

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 257**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 47/61 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2009 PCT/US2009/004986**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.03.2010 WO10027479**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2009 E 09744219 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2344202**

54 Título: **Administración mucosa de moléculas, proteínas o partículas terapéuticas acopladas a lípidos de ceramida**

30 Prioridad:

08.09.2008 US 191468 P

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

10.12.2020

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION
(100.0%)
55 Shattuck Street
Boston, Massachusetts 02115, US**

72 Inventor/es:

**LENCER, WAYNE I. y
CHINNAPEN, DANIEL JF**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 798 257 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

Administración mucosa de moléculas, proteínas o partículas terapéuticas acopladas a lípidos de ceramida

Antecedentes de la invención

5 La permeabilidad y la semivida de los fármacos son algunos de los factores limitantes de los nuevos productos terapéuticos. Sería beneficioso contar con mejores planteamientos para potenciar la disponibilidad de los fármacos, introduciendo fármacos en las células y extendiendo sus semividas.

10 L. FRANCHINI et al: "Synthesis of a fluorescent sulfatide for the study of CD1 antigen binding properties"., EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, val. 2004, no. 23, diciembre de 2004 (2004-12), páginas 4755-4761, XP002596009, ISSN: 1099-0690, DOI: 10.1 002ejoc.200400398 describe un complejo (ver la Figura 1a) que es una sonda fluorescente (sonda de dansilo) enlazada a la posición 6 de una galactosa en sulfátido (una mezcla de β -D-galactosilceramidas 3-sulfatadas con diferentes ácidos grasos en el resto ceramida).

15 CHIGORNO Vet al: "Formation of a cytosolic ganglioside-protein complex following administration of photoreactive ganglioside GM1 to human fibroblasts in culture", FEBS LETTERS, val. 263, no. 2, 24 de abril de 1990 (1990-04-24), páginas 329-331, XP025601899, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/0014-5793(90)81406-E describe ciertos conjugados de grupos fotorreactivos de gangliósidos.

El documento WO 99/43356 describe conjugados de, entre otros, Gb3 que no están enlazados a un resto de oligosacárido.

20 BAGAI Setal: "Reconstituted Sendai virus envelopes as biological carriers: dual role of F protein in binding and fusion with liver cells", BIOCH I MICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, val. 1152, no. 1, 10 de octubre de 1993 (1993-1 0-1 0), páginas 15-25, XP023352288, ISSN: 0005-2736, DOI: 10.1 016/0005-2736(93)90226-P describe que la incorporación de asialogangliósido GM1 en virosomas aumenta su absorción por el hígado. GM1, no obstante, no se une a los virosomas.

El documento WO 94/01138 describe en el ejemplo 7 un compuesto antivírico que consiste en ceramida conjugada a AZT-monofosfato.

25 El documento WO 99/15201 describe la preparación de conjugados de fucosil-GM1-KLH en donde la cadena de ácido graso del dominio ceramida de GM1 es un ácido graso C18 saturado y que implica la conversión del doble enlace ceramida a un grupo aldehído por ozonólisis, seguido de enlace a grupos -NH₂ en KLH usando cianoborohidruro de sodio.

Compendio de la invención

30 La invención se refiere a vehículos para administración, complejos de glicoesfingolípido-agente terapéutico, complejos de gangliósido-agente terapéutico y composiciones que comprenden los agentes mencionados, como se define en las reivindicaciones anejas.

35 Se describen en este documento composiciones y métodos útiles para permitir la absorción (pasaje) de agentes de interés, como agentes terapéuticos, en las barreras epiteliales y mucosas y/o en ciertos otros compartimientos subcelulares de la célula, como el endosoma de reciclaje (RE), Golgi y el retículo endoplasmático (ER). En las composiciones y métodos de la invención, un agente, tal como un agente terapéutico, se acopla con o se une a una ceramida de la estructura correcta, como se describe en este documento. Como se describe también en la presente invención, se ha demostrado que la estructura del ácido graso de las ceramidas dirige su tráfico, y las composiciones y los métodos de la invención se pueden usar para aprovechar el tráfico intracelular con el fin de prolongar la semivida de los agentes de interés (p. ej., agentes terapéuticos) y/o para administrar agentes de interés en las barreras mucosas epiteliales. La tecnología será útil para administrarlos por vía parenteral (p. ej., administración subcutánea, intramuscular, por inhalación o por inyección intravenosa, tópica a las mucosas u otras superficies epiteliales) o enteral/no parenteral.

45 El agente de interés del vehículo de administración es, por ejemplo, una proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato (p. ej., polisacárido), lípido, glucoproteína, y cualquiera de sus combinaciones. También se incluyen los fármacos orgánicos e inorgánicos sintéticos que pueden ejercer un efecto biológico cuando se administran a un sujeto. El agente de interés puede ser un agente terapéutico, como un agente antiinflamatorio, un antígeno de vacuna, un fármaco antineoplásico o un fármaco quimioterapéutico, un factor de coagulación, una hormona, una citocina, una quimiocina, una metaloproteasa de matriz o una molécula pequeña bioactiva tal como adenosina, un esteroide, una citocina, un antibiótico o un fármaco para el tratamiento de enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune, alergia, un trastorno de la sangre, un trastorno metabólico o una enfermedad de la piel. Además, los glicoesfingolípidos unidos a antígeno se pueden administrar como una vacuna y/o estimular la respuesta de un individuo a una vacuna. Un antígeno se selecciona del grupo que consiste en: un antígeno que es característico

de un patógeno, un antígeno que es característico de una enfermedad autoinmune, un antígeno que es característico de un alérgeno, un antígeno que es característico de un tumor y un antígeno que sirve como adyuvante (p. ej., agonistas de TLR, como ligandos de TLR). El antígeno de vacuna comprende células, virus y/o cualquiera de sus componentes. En algunos casos, el complejo de glicoesfingolípido-antígeno sirve como adyuvante y se administra lo suficientemente próximo en tiempo con una vacuna (simultánea o secuencialmente) para estimular la respuesta del individuo a la vacuna.

El glicoesfingolípido del complejo se puede seleccionar del grupo que consiste en glicoesfingolípidos neutros, como globósidos o glicoesfingolípidos ácidos, como gangliósidos. El gangliósido del complejo de agentes terapéuticos de gangliósidos comprende un ácido siálico (uno o más, por lo menos uno) y en un caso específico, incluye solamente ácido siálico. En un caso específico, el gangliósido del complejo es monosialotetrahexosilgangliósido (GM1). El agente terapéutico es, por ejemplo, una proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato (p. ej., polisacárido), lípido, glucoproteína y cualquiera de sus combinaciones. También se incluyen fármacos orgánicos e inorgánicos sintéticos que pueden ejercer un efecto biológico cuando se administran a un sujeto. Además, los glicoesfingolípidos unidos a antígeno se pueden administrar como una vacuna y/o estimular la respuesta de un individuo a una vacuna. Un antígeno se selecciona del grupo que consiste en: un antígeno característico de un patógeno, un antígeno característico de una enfermedad autoinmune, un antígeno característico de un alérgeno, un antígeno característico de un tumor y un antígeno que sirve como adyuvante (p. ej., agonistas de TLR, como ligandos de TLR). El antígeno de vacuna comprende células, virus y/o cualquiera de sus componentes. En algunos casos, el complejo de glicoesfingolípido-antígeno sirve como adyuvante y se administra lo suficientemente próximo en tiempo con una vacuna (simultánea o secuencialmente) para estimular la respuesta del individuo a la vacuna. El agente terapéutico es, por ejemplo, un agente antiinflamatorio, un antígeno de vacuna, un antineoplásico o fármaco quimioterapéutico, un factor de coagulación, una hormona, un esteroide, una citocina, un antibiótico o un fármaco para el tratamiento de enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune, alergia, un trastorno de la sangre, un trastorno metabólico o una enfermedad de la piel.

El glicoesfingolípido del complejo se puede seleccionar del grupo que consiste en glicoesfingolípidos neutros, como globósidos o glicoesfingolípidos ácidos, como gangliósidos. El gangliósido del complejo de gangliósido-agente terapéutico comprende un ácido siálico (uno, uno o más, por lo menos uno) y, en un caso específico, incluye solamente un ácido siálico. En un caso específico, el gangliósido del complejo es monosialotetrahexosilgangliósido (GM1). El agente terapéutico es, por ejemplo, una proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato (p. ej., polisacárido), lípido, glucoproteína y cualquiera de sus combinaciones. También se incluyen los fármacos orgánicos e inorgánicos sintéticos que pueden ejercer un efecto biológico cuando se administran a un sujeto. Además, los glicoesfingolípidos unidos a un antígeno se pueden administrar como una vacuna y/o estimular la respuesta de un individuo a una vacuna. Un antígeno se selecciona del grupo que consiste en: un antígeno característico de un patógeno, un antígeno característico de una enfermedad autoinmune, un antígeno característico de un alérgeno, un antígeno característico de un tumor y un antígeno que sirve como adyuvante (p. ej., agonistas de TLR, como ligandos de TLR). El antígeno de vacuna comprende células, virus y/o cualquier combinación de estos. En algunos casos, el complejo de glicoesfingolípido-antígeno sirve como un adyuvante y se administra lo suficientemente próximo en tiempo con una vacuna (simultánea o secuencialmente) para estimular la respuesta del individuo a la vacuna. El agente terapéutico es, por ejemplo, un agente antiinflamatorio, un antígeno de vacuna, un fármaco antineoplásico o quimioterapéutico, un factor de coagulación, una hormona, un esteroide, una citocina, un antibiótico o un fármaco para el tratamiento de enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune, alergia, un trastorno de la sangre, un trastorno metabólico o una enfermedad de la piel.

Se describe también en este documento un complejo de gangliósido-agente terapéutico, en donde el gangliósido comprende una ceramida que comprende (a) un ácido graso de cadena corta (C4 - C12) o (b) un ácido graso de cadena larga (C14 - C28) que comprende un doble enlace *cis* (uno, uno o más, por lo menos uno) y el agente terapéutico se une al oligosacárido del gangliósido. El componente ácido graso de cadena corta (4 - 12 átomos de carbono) puede ser un ácido graso sin dobles enlaces entre los átomos de carbono. En casos específicos, el ácido graso es un ácido graso C12 sin dobles enlaces entre los átomos de carbono (C12:0) o un ácido graso C16 que comprende un doble enlace *cis* y, en un caso específico, un ácido graso C16 con un doble enlace *cis* (designado C16:1). El gangliósido del complejo de gangliósido-agente terapéutico comprende un ácido siálico (uno, uno o más, por lo menos uno) y, en un caso específico, incluye solamente un ácido siálico. En un caso específico, el gangliósido del complejo es monosialotetrahexosilgangliósido (GM1). El agente terapéutico es, por ejemplo, una proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato (p. ej., polisacárido), lípido, glucoproteína y cualquiera de sus combinaciones. También se incluyen los fármacos orgánicos e inorgánicos sintéticos que pueden ejercer un efecto biológico cuando se administran a un sujeto. Asimismo, los glicoesfingolípidos unidos a antígeno se pueden administrar como una vacuna y/o estimular la respuesta de un individuo a una vacuna. Un antígeno se selecciona del grupo que consiste en: un antígeno característico de un patógeno, un antígeno característico de una enfermedad autoinmune, un antígeno característico de un alérgeno, un antígeno característico de un tumor y un antígeno que sirve como adyuvante (p. ej., agonistas de TLR, como ligandos de TLR). El antígeno de vacuna comprende células, virus y/o cualquier componente de estos. En algunos casos, el complejo de glicoesfingolípido-antígeno sirve como adyuvante y se administra lo suficientemente próximo en tiempo con una vacuna (simultánea o secuencialmente) para estimular la respuesta del

individuo a la vacuna. El agente terapéutico es, por ejemplo, un agente antiinflamatorio, un antígeno de vacuna, un fármaco antineoplásico o quimioterapéutico, un factor de coagulación, una hormona, un esteroide, una citocina, un antibiótico, o un fármaco para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune, alergia, un trastorno de la sangre, un trastorno metabólico o una enfermedad de la piel.

5 También se describe en este documento un complejo de gangliósido-agente terapéutico que comprende monosialotetrahexosilgangliósido (GM1) unido a un agente terapéutico, en donde el componente ácido graso de la ceramida comprende (a) átomos de carbono 4 - 12 sin dobles enlaces entre los átomos de carbono o (b) átomos de carbono 14 - 28 que comprenden por lo menos un doble enlace *cis* entre dos átomos de carbono, y el agente terapéutico está unido al oligosacárido de monosialotetrahexosilgangliósido (GM1).

10 En casos específicos, el ácido graso de cadena corta (C4 - C12) no incluye dobles enlaces entre sus átomos de carbono. En casos alternativos, el ácido graso de cadena corta (C4 - C12) comprende un doble enlace *cis* (uno, uno o más, por lo menos uno) entre sus átomos de carbono.

El agente terapéutico es, por ejemplo, una proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato (p. ej., polisacárido), lípido, glucoproteína y cualquier combinación de estos. También se incluyen los fármacos orgánicos e inorgánicos sintéticos que pueden ejercer un efecto biológico cuando se administran a un sujeto. Además, los glicoesfingolípidos unidos a un antígeno se pueden administrar como una vacuna y/o para estimular la respuesta de un individuo a una vacuna. Un antígeno se selecciona del grupo que consiste en: un antígeno característico de un patógeno, un antígeno característico de una enfermedad autoinmune, un antígeno característico de un alérgeno, un antígeno característico de un tumor y un antígeno que sirve como adyuvante (p. ej., agonistas de TLR, como ligandos de TLR). El antígeno de vacuna comprende células, virus y/o cualquiera de sus componentes. En algunos casos, el complejo de glicoesfingolípidos-antígeno sirve como adyuvante y se administra lo suficientemente próximo en tiempo con una vacuna (simultánea o secuencialmente) para estimular la respuesta de un individuo a la vacuna. El agente terapéutico es, por ejemplo, un agente antiinflamatorio, un antígeno de vacuna, un fármaco antineoplásico o quimioterapéutico, un factor de coagulación, una hormona, un esteroide, una citocina, un antibiótico o un fármaco para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune, alergia, un trastorno de la sangre, un trastorno metabólico o una enfermedad de la piel. En otro caso, el agente unido al oligosacárido de GM1 es un grupo cargado hidrófilo, como un grupo cargado hidrófilo fuerte. En un caso, este grupo es fluoróforo (p. ej., ALEXA, p. ej., ALEXA568).

