 3).

La invención también comprende, en ciertas realizaciones, la forma retro-inversa de las secuencias dadas anteriormente.

Secuencias de Fórmula 2

Los péptidos de acuerdo con la Fórmula 2 inhiben las interacciones PP1-MYPT1. De acuerdo con algunas realizaciones de los diversos aspectos de la invención de acuerdo con la secuencia abarcada por la Fórmula 2 en la que:

X₅ es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
X₆ es Tyr;
X₇ es Gln, y
X₈ es Tyr.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X₅ es Lys o Arg;
X₆ es Tyr;
X₇ es Gln; y
X₈ es Tyr.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X₅ es Lys;
X₆ es Tyr;
X₇ es Gln; y
X₈ es Tyr.

La invención también comprende, en ciertas realizaciones, la forma retro-inverso de las secuencias dadas anteriormente.

Las secuencias de acuerdo con diversas realizaciones de la Fórmula 2 definen el motivo de direccionamiento PP1-MYPT1. Para funcionar eficazmente en todas las realizaciones del primer aspecto de la invención y en algunas realizaciones de otros aspectos de la invención, un péptido que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 2 también contiene una secuencia de CPP de péptido que penetra en la célula para asegurar su administración al citosol de las células epiteliales donde tiene su objetivo.

De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, una secuencia de acuerdo con la Fórmula 2 es

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂ (Id. de Sec. n°: 9), o X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (Id. de Sec. n°: 10), o X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂ (Id. de Sec. n°: 11), preferiblemente X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂ (Id. de Sec. n°: 9) Fórmula 2a

en la que:

X₁ es hasta 10 residuos de aminoácidos cargados positivamente;
X₂ es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
X₃ es Ala o Val;
X₄ está ausente o Ala o 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos cargados positivamente;
X₅ es un residuo de aminoácido cargado positivamente;

X₆ es Tyr;
 X₇ es Gln;
 X₈ es Tyr;
 X₉ está ausente o Ala o 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos de carga positiva;
 X₁₀ es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 X₁₁ es un residuo de aminoácido cargado positivamente; y
 X₁₂ es hasta 10 residuos de aminoácidos de carga positiva; o en donde todos los residuos de aminoácidos son de la configuración D y el orden de secuencia se invierte.

De acuerdo con ciertas realizaciones de las fórmulas alternativas dadas inmediatamente antes para la Fórmula 2a, en relación con todos los aspectos de la presente invención,

X₁ es hasta 10 residuos de Lys y/o Arg en cualquier combinación;
 X₂ es Lys o Arg;
 X₃ es Ala o Val;
 X₄ está ausente Ala, Lys o Arg;
 X₅ es Lys o Arg;
 X₆ es Tyr;
 X₇ es Gln;
 X₈ es Tyr;
 X₉ es Ala o Lys o Arg;
 X₁₀ es Lys o Arg;
 X₁₁ es Lys o Arg; y
 X₁₂ hasta 10 residuos de Lys y/o Arg en cualquier combinación; o todos los residuos de aminoácidos son de la configuración D y el orden de secuencia se invierte.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X₁ es Lys o Arg;
 X₂ es Lys o Arg;
 X₃ es Ala;
 X₄ está ausente;
 X₅ es Lys;
 X₆ es Tyr;
 X₇ es Gln;
 X₈ es Tyr;
 X₉ está ausente;
 X₁₀ es Lys o Arg;
 X₁₁ es Lys o Arg; y
 X₁₂ es Lys o Arg.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X₁ es Arg;
 X₂ es Lys;
 X₃ es Ala;
 X₄ está ausente;
 X₅ es Lys;
 X₆ es Tyr;
 X₇ es Gln;
 X₈ es Tyr;
 X₉ está ausente;
 X₁₀ es Arg;
 X₁₁ es Arg; y
 X₁₂ es Lys;

es decir, la secuencia es Arg₁-Lys₂-Ala₃-Lys₅-Tyr₆-Gln₇-Tyr₈-Arg₁₀-Arg₁₁-Lys₁₂ (Id. de Sec. n°: 4)

La invención también comprende, en ciertas realizaciones, la forma retro-inversa de las secuencias dadas anteriormente.

Secuencias retro-inversas

Las secuencias de Fórmula 1 y Fórmula 2 se derivan de secuencias de origen natural. Las secuencias naturales de las que derivan tienen residuos de aminoácidos en la configuración L. Por lo tanto, en tales circunstancias, de acuerdo con algunas realizaciones, los aminoácidos están en configuración L.

Los péptidos que comprenden D-aminoácidos pueden ser más atractivos como fármacos porque tienden a ser menos susceptibles a la degradación en el estómago o en el interior de las células mediante proteólisis. Por lo tanto, tienden a ser más adecuados para la administración oral y tienden a ser eficaces durante períodos de tiempo más largos.

La presente invención, en sus diversos aspectos, abarca péptidos en los que todos los aminoácidos están en la configuración D y el orden de secuencias peptídicas de Fórmula 1 y 2 (y secuencias más estrechamente definidas que caen dentro del alcance de la Fórmula 1 o 2 y especificadas arriba) está invertido.

El código de aminoácidos de una sola letra en minúsculas es una abreviatura para la configuración retro-inversa. De acuerdo con ciertas realizaciones, se prefiere la configuración retro-inversa.

Composiciones farmacéuticas

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 2

X_5 - X_6 - X_7 - X_8 Fórmula 2 (Id. de Sec. n°: 2)

en la que:

X_5 es cualquier residuo de aminoácido;
 X_6 es Tyr;
 X_7 es Gln; y
 X_8 es Tyr.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X_5 es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 X_6 es Tyr;
 X_7 es Gln, y
 X_8 es Tyr;

o que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 1:

X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 Fórmula 1 (Id. de Sec. n°: 1)

en la que:

X_4 es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu;
 X_5 es un residuo de aminoácido hidrófobo pequeño, por ejemplo Val o Ala;
 X_6 es un residuo de aminoácido cargado positivamente, por ejemplo Lys o Arg;
 X_7 es un residuo de aminoácido hidrófilo, por ejemplo, Tyr, Phe, Thr o Ser; y
 X_8 es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu;

o que comprende la forma retro-inversa de la secuencia de acuerdo con la Fórmula 1 o la Fórmula 2 en la que todos los residuos de aminoácidos están en configuración D y el orden de secuencia peptídica está invertido y es un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ciertas realizaciones del segundo aspecto de la invención pueden incluir un péptido de acuerdo con cualquiera de las diversas realizaciones del primer aspecto de la invención.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un agente para promover la penetración del péptido en el citosol de la célula epitelial diana, por ejemplo, un agente formador de liposomas. La presencia de dicho agente se ve favorecida especialmente si el propio péptido carece de una secuencia de penetración celular, por ejemplo, si carece de la secuencia peptídica de penetración celular de Fórmula 1a o 2a. Sin embargo, los agentes para ayudar con la penetración celular pueden estar presentes, según algunas realizaciones, independientemente de la presencia o ausencia de tales secuencias en el péptido de acuerdo con la Fórmula 1 o Fórmula 2. De acuerdo con ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender un péptido de acuerdo con la Fórmula 1, o el análogo retro-inverso del mismo, en combinación con un péptido de acuerdo con la Fórmula 2, o el análogo retro-inverso del mismo.

Revestimientos entéricos

Una composición farmacéutica puede comprender una dosificación por tener un recubrimiento entérico. Un recubrimiento entérico es un recubrimiento aplicado a composiciones medicinales orales tales como comprimidos, comprimidos oblongos y cápsulas con el fin de controlar la absorción para que tenga lugar en el intestino delgado.

Los recubrimientos entéricos se aplican típicamente a la superficie de las formas de dosificación de modo que presenten una superficie estable en el pH altamente ácido del estómago, pero se descomponen rápidamente en el entorno relativamente más básico del intestino delgado. Los materiales utilizados para recubrimientos entéricos incluyen ácidos grasos, ceras, shellac, plásticos y fibras vegetales.

Cuando la presente invención se usa en el contexto del suministro de un segundo agente terapéutico en una dosificación oral a través del epitelio del intestino delgado, se puede usar un recubrimiento entérico si el agente terapéutico se degradaría de otro modo en el entorno estomacal. Tal recubrimiento puede ser especialmente útil si el segundo agente terapéutico es irritante para el estómago, si es ácido inestable (por ejemplo ciertos azoles tales como esomeprazol son ácidos inestables) o si el segundo agente terapéutico es una proteína o péptido (por ejemplo, insulina, GLD-1 o un derivado, o análogo del mismo) que se podría esperar que se degrade por las enzimas presentes en el estómago.

De acuerdo con esto, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con el segundo aspecto de la invención pueden comprender una forma de dosificación sólida que tiene un revestimiento entérico y otros aspectos de la invención también pueden utilizar o relacionarse con dicho recubrimiento.

Segundo agente terapéutico

De acuerdo con diversos aspectos de la invención que se refieren a un péptido de la invención y a un segundo agente terapéutico, por ejemplo las composiciones farmacéuticas de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, los dos componentes se mezclan preferiblemente conjuntamente, por ejemplo en la composición farmacéutica para que se presenten en la superficie epitelial al mismo tiempo. Los péptidos de la invención pueden usarse para administrar una amplia gama de agentes terapéuticos. Pueden ser especialmente relevantes para la administración de agentes terapéuticos que son moléculas pequeñas, y también en la administración de agentes terapéuticos que son péptidos o proteínas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, el agente terapéutico podría ser insulina, hormona paratiroidea, calcitonina, eritropoyetina, GM-SF u hormona de crecimiento, o un ARNsi o agente de terapia génica. La invención también se refiere a la administración de agentes terapéuticos que son anticuerpos o derivados de anticuerpos. Si se encuentra que las moléculas de anticuerpo completas son demasiado grandes para administrarse de manera efectiva de acuerdo con la invención, las versiones más pequeñas de tecnologías basadas en anticuerpos, por ejemplo, moléculas de scFv, anticuerpos de camello, fragmentos de anticuerpos de cambio simple y dominios y similares pueden ser de particular utilidad. Todos estos agentes terapéuticos podrían administrarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos después de la apertura de la unión estrecha por un péptido de la invención. Por ejemplo, la insulina y GLP-1 podrían administrarse en la misma forma de dosificación que un péptido de la invención.

Vehículos farmacéuticos

Un vehículo farmacéutico (o "portador de fármaco") es una sustancia presente en una composición farmacéutica para mejorar la administración, formulación, dosificación o eficacia de un fármaco o para ayudar en su conservación, mezcla, preparación o procesamiento.

Epitelio

La invención en sus diversos aspectos se refiere a un epitelio ("superficie epitelial"). Esta puede ser una superficie in vitro o in vivo. Ejemplos no limitantes incluyen el epitelio del intestino grueso, el intestino delgado, el recto, el ano, el cuello uterino, la vagina, el tracto respiratorio (por ejemplo, tráquea, bronquios, bronquiolos o laringe), la nariz, la boca y el córnea, presente tanto in vivo como in vitro.

Las líneas celulares inmortalizadas de células epiteliales, por ejemplo de los tipos de células epiteliales descritas inmediatamente antes, están especialmente contempladas.

Medicamentos

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un péptido para el primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con un segundo aspecto de la invención de uso como medicamento. El tercer aspecto de la invención se refiere a un "medicamento". Dicho medicamento puede comprender un péptido de la invención o un péptido de la invención y un segundo agente terapéutico como se describe en la presente memoria con referencia a otros aspectos de la invención. Este segundo agente terapéutico puede ser un péptido, una pequeña entidad molecular, un ácido nucleico u otro compuesto químico. El medicamento puede formularse como se describe en la presente memoria con referencia a otros aspectos de la invención para el tratamiento de un trastorno de la enfermedad o afección no médica tal como se describe en otra parte del presente documento en un sujeto como se describe en otra parte de la presente memoria.

Sujetos para tratamiento

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención, en todos los aspectos se refiere al tratamiento de sujetos. Tales sujetos pueden ser de cualquier especie que tenga un epitelio con uniones estrechas. De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, la presente invención en todos los aspectos se refiere al tratamiento de sujetos mamíferos. Más preferiblemente, la presente invención en todos los aspectos se refiere al tratamiento de sujetos humanos de cualquier sexo y de cualquier edad (por ejemplo desde el nacimiento hasta 1 año, desde el nacimiento hasta los 5 años, desde el nacimiento hasta los 12 años, desde el nacimiento hasta los 60 años, desde el nacimiento hasta los 80 años; desde los 2 a los 80 años, desde los 5 a los 80 años, desde los 12 a los 80 años o desde los 16 a los 80 años en adelante).

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención en todos los aspectos se refiere al tratamiento de sujetos humanos que necesitan un agente terapéutico que debe administrarse a través de una membrana mucosal. El agente terapéutico puede ser uno de los agentes descritos en otra parte del presente documento. El sujeto humano, de acuerdo con ciertas realizaciones de todos los aspectos de la invención, puede ser un sujeto a quien se le ha administrado el agente terapéutico mencionado anteriormente simultáneamente o dentro de un intervalo de tiempo de 15, 10, 5, 2 o 1 minuto a cada lado de la administración. del péptido o composición farmacéutica de la invención.

Enfermedades para el tratamiento

El péptido de acuerdo con el primer aspecto, la composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto, o el medicamento de acuerdo con el tercer aspecto pueden ser para el tratamiento de una enfermedad o trastorno u otra afección. De acuerdo con ciertas realizaciones, la enfermedad o una enfermedad pulmonar, la administración de fármacos poco absorbidos de acuerdo con la invención puede tener el efecto similar a su administración por inyección. Es importante destacar que la capacidad de administrar agentes terapéuticos a ubicaciones epiteliales discretas también daría como resultado la administración local al espacio submucoso. Por estas razones, la invención puede ser especialmente adecuada para tratar afecciones y enfermedades sistémicas (por ejemplo, artritis, talla baja, etc.) y también afecciones y enfermedades que se beneficiarían de la dirección local de agentes terapéuticos (por ejemplo, enfermedad de Crohn, asma, etc.).