También se describen en este documento composiciones que comprenden (a) un vehículo de administración como se describe en la presente invención y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otras composiciones comprenden (a) un complejo de gangliósido-agente terapéutico y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención es útil en métodos para administrar un agente, como un agente terapéutico, a las células/a una superficie mucosa. En un caso, el método comprende poner en contacto un vehículo de administración descrito en este documento con las células/la superficie mucosa, bajo condiciones apropiadas para absorción del agente de interés, solo o unido al vehículo de administración a la célula o su absorción en la superficie mucosa, lo que resulta en la administración del agente de interés, solo o junto con el vehículo de administración. En algunas cosas, el agente de interés se libera del vehículo de administración e ingresa en las células o cruza la superficie mucosa (no unida al vehículo de administración). En algunos casos, el vehículo de administración lo hace.

En otro caso, el método es un método para administrar un agente terapéutico/que permita la absorción de un agente terapéutico por las superficies mucosas u otras superficies epiteliales, que comprende poner en contacto un complejo de gangliósido-agente terapéutico descrito en este documento con la superficie mucosa, bajo condiciones apropiadas para el pasaje del agente terapéutico, solo o unido al complejo de gangliósido-agente terapéutico, por las superficies mucosas. En algunos casos, el agente terapéutico se libera del complejo e ingresa en las células o atraviesa la superficie mucosa (no unida al complejo de gangliósido-agente terapéutico). En algunos casos, el complejo de gangliósido-agente terapéutico lo hace.

En otros casos, el método es un método para administrar un agente a las células/las superficies mucosas en un individuo, que comprende administrar al individuo un vehículo de administración descrito en este documento, que comprende un gangliósido y un agente para administrar o una composición que comprende dicho vehículo descrito en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otros casos, el método es un método para administrar un agente terapéutico a las células/la superficie mucosa en un individuo, que comprende administrar al individuo un complejo de gangliósido-agente terapéutico descrito en este documento o una composición descrita en este documento que comprende (a) un complejo de gangliósido-agente terapéutico y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Cuando se administra un vehículo para administración-agente de interés o un complejo de gangliósido-agente terapéutico o una composición que comprende uno de estos, la administración puede ser enteral/no parenteral o parenteral.

En otro caso, la invención se aplica en un método para potenciar/aumentar la semivida de un agente terapéutico en un individuo, que comprende administrar al individuo un vehículo de administración que comprende un gangliósido y un agente para ser administrado, en donde el agente es un agente terapéutico o un complejo de gangliósido-agente terapéutico descrito en este documento. En casos específicos, una composición que comprende un vehículo de administración, o un complejo de gangliósido-agente terapéutico se administra al individuo. En cada uno de los casos, si se administra un vehículo de administración-agente de interés, un complejo de gangliósido-agente terapéutico o una composición que comprende uno de estos, se puede administrar por vía enteral/no parenteral o parenteral.

En otro caso, la invención se aplica en un método para tratar una enfermedad o afección en un individuo que lo necesita, que comprende administrar una cantidad eficaz de un vehículo para administración que comprende un gangliósido y un agente que se va a administrar, en donde el agente es un agente terapéutico o un complejo de gangliósido-agente terapéutico, en donde una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para mitigar/reducir el grado al que la enfermedad o afección ocurre en el individuo. En casos específicos, se administra al individuo una composición que comprende un vehículo de administración o un complejo de gangliósido-agente terapéutico. En cada uno de los casos, si se administra un vehículo para administración-agente de interés, un complejo de gangliósido-agente terapéutico o una composición que comprende uno de estos, se puede administrar por vía enteral/no parenteral o parenteral.

La importancia de la presente invención es particularmente obvia en el área de administración y desarrollo de fármacos. Se refiere a dos problemas principales en el campo: el transporte macromolecular por las barreras mucosas y la semivida del fármaco. La mayoría de los productos terapéuticos de proteínas no pueden ser absorbidos en las superficies mucosas (como el intestino), lo que los hace clínicamente ineficaces para administración oral y los restringe a formas parenterales de administración del fármaco. Esta tecnología supera estos problemas. Además, la tecnología ofrece una forma de dirigir moléculas terapéuticas a las superficies mucosas por administración local (tópica), haciendo que sea posible tratar enfermedades mucosas, como la enfermedad intestinal inflamatoria, sin toxicidades sistémicas

Breve descripción de las figuras

La patente o el expediente de solicitud contienen por lo menos un dibujo ejecutado en color. Las copias de esta patente o de la publicación de solicitud de la patente con dibujo(s) en color serán provistas por la Oficina a solicitud y ante el pago de la tasa necesaria.

La Figura 1 ilustra isoformas de GM1 que contienen fluoróforo ALEXA 568 acoplado al grupo principal del oligosacárido GM1 y con los siguientes ácidos grasos en el dominio de ceramida: Panel A - C12:0, Panel B - C16:1, Panel C - C16:0 y Panel D - C20:0.

La Figura 2 muestra imágenes confocales en vivo de células A431 con Alexa-isoformas GM1 integradas en la membrana plasmática a 37°C durante 1 h. GM1 con cadenas de ceramida que contienen un FA C12 corto (Panel A); se utilizó o un ácido graso C18 largo (Panel B). Los resultados muestran que la ceramida de cadena corta va al endosoma de reciclaje y a la red trans Golgi. La ceramida de cadena larga va al compartimiento del endosoma tardío rab7.

La Figura 3 muestra imágenes confocales en vivo de células A431 con Alexa-isoformas GM1 integradas en la membrana plasmática a 37°C durante 1 h. GM1 con cadenas de ceramida que contienen un FA C12 corto (Panel A); o se usó un ácido graso C18 largo (Panel B). Ambas isoformas GM1 no ingresan en las cisternas Golgi ni en el retículo endoplasmático en cantidades detectables.

La Figura 4 muestra imágenes confocales en vivo de células A431 con Alexa-isoformas GM1 que contienen o bien ácido graso C16:0 (Panel A) o ácido graso C16:1 (Panel B). Las cadenas de ácido graso están enlazadas por un enlace amida a esfingosina típicamente C18:1. El "punto de quiebre" estructural para la estructura de ceramida que dicta la clasificación en endosoma de reciclaje/TGN es un doble enlace sencillo.

La Figura 5 es una representación del tráfico intracelular de isoformas de ceramida que comprenden ácido graso de cadena corta (C12), ácido graso de cadena larga con un doble enlace *cis* (C16:1) o ácidos grasos saturados de cadena larga (C16:0 y C18:0). La clasificación ocurre en el endosoma temprano (EE). Los ácidos grasos de cadena corta y los ácidos grasos de cadena larga, con por lo menos un doble enlace *cis* se localizan en el endosoma de reciclaje (RE) y Golgi (TGN), mientras que las cadenas largas de ácidos grasos saturados se dirigen a las vías lisosomales. También se presenta un resumen de los resultados de clasificación en estado estable.

La Figura 6 es una ilustración de los experimentos de transcitosis. El lípido GM1 que comprende o bien ácido graso de cadena corta o cadena larga se añade a la membrana apical de las células MDCK polarizadas y se incuban durante 1,5 h a 37°C. Se toman luego imágenes de las células en vivo por microscopia confocal.

La Figura 7 muestra la sección transversal media de células MDCK con Alexa-GM1 que contienen ácido graso de cadena corta (C12:0). C12-GM1 de cadena corta es transcitotizado a la membrana lateral en las células.

La Figura 8 muestra la sección transversal de la membrana basal de células MDCK con Alexa-GM1 que contienen ácido graso de cadena corta (C12:0). C12-GM1 de cadena corta es transcitositado a la membrana basal en las células.

La Figura 9 muestra la sección transversal media de células MDCK con Alexa-GM1 que contienen ácido graso de cadena larga (C18:0). C18-GM1 de cadena larga no etiqueta la membrana lateral en las células.

5 La Figura 10 muestra la sección transversal de la membrana basal de células MDCK con Alexa-GM1 que contienen ácido graso de cadena larga (C18:0). C18-GM1 de cadena larga no etiqueta la membrana basal en las células.

Figura 11: GLP1 deriva de proglucagón por escisión post-traducción al péptido activo.

10 La Figura 12 muestra células vivas incubadas con gangliósido C12:0 de cadena corta (panel izquierdo) y con GM1 de cadena larga (panel derecho). Las células expresan en forma estable Rab11a, Rab7 y Golgin97 etiquetado con EGFP para marcar el endosoma de reciclaje, el endosoma tardío y trans Golgi (TGN). Las ceramidas de cadena corta se co-localizan con el endosoma de reciclaje, PM y trans Golgi – pero las ceramidas de cadena larga se localizan con el endosoma tardío. Los datos morfológicos se cuantifican en los histogramas en la sección derecha y en la sección derecha inferior de cada panel.

15 La Figura 13 muestra que la cadena insaturada (C16:1) ocupa el RE y TGN evitando el endosoma tardío, mientras que GM1 de cadena saturada (C16:0) se clasifica predominantemente en el endosoma tardío. El punto de quiebre es la presencia de un doble enlace en el ácido graso de la cadena de ceramida.

La Figura 14 muestra que cuando se aplican juntas, las dos ceramidas (C12:0 y C18:0) se clasifican de manera diferencial prácticamente por completo lejos una de la otra. Ninguna de las ceramidas induce toxicidad.

20 Los resultados que se muestran en la Figura 15 demuestran que los dos grupos principales de fluoróforos Alexa, Alexa568 y Alexa 647, no afectan la distribución de GM1 en estado estable.

En la Figura 16, se cargaron células epiteliales humanas A431 vivas con isoformas GM1. Se observó formación de túbulos con GM1 de cadena corta (C12) 1(izquierda), mientras que no se formaron túbulos con C18 GM1 de cadena larga y se halla en los puntos lisosomales (derecha). Esto evidencia que la cadena corta puede ingresar en la clasificación de túbulos que se clasifican el lípido fuera de la vía degradativa.

25 Los resultados que se muestran en la Figura 17 demuestran que tanto las ceramidas C12 como C18 ingresan en los endosomas tempranos.

La Figura 18 muestra que reticular GM1 con toxina de cólera no afecta el tráfico de ceramidas de cadena larga.

30 La Figura 19 muestra que reticular GM1 con toxina de cólera redistribuye las ceramidas "torcidas" de RE a LE, mientras que el tráfico hacia TGN permanece inalterado. La toxina se aplicó a las células cargadas con las ceramidas de cadenas insaturadas (paneles derechos) y se las comparó con los controles (paneles izquierdos). La agrupación de las ceramidas insaturadas desplazó el tráfico fuera de la vía de reciclaje (comparación de paneles superiores izquierdos y derechos) y hacia el endosoma tardío (paneles medios). El transporte hacia TGN, no obstante, no se vio afectado (paneles inferiores).

35 La Figura 20 muestra que los resultados no pueden ser estocásticos. Hay 2 posibilidades: Una es que la toxina reticula tanto el marcador como los gangliósidos endógenos, en donde el volumen de las cadenas de ceramidas endógenas es de cadena larga y actúa en forma predominante. La otra es que agrupar las ceramidas de cadenas insaturadas altera la biología de los lípidos – de manera que se forman microdominios y el tráfico se deriva hacia LE.

40 La Figura 21 muestra que en células que carecen de GM1 – reticular la ceramida "torcida" (paneles derechos) no tiene ningún efecto sobre el tráfico hacia RE o TGN (en comparación con los controles en los paneles izquierdos). Se usaron fibroblastos embrionarios de ratón que carecen de gangliósidos (células derivadas de ratón KO GD2 sintasa).

La Figura 22 muestra que en células que carecen de GM1 –C12-GM1 de cadena corta se desvía fuera de RE después de la reticulación de CTB pero el tráfico hacia TGN se "rescata".

La Figura 23 muestra que reticular hacia GM1 de cadena larga no produce ningún efecto. La ceramida de cadena larga se clasifica fuera de RE o TGN en MEF.

45 La Figura 24 muestra que cuando GM1 de diferentes estructuras se carga a la superficie celular en cantidades equivalentes (concentraciones en barras negras en el gráfico izquierdo), y se añade toxina de cólera a las células, los lípidos GM1 C12 y C16:1 clasifican la toxina de manera más eficiente que las cadenas largas, es decir, causa más toxicidad en tiempos más cortos según lo ensayado por medición de los niveles de cAMP (gráfico derecho).

50 La Figura 25 muestra los resultados que demuestran la conducta de punto crítico: C18 GM1 se dirige hacia RE (y PM) en células A431 que carecen de colesterol.

La Figura 26 muestra que la aplicación de Brefeldin-1 inhibe el transporte de C12-GM1 hacia TGN.

La Figura 27 es una representación gráfica del curso de tiempo de las imágenes del tráfico de C12-GM1.

Descripción detallada

5 La clasificación de proteínas y lípidos a varios compartimientos intracelulares de células eucariotas depende del movimiento de las membranas por las vías segregadoras y endocíticas mediante los vehículos vesiculares. Los dominios membrana salen de un compartimiento brotando en vesículas de transporte más pequeñas o túbulos. Ambos eventos requieren la formación de curvas pronunciadas en la membrana donante como para formar vehículos de transporte. Las proteínas especializadas se ensamblan en la superficie plasmática del compartimiento donante ("recubrimientos" de membrana) para iniciar dicha curvatura. Las vesículas recubiertas con clatrina tipifican estas estructuras. Las vesículas o túbulos incipientes se dirigen luego al compartimiento aceptor, en donde se introducen para condensarse, por ensamblaje de otros complejos de proteínas.

10 Las proteínas típicamente se mueven dentro de estas vías de transporte de acuerdo a determinantes de clasificación múltiples y jerárquicamente ordenados codificados estructuralmente dentro de la proteína propiamente dicha o dentro de la estructura de un receptor o chaperona asociada. La clasificación de proteínas es altamente eficiente y específica, tipificada, por ejemplo, por E-caderina, Na/K-ATPasa, o algunas de las beta-integrinas, que se expresan estrictamente en la membrana basolateral de células epiteliales polarizadas, o la chaperona Bip, que se dirige específicamente al lumen ER.

15 En contraste con las proteínas, la clasificación de lípidos no es tan absoluta. Los mecanismos que regulan el transporte de lípidos diferencial a través de las vías de tráfico intracelular permanecen indefinidos. Una idea principal en el campo es que la estructura de los lípidos dicta la clasificación hacia varios compartimientos, permitiendo o restringiendo el movimiento de los lípidos por las curvas pronunciadas y altamente dinámicas de las vesículas y túbulos incipientes (Maxfield y McGraw, 2004; Mukherjee y Maxfield, 2000; Mukherjee et al., 1999). Otra idea biológicamente creíble es la hipótesis del conjunto de lípidos (Brown, 2006; Simons y Ehehalt, 2002; Simons y Vaz, 2004), que propone el autoensamblaje de pequeños dominios que contienen lípidos específicos tales como gangliósidos y proteínas con funciones biológicas reguladas, incluidos especialmente el tráfico y la transducción de señales.

20 Los gangliósidos, tales como monosialotetrahexosilgangliósido (GM1), están comprendidos por dos dominios principales: un grupo principal de oligosacárido que contiene ácido siálico enlazado a uno o más ácidos siálicos, que sobresalen de la membrana celular hacia el espacio extracelular, y el extremo del lípido de ceramida hidrófobo que ancla la molécula a la membrana. Las ceramidas están compuestas por una cadena de esfingosina (prácticamente siempre C18:1; la nomenclatura es longitud de la cadena de carbono: número de dobles enlaces) acoplada por un enlace amida a un ácido graso. Las ceramidas nativas en las células humanas exhiben heterogeneidad en la estructura del ácido graso, más típicamente por longitud de la cadena de carbono y el grado de saturación. (El número de dobles enlaces carbono-carbono). Los ácidos grasos insaturados que ocurren más naturalmente ocurren en la configuración *cis*, en donde los átomos de hidrógeno están del mismo lado que el doble enlace. Esto causa que la cadena hidrocarbonada del ácido graso se curve, introduciendo de este modo una "torcedura" en el ácido graso. Al aumentar el número de dobles enlaces *cis* en un ácido graso se aumenta el grado al cual se curva (su capacidad de torsión) y se restringe su libertad conformacional y flexibilidad.

30 GM1, el miembro "prototípico" de gangliósidos, es el receptor de lípido para la toxina del cólera, que tipifica la biología de todas las otras toxinas de subunidad AB5 (*Shigella*, *E. coli*, *Pertussis*) y algunos virus (SV40 y el virus del poliovirus humano) (Lencer y Tsai, 2003). GM1 es el vehículo que porta la toxina desde la membrana plasmática (PM) de la célula hospedante hasta el retículo endoplasmático (ER). Una vez dentro del ER, la proteína chaperona del ER disulfuro isomerasa despliega una porción de la toxina para retro-translocación al citosol, en donde el péptido actúa para inducir toxicidad (Lencer y Tsai, 2003; Tsai et al., 2001). GM1 también porta la toxina por las células epiteliales polarizadas mediante transcitosis, proporcionando así una vía para que la proteína bacteriana rompa las barreras mucosas (Lencer et al., 1995). Las dos vías, una retrógrada de PM a ER, y la otra transcitótica, se desvían en su itinerario intracelular en el endosoma de clasificación temprana (Lencer y Saslowsky, datos no publicados).

35 Como se describe en este documento, los solicitantes han demostrado que la estructura del ácido graso del dominio ceramida de un gangliósido dicta el tráfico intracelular del lípido. Como se describe también en este documento, las isoformas de la ceramida que comprenden ácidos grasos de cadena corta o ácidos grasos, como ácidos grasos de cadena larga, con por lo menos un doble enlace *cis* se localizan hacia el endosoma de reciclaje y trans Golgi, y las isoformas de la ceramida que comprenden una cadena de ácido graso larga saturada son dirigidas hacia las vías lisosomales de células epiteliales humanas cultivadas. Se describen en este documento nuevos complejos de glicoesfingolípido-agente terapéutico. Un complejo comprende un glicoesfingolípido que comprende una ceramida de estructura específica unida a un agente terapéutico para aprovechar el tráfico intracelular y, por lo tanto, aumentar la semivida del agente terapéutico (evitando el transporte lisosomal) y/o administrar dicho agente terapéutico a través de las barreras mucosas (por transcitosis).

Los glicosfingolípidos mínimamente comprenden un monosacárido unido directamente a una ceramida. En algunos casos, el glicosfingolípidos comprende globósidos neutros, como globotriaosil ceramida (Gb₃). En otros casos, los glicosfingolípidos comprenden gangliósidos ácidos, como monosialotetrahexosilgangliósido (GM1). En casos específicos, un complejo de gangliósido-agente terapéutico/resto, también denominado complejo de glico-ceramida-agente terapéutico, comprende una ceramida que comprende (a) un ácido graso de cadena corta (C4 - C12) o (b) un ácido graso de cadena larga (C14 - C28) que comprende un doble enlace *cis* y un agente terapéutico que está unido (acoplado) al oligosacárido (también denominado grupo principal del oligosacárido) del gangliósido (glico-ceramida). El ácido graso de cadena corta de la ceramida puede no contener ningún doble enlace entre los átomos de carbono o puede comprender un doble enlace *cis* (uno, por lo menos uno, uno o más). El doble enlace *cis* puede estar presente entre cualquiera de dos átomos de carbono consecutivos; su presencia causa que la cadena hidrocarbonada del ácido graso se curve, lo que resulta en una "torcedura" en el ácido graso y una conformación que resulta en el tráfico intracelular descrito en este documento. En algunos casos, el doble enlace *cis* está presente entre los átomos de carbono 8 y 9. En otros casos, en el ácido graso de cadena corta, el doble enlace *cis* está presente entre otros dos átomos de carbono consecutivos (p. ej., 1 y 2; 2 y 3; 3 y 4; 4 y 5; 5 y 6; 6 y 7; 7 y 8; 9 y 10; 10 y 11; u 11 y 12. En el ácido graso de cadena larga, el doble enlace *cis* está presente entre otros dos átomos de carbono consecutivos (p. ej., 1 y 2; 2 y 3; 3 y 4; 4 y 5; 5 y 6; 6 y 7; 7 y 8; 9 y 10; 10 y 11; 11 y 12; 12 y 13; 13 y 14; 14 y 15; 15 y 16; 16 y 17; 17 y 18; 18 y 19; 19 y 20; 20 y 21; 21 y 22; 23 y 24; 24 y 25; 25 y 26; 26 y 27 o 27 y 28). En todos los casos, el ácido graso de cadena corta o de cadena larga puede contener más de un doble enlace.

El agente terapéutico puede estar unido al oligosacárido de la ceramida por cualquier medio físico-químico, como interacción hidrófoba, interacción covalente, enlace de hidrógeno o interacciones iónicas. La naturaleza del enlace preferido dependerá, entre otras cosas, del modo de administración y de los vehículos farmacéuticos utilizados para administrar el complejo al sitio diana deseado. Se pueden diseñar "grupos enlazadores" para facilitar la sujeción del agente terapéutico al oligosacárido de la ceramida, o para facilitar, influir, modular o regular la liberación del agente en el sitio diana deseado. Un solo agente terapéutico puede acoplarse a una sola molécula de glicosfingolípidos, o puede unirse (acoplarse) a más de una molécula de glicosfingolípidos. "Agente terapéutico" hace referencia a células eucariotas y procariotas, virus, vectores, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, polisacáridos y carbohidratos, lípidos, glucoproteínas y sus combinaciones, y fármacos orgánicos e inorgánicos sintéticos que ejercen un efecto biológico cuando se administran a un individuo.

Se sintetizan las isoformas de GM1 que contienen el fluoróforo ALEXA 568- acoplado al grupo principal del oligosacárido de GM1 y con los siguientes ácidos grasos en el dominio ceramida: C12:0, C16:0, C16:1 C18/20:0 (Figura 1). Los gangliósidos etiquetados con ALEXA se introducen en las células epiteliales humanas A431 que expresan proteínas eGFP localizadas a compartimientos intracelulares específicos y se sigue el tráfico del gangliósido en las células vivas por microscopia confocal de 5 dimensiones (espacio, tiempo y color 3-D). GM1 con C12:0 de cadena corta y "cadena torcida" y ceramidas C16:1 localizadas al endosoma de reciclaje, membrana plasmática y red trans Golgi (TGN) (Figuras 2-4, 12-14). Los gangliósidos de cadena larga totalmente saturados C18 y C16:0 se localizan en el endosoma tardío/lisosoma (Figura 2-4, 12-14, no se muestra C20). Por lo tanto, la forma de "torcedura" o cadena corta del lípido permite el movimiento por la curva pronunciada y las curvas de los túbulos y vesículas de clasificación como para permitir que el lípido escape de la vía del endosoma tardío degradativo e ingrese en otras vías de tráfico (Maxfield y McGraw, 2004; Mukherjee et al., 1999), incluido el endosoma de reciclaje y TGN; y posiblemente la ruta transcítica mediante el endosoma de reciclaje apical (ARE, Lencer y Tzaban, datos no publicados).

Tabla: Localización de ceramidas

	C12:0	C16:1	C16:0	C18:0
Endosomas de reciclaje (rab11a-GFP)	21,3%	22,4%		5% 6%
TGN (golgin97-GFP)	10,9%	10,2%	2%	2,4%
Endosomas tardíos (rab7-GFP)	4,6%	14,5%		73% 80,1%

"punto de quiebre"

La relevancia de la presente invención es particularmente evidente para el desarrollo del fármaco terapéutico. Se refiere a dos problemas principales en el campo: el transporte macromolecular por las barreras mucosas y la semivida del fármaco. La mayoría de los agentes terapéuticos de proteínas no se pueden absorber en las superficies mucosas (como el intestino), lo que los hace clínicamente ineficaces para la administración oral y los restringe a las formas parenterales de administración del fármaco. Esta tecnología supera estos problemas. La tecnología también ofrece una forma de dirigir las moléculas terapéuticas a las superficies mucosas por administración local (tópica) como para tratar enfermedades mucosas, como enfermedad intestinal inflamatoria, sin toxicidades sistémicas. La cadena de ceramida condensada a IL-10 recombinante o adenosina son ejemplos de agentes terapéuticos para calmar enfermedades inflamatorias con eficacia pronosticada cuando se aplica a las superficies mucosas por administración tópica u oral. Otra aplicación es para condensar la ceramida a un factor o factores de coagulación, como el factor VIII y/o el factor IX como para prolongar su semivida cuando se administra por vía parenteral, como para el tratamiento de hemofilia. La composición y los métodos descritos en este documento también se pueden utilizar como vehículo de administración para nuevas vacunas o vacunas mucosas nuevamente modificadas genéticamente. La tecnología representa una plataforma para la administración del fármaco con muchas otras aplicaciones potenciales, incluido el rediseño de agentes terapéuticos de moléculas pequeñas y proteínas ya en uso clínicamente (p. ej., anticuerpos contra TNF- α o los interferones; clotrimazol, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y otros ligandos para la proteína G acoplada a receptores enlazados a la activación de cAMP, ligandos del receptor de EGF.

Inducción de inmunidad mucosa creando una nueva plataforma para transporte de antígenos de vacuna y adyuvantes en las barreras epiteliales

Las vacunas mucosas se pueden reforzar haciendo uso de la maquinaria intracelular que suministra moléculas por las superficies mucosas del revestimiento intracelular con el fin de estimular las células del sistema inmune adaptativo. La tecnología representa una nueva plataforma comprendida por lípidos específicos basados en ceramidas que actuarán como vehículos moleculares capaces de administrar una amplia gama de antígenos de vacuna y ligandos de receptores de tipo Toll (peaje) (TLR) (como adyuvantes) por las barreras epiteliales para inducir la inmunización mucosa. La tecnología se puede utilizar para administrar antígenos de proteína o péptido para vacunación mucosa y agonistas de TLR como adyuvantes. Ova como un antígeno modelo, o el péptido SIINFEKL MHC Clase I, se pueden usar para fusión a los lípidos de ceramida relevantes. En este sistema, las pruebas de utilidad en la administración mucosa se potencian usando ratones ya sensibilizados a OVA o trasplantados de forma adoptiva con células T que expresan receptores para el péptido SINFEKL.

Las superficies mucosas representan grandes áreas en donde los tejidos hospedantes se separan del entorno meramente mediante una única y delicada pero altamente eficaz capa de células epiteliales columnares. Bajo el epitelio, el tejido conjuntivo es vigilado por células presentadoras de antígenos y armadas con efector y linfocitos de memoria responsables de la protección mucosa local y respuestas de memoria rápida a obstáculos de patógenos.

La inmunidad mucosa protectora se induce mejor por administración mucosa directa de antígenos de vacuna. En los últimos años ha habido muchísimo interés en potenciar la absorción de antígenos de vacuna en la barrera epitelial intestinal mediante células M especializadas que yacen sobre tejidos linfoides mucosos organizados (como los parches de Peyer); es aquí donde se cree que ocurren muchos eventos inductivos iniciales que conducen a las respuestas inmunes mucosas. No obstante, la tecnología se centra en un método diferente y potencialmente más eficiente de inducir inmunidad para las acciones dirigidas a los enterocitos absorbentes, que cubren la gran mayoría de la superficie mucosa. Los enterocitos son también capaces de transportar antígenos. Estas células cumplen funciones complejas tanto en la inmunidad innata como adaptativa, proporcionando una corriente constante de información a las células subepiteliales para optimizar la protección inmune mucosa (Shang 2008). Cabe destacar que las células epiteliales expresan los receptores de tipo Toll (TLR) que reconocen componentes moleculares comunes únicos a microorganismos; responden a microbios lumbales y productos microbianos liberando señales de citocinas y quimiocinas que desencadenan cadenas innatas, no específicas y promueven respuestas inmunes adaptativas e inhibición de la tolerancia (Backhed 2005; Rakoff-Nahoum 2008).