Tratamiento no terapéutico

De acuerdo con ciertas realizaciones, los diversos aspectos de la invención se refieren al tratamiento no terapéutico de afecciones, tales como el estado cosmético de la piel, o el tratamiento de una persona que no es médicamente obesa pero que desea perder peso (o mantener un peso saludable) para fines cosméticos.

Método de abrir uniones estrechas

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un método para abrir las uniones estrechas de una superficie epitelial que comprende administrar una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una composición farmacéutica de acuerdo con un segundo aspecto de la invención para el epitelio, en donde dicho método se lleva a cabo in vitro.

La invención, de acuerdo con su cuarto aspecto, puede referirse a la apertura in vitro de uniones estrechas de un epitelio en un cultivo celular, por ejemplo como una monocapa cultivada en células de epitelio humano o animal, con el fin de estudiar las propiedades del epitelio o el paso de moléculas (por ejemplo, candidatos a fármacos) a través de dicho epitelio.

Método de entrega

De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona un método para suministrar un agente a través de una superficie epitelial que comprende administrar dicho agente junto con un péptido de acuerdo con un primer aspecto de la invención o como parte de una composición farmacéutica de acuerdo con un segundo aspecto de la invención, en el que dicho método se lleva a cabo in vitro.

En varios aspectos de este aspecto de la invención, la superficie epitelial, el péptido y la composición farmacéutica pueden ser como se describe en referencia a los otros diversos aspectos de la invención. El agente puede ser un agente de diagnóstico, un agente de contraste o, de acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, un agente terapéutico como se describe en este documento bajo el encabezado "segundos agentes terapéuticos".

Varios aspectos de la presente invención se describen a continuación con referencia a los siguientes ejemplos y figuras no limitativos.

Ejemplos

Materiales y métodos

Síntesis de péptidos

Los péptidos se sintetizaron mediante (Fmoc)-SPSS (sintetizador de péptidos ActivoSyn) usando aminoácidos obtenidos de Nova Biochem, excepto isoleucina, que se obtuvo de Sigma Aldrich. El primer aminoácido se acopló a la resina Rink Amide MBHA (malla 100-200; Nova Biochem) usando N,N'-diisopropilcarbodiimida. Los acoplamientos posteriores se llevaron a cabo en un sintetizador de péptidos Activo P-11 usando PyBop. La desprotección se llevó a cabo usando 20% de piperidina en dimetilformamida. Los péptidos se escindieron de la resina usando una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA), triisopropilsilano y agua (95:2,5:2,5), y luego se precipitaron en éter dietílico. El producto bruto se purificó por HPLC, usando una columna Phenomenex Gemini C18 (250 x 10 mm, tamaño de poro 5 µm) y una fase móvil en gradiente de agua con TFA al 0,1% y acetonitrilo con TFA al 0,1% usando un caudal de 2,5 ml/min. Los espectros de masas de tiempo de vuelo de alta resolución se obtuvieron en un espectrómetro de masas micrOTOF de Bruker Daltonics usando ionización por electrospray (ESI) para verificar la identidad del péptido. Los péptidos purificados se secaron por liofilización y se almacenaron a -80°C.

Cultivo de células

Se mantuvo una línea de células epiteliales intestinales humanas inmortalizadas (Caco-2) en medio DMEM/F12 (Gibco, Paisley, RU) suplementado con 10% de SFB, L-glutamina 2 mM (Gibco) 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (Gibco). Se sembraron células Caco-2 a una densidad de 7 x 10⁴/pocillo en filtros de membrana de poliéster Transwell™ (Corning, NY) (12 mm de diámetro, 0,4 µm de tamaño de poro). La realimentación con DMEM (Life Technologies, Paisley, Reino Unido) se llevó a cabo cada dos días. Las monocapas de Caco-2 con resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER) > 350 Ω • cm² se consideraron confluentes y se usaron en ensayos de transporte; se usaron electrodos de paleta fijos para medir TEER (World Precision Instruments, Reino Unido).

Estudios de transporte in vitro

Se realizó un flujo de apical a basal de 50 mg/ml de dextrano de 4 kDa o 50 mg/ml de dextrano de 70 kDa (Sigma) para evaluar el impacto de los péptidos PIP sobre la permeabilidad paracelular. El volumen del compartimento apical fue de 200 µl; a tiempos establecidos, se recogió el volumen del compartimento basal de 600 µl y se reemplazó con HBSS recién hecho. La fluorescencia del compartimento apical y basal se determinó usando un lector de microplacas Floustar Omega (BMG Labtech, Ortenburg, Alemania). Las medidas de TEER se realizaron para cada pocillo inmediatamente después del reemplazo de HBSS. Después de 3 horas, el compartimento apical dextrano y la solución de péptido se eliminaron y se reemplazaron con PBS y se registraron los valores de TEER durante 30 minutos más para evaluar la recuperación de la monocapa.

Análisis de PhosphoMLC

Después de enjuagar con PBS helado, se lisaron monocapas de Caco-2 o células epiteliales de tejido intestinal aislado en 3 µl de un cóctel inhibidor de proteasa y 200 µl de tampón RIPA y se dejaron en hielo durante 10 minutos. El tejido intestinal aislado se colocó de forma similar en PBS helado durante 15 minutos antes de la maceración en un cóctel inhibidor de proteasa y tampón RIPA, y se dejó en hielo durante 10 minutos. Todos los lisados de células y tejidos se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 min para recoger el sobrenadante, que se almacenó a -80 °C hasta su uso. Para el análisis de Western blots, los lisados se separaron mediante SDS-PAGE (12%) a 220V durante 40 minutos y se electrotransferieron a una membrana de PDVF a 30 V durante 70 minutos usando un módulo XCell™ Blot (Invitrogen). Las membranas se bloquearon usando albúmina de suero bovino al 5% en TBS-T (Tris 2 M, HCl, pH 7,5, NaCl 4 M y Tween 20 al 0,1%) durante 1 hora. Las membranas se lavaron con agua, se incubaron con anticuerpo primario (anticuerpo anti-cadena ligera de miosina (fosfo S20) o anticuerpo anti-cadena ligera de miosina 2) durante la noche a 5°C, se lavaron tres veces con TBS-T y luego se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a peróxido de rábano picante (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces en TBST, la actividad de HRP se detectó por ECL (Santa Cruz).

Medida de viabilidad celular

Ensayo de MTT: se evaluó la viabilidad celular usando el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Después de la exposición de las células a los complejos de CPP durante 72 horas, se añadieron 0,5 mg/ml de MTT al medio de cultivo y se incubaron con las células durante 3 horas más. Los medios se eliminaron y se reemplazaron con DMSO para lisar las células. La absorbancia se registró luego a 550 nm.

Microscopía

Las células se cultivaron en cubreobjetos de vidrio antes de la adición de CPP, en complejo con BSA marcada con rodamina. Las células se incubaron con los complejos durante 2 horas y luego se lavaron varias veces con medio completo para eliminar el exceso de complejos antes de fijar con paraformaldehído al 4%. La incorporación de BSA marcada en las células se determinó mediante microscopía confocal (Zeiss LSM 510). Los niveles de entrada de

BSA se estimaron midiendo la intensidad de fluorescencia media de la etiqueta Rhodamina en relación con el número de células en el campo de visión.

Estudios in vivo

Las ratas Wistar macho, criadas en casa, tenían 225-275 g (aproximadamente 6-8 semanas de edad) cuando empezó el estudio. Las ratas se alojaron en grupos de 3-5 por jaula en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Todos los experimentos se realizaron durante la fase de luz y se llevaron a cabo utilizando un protocolo de no recuperación que utilizó anestesia con isoflurano continuo. Se realizó una incisión abdominal de 4-5 cm en la línea media para exponer el yeyuno medio a las regiones del íleon temprano del intestino delgado y para proporcionar acceso a la vena porta para la inserción de una cánula. Se prepararon soluciones de insulina (recombinante humano, Sigma) y péptidos PIP en solución salina al 0,9% que contenía ácido cítrico 10 mM para reducir la proteólisis local y se mezclaron 1:1 antes de la inyección usando una aguja hipodérmica de calibre 29 en un volumen de 200 μ l/kg (o 50 μ l por 250 g de rata). El sitio de inyección se marcó con un marcador permanente. La incisión se cerró con pegamento quirúrgico. Se tomaron muestras de sangre de la vena porta, así como circulación sistémica durante las siguientes dos horas para controlar la glucosa, la insulina sérica y la endotoxina. Los grupos de tratamiento control incluyeron la inyección SC de insulina administrada en la luz intestinal, así como la inyección intestinal de péptido PIP sin insulina o insulina sola en la formulación de solución salina tamponada con fosfato (PBS) utilizada para todos los grupos. Al final de un estudio, se aisló una región de 3-5 mm alrededor del segmento marcado del intestino. Este tejido se lisó para la evaluación bioquímica del estado de fosforilación de MLC o se fijó, se seccionó y se tiñó con hematoxilina/eosina antes del análisis leído por un patólogo veterinario autorizado. Se realizaron inyecciones de insulina subcutánea (SC) (20 μ l/kg) en la región escapular media y se midió la glucosa en sangre de la misma manera. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Ley de Animales de los Estados Unidos (Procedimientos Científicos) de 1986, la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas de 1986 (86/609/CEE) y los procedimientos de revisión ética de la Universidad de Bath.

Prueba de toxicidad in vivo

Dado que las acciones de los péptidos que penetran en la célula para inducir daño celular y toxicidad es una posibilidad (Carter, 2013 #109; Kilk, 2009 #110), la inducción de la apoptosis, como medida de la intoxicación celular en estadio temprano, se evaluó examinando actividad de la enzima caspasa-3 usando el kit comercial APT165 según las instrucciones del fabricante (Millipore, Watford, Reino Unido). Los tejidos intestinales se aislaron 45 minutos después de la exposición a agentes de prueba administrados por inyección intraluminal intestinal directa. Se administró higromicina (150 μ g/ml) como un control positivo para incitar la apoptosis a través de la activación de caspasa-3.

Análisis de PhosphoMLC

Después de enjuagar con PBS helado para eliminar el péptido PIP o controlar los agentes de tratamiento, se colocó tejido intestinal aislado en PBS helado durante 15 minutos antes de la adición de 25 μ l de cóctel inhibidor de proteasa (Fisher), 25 μ l de cóctel inhibidor de fosfatasa (Fisher) y 500 μ l de tampón RIPA (Sigma Aldrich). Después de 10 minutos en hielo, los lisados se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 minutos para recoger el sobrenadante, que se almacenó a -80 °C hasta su uso. Para el análisis de Western blot, los lisados se separaron mediante SDS-PAGE (12%) a 220V durante 40 minutos y se electrotransferieron a una membrana de PDVF a 30V durante 70 minutos usando un módulo XCell™ Blot (Invitrogen). Las membranas se bloquearon usando albúmina de suero bovino al 5% en TBS-T (Tris HCl 2 M, pH 7,5, NaCl 4 M y Tween 20 al 0,1%) durante 1 h. Las membranas se lavaron con agua, se incubaron con anticuerpo primario (anticuerpo anti-cadena ligera de miosina 1 (fosfo S19) (Cell Signaling Technologies) o anticuerpo anti-cadena ligera de miosina 2 (Abcam) durante la noche a 5°C, se lavaron tres veces con TBS-T, y luego se incubó con anticuerpo secundario acoplado a peróxido de rábano picante (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces en TBS-T, se detectó actividad de HRP por ECL (Santa Cruz).

Medición de la viabilidad celular

La inducción de la apoptosis, como una medida de la intoxicación celular en estadio temprano, se evaluó examinando la actividad de la enzima caspasa-3 usando el kit comercial APT165 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Millipore, Watford, Reino Unido). Los tejidos intestinales se aislaron 45 minutos después de la exposición a agentes de prueba administrados por inyección intraluminal intestinal directa. Se administró higromicina (150 μ g/ml) como un control positivo para incitar la apoptosis a través de la activación de caspasa-3.

Microscopía

Se evaluó in vivo la absorción mediada por péptido PIP de insulina marcada con Cy3 (Nancocs) donde los segmentos intestinales expuestos se aislaron 15 minutos después de la administración para el análisis microscópico. Los tejidos aislados se enjuagaron brevemente en PBS helado y luego se fijaron con paraformaldehído al 4% en

hielo antes de la evaluación usando un microscopio de fluorescencia Zeiss LSM 510. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) se usó como una tinción nuclear.

Análisis de los datos

Los valores de TEER se calcularon restando la lectura de filtro en blanco y normalizados como un porcentaje del valor de TEER inicial para esa monocapa. El flujo de dextrano fluorescente utilizado para calcular la permeabilidad paracelular se realizó como se describió previamente. Los niveles de glucosa en sangre se expresaron como un porcentaje de los niveles de glucosa iniciales para cada animal. Los datos se compararon con los valores de control usando una prueba T de Student de dos colas, sin emparejar. Se consideró que un valor p de <0,05 demostraba diferencias significativas.