Para prevenir reacciones indeseadas contra microsondas lumbales y otros antígenos potenciales, no obstante, la barrera epitelial se organiza como para restringir el acceso a los TLR y células del sistema inmune adaptativo; estas células se localizan en el lado basolateral opuesto de la barrera epitelial. Por lo tanto, si el transporte de antígenos de vacuna junto con ligandos de TLR (como adyuvantes) por las barreras epiteliales se puede potenciar, las respuestas inmunes mucosas podrían ampliarse en gran medida. Un nuevo planteamiento para lograr esta meta consiste en adaptar la estrategia utilizada por la toxina a medida que invade las células epiteliales intestinales para causar la diarrea masiva en el cólera. La toxina del cólera es probablemente el adyuvante más eficaz para la vacuna mucosa y el más frecuentemente utilizado en los modelos de vacunas mucosas experimentales. GM1 es el vehículo que porta la toxina hacia y por el epitelio de la barrera intestinal. Las ceramidas GM1 que contienen ácidos grasos C12:0 de "cadena corta" o C16:1 insaturados de "cadena torcida" ingresan en el endosoma de reciclaje, un compartimiento en el que las membranas son "clasificadas" en otras vías, incluido el transporte por la célula a la membrana basolateral por transcitosis (absorción). Las ceramidas cortas o de "cadena torcida" evitan completamente el transporte hacia el lisosoma, el compartimiento degradativo. En contraste, las ceramidas GM1 con cadenas de ácido graso totalmente saturadas (C18:0 o C16:0) son solamente transportadas hacia el lisosoma. Por lo tanto, las ceramidas de estructura

- específica se pueden usar para dirigir antígenos de vacuna y adyuvantes basados en TLR hacia la vía transcitótica (absorbente) y evitar así el transporte lisosomal. Se pueden mencionar ceramidas específicas que suministran estas moléculas por las barreras mucosas para potenciar la inmunidad adaptativa. El planteamiento direcciona el gran número de células epiteliales que recubren la mayor parte del intestino y las vías respiratorias – no solo células M, hasta el momento del foco primario para la administración de la vacuna. La tecnología se puede aplicar para prevenir enfermedades como la diarrea, TB, VIH, enfermedad respiratoria y muchas otras que se cobran las vidas de millones de niños.
- Por consiguiente, la presente invención se aplica en la administración dirigida de las siguientes clases de compuestos biológicamente activos:
- 10 Compuestos antineoplásicos. Nitrosoureas, p. ej., carmustina, lomustina, semustina, estrepzotocina; Metilhidrazinas, p. ej., procarbazona, dacarbazina; hormonas esteroideas, p. ej., glucocorticoides, estrógenos, progestinas, andrógenos, tetrahydrodesoxicaricosterona, citocinas y factores de crecimiento; Asparaginasa.
- Compuestos inmunorreactivos. Inmunosupresores, p. ej., pirimetamina, trimetopterin, penicilamina, ciclosporina, azatioprina; inmunoestimulantes, p. ej., levamisol, dietil ditiocarbamato, encefalinas, endorfinas.
- 15 Compuestos antimicrobianos. Antibióticos, p. ej., beta lactama, penicilina, cefalosporinas, carbapenimas y monobactamas, inhibidores de beta-lactamasa, aminoglicósidos, macrólidos, tetraciclinas, espectinomycin; Agentes antimalaria, Amebicidas, Antiprotozoarios, Antifúngicos, p. ej., anfotericina beta, Antivíricos, p. ej., aciclovir, idoxuridina, ribavirina, trifluridina, vidarbina, ganciclovir.
- Parasiticidas. Antihelmínticos, Radiofarmacéuticos, fármacos gastrointestinales.
- 20 Compuestos hematológicos. Inmunoglobulinas; proteínas de coagulación de la sangre; p. ej., factor antihemofílico, complejo del factor IX; anticoagulantes, p. ej., dicumarol, heparina Na; inhibidores de fibrolysis, ácido, tranexámico.
- Fármacos cardiovasculares. Fármacos antiadrenérgicos periféricos, fármacos antihipertensivos que actúan a nivel central, p. ej., metildopa, metildopa HCl; vasodilatadores directos antihipertensivos, p. ej., diazóxido, hidralazina HCl; fármacos que afectan el sistema renina-angiotensina; vasodilatadores periféricos, fentolamina; fármacos antiangina; glicósidos cardíacos; vasodilatadores; p. ej., amrinona, milrinona, enoximona, fenoximona, imazodan, sulmazol; antidisrrítmicos; bloqueantes de la entrada de calcio; fármacos que afectan los lípidos sanguíneos; ranitidina, bosentán, rezulin.
- 25 Fármacos respiratorios. Fármacos simpatomiméticos: albuterol, bitolterol mesilato, dobutamina HCl, dopamina HCl, efedrina SO, epinefrina, fenfluramina HCl, isoproterenol HCl, metoxamina HCl, norepinefrina bitartrato, fenilefrina HCl, ritodrina HCl; fármacos colinomiméticos, p. ej., acetilcolina Cl; anticolinesterasas, p. ej., edrofonio Cl; reactivadores de colinesterasa; fármacos bloqueantes adrenérgicos, p. ej., acebutolol HCl, atenolol, esmolol HCl, labetalol HCl, metoprolol, nadolol, fentolamina mesilato, propranolol HCl; fármacos antimuscarínicos, p. ej., anisotropina metilbromuro, atropina SO4, clinidio Br, glicopirrolato, ipratropio Br, escopolamina HBr.
- 30 Fármacos bloqueantes neuromusculares. Despolarizantes, p. ej., atracurio besilato, hexafluorenio Br, yoduro de metocurina, succinilclina Cl, tubocurarina Cl, vecuronio Br; relajantes musculares que actúan a nivel central, p. ej., baclofeno.
- 35 Neurotransmisores y agentes neurotransmisores. Acetilcolina, adenosina, adenosina trifosfato, neurotransmisores de aminoácidos, p. ej., aminoácidos excitadores, GABA, glicina; neurotransmisores de amina biogénicos, p. ej., dopamina, epinefrina, histamina, norepinefrina, octopamina, serotonina, tiramina; neuropéptidos, óxido nítrico, toxinas de los canales de K+,
- 40 Fármacos antiparkinsonianos. Amaltidina HCl, benzotropina mesilato, p. ej., carbidopa.
- Diuréticos. Diclorfenamida, metazolamida, bendroflumetiazida, poltiazida.
- Uterina, Fármacos antimigraña. Carboprost trometamina, mesilato, metisergida maleato.
- 45 Hormonas. Hormonas hipofisarias, p. ej., gonadotropina coriónica, cosintropina, menotropinas, somatotropina, iorticotropina, protirelina, tirotropina, vasopresina, lipresina; hormonas adrenérgicas, p. ej., beclometasona dipropionato, betametasona, dexametsona, triamcinolona; hormonas pancreáticas, p. ej., glucagón, insulina; hormona paratiroidea, p. ej., dihidroquasterol; hormonas tiroideas, p. ej., calcitonina etidronato disódico, levotiroxina Na, liotironina Na, liotrix, tiroglobulina, teriparatida acetato; fármacos antitiroideos; hormonas estrogénicas; progestinas y antagonistas, anticonceptivos hormonales, hormonas testiculares; hormonas gastrointestinales: colequistoquinina, enteroglicano, galanina, polipéptido inhibidor gástrico, factor de crecimiento epidérmico-urogastrona, polipéptido inhibidor gástrico, péptido liberador de gastrina, gastrinas, pentagastrina, tetragastrina, motilina, péptido YY, secretina, péptido intestinal vasoactiva, sincalida.
- 50

Enzimas. Hialuronidasa, estreptocinasa, activador del plasminógeno tisular, urocinasa, activador de PGE-adenosina.

Anestésicos intravenosos. Droperidol, etomidato, fetanil citrato/droperidol, hexobarbital, cetamina HCl, metohexital Na, tiamilal Na, tiopental Na.

5 Antiepilépticos. Carbamazepina, clonazepam, divalproex Na, etosuximida, mefenitoína, parametadiona, fenitoína, primidona.

10 Péptidos y proteínas. Los glicosfingolípidos se pueden unir a péptidos o polipéptidos, p. ej., anquirinas, arrestinas, proteínas de membrana bacteriana, clatrina, conexinas, distrofina, receptor de endotelina, espectrina, selectina, cictocinas; quimiocinas; factores de crecimiento, insulina, eritropoyetina (EPO), factor de necrosis tumoral (TNF), neuropéptidos, neuropéptido Y, neurotensina, factor de crecimiento transformante alfa., factor de crecimiento transformante beta., interferón (IFN), y hormonas, inhibidores del crecimiento, p. ej., genisteína, esteroides, etc;

15 En algunos casos, la invención encuentra aplicación en la administración dirigida de la hormona de péptido GLP1. GLP1 humano deriva del producto de proteína conocido como proglucagón. El producto traducido del transcrito de ARNm de proglucagón se procesa de manera diferente en células L pancreáticas o intestinales (Panel A) (Kieffer y Habener, 1999). En células intestinales, las enzimas prohormona convertasa específicas del intestino 1 y 3 producen
20 dos formas de GLP1 y ambas son segregadas: GLP1(7-37) y GLP1(7-36)amida (Figura 11). Ambas moléculas son igualmente potentes *in vivo* (Orskov et al., 1993). La mayoría del GLP1 activo circulante, sin embargo, es GLP1(7-36)amida. GLP1(7-36)amida ilustra que el ácido carboxílico de Arg en la posición 36 ha sido amidado mientras que GLP1(7-37) contiene un residuo C-terminal Gly. La amidación es crítica para preservar la semivida del péptido circulante que contiene un penúltimo residuo Arg C-terminal. La bioactividad de los péptidos nativos *in vivo* finaliza
25 con dipeptidil peptidasa IV, que elimina el dipéptido N-terminal His-Ala (Panel B arriba) (Sturm et al., 1998). Puesto que la pro-hormona ya contiene sitios de escisión post-traducción en ambos extremos N y C, estos rasgos se pueden utilizar de una manera nueva para diseñar enlaces reversibles "nativos" al lípido del vehículo que liberará los péptidos nativos, GLP1(7-37) o GLP1(7-36)amida, tras la absorción en o hacia el intestino.

30 GLP1 humano es un producto de escisión de proglucagón producido en células L pancreáticas o intestinales (Kieffer y Habener, 1999). Una vez en la circulación, GLP-1 tiene una semivida de menos de 2 minutos, debido a la rápida degradación por la enzima dipeptidil peptidasa-4. GLP-1 posee varias propiedades fisiológicas que lo convierten en un tratamiento potencial de diabetes mellitus, especialmente de tipo II. Las funciones fisiológicas conocidas de GLP-1 incluyen su capacidad de aumentar la segregación de insulina del páncreas en un modo dependiente de la glucosa; reducir la segregación de glucagón del páncreas; y aumentar la masa de células beta y la expresión de genes de insulina. GLP-1 es un candidato atractivo para este estudio debido al interés en su uso como péptido terapéutico, su
35 corta semivida y la facilidad de bioensayo para actividad de GLP-1 (glucosa en el suero).

Ciertos aspectos de la estructura de GLP-1 y su biogénesis del proglucagón permiten el diseño de sitios de escisión en las moléculas de fusión propuestas para liberación del péptido nativo del lípido GM1 después o durante la absorción.

40 Relevancia: Normalmente, las superficies mucosas son impermeables a grandes moléculas del tamaño de GLP1. Hasta el momento, este problema ha evitado la aplicación de las moléculas terapéuticas para administración de fármacos oral o pulmonar o para vacunas mucosas. La tecnología presenta un planteamiento nuevo y simple para tornar una proteína, péptido o molécula pequeña en sustrato para transporte a través de vías absorbentes transcelulares endógenas que atraviesan las barreras mucosas (intestino, pulmón, mucosa oral, aparato genitourinario). Se pronostica que esto conduce a la administración tópica o sistémica/antigénica, o ambas; y a la potenciación de la semivida del fármaco mediante el tráfico fuera de los compartimientos de lisosomas degradativos.

45 Es grande la necesidad de dichas rutas de administración no parenterales para proteínas terapéuticas y antígenos de vacuna. Especialmente para vacunas mucosas, se pronostica que dicha ruta de absorción por las barreras epiteliales potencia las inmunizaciones contra patógenos orales y respiratorios que invaden mediante las superficies mucosas.

50 Además, la tecnología permite la administración tópica de agentes antiinflamatorios potentes que tienen toxicidad importante cuando se administran sistémicamente. Un buen ejemplo en el que dicha aplicación tendría gran utilidad es la enfermedad inflamatoria de los intestinos.

55 Citocinas y receptores de citocinas. Los ejemplos de citocinas y sus receptores que pueden administrarse acoplado un glicosfingolípido con estructura de ceramida definida incluyen, aunque sin limitarse a ello: Interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, receptor IL-1 receptor, receptor IL-2, receptor IL-3, receptor IL-4, receptor IL-5, receptor IL-6, receptor IL-7, receptor IL-8, receptor IL-9, receptor IL-10, receptor IL-11, receptor IL-12, receptor IL-13, receptor IL-14, receptor IL-15, receptor IL-16, receptor IL-17, receptor IL-18, factor inhibidor de linfocinas, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de crecimiento

derivado de plaquetas, factor de células madre, factor de crecimiento de tumores beta., factor de necrosis tumoral, linfotóxina, Fas, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos, interferón alfa, interferón beta., interferón gama.

5 Factores de crecimiento y hormonas de proteínas. Los ejemplos de factores de crecimiento y sus receptores y de hormonas de proteína y sus receptores que se pueden administrar acoplado a un glicosfingolípido con estructura de ceramida definida incluyen, entre otros: eritropoyetina, angiogenina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento neuronal, factor de crecimiento tumoral .alfa., trombopoyetina, factor estimulante de tiroides, hormona liberadora de tiroides, neurotrofina, factor de crecimiento epidérmico, VEGF, factor neurotrófico ciliar, LDL, somatomedin, factor de crecimiento de insulina, factor de crecimiento de tipo insulina I y II.

10 Quimiocinas. Los ejemplos de quimiocinas y sus receptores que se pueden administrar acoplado a un glicosfingolípido con estructura de ceramida definida incluyen, entre otros: ENA-78, ELC, GRO-alfa, GRO-beta, GRO-gama, HRG, LIF, IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, MIG, MDC, NT-3, NT-4, SCF, LIF, leptina, RANTES, linfotactina, eotaxina-1, eotaxina-2, TARC, TECK, WAP-1, WAP-2, GCP-1, GCP-2, receptores de alfa-quimiocina: CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7 receptores de beta-quimiocina: CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7.

20 Quimioterapéuticos. El glicosfingolípido con estructura de ceramida definida puede también conjugarse a una quimioterapia o a agentes antitumorales eficaces contra distintos tipos de cáncer humano (como leucemia, linfomas, carcinomas, sarcomas, mielomas), como doxorubicina, mitomicina, cisplatino, daunorrubicina, bleomicina, actinomicina D, neocarzinostatina.

25 Anticuerpos. El glicosfingolípido con estructura de ceramida definida de la presente invención se puede conjugar a anticuerpos como, entre otros: (a) anti-conglomerado de diferenciación de antígeno CD-1 a CD-166 y los ligandos o contra receptores para estas moléculas; (b) anticuerpos anti-citocina, p. ej., anti-IL-1 a -IL-18 y los receptores para estas moléculas; (c) anticuerpos de receptores anti-inmunes, anticuerpos contra receptores de células T, complejos de histocompatibilidad mayor I y II, receptores de células B, receptores de inhibidores de selectina, receptores activadores citolíticos, OX-40, MadCAM-1, Gly-CAM1, integrinas, cadherinas, sialoadherinas, Fas, CTLA-4, receptores Fc gama, receptores Fc alfa, receptores Fc epsilon, receptores Fc mu y sus ligandos; (d) anticuerpos anti-metaloproteinas, p. ej., colagenasa, MMP-1 a MMP-8, TIMP-1, TIMP-2; moléculas anti-lisis celular/proinflamatorias, p. ej., perforin, componentes de complemento, prostanoides, óxido de nitrógeno, tromboxanos; y (e) moléculas anti-adhesión, p. ej., antígenos carcioembrionarios, laminas, fibronectinas.

30 Agentes antiviricos. El glicosfingolípido con estructura de ceramida definida se puede conjugar a agentes antiviricos tales como inhibidores de transcriptasa inversa y análogos de nucleósidos, p. ej., ddI, ddC, 3TC, ddA, AZT; inhibidores de proteasa, p. ej., Invirasa, ABT-538; inhibidores de procesamiento de ARN, p. ej., ribavirina.

35 Los ejemplos específicos de agentes terapéuticos conocidos que se pueden administrar acoplado a un glicosfingolípido con estructura de ceramida definida incluyen, aunque sin limitarse a ello:

(a) Capoten, Monopril, Pravachol, Avapro, Plavix, Cefzil, Duricef/Ultracel, Azactam, Videx, Zerit, Maxipime, VePesid, Paraplatin, Platinol, Taxol, UFT, Buspar, Serzone, Stadol NS, Estrace, Glucophage (Bristol-Myers Squibb);

(b) Ceclor, Lorabid, Dynabac, Prozac, Darvon, Permax, Zyprexa, Humalog, Axid, Gemzar, Evista (Eli Lilly);

40 (c) Vasotec/Vaseretic, Mevacor, Zocor, Prinivil/Prinizide, Plendil, Cozaar/Hyzaar, Pepcid, Prilosec, Primaxin, Noroxin, Recombivax HB, Varivax, Timoptic/XE, Trusopt, Proscar, Fosamax, Sinemet, Crixivan, Propecia, Vioxx, Singulair, Maxalt, Ivermectin (Merck & Co.);

(d) Diflucan, Unasyn, Sulperazon, Zithromax, Trovan, Procardia XL, Cardura, Norvasc, Dofetilide, Feldene, Zolof, Zeldox, Glucotrol XL, Zyrtec, Eletriptan, Viagra, Droloxifene, Aricept, Lipitor (Pfizer);

45 (e) Vantin, Rescriptor, Vistide, Genotropin, Micronase/Glyn./Glyb., Fragmin, Total Medrol, Xanax/alprazolam, Sermion, Halcion/triazolam, Freedox, Dostinex, Edronax, Mirapex, Pharmorubicin, Adriamycin, Camptosar, Remisar, Depo-Provera, Caverject, Detrusitol, Estring, Healon, Xalatan, Rogaine (Pharmacia & Upjohn);

(f) Lopid, Accrupil, Dilantin, Cognex, Neurontin, Loestrin, Dilzem, Fempatch, Estrostep, Rezulin, Lipitor, Omnicef, FemHRT, Suramin, Clinafloxacin (Warner Lambert).

50 (g) Proteínas cápside de rotavirus VP6 y VP7: Estas se refieren a las proteínas víricas principales reconocidas en la técnica de la cápside interior y exterior de cualquier especie o cepa dentro del género Rotavirus. Los ejemplos de cepas de rotavirus de donde pueden aislarse proteína VP6 y proteína VP7 y emplearse en la presente invención incluyen, entre otros, SA-11 simio, D rotavirus humano, rotavirus UK bovino, rotavirus Wa o W humano, rotavirus DS-1 humano, rotavirus de rhesus, el agente "O", rotavirus NCDV bovino, rotavirus K8 humano, rotavirus KU humano,

rotavirus DB humano, rotavirus S2 humano, rotavirus KUN humano, rotavirus 390 humano, rotavirus P humano, rotavirus M humano, rotavirus Walk 57/14 humano, rotavirus Mo humano, rotavirus Ito humano, rotavirus Nemoto humano, rotavirus YO humano, rotavirus McM2 humano, rotavirus de mono rhesus MMU18006, rotavirus CU-1 canino, rotavirus Taka felino, rotavirus H-2 equino, rotavirus St. Thomas No. 3 y No. 4 humanos, rotavirus Hosokawa humano, rotavirus Hocht humano, rotavirus SB-2 porcino, rotavirus Gottfried porcino, rotavirus SB-1A porcino, rotavirus OSU porcino, rotavirus H-1 equino, rotavirus Ch.2 de pollo, rotavirus Ty.1 de pavo y rotavirus C486 bovino. Por lo tanto, se contempla el uso de VP6 y VP7 de cualquier cepa de rotavirus, ya sea del subgrupo I, subgrupo II, o cualquier subgrupo aún no definido, así como también de cualquiera de los serotipos 1-7, así como también serotipos aún no definidos.

(h) Clotrimazol

10 (i) Adyuvantes basados en TLR (incluidos flagellina, polisacáridos, ARNss, ARNs)

Otros ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden administrar mediante el complejo de glicoesfingolípido-agente terapéutico de la presente invención se pueden hallar en: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9ª ed. McGraw-Hill 1996.

15 Las composiciones y los métodos descritos en este documento se pueden usar en muchos contextos y un individuo en quien se usan es, por ejemplo, un ser humano o un animal vertebrado, como un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pollo, mono, rata o ratón. Los complejos de gangliósido-agente terapéutico se pueden administrar a un individuo que padece o que es susceptible a padecer una o más afecciones/enfermedades que requerirían o se beneficiarían con el tratamiento. Por ejemplo, las composiciones descritas en este documento se pueden utilizar para tratar, prevenir o mitigar deficiencias del sistema inmune, enfermedades infecciosas (víricas, fúngicas, bacterianas o parasitarias), enfermedades autoinmunes, trastornos de la sangre, cáncer, trastornos metabólicos, alergias, enfermedad intestinal inflamatoria y trastornos de la piel. Además, los gangliósidos unidos a antígeno se pueden administrar para estimular la respuesta de un individuo a una vacuna. El antígeno se selecciona del grupo que consiste en: un antígeno que es característico de un patógeno, un antígeno que es característico de una enfermedad autoinmune, un antígeno que es característico de un alérgeno y un antígeno que es característico de un tumor.

25 Las deficiencias del sistema inmune incluyen cualquier trastorno o enfermedad en donde el sistema inmune de un individuo no funciona normalmente o donde sería útil reforzar la respuesta inmune del individuo, por ejemplo, eliminar un tumor o cáncer (p. ej., tumores del cerebro, pulmón (p. ej., células pequeñas y células no pequeñas), ovario, mama, próstata, colon, además de otros carcinomas y sarcomas) o una infección en un individuo.

30 Los ejemplos de virus infecciosos incluyen: Retroviridae p. ej., virus de inmunodeficiencia humana, como VIH-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III) y otros aislados, como VIH-LP; Picornaviridae (p. ej., polio virus, virus de hepatitis A; enterovirus, virus coxsackie humano, rinovirus, ecovirus); Calciviridae (p. ej., cepas que causan gastroenteritis); Togaviridae (p. ej., virus de encefalitis equina, virus de rubeola); Flaviridae (p. ej., virus del dengue, virus de encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (p. ej., coronavirus); Rhabdoviridae (p. ej., virus de estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (p. ej., virus del ébola); Paramyxoviridae (p. ej., virus paragripales, virus de paperas, virus de sarampión, virus sincicial respiratorio); Orthomyxoviridae (p. ej., virus gripales); Bunyaviridae (p. ej., virus Hantaan, virus bunga, flebovirus y virus Nairo); Arenaviridae (virus de fiebre hemorrágica); Reoviridae (p. ej., reovirus, orbivirus y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de Hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus del polioma); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de varicela zóster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); Poxviridae (virus variola, virus vaccinia poxvirus); e Iridoviridae (p. ej., virus de la fiebre porcina africana); y virus no clasificados (p. ej., los agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, el agente de hepatitis delta (que se cree es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de hepatitis B, no A (clase 1=transmitidos internamente; clase 2=transmitidos parenteralmente (es decir, Hepatitis C); Norwalk y virus relacionados, y astrovirus).

45 Los ejemplos de bacterias infecciosas incluyen: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* spp. (p. ej., *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Grupo A *Streptococcus*), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B *Streptococcus*), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (anaerobic spp.), *Streptococcus pneumoniae*, *pathogenic Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira* y *Actinomyces israelii*.

55 Los ejemplos de hongos infecciosos incluyen: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) incluyen: *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*.

Los ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen: enfermedad de Addison, diabetes mellitus (tipo 1), enfermedad de Graves, cistitis intersticial, lupus eritematoso, esclerosis múltiple y tiroiditis de Hashimoto. Los cuadros alérgicos

incluyen eczema, rinitis alérgica o catarro, fiebre del heno, asma bronquial, urticaria (sarpullido) y alergias a los alimentos, y otras afecciones atópicas.

Una "cantidad eficaz" de un complejo de gangliósido-agente terapéutico es la cantidad necesaria o suficiente para lograr un efecto deseado en un individuo. La cantidad eficaz variará con la afección particular que se esté tratando, la edad y el estado físico del individuo que se esté tratando, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hubiese), la ruta específica de administración y otros factores dentro del conocimiento y la experiencia del profesional de la salud. Por ejemplo, una cantidad eficaz podría ser aquella necesaria para prevenir un tumor o cáncer, o una infección bacteriana, vírica o fúngica, o para reducir (parcial o totalmente) el grado al cual ocurre. Esta cantidad variará de un individuo a otro y se puede determinar de manera empírica usando métodos conocidos en la técnica.

Los vehículos para administración y los complejos de gangliósidos-agente terapéutico se pueden administrar por cualquier ruta. Las rutas de administración incluyen rutas enterales, como oral y otros medios en los que están implicados el tubo digestivo, y rutas parenterales, como por inyección (inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular) o infusión (típicamente por ruta intravenosa). La inyección puede ser en un bolo o por infusión continua.

Cuando se administran, el vehículo de administración o el complejo de gangliósido-agente(s) terapéutico típicamente se administran como preparaciones farmacéuticas aplicadas en cantidades farmacéuticamente aceptables en una composición farmacéuticamente aceptable. Dichas preparaciones pueden contener sal, agentes tampón, conservantes, vehículos compatibles, y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales no farmacéuticamente aceptables pueden utilizarse de manera conveniente para preparar sus sales farmacéuticamente aceptables y no se excluyen del alcance de la invención. Dichas sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitarse a ello, aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Además, las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar como sales de metal alcalino o alcalino térreo, como sales de sodio, potasio o calcio.

Los complejos de gangliósido-agente terapéutico/resto se pueden combinar, opcionalmente, con un vehículo farmacéuticamente aceptable (compatible). La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", tal como se emplea en este documento, significa una o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidas o líquidas compatibles adecuadas para administrar a un ser humano. El término "vehículo" indica un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el cual se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de entremezclarse con las composiciones de la presente invención, y entre sí, en un modo en el que no haya interacción que obstaculice sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes tampón adecuados, como se describió anteriormente, como: acetato, fosfato, citrato, glicina, borato, carbonato, bicarbonato, hidróxido (y otras bases) y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos antes mencionados. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados, como: cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenos y timerosal.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitaria y se pueden preparar con cualquier método conocido en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con un vehículo, que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan de manera uniforme y asociando íntimamente el compuesto activo con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

La presente invención se ilustra además con los siguientes Ejemplos que no deben interpretarse en modo alguno como limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1 Las isoformas de GM1 fluorescentemente marcadas se aplicaron a membranas apicales de células epiteliales polarizadas en una concentración de 1,6 μM en disolución salina tamponada de Hank (HBSS) con 0,034% albúmina de suero bovino (BSA) desnatada a 10 C durante 1 hora. Después de eliminar GM1 no incorporado de la membrana apical con HBSS fría, las células se incubaron a 37°C durante 90 minutos y luego se tomaron imágenes por microscopía confocal con un disco giratorio. Los datos muestran que solamente la isoforma C12 carga las membranas basolaterales. La isoforma C18 no etiqueta las membranas basolaterales y pasa a los endosomas tardíos solamente como se muestra con puntos concentrados en células no polarizadas. (Figuras 6-10).

Ejemplo 2 Construcción del complejo de gangliósido-péptido. Se acopla químicamente un péptido "indicador" pequeño GKSKG-YPYDVPDYA(HA-etiqueta)-GKSGC al grupo principal de oligosacárido del gangliósido GM1 que contiene ceramidas con ácidos grasos C12:0, C16:1 o C18:0.

La química para esto es con el uso de un reticulador de maleimida-hidrazida para acoplar el péptido en su término C a un aldehído generado en la cadena de glicerol en el ácido siálico del oligosacárido GM1 por oxidación de peryodato. Las isoformas de ceramida se sintetizan comenzando con lyso-GM1 y enlazando los ácidos grasos de estructura definida a la amina libre por activación del grupo carboxilo del ácido graso con diciclohexilcarbodiimida (DCC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) seguido de adición o bien de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) o N-hidroxisuccinimida (NHS) en dimetilsulfóxido (DMSO). La purificación ocurre por cromatografía de fase inversa y de intercambio iónico FPLC seguida de confirmación estructural con espectroscopia de masas. Los lípidos sintetizados de esta manera se ilustran en la Figura 1.

Ejemplo 3 Evaluación *in vitro*

10 Los nuevos lipo-péptidos preparados anteriormente se ensayan para transporte transcelular por las barreras de células epiteliales polarizadas *in vitro*; y para tráfico diferencial en la vía endosomal/lisosoma de reciclaje o tardía en células no polarizadas. Solamente las ceramidas C12:0 de cadena corta y C16:1 insaturadas transportan el péptido hacia la vía transcitótica y fuera del lisosoma.