Ejemplo 1 - Teoría de fondo para el control dinámico de la estructura y función de la unión estrecha (TJ)

Las estructuras TJ están compuestas de proteínas integrales de membrana que interactúan con elementos contráctiles y de andamiaje para regular dinámicamente las propiedades de barrera epitelial en la salud y la enfermedad (Turner (2009) Nat. Rev. Immunol. 9:799-809; Xiao et al. (2011) J.Aller. Clin. Immunol., 128:549 - 556). Los estímulos fisiológicos y patológicos alteran las propiedades de la barrera de las TJ a través de múltiples quinasas: proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa A, proteína quinasas activadas por mitógenos, vías de señalización de Rho y fosfoinosítido 3-quinasa (Gonzalez-Mariscal (2008) Biochim. Biophys. Acta 1778:729-756). Un elemento central de esta diafonía cruzada de quinasas implica la regulación de la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) (Woodsome et al. (2006) J. Cell Sci. 119: 1769-1780); Fig. 1. Existe una conexión directa entre la fosforilación de MLC aumentada y la disminución de la función de la barrera de las TJ; las citoquinas proinflamatorias pueden conducir a la fosforilación de MLC, lo que da como resultado la apertura de las TJ, con MLC quinasa (MLCK) jugando un papel fundamental. El inventor identificó previamente un inhibidor de péptido estable, permeable a la membrana, de MLCK, denominado PIK (flecha en la Fig. 1) que es capaz de rectificar la disminución de la función de la barrera de las TJ por la inflamación en el intestino y el pulmón (Clayburgh et al., 2005). J. Clin. Invest. 115: 2702 - 2715; Mirzapiozava et al. (2011) Am. J. Respir. Cell Molec. Biol. 44: 40 - 52). La función de MLCK está supuestamente contrarrestada por las acciones de la fosfatasa MLC (MLCP). Mientras que los estudios que utilizan el knock-out genético para dianas dentro de esta red pueden proporcionar una idea de su papel en la función de barrera, las acciones en el sistema general por cualquier molécula dirigida a un solo objetivo dentro de esta red deben determinarse a través de estudios farmacológicos. Que estos sitios de contacto con la superficie de la proteína son intracelulares y que un sitio primario para la prueba relevante de estos agentes es el intestino, los inhibidores exitosos deberían ser preferiblemente estables y permeables a la membrana.

Ejemplo 2 - Estudios preliminares

El inventor ha desarrollado previamente un inhibidor peptídico de 9 residuos (PIK) de MLCK que cierra estructuras TJ preparadas en la posición abierta debido a eventos inflamatorios. PIK emula una estructura de superficie de proteína crítica para la función MLCK. Después de la identificación de contactos interfaciales críticos, este péptido se modificó para integrar un aminoácido que permitiría la función del péptido de penetración celular (CPP) y aumentaría la estabilidad metabólica. Aplicando estos mismos principios de diseño, se han desarrollado agentes y métodos de acuerdo con diversos aspectos de la presente invención.

El MLCP es una holoenzima de la proteína fosfatasa-1 (PP1) trimérica, que consiste en una isoforma PP1, el complejo regulador MYPT1-CPI-17 de la subunidad dirigida a la miosina y una subunidad accesoria de 21 kDa. Para identificar posibles inhibidores peptídicos de MLCP, el inventor se ha centrado en las interacciones entre MYPT1 o el inhibidor de proteínas CPI-17 de 17 kDa con PP1 para regular directamente la función de MLCP (figura 3).

Ejemplo 3 - Orientación de interacciones PP1-CP1-17

La inhibición de MLCP por CPI-17 es impulsada por eventos estimulados por PKC; la fosforilación del residuo T³⁸ (pT³⁸) en CPI-17 aumenta la inhibición de MLCP más de 1000 veces; se identificó un dominio inhibitorio mínimo dentro de CPI-17 que incluye T³⁸ (24) y se sintetizó un pequeño cuadro de péptidos que emulan la secuencia R¹⁶VTVKYDRR⁴⁴ (Id. de Sec. n°: 13) en CPI-17 que participa en su interacción con PP1. Se incluyeron en el conjunto de péptidos inicial modificaciones para imitar a pT³⁸ (ácido glutámico; E), y la introducción de bases adicionales para emular las secuencias de CPP para mejorar la permeabilidad de la membrana (Tabla 1).

Tabla 1. Muestra los resultados de los péptidos derivados de CPI-17 probados. R³⁶VTVKYDRR⁴⁴ (Id. de Sec. n°: 8) se seleccionó como la secuencia de inicio (entrada 1). Los residuos se variaron en series de prueba (entradas 2-6) como se indica (negrita, subrayado). La eficacia se determinó por reducción de TEER después de la aplicación apical a monocapas de células Caco-2.

N°	Secuencia de péptido	Eficacia a 5 mM
1	NH ₂ -RRV TVKYDRR-NH ₂ (Id. de Sec. n°: 14)	No
2	NH ₂ -RRV <u>p</u> TVKYDRR-NH ₂ (Id. de Sec. n°: 15)	No

3	NH ₂ -RRV TVKYKRR-NH ₂ (Id. de Sec. n°: 16)	No
4	NH ₂ -RRVpTVKYKRR-NH ₂ (Id. de Sec. n°: 17)	No
5	NH ₂ -RRK TVKYDRR-NH ₂ (Id. de Sec. n°: 18)	No
6	NH ₂ -RRV EVKYDRR-NH ₂ (Id. de Sec. n°:3)	Sí

Los péptidos se aplicaron apicalmente a una concentración de 5 mM a monocapas confluentes de células Caco-2 cultivadas en insertos semipermeables (Rubus et al. (1996) J. Pharma. Sci 85: 165-169) para evaluar su capacidad para afectar la función de las TJ (Peterson y Mooseker (1992) J. Cell. Sci. 102 (3): 581-600). RRVEVKYDRR (péptido n° 6; péptido 640, Id. de Sec. n°: 3) redujo la resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER) de las monocapas de Caco-2 con una caída del 50% a los 25 minutos de la adición (figura 4), y ninguna de los péptidos eran tóxicos a esta concentración según el ensayo de MTT (Mosman (1983) J. Immunol. Methods 65: 55 - 63). Críticamente, después de un lavado suave, las monocapas de Caco-2 tratadas con RRVEVKYDRR (Id. de Sec. n°: 3) recuperaron valores de TEER al 80% de sus valores originales en 24 h. Se identificó un candidato principal, péptido NH₂-rrdykevrr-NH₂, (Id. de Sec. n°: 20) en base a la secuencia RRVEVKYDRR (Id. de Sec. n°: 3) pero usando la configuración retro-inversa con los aminoácidos en configuración D.

Mientras que CPI-17 se expresa ampliamente en músculo liso (Eto (2009) J. Bid. Chem. 369: 149-156), estos datos son los primeros en sugerir su papel funcional en células epiteliales polarizadas. Mientras que pT38 es esencial para la función inhibidora de CPI-17, los presentes hallazgos indican que un mimético estable adecuado (por ejemplo, el residuo E) puede reemplazar a pT38 para nuestra aplicación. Los extremos N y C de los péptidos de la tabla 1 se proporcionan como secuencias de penetración celular, pero podrían dispensarse si se emplearan otros métodos para conseguir la penetración celular.

Ejemplo 4 - Selección de interacciones PP1-MYPT1

Se produce la inhibición de MLCP después de la fosforilación mediada por Rho-quinasa de MYPT1 en los residuos T⁶⁹⁶ y T⁸⁵³ (Murthy et al. (2003) Biochem. J. 374:145-155). MYPT1 se une a PP1 a través de 3 regiones diferentes: el motivo de unión RVxF, el brazo N-terminal y el segundo grupo de repeticiones de anquirina de esta proteína. Mientras que la fosforilación de MYPT1 tanto en T⁶⁹⁶ como en T⁸⁵³ parece estar implicada en la regulación de MLCP, una secuencia de KVKF dentro del dominio N-terminal de 300 residuos de MYPT1 facilita su asociación con PP1 (Peti et al. (2013) FEB SJ 280: 596-611). El análisis estructural de MYPT unido a PP1 muestra que E³⁰⁰ a E³⁰⁹ de PP1 se colocan entre 2 repeticiones de anquirina de MYPT; en particular, las repeticiones de anquirina se unen con Y³⁰⁵ e Y³⁰⁷, lo que sugiere que el extremo C de PP1 es importante para que la interacción de la subunidad reguladora medie la especificidad de la isoforma. Por lo tanto, se especuló que un péptido correspondiente a esta área podría evitar la unión de MYPT a PP1 y, por lo tanto, disminuir la especificidad de la miosina del complejo MYPT/PP1.

Para probar esta hipótesis, se sintetizó RKAKYQYRRK (péptido 250, Id. de Sec. n°: 4) que incorporaba la región ³⁰¹KAKYQY³⁰⁶ (Id. de Sec. n°: 19) de la región C-terminal de PP1. La evaluación de los contactos interfaciales específicos sugirió que se podría agregar un residuo R y el tripéptido RRR en los extremos N y C, respectivamente, sin interferir con la función para facilitar la función CPP. Dado que los policones pueden inducir daño celular y toxicidad (Wender et al. (2005) Org. Lett. 7:4815-4818), se confirmó la falta de citotoxicidad para este péptido usando el ensayo de MTT (datos no mostrados). La adición apical a monocapas de Caco-2 polarizadas de péptido 250 5 mM se comparó con la de RRVEVKYDRR 5 mM (péptido n.º 6, péptido 640, Id. de Sec. n°: 3) y un péptido de control (figura 5). Mientras que los péptidos 250 y 640 aumentaron el transporte de un marcador paracelular en relación con el control, lo hicieron en diferentes cursos de tiempo y con diferentes impactos en TEER. El inventor seleccionó dextano fluorescente de 4 kDa (4FD) como marcador paracelular ya que el radio hidrodinámico de esta molécula es ligeramente mayor que el de la insulina y GLP-1 y, por lo tanto, debería predecir su transporte. El péptido 640, que se dirigió a las interacciones PP1-CPI-17, causó una disminución rápida en TEER a ~ 50% de su valor inicial y provocó un aumento casi inmediato en el transporte de 4FD; estos efectos se acoplaron estrechamente al lavado del péptido a los 45 min y la readición a los 70 min. El péptido 250, que se dirigía a las interacciones PP1-MYPT1, producía una caída más lenta y menos pronunciada en TEER y un aumento inicial menos prominente en el transporte de 4FD comparado con el péptido 640. Curiosamente, mientras que la eliminación del péptido 250 a 45 min causaba una recuperación de TEER, del péptido a los 70 min no pudo afectar a TEER pero mejoró aún más el transporte de 4FD.

En base a esta información, se identificó un candidato principal, el péptido 250 = NH₂-krryqykakr-NH₂ (Id. de Sec. n°: 21), que usa la configuración retro-inversa y los D-aminoácidos.

Estos estudios demuestran que los péptidos diseñados racionalmente para bloquear las interacciones de CPI-17 o MYPT1 con PP1 pueden producir resultados farmacológicos distintos con respecto a TEER y transporte paracelular, lo que sugiere que están presentes mecanismos reguladores separados, que involucran CPI-17 y MYPT1, que permite que las TJ se abran dinámicamente en diferentes grados y extensiones.

Estudios in vitro

Con el fin de comparar adecuadamente los péptidos PIP 250 y 640, intentamos hacer coincidir los dos en función de la respuesta basada en TEER. Esto se hizo debido a varias incertidumbres que hacen que una comparación de dosis directa sea inapropiada porque es probable que los dos péptidos tengan propiedades diferentes críticas para sus acciones: accesibilidad a sus objetivos intracelulares (debido a las diferentes capacidades de CPP), afinidades vinculantes para sus objetivos relacionados con MLCP correspondientes, acciones fuera del objetivo y estabilidades intracelulares. Se determinó que el péptido 250 20 mM proporcionó una respuesta muy comparable al péptido 640 10 mM (figura 6). La reducción de la dosis apical de estos dos péptidos PIP demostró que cada uno inducía cambios dependientes de la dosis en TEER respecto a la velocidad de inicio y el efecto máximo (Fig. 6). Después de 180 min de exposición al péptido PIP, la sustitución de los medios frescos al compartimento apical mostró que la eliminación de estos péptidos PIP iniciaba una reversión rápida de la depresión TEER con las células expuestas al péptido 640 que respondían más rápidamente que las expuestas al péptido 250 (Fig. 6). Esta observación sugiere que la recuperación de las alteraciones celulares inducidas por el péptido 250 puede ser menos dinámica que las vías afectadas por el péptido 640. Dado que el péptido 640 se diseñó para afectar a un regulador mediado por PKC de MLCP y el péptido 250 se diseñó para afectar a la regulación mediada de MLCP por una Rho-quinasa, tal sugerencia es consistente con las funciones percibidas desempeñadas por PKC y Rho-quinasa en las alteraciones rápidas y más duraderas de la estructura/función de TJ.

A continuación, se preguntó si las acciones de los péptidos PIP 640 y 250 en los valores TEER se traducían en cambios en la permeabilidad paracelular (Fig. 7). A pesar de producir una pérdida de casi el 50% en TEER después de 180 minutos de exposición, el péptido 640 5 mM no pudo afectar la permeabilidad del dextrano de 4 kDa a través de las monocapas de Caco-2. La aplicación apical del péptido 640 10 mM aumenta la tasa de permeación de 4 kDa en aproximadamente 3 veces. De manera interesante, el péptido 640 10 mM era igual al péptido 250 10 mM con respecto a las tasas de flujo de 4 kDa; a pesar de tener un impacto levemente retrasado y menos intenso en los cambios de TEER en comparación con este otro péptido. Sorprendentemente, el péptido 250 20 mM resultó en el doble de la tasa de flujo (~6 veces en comparación con el control) para dextrano de 4 kDa en comparación con el péptido 640 10 mM a pesar de que los perfiles de cambio TEER fueron casi idénticos para estos tratamientos. También observamos que el péptido 640 no pudo afectar el flujo de dextrano de 70 kDa, mientras que el péptido 250, a 20 mM, podría aumentar este flujo aproximadamente 3 veces. La linealidad de estos flujos mejorados de dextrano de 4 kDa (Fig. 7) sugirió que las acciones de los cambios de permeabilidad inducidos por estos péptidos PIP eran bastante rápidas a pesar del tiempo requerido para alcanzar una meseta de respuesta TEER (Fig. 6). Hubo un indicio de una inducción ligeramente retardada de transporte mejorado de dextrano de 70 kDa inducido por péptido 250 20 mM. En general, estos resultados sugieren que el péptido 640 induce una apertura más dinámica y menos robusta de la ruta paracelular en comparación con acciones equivalentes (basadas en TEER) inducido por el péptido 250.