15 Los lipo-péptidos se introducen en la membrana apical o basolateral de células intestinales polarizadas en cultivo monocapa a 10°C. Después de la subsiguiente incubación a 37°C, se ensaya la transcitosis bioquímicamente por biotinylación de la superficie celular selectiva (la molécula indicadora transporta aminas libres que proporcionan el grupo reactivo para acoplar a biotina) y morfológicamente por microscopia confocal después de la fijación e inmunotinción para la marca HA también contenida en el péptido indicador.

20 El control para transporte paracelular no específico es para restringir el tráfico vesicular en las monocapas a 4°C, y el control positivo para transcitosis será mediante el uso de la subunidad B de la toxina del cólera (Lencer et al., 1995). Un control positivo adicional para mostrar la biotinylación exitosa del lipo-péptido se realiza mediante biotinylación de la superficie celular selectiva de las monocapas epiteliales en la misma superficie celular que la administración de lipo-péptido y con el tráfico vesicular restringido a 4°C.

25 Los métodos para biotinylación de la superficie celular selectiva, microscopia confocal en vivo y fija, y transporte de soluto transepitelial están bien consolidados (Dickinson et al., 1999; Dickinson et al., 2008; Lencer et al., 1995; Spiekermann et al., 2002).

Ejemplo 4 Evaluación de ratones *in vivo*

30 Los nuevos lipo-péptidos se ensayan para absorción en o a través de las superficies mucosas para semivida circulante potenciada en ratones *in vivo*. Solamente las ceramidas C12:0 de cadena corta y C16:1 insaturadas transportan el péptido hacia el espacio subepitelial de los tejidos mucosos expuestos o hacia la circulación sistémica y aumentan la semivida.

35 Los lipo-péptidos se introducen en bucles intestinales aislados de ratones y se ensayan para absorción y transporte transcelular usando microscopia confocal en cortes de tejido como se describió anteriormente. Se establecen relaciones de respuesta a la dosis, y a los resultados positivos les sigue la administración intra-gástrica de los lipo-péptidos a ratones no quirúrgicamente manipulados. La absorción en la mucosa intestinal se evalúa por microscopia, y la absorción sistémica se evalúa por ELISA desarrollado contra el péptido acoplado a GM1. La conjuntiva, el esófago, colon, árbol bronquial y mucosa oral también se ensayan por administración tópica y se ensayan para absorción en el tejido por microscopia confocal.

40 Para ensayar los efectos sobre la semivida, los nuevos lipo-péptidos o el péptido no derivado se inyectan en los ratones por administración IV y concentraciones circulantes por ELISA con el transcurso del tiempo.

Los lipo-péptidos se ensayan en cortes de tejido después de inmunoetiquetar usando anticuerpos contra la marca HA o por microscopia de epifluorescencia confocal directa después de etiquetar con fluoróforos antes de la administración.

45 El ensayo ELISA para ensayar la absorción sistémica y la semivida es un ensayo "sándwich". La captura del lipo-péptido se efectúa inmovilizando anticuerpos contra la marca del epítipo HA en placas de 96 pocillos. El lipo-péptido capturado por afinidad se detecta por aplicación en la subunidad B de toxina de cólera conjugada a HRP que reconoce específicamente el grupo principal del oligosacárido del GM1 derivado (la unión de la toxina permanece intacta al oligosacárido modificado, resultados no publicados de Lencer y Chinnapen).

50 **Ejemplo 5** La preparación de moléculas de fusión y evaluación *in vivo* descrita en este ejemplo es la preparación de moléculas de fusión, como se ejemplifica con la preparación de moléculas de fusión que comprenden la hormona de péptido tipo insulina GLP1 y las isoformas de GM1 que contienen dominios de ceramida con ácidos grasos o bien de C18:0 o C12:0.

Se preparan moléculas de fusión entre la hormona del péptido GLP1 y GM1 con dominios de ceramida que contienen ácidos grasos o bien de C18:0 o C12:0.

1) Diseño del péptido

Se sintetizan dos formas básicas del péptido GLP1 activo con secuencias enlazadoras (los detalles se describen a continuación) y se unen a GM1 con dominios ceramida C12:0 de cadena corta (o C16:1 insaturado) o dominios ceramida C18:0 de cadena larga (como control). El péptido GLP-1 se sintetiza con enlazadores de péptidos cortos posicionados en el término N o C y con o sin un motivo para escisión de furina. La furina es una proteasa intracelular localizada en el endosoma de reciclaje y la red *trans-Golgi*. La escisión por furina libera el péptido de la ceramida después de la internalización por las células epiteliales mucosas; esto puede ser importante para permitir la administración sistémica.

Otra forma de permitir la fusión reversible del péptido al vehículo GM1 consiste en utilizar sitios de escisión del péptido nativo construidos en la secuencia de proglucagón (ver Recuadro 1 arriba). El motivo del acoplamiento de GLP1 a GM1 o bien en el término N o C (GM1-GLP1 o GLP1-GM1) es que esto nos permite mejorar las probabilidades de 1) producción de una molécula de fusión funcional, 2) suficiente separación espacial entre los dos elementos para facilitar las actividades biológicas de cada uno, 3) suficiente asociación/inserción de membrana del elemento GM1, y 4) suficientes oportunidades, en última instancia, pero oportunamente, de separación de GM1 de GLP1. Existen también ventajas potenciales de tener una molécula de fusión péptido-lípido no escindible. Por ejemplo, esto podría permitir la absorción eficiente por las barreras mucosas, pero restringir que la molécula terapéutica se vuelva sistémica en virtud de la cadena de ceramida que retiene la molécula en la membrana celular; permitiendo así un agente terapéutico localizado "tópico". Dicha molécula podría ser útil para administración tópica de moléculas antiinflamatorias potentes a las superficies mucosas sin toxicidad sistémica – como se necesita actualmente en el tratamiento de enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) y asma.

Péptidos sintetizados

Las formas activas de GLP1(7-36)amida y GLP1(7-37) se ilustran en negrita. Los péptidos enlazadores (escindibles y no escindibles) se describen en NEGRO, y los sitios de escisión en cursiva.

Para péptidos en los que el penúltimo residuo es (o será después del procesamiento proteolítico) Arg, este residuo se sintetiza como Arg_(amida) para proteger de degradación y extender la semivida del péptido.

1) *Conjunto acoplado (CS): péptido y GM1 irreversiblemente condensados entre sí:*

CAAWAAWAA-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR_(amida)-NH₂ (Seq ID No: 1); CS-AW-36

(acoplamiento no escindible en el término N)

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-AAWAAWAAAC (Seq ID No: 2); CS-36-AW

(no escindible, acoplamiento en el término C)

2) *Conjunto no acoplado (US): péptido enlazado a GM1 por secuencia de enlazador escindible de furina*

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR_(amida)-RTRAAAC (SEQ ID NO: 3); US-36-FP

(enlazador escindible de furina, acoplamiento en el término C)

CAAARTPR-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR_(amida)-NH₂ (SEQ ID NO: 4); US-FP-36

(enlazador escindible de furina, acoplamiento en el término N)

3) *Conjunto no acoplado nativo (NUS): péptido enlazado a GM1 que permite la escisión en sitios nativos en la secuencia de proglucagón (ver Recuadro 1 arriba):*

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR_(amida)G-AAWAAWAAAC (SEQ ID NO: 5); NUS-37-AW (sitio C-terminal nativo para escisión de pro-GLP1, acoplamiento en el término C)

CKRDEFER-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR_(amida)-NH₂ (SEQ ID NO: 6); NUS-PP(N)-36

(sitio de escisión N-terminal nativo de pro-GLP1, acoplamiento en el término N)

4) *Péptido enlazador alternativo para grupos 1 y 3 anteriores:* La secuencia del péptido enlazador CGGPGGPGG (GP) tiene una movilidad de rotación diferente y permite un segundo planteamiento para optimizar la función del GLP1 o los dominios ceramida, o ambos.

Cada fusión de péptido-lípido se confirma en forma independiente para estructura y pureza por espectrometría de masas y para función en un ensayo *in vitro* para respuesta de cAMP inducida por GLP1 usando células CHO que expresan el receptor hGLP-1 (células R7) (Xiao et al., 2001). La utilidad de las fusiones de GM1 al término C y N de

GLP1 se evalúa comenzando con dos péptidos (pares de enlazadores CS N y C terminales). En función de las actividades de estas moléculas de fusión en el ensayo cAMP de células R7, se preparan los péptidos US y NUS como fusiones C o N terminales, o ambos.

2) Fusión a isoformas de ceramida GM1

5 La química de acoplamiento utiliza un procedimiento simple de tres etapas que ya ha sido verificado en nuestros estudios en las isoformas Alexa-GM1 descritas anteriormente y que se muestran en las Figuras.

1) Se generan restos aldehído en el residuo de ácido siálico en el grupo principal de GM1 con peryodato sódico, que oxida selectivamente la posición C7 de la cadena lateral de glicerol cuando se realiza en hielo durante una hora. La reacción procede hasta completarse y se inactiva el peryodato con exceso de glicerol libre (Murray et al., 1989).

10 2) Los aldehídos recién generados son palancas reactivas para el ataque nucleófilo por un reactivo bifuncional de hidrazida-maleimida, a saber Hidrocloruro de 4-(4-N-Maleimidofenil) Ácido Butírico Hidrazida (MPBH, Pierce). La reacción de aldehído-hidrazida es muy eficiente y crea un enlace hidrazona que se reduce específicamente con cianoborohidruro de sodio para formar un enlace covalente estable (Hermanson, 1996). El GM1 acoplado a MPBH modificado luego se purifica por TLC preparativa.

15 3) El sulfhidrilo libre de los residuos Cys terminales en cada uno de los péptidos CS-, US- y NUS-GLP1 consiste luego en sitios para acoplamiento covalente al grupo reactivo maleimida en MPBH- GM1 (Hermanson, 1996). Los conjugados GLP1-GM1 finales se purificarán por HPLC y la estructura se verificará por espectrometría de masas.

Prueba de la utilidad de las moléculas de fusión de GLP1-ceramida para absorción mucosa y extensión de semivida *in vivo* usando el ratón *ob/ob*.

20 La primera etapa en el análisis de los lipo-péptidos descritos anteriormente *in vivo* consiste en verificar la retención de la actividad biológica de GLP1. Esto se logra fácilmente monitoreando los niveles de glucemia (curvas de tolerancia a la glucosa) en ratones (*ob/ob*) diabéticos después de una inyección intraperitoneal (IP). GLP1 biológicamente activo induce una liberación de insulina, inhibición de glucagón y subsiguiente reducción del azúcar en la sangre; básicamente proporcionando una regulación de la glucosa administrada oralmente o IP (Doyle y Egan, 2001). Los detalles experimentales se describen a continuación. En síntesis, se realiza una incisión en el rabo de un ratón para obtener 5 µl de sangre completa, que luego se dispone directamente en tiras reactivas comerciales y se lee inmediatamente usando un glucosímetro. La instrumentación y el ensayo de glucosa en el suero son ahora de muy baja tecnología, extremadamente fáciles de usar y altamente robustos. Los puntos de tiempo que han sido exitosos para el monitoreo de la glucosa de actividad biológica de GLP1 después de la inyección IP son: 2 valores pre-dosis, 25 15, 30, 45 min, 1, 2, 3 y 4 horas post-dosis. Dado que la semivida de GLP1 es muy corta y difícil de medir en la sangre, este bioensayo es el medio más sensible para medir la presencia de GLP1 biológicamente activo.

35 La siguiente etapa consiste en ensayar el efecto de la modificación de lípido sobre la semivida y la absorción mediante el intestino y las vías respiratorias; usando el mismo ensayo. El planteamiento es exactamente el mismo que se utiliza para ensayar la absorción mucosa mediada por los receptores y la extensión de la semivida de la eritropoyetina condensada a Fc humano (por el receptor de Fc, FcRn) (Spiekermann et al., 2002).

40 Para ensayar la absorción en el intestino, se hace ayunar durante la noche a ratones (*ob/ob*) diabéticos y después de anestesiarse con luz CO₂ se alimentan por gavage intragástrico moléculas de la fusión GLP1-GM1 (fusión GM1-C12:0 y GM1-C18:0 como control), sin péptido, o GLP-1 nativo no condensado a GM1 en disolución de glucosa y sal tamponada fuertemente con HCO₃. El monitoreo de la glucosa se obtiene de la incisión del rabo (5 µl de sangre completa) como se describió anteriormente: 2 valores pre-dosis, 15, 30, 45 min, 1, 2, 3 y 4 horas post-dosis.

45 Para pruebas de absorción en las vías respiratorias, se hace ayunar durante la noche a ratones (*ob/ob*) diabéticos y después mediante anestesia de luz CO₂ se les administran varias gotas de péptidos de fusión en disolución salina tamponada con fosfato en la nariz. Esto suministra el péptido a regiones de las vías respiratorias superiores e inferiores (Spiekermann et al., 2002). El monitoreo de glucosa se obtiene de una incisión en el rabo (5 µl de sangre completa) como se describió anteriormente: 2 valores pre-dosis, 15, 30, 45 min, 1, 2, 3 y 4 horas post-dosis.

El diseño experimental y la lógica se señalan en más detalle a continuación.

50 *Interpretación:* Una gota en la glucosa en suero ocurre durante las pruebas de tolerancia a la glucosa con la administración concomitante de péptidos GLP1 condensados a isoformas de GM1 que contienen cadenas de ceramida C12:0 o C16:1, pero no ocurre dicha gota en la glucosa en suero con péptidos GLP1 condensados a isoformas de GM1 C18:0 largas, saturadas. Esto es consistente con la absorción por transcitosis de las ceramidas de cadena corta/cadena insaturada; y consistente con la semivida prolongada. Dicha evidencia ofrece una prueba del principio de la tecnología propuesta y sienta las bases de otros análisis de las vías implicadas y el desarrollo de aplicaciones terapéuticas.

Otras aplicaciones potenciales incluyen: cadena de ceramida condensada a IL-10 recombinante como un ejemplo de un agente terapéutico tópico (de acción local) para calmar las enfermedades mucosas inflamatorias; y fusiones de la ceramida a factores de coagulación VIII o IX como para prolongar la semivida cuando se administra parenteralmente como tratamiento de la hemofilia.

5 La tecnología representa una plataforma de administración del fármaco con muchas otras aplicaciones potenciales incluido el rediseño de agentes terapéuticos de moléculas pequeñas y proteínas ya en uso clínicamente.

10 Planteamiento alternativo: La introducción de constructos CS y US en bucles expuestos de yeyuno o íleon se puede realizar bajo anestesia general en ratones obesos (como se realizó anteriormente, (Rufo et al., 1997)) con extracciones de sangre para glucosa en sangre tomadas después de la administración del péptido en un marco de tiempo de 45 min a 1 h como se propuso anteriormente; y antes de la eutanasia y recolección de muestras de tejido intestinal y hepático. El bioensayo para absorción de GLP1 se realiza midiendo los niveles de glucemia, como se describió anteriormente.

Métodos detallados para estudios *in vivo*

15 Estudio 1: Prueba de utilidad de fusiones N frente a C terminales de moléculas de fusión CS-GLP1-GM1, US-GLP1-GM1 y NUS-GLP1-GM1 (inyecciones IP);

Criterios: La funcionalidad de las moléculas de fusión se ensaya *in vivo*.

20 Diseño del estudio: Cada molécula de fusión se estudia a 5 μ M en experimentos separados por inyección IP en los grupos de tratamiento mencionados a continuación. Ya que las pruebas de tolerancia a la glucosa (GTT) en ratones *ob/ob* después de la inyección IP son tan robustas (>5 veces reducción en BS y altamente reproducibles), se usan 5 ratones de cada grupo. Se ensayan las fusiones a isoformas GM1-C12:0 y GM1-C18:0). Debido al tamaño de este estudio, el experimento se lleva a cabo en segmentos, pero siempre incluyendo los grupos 1 y 2 (controles negativos y positivos) como "calibraciones de 2 puntos".

1) Sin péptido (control negativo) – los ratones *ob/ob* muestran GTT altamente normal

2) Péptido nativo (control positivo – sin fusión con lípido) – los ratones *ob/ob* muestran GTT normalizado

25 3a) Fusión del péptido N-terminal de cadena larga

3b) Fusión del péptido N-terminal de cadena corta

4a) Fusión del péptido C-terminal de cadena larga

4b) Fusión del péptido C-terminal de cadena corta

Método:

30 • Se deja ayunar a los animales durante la noche

• Se obtienen 2 BS pre dosis

• Se dispone a los ratones boca abajo – Inyección intraperitoneal de glucosa (2 g/kg) en disolución salina mezclada con péptido GM1 (5 μ M)

35 • Se mide la glucemia (BS) en aproximadamente 5 μ l de sangre completa obtenida de una incisión en el rabo a 15, 30, 45 min y 1, 2, 3, 4 horas.

• Toda la recuperación y el reciclaje de animales para otros estudios, o si esto no puede validarse para GTT fiable en experimentos subsiguientes, sacrificaremos a los animales por asfixia con CO₂ y usaremos animales nuevos para cada experimento.

40 Los resultados demostrarán si las fusiones de péptidos N- o C-terminales (o ambos) son funcionales *in vivo* y sugieren una jerarquía de potencias.

Estudio 2: Se investiga la dependencia de la dosis de moléculas de fusión de péptido-GM1 – inyecciones IP, altas dosis de péptidos

Criterios: Estos estudios determinan la ED50 para moléculas de fusión ensayadas para utilidad en absorción mucosa.

45 Diseño del estudio: Cada molécula de fusión se estudia en experimentos separados por inyección IP en los grupos de tratamiento que se mencionan a continuación. Se usarán 5 ratones en cada grupo.

1) Ningún péptido (control negativo – define GTT anormal inicial)

2) Molécula de fusión de péptido-GM1 seleccionado (dosis más alta estimada de 5 μ M); para GM1(C12:0) y GM1(C18:0).

5 3a-e) Molécula de fusión de péptido-GM1 seleccionado (diluciones en serie de 0,5 log); pares GM1(C12:0) y GM1(C18:0)

Método: el mismo que para el Estudio 1.

Los resultados determinarán la ED50 para moléculas de fusión GM1(C12:0) y GM1(C18:0) seleccionadas cuando se administran en forma parenteral. La E50 se usa para determinar la dosis para estudios de absorción mucosa (típicamente 30 a 50 veces más alta que la ED50 para administración IP).

10 Estudio 3: Prueba de gavage gástrico oral (o administración nasal) de moléculas de fusión seleccionadas.

Criterios: Estos estudios determinan la utilidad de condensar una proteína terapéutica a las isoformas de cadena corta o larga de GM1 como vehículo, permitiendo la absorción mucosa.

15 Diseño del estudio: Se estudian moléculas de fusión seleccionadas en base a potencia como se definió en los Estudios 1 y 2 anteriores. Cada molécula de fusión (pares C12:0 y C18:0) y ruta de administración se estudian en experimentos separados usando los grupos de tratamiento que se mencionan a continuación. Se emplean 5 ratones para el grupo control negativo sin péptido y 10 ratones para los grupos de administración mucosa debido a la mayor variabilidad pronosticada en la respuesta después de las administraciones mucosas. Los cálculos de potencia se basan en el tamaño del efecto >5 veces pronosticado para tratamiento frente a no tratamiento.

1) Sin péptido (control negativo) – los ratones *ob/ob* muestran GTT altamente anormal

20 2) Fusión de péptido-GM1 seleccionado administrada IP (control positivo)

3a) Fusión de péptido N/C-terminal de cadena corta administrada por gavage gástrico o intra-nasal (50 veces x ED50 dosis IP)

3b) Fusión de péptido N/C-terminal de cadena larga administrada por gavage gástrico o intra-nasal (la misma dosis que para la isoforma de cadena corta, grupo 3a anterior)

25 Método:

- Se deja ayunar a los animales durante la noche
- Se obtienen 2 BS pre dosis
- Anestesia de isoflurano (2-4% administrada con máquina de isoflurano en el establecimiento de animales ARCH). La anestesia de isoflurano no tiene efecto sobre GTT

30 ◦ Se dispone al ratón boca abajo – se inyecta glucosa (2 gm/kg) en disolución salina

◦ Se dispone al ratón en posición vertical – fusiones de péptido-GM1 por gavage (o gotas nasales)

◦ Se mide la glucemia (BS) en aproximadamente 5 μ l de sangre completa obtenida de una incisión en el rabo a 15, 30, 45, 60 min.

- Se los deja despertar

35 • Se siguen tomando mediciones de la glucemia (BS) en aproximadamente 5 μ l de sangre completa obtenida de la incisión del rabo a 2 h 3 h, 4 h

- Se deja recuperar y reciclar al animal para otros estudios o se sacrifica por asfixia con CO₂ (como anteriormente – ver Estudio 1).

40 Los resultados mostrarán si esas isoformas de GM1 con dominios de ceramida de cadena corta permiten la absorción mucosa actuando como vehículos para el transporte por las células epiteliales mediante transcitosis.

Estudio 4: Inyección directa del péptido seleccionado en el lumen ileal (50x de ED50).

Criterios: Si los estudios de gavaje gástrico son negativos para absorción, este resultado sugeriría que las moléculas de fusión de péptido-GM1 podrían ser degradadas por enzimas digestivas. Estos estudios ensayarán la idea por derivación de los sitios principales de digestión intestinal mediante aplicación directa a la mucosa ileal.

5 Diseño del estudio: Se estudian moléculas de fusión seleccionadas como se describió en el Estudio 3. Cada molécula de fusión (pares C12:0 y C18:0) se estudia en experimentos separados usando los grupos de tratamiento que se mencionan a continuación. Se usan 5 ratones para el control negativo sin péptido y 10 ratones para las administraciones intra-ileales.

1) Sin péptido (control negativo) – los ratones *ob/ob* muestran GTT altamente anormal

2) Fusión de péptido-GM1 seleccionada administrada IP (control positivo)

10 3a) Fusión de péptido N/C-terminal de cadena corta intra-ileal (50 veces x ED50 dosis IP)

3b) Fusión de péptido N/C-terminal de cadena larga intra-ileal (la misma dosis que para la isoforma de cadena corta, grupo 3a anterior)

Método:

- Se deja a los animales ayunar durante la noche
- 15 • Se obtienen 2 BS pre dosis
- Anestesia de isoflurano (2-4% administrada con máquina de isoflurano en el establecimiento de animales ARCH).
- se lava, rasura y abre el abdomen con el animal dispuesto en una mesa con calor
- se aísla el íleon
- 20 ◦ 2ª BS pre dosis– dos mediciones
- se inyecta la fusión de péptido-GM1 en el lumen del íleon
- se administra inmediatamente la dosis IP de glucosa en disolución salina a la cavidad peritoneal
- se cierra el peritoneo
- se mide la glucemia (BS) en aproximadamente 5 µl de sangre completa obtenida de una incisión en el rabo a 15, 30,
- 25 45, 60, 90 y 120 min.
- se sacrifica al animal por asfixia con CO₂

Los resultados muestran si las isoformas de GM1 con dominios ceramida de cadena corta permitirán la absorción mucosa actuando como vehículos para el transporte por la célula epitelial mediante transcitosis.

Ejemplo 6 Administración de adyuvante de TLR por la barrera epitelial *in vitro*

30 El agonista de TLR5 FliC (*salmonella flagellin*) se acopla a ceramidas de cadena corta o de cadena larga, y las moléculas de fusión se aplican a membranas apicales de células epiteliales intestinales en cultivo monocapa. (FliC es aún funcional después de las fusiones o bien al término N o C.) La administración por la monocapa se detecta por activación de TLR5 en la membrana basolateral. Las fusiones a ceramidas de cadena corta o larga proporcionan control de cada una dirigiendo la molécula hacia el lisosoma o las vías transcitóticas respectivamente. FliC solo

35 proporciona control adicional. TLR5 se ensaya midiendo la segregación de la citocina IL8, la quimiocina CCL20 y los factores activadores de células B BAFF y APRIL. Estos estudios muestran si la ceramida puede dirigir las moléculas de fusión por las barreras epiteliales.

40 Luego se modela la administración de antígeno a células presentadoras de antígenos profesionales localizadas en el espacio sub-epitelial. Aquí, se usa el péptido OVA inmunogénico (residuos de ovalbúmina 323-339; ISQAVHAAHAEINEAGR; SEQ ID NO: 7) acoplados a los lípidos de ceramida, con y sin la fusión adicional a FliC (antígeno más adyuvante en una molécula). El transporte del péptido OVA por la barrera se determina aplicando el medio celular basolateral "acondicionado" a células dendríticas aisladas y linfocitos OT-II. El clon de células T OT-II reacciona específicamente con el péptido OVA cuando se presenta en células dendríticas por proliferación, y esto se detecta mediante incorporación de timida radiactiva. El péptido OVA solo proporciona control adicional.

Se ensaya la capacidad de las ceramidas de cadena corta o larga (control) condensadas al péptido FliC-OVA de transportar el complejo por las barreras mucosas en el intestino o las vías respiratorias de ratón para inducir respuestas de células T específicas de antígenos. Ambas superficies mucosas restringen fuertemente la absorción de dichas moléculas-un motivo clave por el que las vacunas mucosas han sido un desafío. Aquí, se transfieren de manera adoptiva¹⁰⁷ OT-II células T a ratones C57B1/6 y se aplican las moléculas de fusión de FliC-OVA-ceramida (o FliC-OVA solas o como control adicional) en forma intragástrica o intranasal en 1 a 3 dosis. Cinco días después de la última dosis, las células T CD4+ del bazo o los ganglios linfáticos mesentéricos se cosechan, se mezclan con esplenocitos irradiados pulsados con péptido OVA y se ensayan para proliferación de células T CD4+ por ensayo de incorporación de timidina radiactiva. La diferenciación de las células T CD4+ en fenotipos Th1, TH2, TH17 se ensaya midiendo INF γ , IL4 e IL17 respectivamente (ELISA). Midiendo las concentraciones lumbinales totales de SIgA se ofrece un parámetro indirecto de inducción de BAFF o APRIL a través de la activación de TLR5 basolateral.

Las moléculas de fusión de ceramida se reconstituyen en liposomas, que podrían actuar como partículas para dirigir la administración a las células M en el epitelio sobre los parches de Peyer. Como se analizó anteriormente, dirigir los antígenos de vacuna a las células M ha sido el foco principal del campo hasta el momento. Si bien esta tecnología es diferente, se pronostica que también potencia el transporte por la vía de células M. Las respuestas inmunes evocadas por esta formulación se comparan con las respuestas a los complejos de ceramida solubles; y a las respuestas inmunes obtenidas después de acoplar FliC-OVA a liposomas (u otras partículas inertes) en ausencia del vehículo de ceramida.

La tecnología representa una nueva plataforma para la vacuna mucosa contra el rotavirus (causa principal de diarrea), ya que los antígenos protectores VP6 o VP7 ya están identificados. La tecnología puede además utilizarse para vacunas protectoras contra otros patógenos mucosos (TB, VIH, salmonella, shigella, Vibrio, parásitos intestinales).

Ejemplo 7. Para estudiar la biología de los gangliósidos, se sintetizaron las isoformas de GM1 que contenían el fluoróforo ALEXA 568 acoplado al grupo principal del oligosacárido de GM1 (localizado fuera de la membrana) y con los siguientes ácidos grasos en el dominio ceramida: C12:0, C16:0, C16:1; C18/20:0 (Figura 1). Esto permitió estudios de la función de la estructura en el dominio ceramida.

Los gangliósidos etiquetados con ALEXA se introdujeron en células epiteliales humanas A431 que expresan proteínas eGFP localizadas a compartimientos intracelulares (Rab11a, endosoma de reciclaje; Rab7, endosoma tardío; Golgin97, TGN) y el tráfico del gangliósido fue seguido en células vivas por microscopía confocal en 4 o 5 dimensiones (tiempo, color y espacio 3-D) (ver detalles a continuación).

GM1 con ceramidas C12:0 de cadena corta y C16:1 de "cadena torcida" se localizaron al endosoma de reciclaje, membrana plasmática y red *trans*-Golgi (TGN) (ver Figuras). Los gangliósidos C18/20:0 y C16:0 de cadena larga totalmente saturada se localizaron al endosoma/lisosoma tardío (ver Figuras). Nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que la forma de cadena corta o "torcida" del lípido permite el movimiento por las curvas pronunciadas de los túbulos y vesículas de clasificación como para permitir que el lípido escape del endosoma/lisosoma tardío degradativo.