Estudios in vivo

Nuestro enfoque fue examinar el transporte epitelial intestinal antes de abordar los desafíos de formulación relacionados con eludir los ácidos estomacales y las enzimas pancreáticas; tales desafíos se pueden resolver con las tecnologías establecidas de pastillas o comprimidos, pero requieren modelos animales de mayor orden que los roedores. Actualmente, utilizamos un modelo de rata en el que se inyectó directamente un volumen pequeño (50 μ l) en la luz del intestino delgado, en particular yeyuno distal al íleon proximal. Calibramos las respuestas logradas por administración oral mediante inyección subcutánea (SC) de insulina; una disminución dependiente de la dosis en la glucosa en sangre que alcanzó su nadir en ~ 30 min y comenzó a recuperarse en ~90 min. La inyección SC de 3 UI/kg produjo ~ 50% de disminución en la glucosa en sangre (Fig 8a). La inyección intraluminal directa en el intestino delgado (mitad del yeyuno hasta el íleon medio) de ratas de 30 UI/kg no tuvo ningún efecto sobre el azúcar en la sangre (Fig. 8b). Sin embargo, la ILI de 30 UI/kg de insulina más el péptido 250 250 mM produjo una disminución de la glucosa en sangre y un perfil de recuperación similar al observado para la inyección SC de 3 UI de insulina, y señaló que la recuperación del azúcar en sangre en un 70-80% se logró a los 90 min (Figs. 8a, b). Curiosamente, el péptido 250 250 mM administrado con 30 UI/kg por ILI dio como resultado una caída del 40% en la glucosa en sangre en 30 minutos que permaneció en este nivel durante el resto del experimento (figura 8b). La ILI directa de 30 UI/kg de insulina con péptido 640 10 mM dio como resultado una disminución muy retardada en un perfil de cambio de glucosa en sangre (figura 8c) con respecto a la inyección SC (figura 8a) o péptido 250 10 mM (figura 8b); Se requirió ILI de péptido 640 20 mM para producir un efecto similar al observado con el péptido 250 10 mM.

Estos resultados son intrigantes ya que sugieren que estos péptidos PIP tienen distintos perfiles de respuesta in vitro e in vivo que pueden estar relacionados con la durabilidad de su respuesta. In vitro, el péptido PIP aplicado permanece presente y funcional hasta que se elimina físicamente. In vivo, sin embargo, la concentración efectiva de un péptido PIP en la superficie epitelial luminal se complica por eventos tales como la descarga luminal y la absorción sistémica; eventos que pueden alterar la cantidad y la duración del tiempo en que un péptido PIP puede estar en el citoplasma de una célula epitelial del intestino delgado. Observamos que el péptido 640 parecía inducir respuestas más dinámicas para TEER que el péptido 250, lo que daría como resultado respuestas más duraderas in vivo.

Mecanismos de acciones de péptidos PIP

Estos resultados in vivo son, en general, consistentes con nuestros estudios in vitro realizados usando la línea de células epiteliales intestinales humanas Caco-2 que sugirió una alteración dinámica en la permeabilidad paracelular (Figuras 6 y 7). Como se anticipó, las acciones de estos péptidos PIP in vivo fueron transitorias y la duración y el tiempo de inicio de sus acciones dependió de la dosis. Las diferencias entre los péptidos PIP 250 y 640 fueron fácilmente evidentes in vitro cuando se pudo controlar su concentración absoluta y la duración de la exposición. Examinamos el inicio y la duración de las acciones de los péptidos PIP 250 y 640 in vivo mediante la determinación del estado de fosforilación de MLC mediante la comparación del grado de fosfoserina en la posición 19 de MLC (pMLC) a MLC total en tejido intestinal de rata aislado de los sitios de exposición del péptido PIP durante el transcurso del tiempo de las mediciones de azúcar en la sangre (Figuras 8B y 8C).

La proporción de MLC total respecto a pMLC se evaluó mediante análisis de transferencia de Western semicuantitativo (Figura 9A). Este análisis demostró que la relación de fosforilación de MLC inducida por el péptido 640 20 mM se incrementó significativamente en 15 minutos y permaneció elevada a los 45 minutos antes de volver a los niveles iniciales a los 90 minutos. El perfil de relación MLC a pMLC logrado con el péptido 250 20 mM no mostró cambios significativos a los 15 minutos, pero se elevó a los 45 minutos antes de regresar a los niveles basales a los 90 minutos (figura 9B). Estos resultados se correlacionaron bien con el curso temporal de la depresión del azúcar en sangre inducida por la administración conjunta de estos péptidos PIP con insulina (Figuras 8B y 8C). Es importante señalar que, si bien se tuvo cuidado de aislar MLC de solo las células epiteliales intestinales, el procedimiento de extracción utilizado podría haber resultado en algún MLC aislado de otras células presentes en estos tejidos intestinales aislados.

También investigamos nuestra hipótesis del mecanismo de acción del péptido PIP examinando el destino de una forma de insulina marcada con fluorescencia después de su inyección de ILI. Se observó insulina fluorescente (marcada con cy3) en el espacio paracelular intestinal solo cuando se coadministra con un péptido PIP sin una modificación anatómica macroscópica del epitelio (Fig. 9C). En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que la aplicación tópica apical de péptidos PIP actúa localmente para aumentar la permeabilidad paracelular del epitelio intestinal de rata in vivo. Además, el curso temporal del aumento de la permeabilidad paracelular de la insulina fue consistente con el papel de un aumento transitorio del contenido de pMLC en las células epiteliales.

El destino del péptido PIP mejora la captación de insulina

Los estudios del curso temporal que monitorizan la depresión de la glucosa sanguínea y las alteraciones en la fosforilación de MLC relevantes para el contenido total de células MLC después de la inyección de ILI de péptidos PIP y 10 IU de insulina sugieren una ventana de eventos in vivo de aproximadamente 30-60 minutos. Para explorar más esto, medimos las concentraciones de insulina en suero en la sangre recogida de la vena porta (Fig. 10A) y la vena de la cola (Fig. 10B) de 5 a 90 min después de ILI. El inicio del aumento de los niveles de insulina y la duración de esos niveles aumentados en la vena porta sugirieron que el péptido 640 incita un inicio de acción más rápido y una duración de acción más corta en comparación con el péptido 250, consistente con el tiempo de cambio de la relación de fosforilación para estos dos péptidos (Fig. 9).

La cantidad total de insulina detectada por ELISA en el portal y sistémica (vena de la cola) después de ILI de 10 UI/kg mostró perfiles ligeramente diferentes después de una captación mejorada por el péptido 250 frente al péptido 640 para las condiciones ensayadas aquí. Además, determinamos los perfiles de concentración en el tiempo para las concentraciones portal y sistémicas de insulina después de la inyección SC (Fig. 10C). Usando un análisis no compartimental y deconvolución de Wagner-Nelson, la biodisponibilidad relativa de la administración oral (con respecto a la SC) para la insulina humana detectada en la vena porta cuando se administró por ILI con péptido 250 frente al péptido 640 fue 4% y 3%, respectivamente. Curiosamente, la biodisponibilidad relativa para la insulina humana que alcanza la circulación sistémica después de la administración de ILI con el péptido 250 frente al péptido 640 fue del 1,6% y del 1,4%, respectivamente. Estos resultados sugieren que una fracción sustancial de insulina humana administrada a la vena porta no alcanzó la circulación sistémica.

Viabilidad de las células epiteliales después de la exposición al péptido PIP

Los estudios iniciales in vitro usando células Caco-2 sugirieron que los péptidos 250 y 640, probados a concentraciones que modulaban TEER y la permeabilidad paracelular, no afectaban la viabilidad celular según se evaluó mediante el marcador de polaridad de la membrana mitocondrial MTS. Debido a la naturaleza transitoria de las acciones de PIP in vivo, nos centramos en las señales celulares que podrían definir mejor los cambios celulares tempranos que podrían correlacionarse con la disminución de la viabilidad celular; la activación de la cascada de la enzima caspasa es un paso temprano en los eventos de apoptosis en las células epiteliales. Medimos el nivel de actividad de caspasa-3 en tejido intestinal de rata aislado 60 minutos después de la exposición apical de los péptidos 250 o 640 a concentraciones que mostraron disminuir la glucosa en sangre (figura 8), aumentar el grado de pMLC (figura 9) y mejorar la absorción de insulina en la vena porta (Fig. 10). Los tejidos intestinales no mostraron una inducción de la actividad de la enzima caspasa-3 después de una exposición apical similar de péptido PIP 250 o 640 20 mM, mientras que la higromicina (150 mg/ml) administrada por ILI se utilizó como control positivo para la inducción de caspasa-3 dio como resultado el aumento de esta actividad enzimática (Fig. 11). La concentración de

endotoxina en la sangre de la vena porta se midió después de la inyección de péptido PIP 250 o 640 20mM con insulina o insulina sola. No se observaron diferencias entre los tratamientos.

Conclusiones

Se han explorado varios agentes para aumentar el flujo paracelular intestinal con el fin de mejorar la administración oral de productos biofarmacéuticos; saponina de quillay, glicirrizinato dipotásico, 18β-glicirretínico, caprato de sodio, taurina y alquilmaltosidos son solo algunos de los agentes que se han descrito. En general, estos agentes se seleccionan típicamente usando sistemas celulares in vitro tales como monocapas de Caco-2 o tejidos intestinales aislados. Algunos de estos agentes, como la palmitoil carnitina, inicialmente son prometedores, pero en última instancia sus beneficios se correlacionan con los efectos líticos sobre la membrana celular y la viabilidad celular reducida. El caprato sódico, un ácido graso de cadena media presente en la leche humana, incluso ha sido aprobado como un agente potenciador de la absorción en un supositorio de ampicilina rectal. Aunque se demostró que el caprato causa dilataciones de las TJ para mejorar la permeabilidad paracelular in vitro, la eficacia del caprato in vivo para sus acciones en el hombre está mejor correlacionada con el daño no específico de la mucosa rectal que la modificación de la permeabilidad paracelular. En la actualidad, no hay agentes aprobados diseñados para mejorar el transporte paracelular de un biofármaco después de la administración oral.

La toxicidad, basada principalmente en una incertidumbre de su mecanismo de acción (o acciones), parece ser un elemento central que limita la identificación de agentes para mejorar de forma segura el transporte paracelular de un biofármaco después de la administración oral. Con esto en mente, estudios recientes han sugerido que el caprato puede alterar la expresión del componente tricelulino de las TJ, para aumentar el flujo paracelular a través de contactos tricelulares en el epitelio. Este hallazgo puede explicar el beneficio in vitro de caprato ya que es similar al posible aumento en la captación paracelular in vitro e in vivo inducido por un péptido que emula un dominio de bucle extracelular de la proteína claudina 1 de las TJ. Por lo tanto, los métodos para desorganizar selectivamente los contactos tricelulares de las TJ pueden proporcionar un mecanismo de acción potencial para aumentar de forma segura y efectiva la permeabilidad paracelular. Hemos tomado uno de estos enfoques para identificar un agente con un mecanismo de acción definido que podría abrir transitoriamente las TJ intestinales para mejorar la absorción paracelular de un biofármaco. Nuestro enfoque se basa en los hallazgos realizados inicialmente por Papenheimer que demostraron que la parte superior del epitelio intestinal tiene un mecanismo endógeno activado por nutrientes para aumentar la permeación paracelular de solutos. Estudios posteriores mostraron que este aumento en la permeación paracelular se debió a un aumento en la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC).

La validación de la fosforilación de MLC en el control de la permeabilidad de soluto mediada por las TJ se validó inicialmente usando un inhibidor permeable a la membrana, estable, del péptido MLC quinasa (PIK) que se demostró que era eficaz en modelos de inflamación epitelial crónica. En el presente, nuestro objetivo era identificar inhibidores permeables a la membrana, estables, selectivos de la fosfatasa MLC (MLCP) que contrarreste las acciones de la actividad residual de la quinasa MLC (Fig. 12). Utilizamos principios bien establecidos para identificar secuencias cortas de péptidos capaces de modular selectivamente las interacciones proteína-proteína con el objetivo de emular contactos interfaciales que implican proteínas reguladoras de MLCP: CPI-17 y MYPT. La regulación de MLCP por estos elementos reguladores proporciona células epiteliales con al menos dos mecanismos distintos de control de la fosforilación de MLC y, por lo tanto, altera las propiedades funcionales de las TJ. Los péptidos que tienen sitios de contacto interfacial extensos suficientes para alcanzar la especificidad de diana sufren de una baja permeabilidad de la membrana y un catabolismo mediado por peptidasa más limitado en la luz intestinal y en el citoplasma de las células epiteliales. Diseñamos y probamos conjuntos de péptidos que emulaban secuencias endógenas para aumentar la especificidad que se preparaban a partir de D-aminoácidos para una mayor estabilidad y contenían una proporción de carga positiva/negativa aumentada para aumentar la permeabilidad de la membrana.

Estudios recientes han validado el enfoque de usar péptidos estables permeables a la membrana para romper un sitio de contacto interfacial y alterar la proteína fosfatasa 1 en células vivas. Como se mostró previamente para la modulación de MLCP con un péptido permeable a la membrana diseñado para dirigirse al motivo de unión a PP1 de tipo RVxF y otros péptidos penetrantes de membrana celular, los péptidos PIP examinados en nuestros estudios no mostraron ninguna acción citotóxica in vitro o in vivo. Esto contrasta notablemente con las microcistinas, una clase de hepatoxinas de heptapéptido cíclico que inhiben múltiples PP1 junto con otras proteínas fosfatasa Ser/Thr al unirse a un sitio común; las enfermedades asociadas con la intoxicación por microcistina están relacionadas con acciones inespecíficas resultantes del aumento de la fosforilación de muchas proteínas. Nuestros resultados demuestran la viabilidad de mejorar la absorción oral de productos biofarmacéuticos mediante la inhibición selectiva de la actividad de MLCP dirigida a contactos interfaciales entre MLCP y proteínas reguladoras específicas que no inducen citotoxicidad, posiblemente debido a sus acciones específicas.

Las investigaciones en los últimos 20 años han demostrado que el Ca^{2+} /calmodulina activa la actividad de MLCK mientras que la quinasa Rho y la proteína quinasa C regulan el MLCP a través de MYPT1 y CPI-17, respectivamente. El péptido PIP 250 tuvo acciones menos dinámicas y abrió estructuras TJ para transportar solutos más grandes en comparación con las acciones del péptido 640. Estos datos sugieren que la supresión de MLCP a través de un mecanismo relacionado con la quinasa Rho da como resultado una modificación más duradera y extensiva de la función TJ que aquellos mediados por CPI-17 (Fig. 12). Estos estudios son consistentes con la

posibilidad de que Rho A pueda mediar cambios de TJ lentos y duraderos a través de sus acciones en MYPT1, mientras que las acciones de PKC en CPI-17 pueden proporcionar un mecanismo para cambios más rápidos y dinámicos en la función de las TJ. Las diferencias en las acciones de los péptidos PIP 250 y 640 fueron más evidentes en estudios in vitro en los que se pudo controlar su concentración y exposición continuada. Los estudios in vivo fueron consistentes con las observaciones realizadas in vitro con respecto a la naturaleza dinámica de las acciones de los péptidos PIP, pero no tan fácilmente obvias. Esto fue probablemente debido a la variabilidad adicional de las condiciones experimentadas in vivo.

Los péptidos PIP identificados y probados en estos estudios han proporcionado una prueba del resultado del principio para sustentar varios conceptos con respecto a la regulación de la fosforilación de MLC. 1) Los péptidos diseñados para interrumpir las interacciones proteína-proteína entre PP1 y sus proteínas reguladoras CPI-17 y MYPT1 pueden aumentar transitoriamente la fosforilación de MLC. 2) El aumento de la fosforilación MLC inducida por estos péptidos puede aumentar el flujo paracelular de macromoléculas, 3) La regulación de los cambios de permeabilidad paracelular inducidos por estos péptidos diseñados para interrumpir las interacciones proteína-proteína entre PP1 y sus proteínas reguladoras CPI-17 y MYPT1 es rápida y reversible. 4) Los cambios en la fosforilación de MLC asociados con estos efectos dinámicos sobre las propiedades de barrera paracelular no están asociados ni conducen a la toxicidad celular. Este último punto es importante en la consideración de los próximos pasos. Mientras que los péptidos PIP 640 y 250 son efectivos, aparentemente específicos y no tóxicos, las concentraciones requeridas para su función están en el rango de mM. Esto en realidad no es un problema importante ya que se logra fácilmente alcanzar estas concentraciones en aplicaciones locales y tópicas donde se coloca un biofarmacéutico simultáneamente. La optimización de estos péptidos PIP para disminuir la concentración requerida es un área de interés futuro. Tal esfuerzo requerirá esfuerzos múltiples e iterativos para minimizar la estructura peptídica mientras se retienen la especificidad y las acciones de la diana así como también se aumenta la eficacia de la permeabilidad de la membrana para alcanzar la diana intracelular requerida. Estos esfuerzos pueden beneficiarse del uso de análogos de fosfoaminoácidos estables en lugar del uso de aminoácidos cargados negativamente para emular estos elementos funcionales requeridos.

En general, nuestros estudios demuestran que los péptidos diseñados racionalmente para bloquear las interacciones de CPI-17 o MYPT1 con PP1 (MLCP) pueden producir resultados farmacológicos distintos con respecto a TEER y transporte paracelular. Mientras que CPI-17 se expresa ampliamente en el músculo liso, estos datos son los primeros en sugerir su función en células epiteliales polarizadas. Además, nuestros resultados sugieren que pueden existir mecanismos de regulación separados que permitan que CPI-17 y MYPT1 abran las TJ dinámicamente en diferentes grados y extensiones. Finalmente, hemos demostrado que la manipulación de la función de MLCP utilizando péptidos diseñados para aumentar la actividad de MLCP puede aplicarse al problema farmacéuticamente relevante que aumenta la biodisponibilidad oral de la insulina.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> The University of Bath
 <120> Agentes para mejorar la administración de fármacos
 <130> P021142WO
 <160> 21
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> FOSFORILACIÓN
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa1 es cualquier residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa2 es cualquier residuo de aminoácido hidrofílico pequeño, por ejemplo Val o Ala
 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa3 es cualquier residuo de aminoácido cargado positivamente, por ejemplo Lys o Arg
 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa4 es cualquier residuo de aminoácido hidrofílico, por ejemplo Tyr, Phe, Thr o Ser
 40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa4 es cualquier residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo PTyr, Asp o Glu
 45 <400> 1

Tyr Val Lys Tyr Tyr
 1 5

50 <210> 2
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> péptido que aumenta la liberación del fármaco

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 60 <223> Xaa en la posición 1 es cualquier residuo de aminoácido
 <400> 2

Xaa Tyr Gln Tyr
 1

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
 <400> 3

 Arg Arg Val Glu Val Lys Tyr Asp Arg Arg
 1 5 10
 10
 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
 <400> 4
 20
 Arg Lys Ala Lys Tyr Gln Tyr Arg Arg Lys
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es hasta 10 residuos de aminoácido cargados positivamente
 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa2 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
 40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa3 ausente o un residuo de aminoácido hidrofóbico
 45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa4 es un residuo de aminoácido cargado negativamente
 50
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa5 es un residuo de aminoácido hidrofóbico pequeño
 55
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa6 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
 60
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa7 es un residuo de aminoácido hidrofóbico

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 5 <223> Xaa8 es un residuo de aminoácido cargado negativamente

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 10 <223> Xaa8 es un residuo de aminoácido cargado negativamente

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 15 <223> Xaa9 es un residuo de aminoácido cargado positivamente

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 20 <223> Xaa10 es hasta 10 residuos de aminoácido cargados positivamente
 <400> 5

Lys Lys Ala Asp Ala Lys Ala Asp Lys Lys
1 5 10

 25 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> péptido que aumenta la liberación del fármaco

 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa1 ausente o un residuo de aminoácido hidrofóbico

 <220>
 <221> VARIANTE
 40 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa2 es un residuo de aminoácido cargado negativamente

 <220>
 <221> VARIANTE
 45 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa3 es un residuo de aminoácido hidrofóbico pequeño

 <220>
 <221> VARIANTE
 50 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa4 es un residuo de aminoácido cargado positivamente

 <220>
 <221> VARIANTE
 55 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa5 es un residuo de aminoácido hidrofóbico

 <220>
 <221> VARIANTE
 60 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa6 es un residuo de aminoácido cargado negativamente

 <220>
 <221> VARIANTE
 65 <222> (7)..(7)

<223> Xaa7 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
<400> 6

Ala Asp Ala Lys Ala Asp Lys Lys
1 5

5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> péptido que aumenta la liberación del fármaco

15

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa1 es hasta 10 residuos de aminoácido cargados positivamente

20

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa2 es un residuo de aminoácido cargado positivamente

25

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa3 ausente o un residuo de aminoácido hidrofóbico

30

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa4 es un residuo de aminoácido cargado negativamente

35

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa5 es un residuo de aminoácido hidrofóbico pequeño

40

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa6 es un residuo de aminoácido cargado positivamente

45

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa7 es un residuo de aminoácido hidrofóbico

50

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa8 es un residuo de aminoácido cargado negativamente
<400> 7

Lys Lys Ala Asp Ala Lys Ala Asp
1 5

55

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60

<220>
<223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
<400> 8

Arg Val Thr Val Lys Tyr Asp Arg Arg
1 5

- 5 <210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa1 es hasta 10 residuos de aminoácido cargados positivamente
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa2 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa3 es a Ala o Val
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa4 está ausente o Ala o 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácido cargado positivamente
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa6 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa6 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa9 está ausente o Ala o 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácido cargado positivamente
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa10 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> Xaa12 es hasta 10 residuos de aminoácido cargados positivamente
<400> 9

Lys Lys Ala Ala Lys Tyr Gln Tyr Ala Lys Lys Lys
1 5 10

- 60 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

- <220>
<223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa1 es hasta 10 residuos de aminoácido cargados positivamente
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa2 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa3 es Ala o Val
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa4 está ausente o Ala o 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácido cargado positivamente
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa5 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa5 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa9 está ausente o Ala o 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácido cargado positivamente
<400> 10
- 40 **Lys Lys Ala Ala Lys Tyr Gln Tyr Ala**
1 5
- <210> 11
<211> 10
<212> PRT
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa1 es Ala o Val
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa1 es Ala o Val
- 60 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa2 está ausente o Ala o 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácido cargado positivamente
- 65 <220>

- <221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa3 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa7 está ausente o Ala o 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácido cargado positivamente
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa8 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa8 es un residuo de aminoácido cargado positivamente
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa10 es hasta 10 residuos de aminoácido cargados positivamente
<400> 11
- 25
- | | | | | | | | | | | |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Ala | Ala | Lys | Tyr | Gln | Tyr | Ala | Lys | Lys | Lys |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 |
- <210> 12
<400> 12
- 30 000
- <210> 13
<211> 9
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
40 <400> 13
- | | | | | | | | | | |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Arg | Val | Thr | Val | Lys | Tyr | Asp | Arg | Arg |
| | 1 | | | | 5 | | | | |
- <210> 14
45 <211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
50 <223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
<400> 14
- | | | | | | | | | | | |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Arg | Arg | Val | Thr | Val | Lys | Tyr | Asp | Arg | Arg |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 |
- 55 <210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<223> péptido que aumenta la liberación del fármaco

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> FOSFORILACIÓN
 <400> 15

5

	Arg	Arg	Val	Thr	Val	Lys	Tyr	Asp	Arg	Arg
	1				5					10

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
 <400> 16

15

	Arg	Arg	Val	Thr	Val	Lys	Tyr	Lys	Arg	Arg
	1				5					10

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> péptido que aumenta la liberación del fármaco

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> FOSFORILACIÓN
 <400> 17

30

	Arg	Arg	Val	Thr	Val	Lys	Tyr	Lys	Arg	Arg
	1				5					10

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
 <400> 18

40

	Arg	Arg	Lys	Thr	Val	Lys	Tyr	Asp	Arg	Arg
	1				5					10

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
 <400> 19

50

	Lys	Ala	Lys	Tyr	Gln	Tyr
	1				5	

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>

60

ES 2 690 580 T3

<223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
<400> 20

	Arg	Arg	Asp	Tyr	Lys	Val	Glu	Val	Arg	Arg
5	1				5					10

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> péptido que aumenta la liberación del fármaco
<400> 21

	Lys	Arg	Arg	Tyr	Gln	Tyr	Lys	Ala	Lys	Arg
15	1				5					10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 2

5 $X_5-X_6-X_7-X_8$ Fórmula 2 (Id. de Sec. nº: 2)

en la que:

10 X_5 es cualquier porción de aminoácido;
 X_6 es Tyr;
 X_7 es Gln; y
 X_8 es Tyr,

De acuerdo con algunas realizaciones:

15 X_5 es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 X_6 es Tyr;
 X_7 es Gln, y
 X_8 es Tyr;

20 o que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 1:

$X_4-X_5-X_6-X_7-X_8$ Fórmula 1 (Id. de Sec. nº: 1)

25 en la que:

X_4 es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu;
 X_5 es un residuo de aminoácido hidrófobo pequeño, por ejemplo Val o Ala;
 X_6 es un residuo de aminoácido cargado positivamente, por ejemplo Lys o Arg;
30 X_7 es un residuo de aminoácido hidrófilo, por ejemplo, Tyr, Phe, Thr o Ser; y
 X_8 es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu,

o que comprende la forma retro-inversa de la secuencia de acuerdo con la Fórmula 1 o Fórmula 2 en la que todos los residuos de aminoácidos están en configuración D y el orden de secuencia peptídica está invertido, en donde el péptido comprende además una secuencia CPP de péptido que penetra en la célula.

35 2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 1 en la que:

40 X_4 es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu;
 X_5 es un residuo de aminoácido hidrófobo pequeño, por ejemplo Val o Ala;
 X_6 es un residuo de aminoácido cargado positivamente, por ejemplo Lys o Arg;
 X_7 es un residuo de aminoácido hidrófilo, por ejemplo, Tyr, Phe, Thr o Ser; y
 X_8 es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu,

45 En la que X_4 es Asp o Glu; X_5 es Val; X_6 es Lys; X_7 es Tyr y X_8 es Asp o Glu; o en el que todos los residuos de aminoácidos están en la configuración D y el orden de la secuencia peptídica está invertido.

3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 1a

50 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ Fórmula 1a (Id. de Sec. nº: 5)

en la que:

55 X_1 es hasta 10 residuos de aminoácidos cargados positivamente;
 X_2 es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 X_3 es un residuo de aminoácido hidrofóbico o está ausente;
 X_4 es un residuo de aminoácido cargado negativamente;
 X_5 es un residuo de aminoácido hidrofóbico pequeño;
60 X_6 es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 X_7 es un residuo de aminoácido hidrofóbico;
 X_8 es un residuo de aminoácido cargado negativamente;
 X_9 es un residuo de aminoácido de carga positiva; y
 X_{10} es hasta 10 residuos de aminoácidos cargados positivamente; o en el que todos los residuos de
65 aminoácidos están en la configuración D y el orden de la secuencia peptídica está invertido.

4. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 3, en la que X_1 es Lys o Arg; X_2 es Lys o Arg; X_3 es Ala o Val; X_4 es Asp o Glu; X_5 es Val; X_6 es Lys; X_7 es Tyr; X_8 es Asp o Glu; X_9 es Lys o Arg; y X_{10} es Lys o Arg; o en el que todos los residuos de aminoácidos están en la configuración D y el orden de la secuencia peptídica está invertido.

5. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de acuerdo con la fórmula 2 en la que:

X_5 es cualquier residuo de aminoácido;
 X_6 es Tyr;
 X_7 es Gln; y
 X_8 es Tyr

en la que X_5 es Lys o Arg; X_6 es Tyr, X_7 es Gln y X_8 es Tyr; o en el que todos los residuos de aminoácidos están en configuración D y el orden de secuencia de péptidos está invertido.

6. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 2a

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} Fórmula 2a (Id. de Sec. nº: 12)

en la que:

X_1 es hasta 10 residuos de aminoácidos cargados positivamente;
 X_2 es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 X_3 es Ala o Val;
 X_4 está ausente o Ala o 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos cargados positivamente;
 X_5 es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 X_6 es Tyr;
 X_7 es Gln;
 X_8 es Tyr;
 X_9 está ausente o Ala o 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos de carga positiva;
 X_{10} es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 X_{11} es un residuo de aminoácido cargado positivamente; y
 X_{12} es hasta 10 residuos de aminoácidos de carga positiva; o en donde todos los residuos de aminoácidos son de la configuración D y el orden de secuencia se invierte.

7. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 6, en el que

X_1 es Arg; X_2 es Lys; X_3 es Ala; X_4 está ausente; X_5 es Lys; X_6 es Tyr, X_7 es Gln; X_8 es Tyr; X_9 está ausente; X_{10} es Arg; X_{11} es Arg y X_{12} es Lys; o en el que todos los residuos de aminoácidos están en configuración D y el orden de secuencia está invertido.

8. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la secuencia Arg-Arg-Val-Glu-Val-Lys-Tyr-Asp-Arg-Arg-NH₂ (Id. de Sec. nº: 3); o la secuencia Arg-Lys-Ala-Lys-Tyr-Gln-Tyr-Arg-Arg-Lys-NH₂; (Id. de Sec. nº: 4) o una secuencia correspondiente en la que todos los residuos de aminoácidos están en configuración D y el orden de secuencia se invierte.

9. Una composición farmacéutica que comprende un péptido que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 2

X_5 - X_6 - X_7 - X_8 Fórmula 2 (Id. de Sec. nº: 2)

en la que:

X_5 es cualquier residuo de aminoácido;
 X_6 es Tyr;
 X_7 es Gln; y
 X_8 es Tyr.

De acuerdo con algunas realizaciones:

X_5 es un residuo de aminoácido cargado positivamente;
 X_6 es Tyr;
 X_7 es Gln, y
 X_8 es Tyr;

o que comprende una secuencia de acuerdo con la Fórmula 1:

X₄-X₅-X₆-X₇-X₈ Fórmula 1 (Id. de Sec. nº: 1)

en la que:

- 5 X₄ es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu;
 X₅ es un residuo de aminoácido hidrofóbico pequeño, por ejemplo Val o Ala;
 X₆ es un residuo de aminoácido cargado positivamente, por ejemplo Lys o Arg;
 X₇ es un residuo de aminoácido hidrófilo, por ejemplo, Tyr, Phe, Thr o Ser; y
 X₈ es un residuo de aminoácido cargado negativamente, por ejemplo pTyr, Asp o Glu;
- 10 o que comprende la forma retro-inversa de la secuencia de acuerdo con la Fórmula 1 o Fórmula 2 en la que todos los residuos de aminoácidos están en configuración D y el orden de secuencia peptídica está invertido y es un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho péptido es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10 que comprende adicionalmente un segundo agente terapéutico.
- 20 12. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho segundo agente terapéutico es insulina, GLP-1 o un derivado, análogo o imitación del mismo.
13. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en la que dicha composición es adecuada para administración oral y opcionalmente comprende un recubrimiento entérico para proteger el péptido y/o el segundo agente terapéutico de la degradación en el estómago.
- 25 14. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, para uso como medicamento.
- 30 15. Un método para abrir las uniones estrechas de una superficie epitelial que comprende administrar una cantidad efectiva de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 para el epitelio, donde dicho método se lleva a cabo in vitro.
- 35 16. Un método para suministrar un agente a través de una superficie epitelial que comprende administrar dicho agente junto con un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o como parte de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que dicho método se lleva a cabo in vitro.

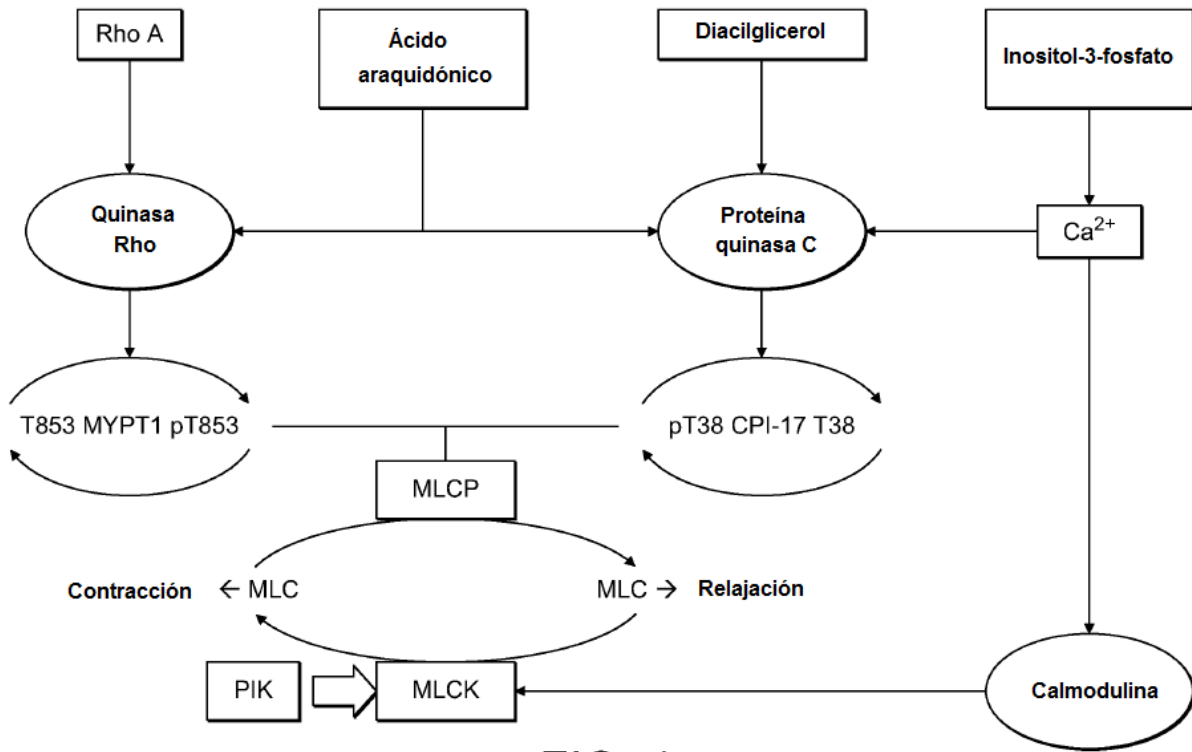


FIG. 1

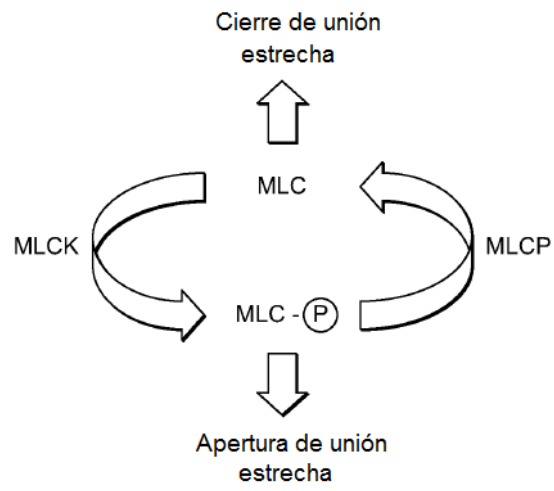
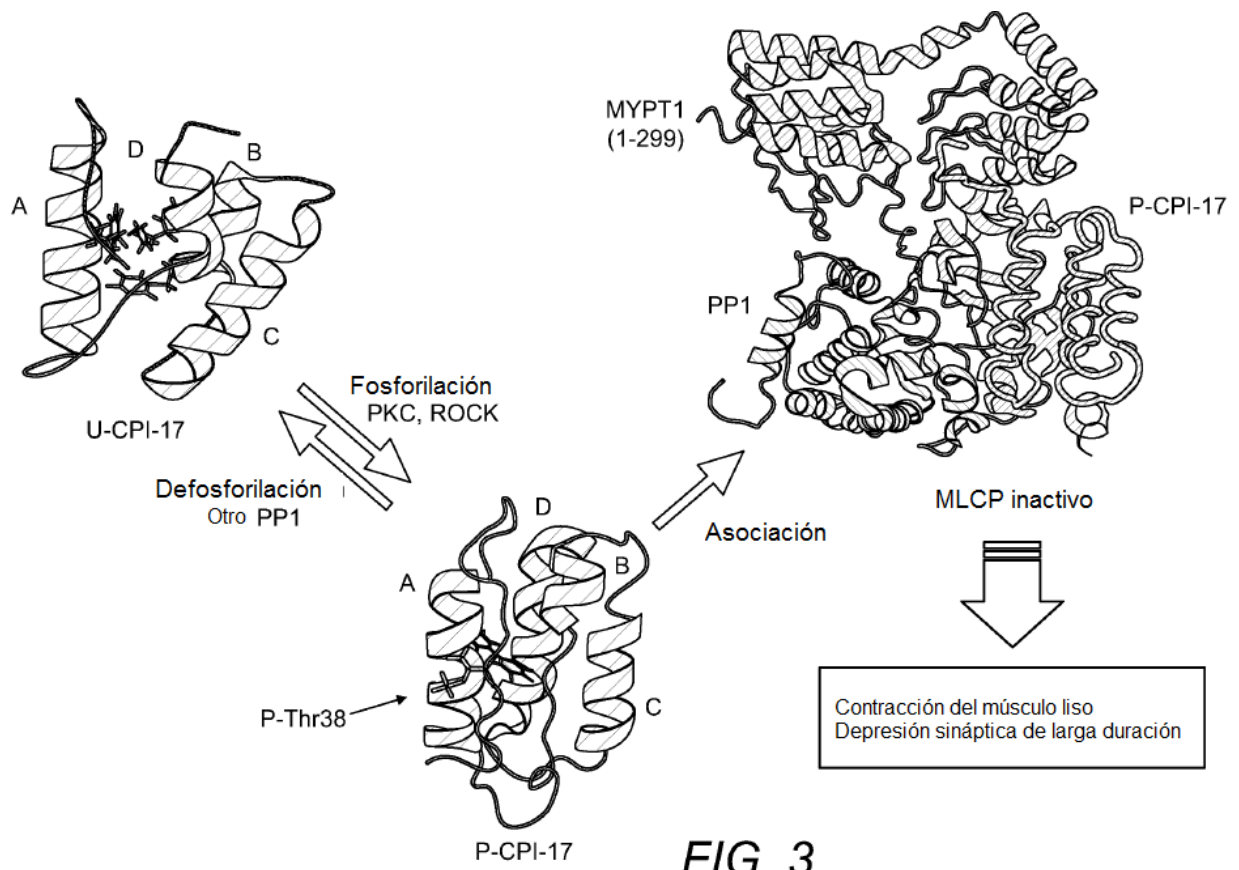


FIG. 2



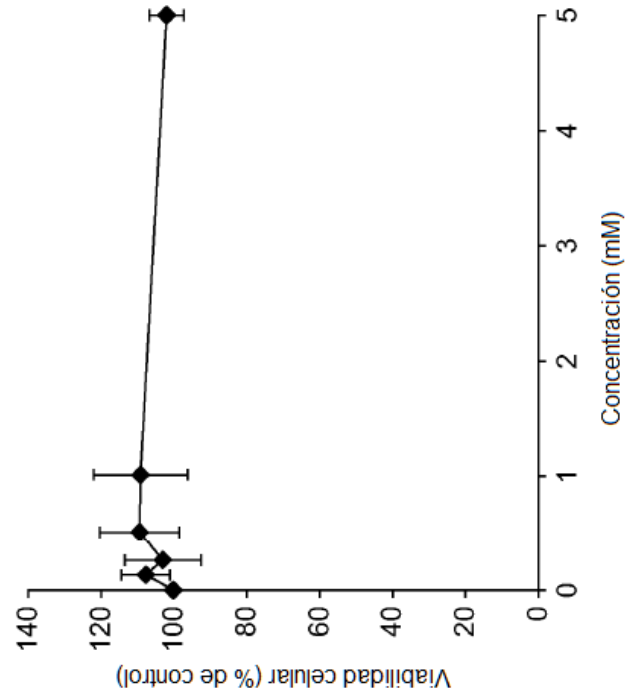


FIG. 4B

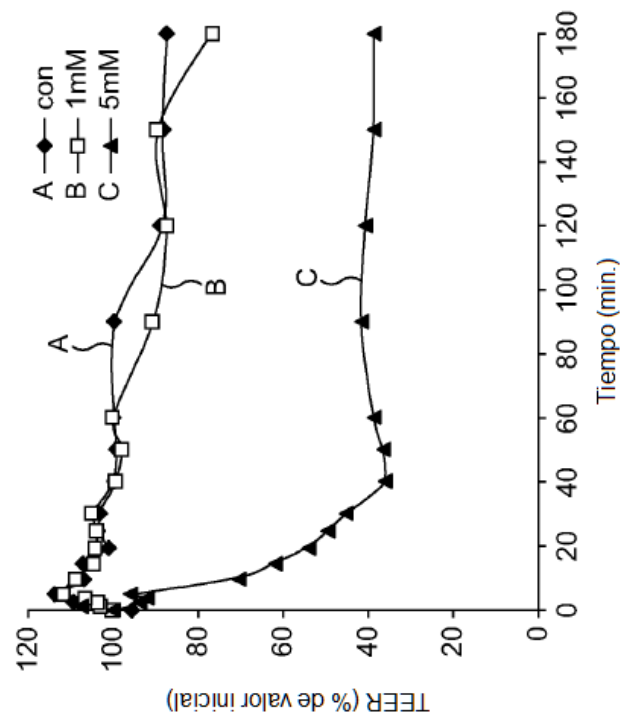


FIG. 4A

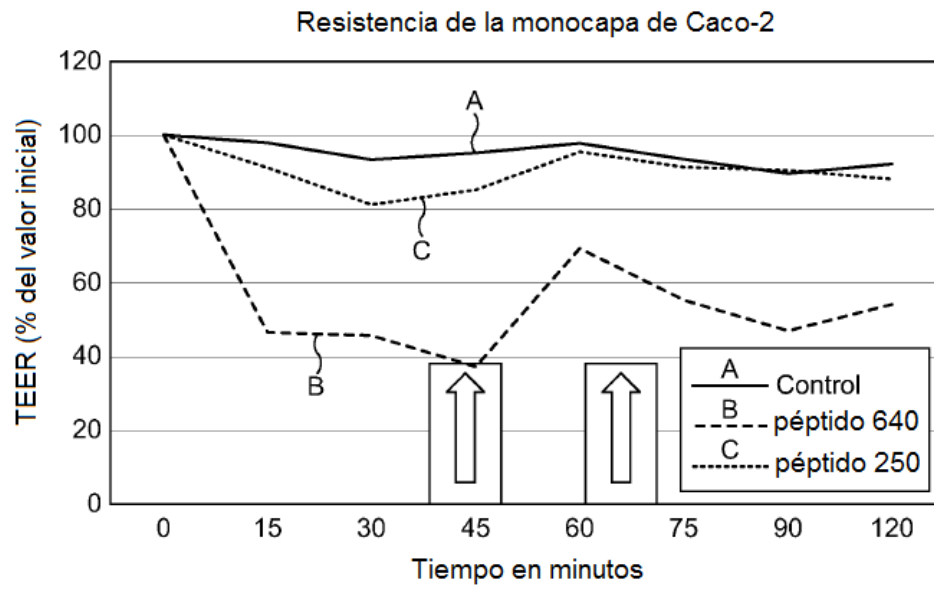


FIG. 5A

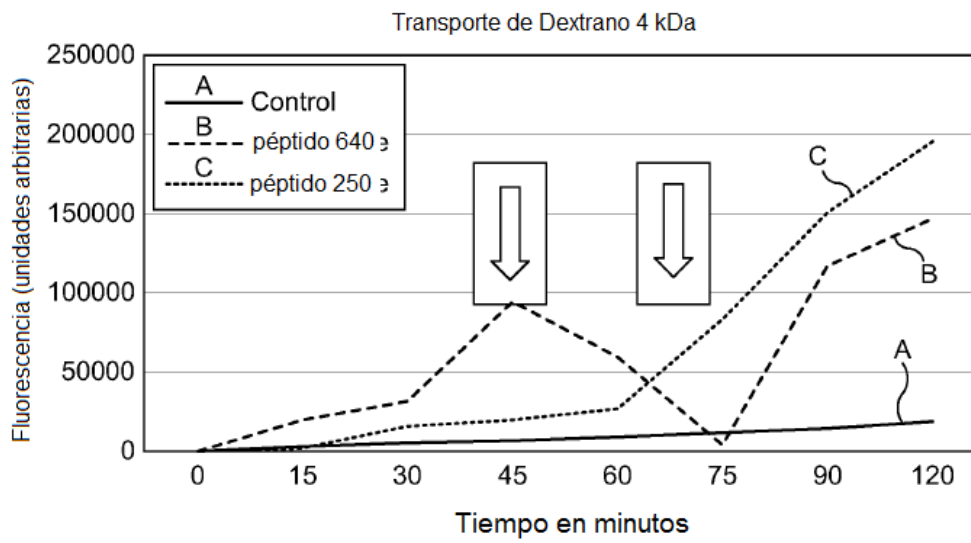


FIG. 5B

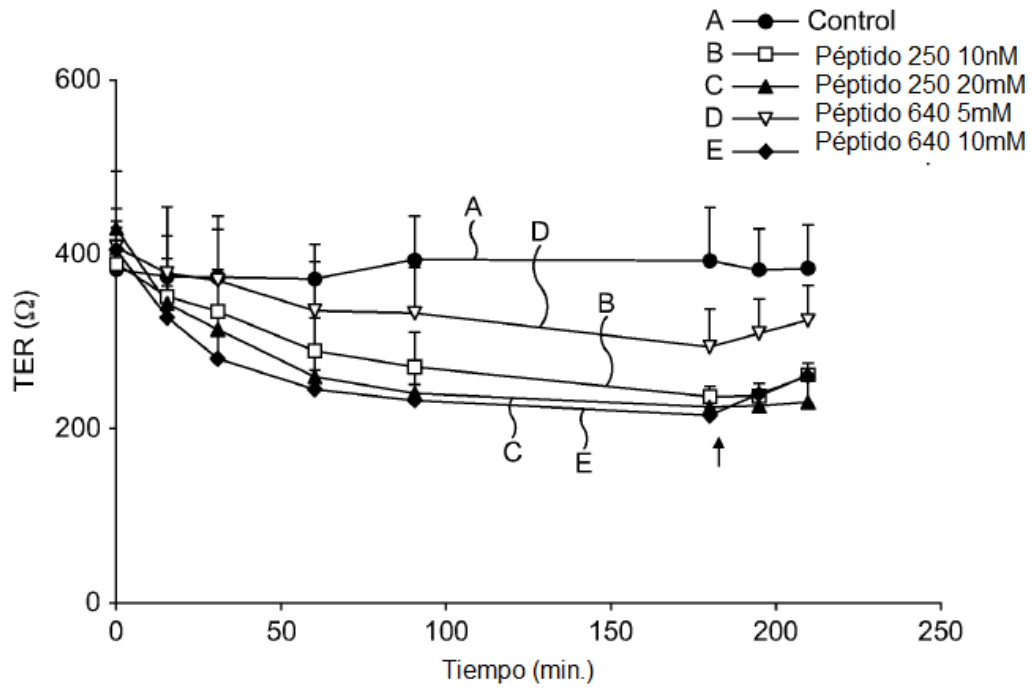


FIG. 6A

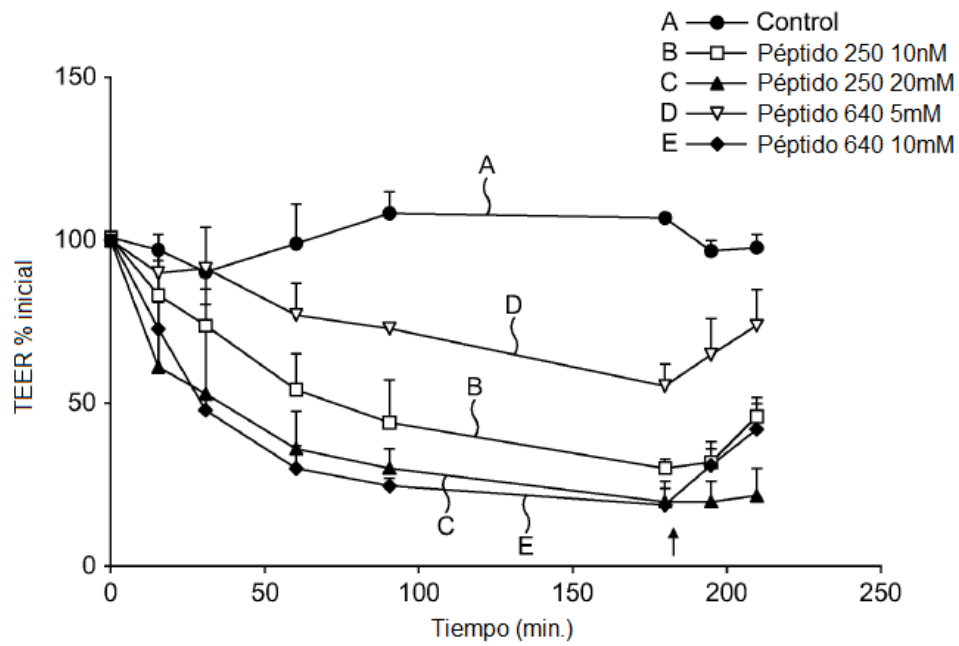
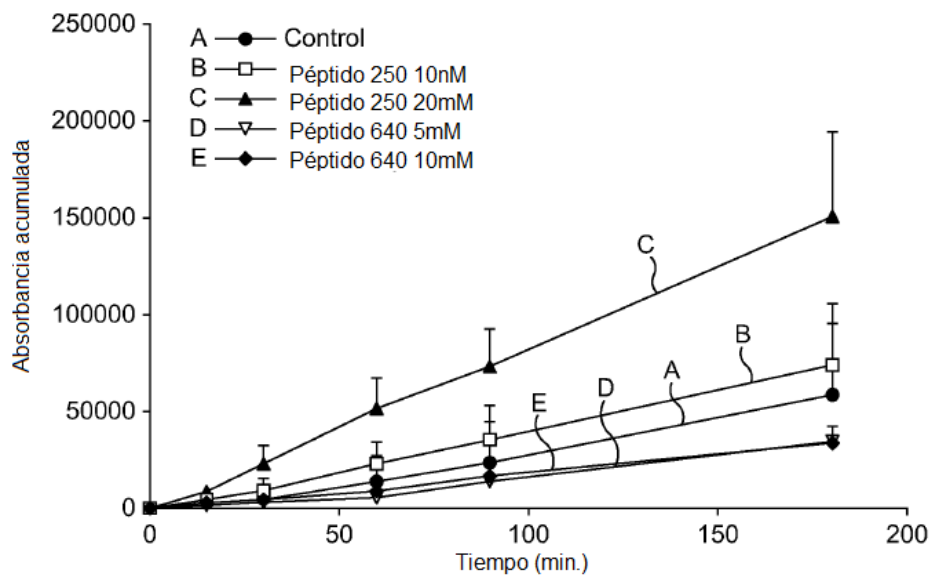
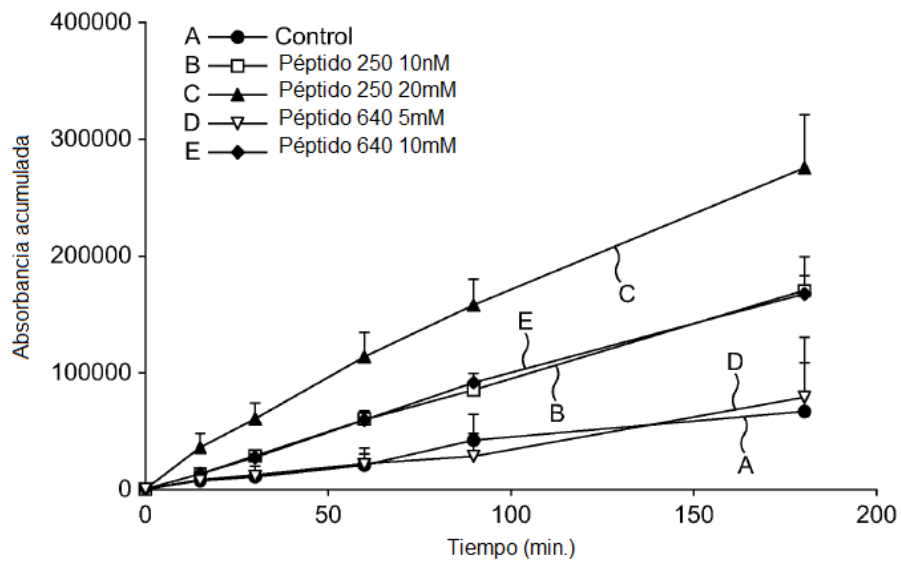


FIG. 6B



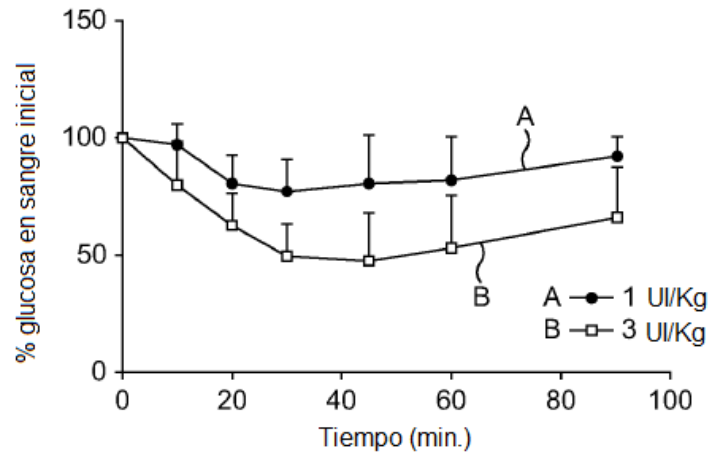


FIG. 8A

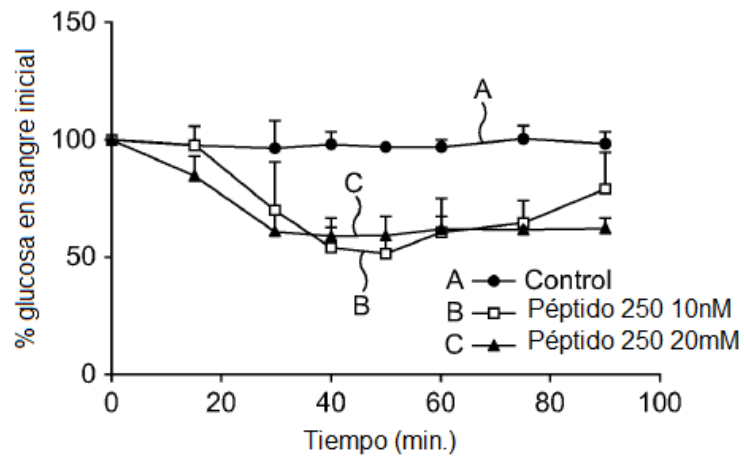


FIG. 8B

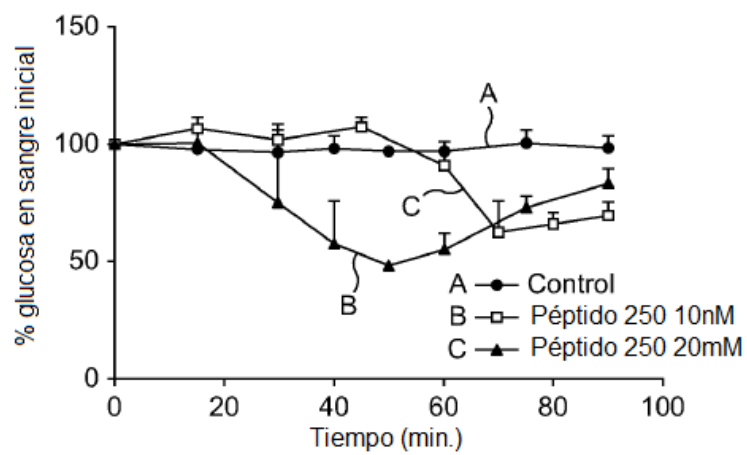


FIG. 8C

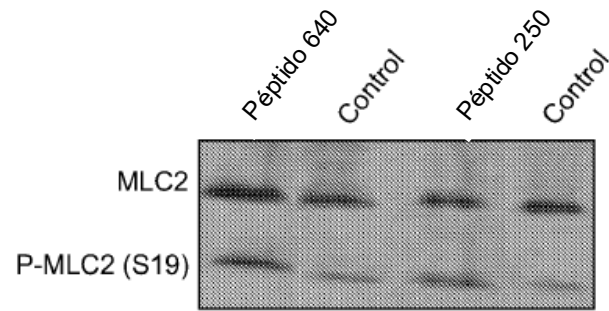


FIG. 9A

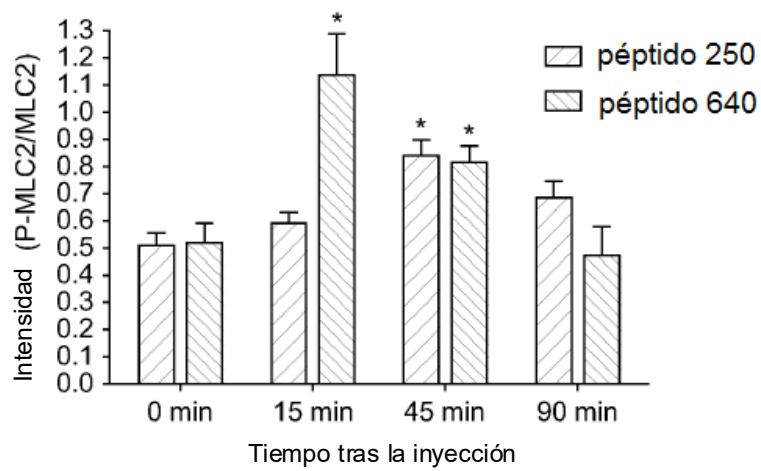


FIG. 9B

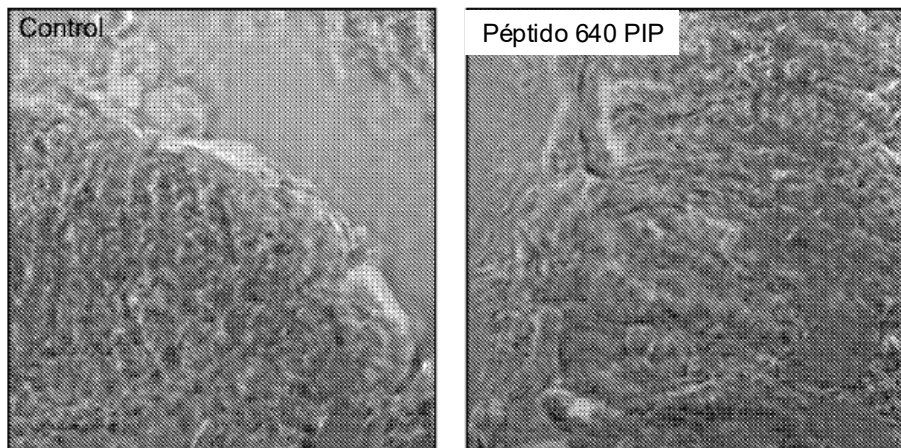


FIG. 9C

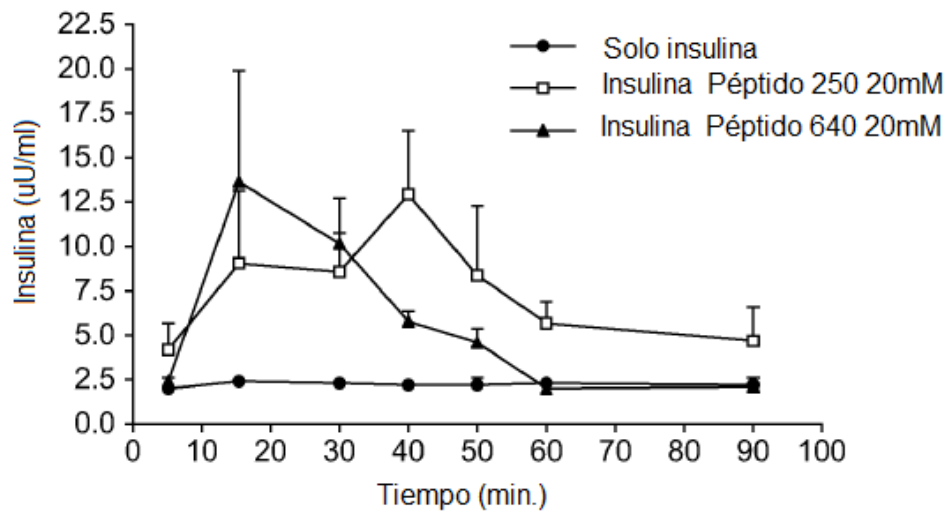


FIG. 10A

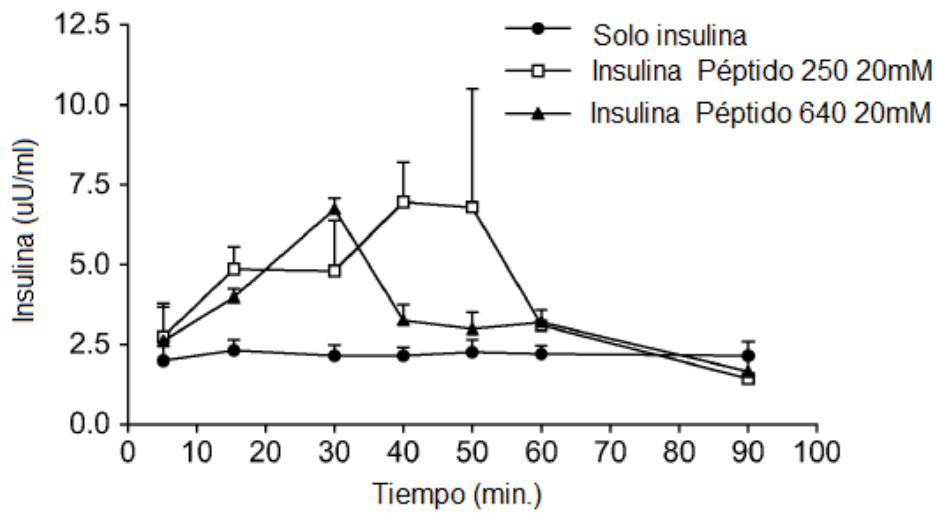


FIG. 10B

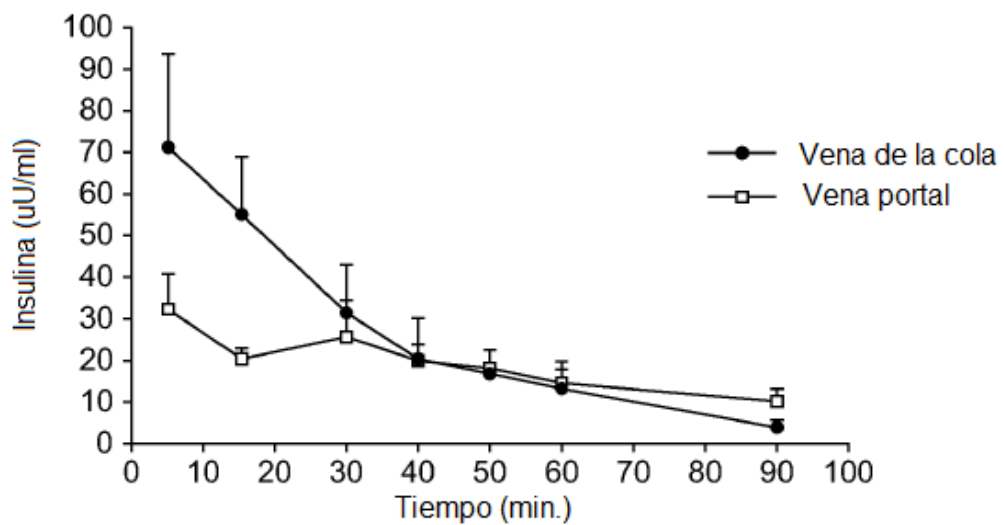


FIG. 10C

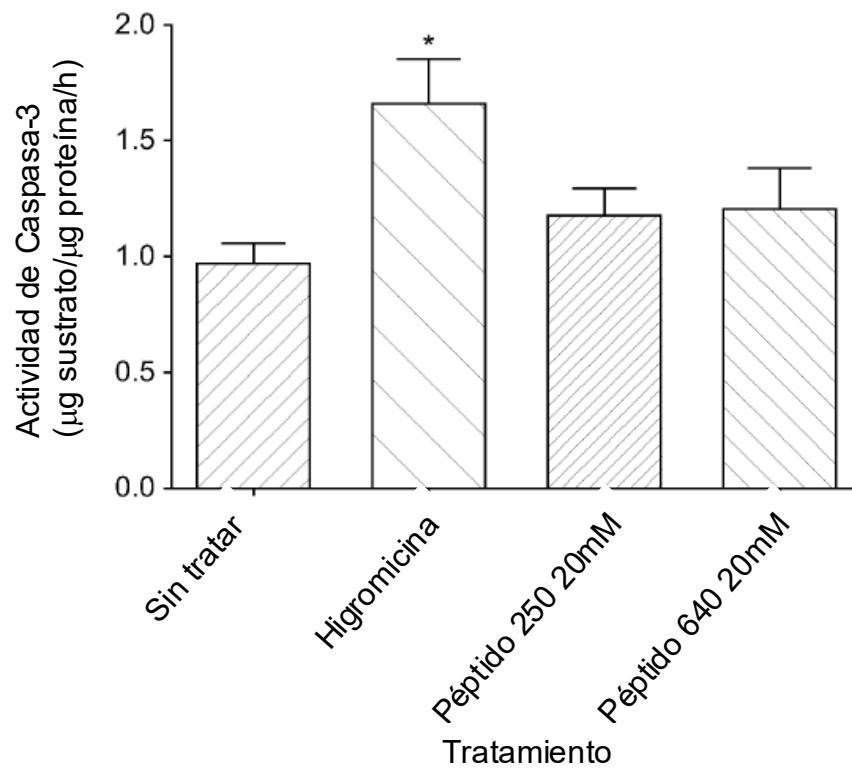


FIG. 11