Tráfico de isoformas de ceramida GM1 de cadena corta y cadena "torcida" hacia el endosoma de reciclaje

Se incubaron con isoformas de GM1 etiquetadas con Alexa (rojo), células epiteliales A431 humanas que expresan establemente Rab11a-GFP (verde) para marcar fisiológicamente el endosoma de reciclaje durante 60 min. Después de lavar, se obtuvieron imágenes de las células vivas por microscopía confocal. El tráfico de GM1 hacia el endosoma Rab11a en 3 dimensiones en estado estable se cuantificó identificando primero objetos que contenían Rab11a-eGFP y GM1 usando un algoritmo de hallazgo de umbral automático (Volocity, Improvion Inc., (Costes et al., 2004), y analizando la co-localización entre Rab11a y GM1 usando el coeficiente de colocalización Manders (denominado $M_{\text{proteína diana}}$). El coeficiente Manders mide la fuerza de colocalización en una escala de 0-1, en donde 0 indica ninguna señal de colocalización y 1 indica colocalización perfecta. La distribución de los coeficientes Manders para cada objeto se exhibe en un gráfico de dispersión usando datos 3D obtenidos de múltiples células y experimentos independientes como se indica.

Métodos para mediciones cuantitativas de tráfico de GM1 y co-localización en compartimientos endosomales específicos

Se determinó la cuantificación de la fracción de una proteína diana determinada en un compartimiento endosomal enmascarado 3D con el siguiente protocolo: 1) se crearon máscaras de objetos segmentando la proteína marcadora del compartimiento o la intensidad fluorescente del lípido encima del fondo local usando un buscador de umbral neutral y automático (Volocity. (Costes et al., 2004)); 2) se midieron los coeficientes de localización (Manders 1992) dentro de la región enmascarada usando Volocity (Improvion, Coventry, Inglaterra). Estos coeficientes varían de 0 a 1, en donde el primero corresponde a imágenes no superpuestas y el segundo refleja 100% de co-localización entre ambas imágenes. 3) La fracción de una proteína contenida dentro de un compartimiento definido denominado $M_{\text{proteína Diana}}$ se define como la relación de la suma de intensidades de píxeles ($M_{\text{Proteína Diana}}$) de la imagen verde (p. ej., proteína/lípido diana), para la cual la intensidad en el canal rojo (proteína del compartimiento) está dentro de los

umbrales de intensidad seleccionados, frente a la suma de las intensidades de todos los píxeles del canal de la imagen verde frente al fondo. Por lo tanto, $M_{\text{Proteína Diana}}$ es un buen indicador de la proporción de la señal verde coincidente con una señal en el canal rojo frente a la intensidad total.

5 **Ejemplo 8.** Imágenes de células vivas en tiempo real de células epiteliales A431 que lleva el tráfico de las isoformas Alexa-GM1: solamente las ceramidas de cadena corta ingresan en los túbulos de clasificación

10 Células epiteliales A431 humanas que expresan establemente Rab7-GFP (verde) para marcar fisiológicamente el endosoma tardío se incubaron con las isoformas de GM1 etiquetadas con Alexa(rojo) y se obtuvieron imágenes en tiempo real por microscopia confocal en 5 dimensiones. Solamente las isoformas de GM1 de cadena corta (C12, panel a) y "torcidas" (C16:1, no se muestra) ingresaron en los túbulos de clasificación del compartimiento endosomal. Este resultado es consistente con la hipótesis de clasificación de lípidos por curvatura de la membrana. Las ceramidas de cadena corta escapan de la vesícula endosomal hacia los túbulos de clasificación que llevan el tráfico de GM1 hacia el endosoma de reciclaje y hacia la vía transcitótica. Las ceramidas de cadena larga (panel b), no obstante, son atrapadas en la vesícula grande y está madura en el endosoma tardío (ver dibujo, panel c). Esto puede explicar la forma en que la estructura del dominio ceramida actúa para influir en el tráfico de GM1.

15 Bibliografía citada

- Brown, D.A. 2006. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology* (Bethesda). 21:430-9.
- Dickinson, B., K. Badizadegan, Z. Wu, J.C. Ahouse, X. Zhu, N.E. Simister, R.S. Blumberg y W.I. Lencer. 1999. Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal cell line. *J. Clin. Invest.* 104:903-911.
- 20 Dickinson, B.L., S.M. Claypool, J.A. D'Angelo, M.L. Aiken, N. Venu, E.H. Yen, J.S. Wagner, J.A. Borawski, A.T. Pierce, R. Hershberg, R.S. Blumberg y W.I. Lencer. 2008. Ca²⁺-dependent Calmodulin Binding to FcRn Affects Immunoglobulin G Transport in the Transcytotic Pathway. *Mol Biol Cell.* 19:414-423.
- Lencer, W.I., S. Moe, P.A. Rufo y J.L. Madara. 1995. Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:10094-10098.
- 25 Lencer, W.I. y B. Tsai. 2003. The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem Sci.* 28:639-45.
- Maxfield, F.R y T.E. McGraw. 2004. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:121-32.
- Mukhejee, S. y F.R. Maxfield. 2000. Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. *Traffic.* 1:203-11.
- 30 Mukhejee, S., T.T. Soe y F.R. Maxfield. 1999. Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. *J Cell Biol.* 144. Simons, K. y R. Ehehalt. 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* 110:597-603.
- Simons, K., and W.L. Vaz. 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 33:269-95.
- 35 Spiekermann, G.M., P.W. Finn, E.S. Ward, J. Dumont, B.L. Dickinson, R.S. Blumberg y W.I. Lencer. 2002. Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. *J Exp Med.* 196:303-10.
- Tsai, B., C. Rodighiero, W.I. Lencer y T. Rapoport. 2001. Protein disulfide isomerase acts as a redoxdependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell.* 104:937-948.
- 40 Brown, D.A. 2006. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology* (Bethesda). 21:430-9.
- Costes, S.V., D. Daelemans, E.H. Cho, Z. Dobbin, G. Pavlakis y S. Lockett. 2004. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J.* 86:3993-4003.
- Doyle, M. y J. Egan. 2001. Glucagon-like peptide-1. *Recent Prog Horm Resch.* 56:377-99.
- Hermanson, G.T. 1996. *Bioconjugate Techniques.* Academic Press, San Diego, CA.
- 45 Kieffer, T.J. y J.F. Habener. 1999. The glucagon-like peptides. *Endocr. Rev.* 20:876-913.
- Lencer, W.I., S. Moe, P.A. Rufo y J.L. Madara. 1995. Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:10094-10098.

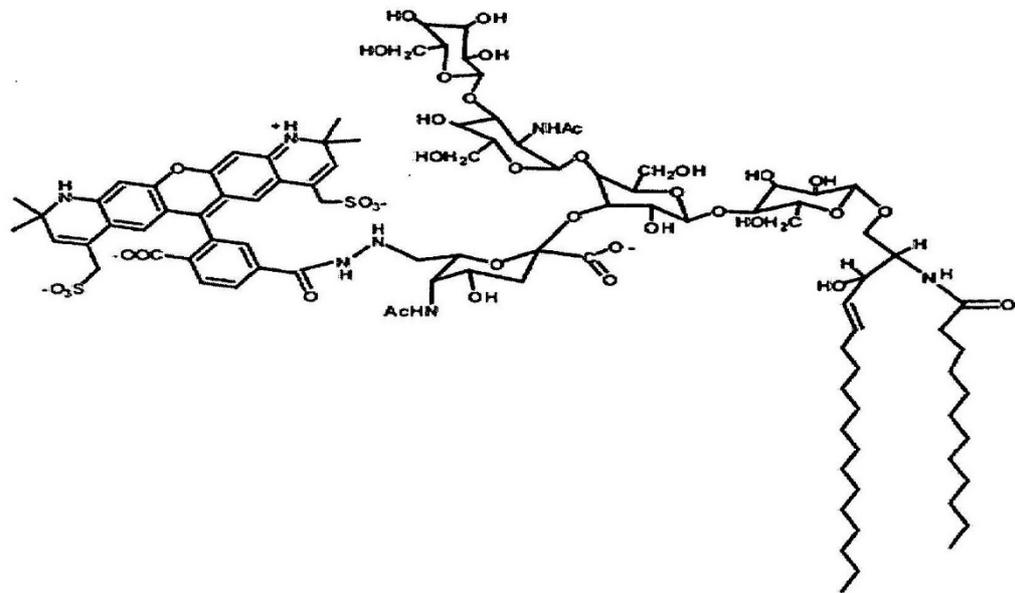
- Lencer, W.I. y B. Tsai. 2003. The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem Sci.* 28:639-45.
- Maxfield, F.R. y T.E. McGraw. 2004. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:121-32.
- Mukhejee, S. y F.R. Maxfield. 2000. Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. *Traffic.* 1:203-11.
- 5 Mukhejee, S., T.T. Soe y R. Maxfield. 1999. Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. *J Cell Biol.* 144.
- Murray, M.C., V.P. Bhavanandan, E.A. Davidson y V. Reinhold. 1989. Modification of sialyl residues of glycoconjugates by reductive amination. Characterization of the modified sialic acids. *Carbohydr Res.* 186:255-65.
- 10 Orskov, C., A. Wettergren y J.J. Holst. 1993. Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes.* 42:658-61.
- Rouille, Y., S. Martin y D.F. Steiner. 1995. Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J Biol Chem.* 270:26488-96.
- 15 Rufo, P.A., D. Merlin, M. Riegler, M. Ferguson-Maltzman, B. Dickinson, C. Brugnara, S.L. Alper y W.I. Lencer. 1997. The antifungal antibiotic clotrimazole inhibits chloride secretion by human T84 cells via blockade of distinct basolateral K⁺ conductances. *J. Clin. Invest.* 100:3111-3120.
- Simons, K. y R. Ehehalt. 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* 110:597-603.
- Simons, K. y W.L. Vaz. 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 33:269-95.
- 20 Spiekermann, G.M., P.W. Finn, E.S. Ward, J. Dumont, B.L. Dickinson, R.S. Blumberg y W.I. Lencer. 2002. Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. *J Exp Med.* 196:303-10.
- Sturm, N.S., Y. Lin, S.K. Burley, J.L. Krstenansky, J.M. Ahn, B.Y. Azizeh, D. Trivedi y V.J. Hruby. 1998. Structure-function studies on positions 17, 18, and 21 replacement analogues of glucagon: the importance of charged residues and salt bridges in glucagon biological activity. *J Med Chem.* 41:2693-700.
- 25 Tsai, B., C. Rodighiero, W.I. Lencer, and T. Rapoport. 2001. Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell.* 104:937-948.
- Xiao, Q., J. Giguere, M. Parisien, W. Jeng, S.A. St-Pierre, P.L. Brubaker y M.B. Wheeler. 2001. Biological activities of glucagon-like peptide-1 analogues in vitro and in vivo. *Biochemistry.* 40:2860-9.
- Kelsall, B. *Mucosal Immunology* (2008) 1:460-469
- 30 Shang et. al. *Gastroenterology* 2008;135:529-38
- Backhed, F. et. al. *Science* 307, 1915-1920 (2005);
- Rakoff-Nahoum S et. al. *Mucosal Immunology* (2008) 1:S10-S14;
- Cerutti A. *Nat Rev Immunol.* 2008 8:421-34;
- Maxfield, F.R. y T.E. McGraw. 2004. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:121-32.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vehículo para administración que comprende un glicosfingolípido y un agente que se ha de administrar, por ejemplo un agente terapéutico, en donde el glicosfingolípido comprende una ceramida que comprende (a) un ácido grado de cadena corta (C4 - C12) o (b) un ácido graso C16 que comprende un doble enlace *cis* entre dos átomos de carbono y el agente que se ha de administrar está unido al oligosacárido del glicosfingolípido.
2. Un complejo de glicosfingolípido-agente terapéutico que comprende un glicosfingolípido unido a un agente terapéutico, en donde el glicosfingolípido comprende una ceramida que comprende un ácido graso de (a) 4 - 12 átomos de carbono o (b) 16 átomos de carbono con un doble enlace *cis* entre dos átomos de carbono, y en donde el agente terapéutico está unido al oligosacárido del glicosfingolípido.
- 10 3. Un complejo de glicosfingolípido-agente terapéutico, en donde el glicosfingolípido comprende una ceramida que comprende (a) un ácido graso de cadena corta (C4 - C12) o (b) un ácido graso C16 que comprende un doble enlace *cis*, y el agente terapéutico está unido al oligosacárido del glicosfingolípido.
- 15 4. Un complejo de gangliósido-agente terapéutico que comprende monosialotetrahexosilgangliósido (GM1) unido a un agente terapéutico, en GM1 comprende una ceramida que comprende un ácido graso de (a) 4 - 12 átomos de carbono sin dobles enlaces entre los átomos de carbono (b) 16 átomos de carbono que comprenden un doble enlace *cis* entre dos átomos de carbono y el agente terapéutico está unido al oligosacárido de monosialotetrahexosilgangliósido (GM1).
- 20 5. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el glicosfingolípido comprende: (a) un gangliósido, opcionalmente en donde el gangliósido comprende un ácido siálico, por ejemplo monosialotetrahexosilgangliósido (GM1); o (b) un globósido, opcionalmente globotriaosil ceramida (Gb₃).
6. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la ceramida comprende un ácido graso C4 - C12 sin dobles enlaces entre átomos de carbono, en donde el ácido graso es un ácido graso C12 sin dobles enlaces entre los átomos de carbono.
- 25 7. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la ceramida comprende un ácido graso C16 que comprende un doble enlace *cis* entre dos átomos de carbono (C16:1).
8. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el agente que se ha de administrar se selecciona del grupo que consiste en proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, polisacáridos y carbohidratos, lípidos, glucoproteínas y sus combinaciones, y grupos sintéticos y fármacos inorgánicos que ejercen un efecto biológico cuando se administran a un sujeto.
- 30 9. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el agente terapéutico es un agente antiinflamatorio (por ejemplo que comprende clotrimazol), un antígeno de vacuna (por ejemplo proteína cápside del rotavirus VP6), un fármaco antineoplásico o quimioterapéutico, un factor de coagulación, una hormona, un esteroide, una citocina, un antibiótico un fármaco para el tratamiento de enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune, alergia, un trastorno de la sangre, un trastorno metabólico o una enfermedad de la piel.
- 35 10. Una composición que comprende una composición farmacéuticamente aceptable y el vehículo o complejo de administración según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 40 11. El vehículo o complejo de administración según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición según la reivindicación 10 para uso en un método para administrar un agente, por ejemplo un agente terapéutico, a las células/a través de la superficie mucosa, o permitir la absorción de un agente terapéutico en una superficie mucosa, que comprende poner en contacto el vehículo de administración o complejo de interés con las células/la superficie mucosa, bajo condiciones adecuadas para absorción del vehículo o el agente de administración de interés en la célula o absorción del vehículo de administración o agente de interés en la superficie mucosa.
- 45 12. El vehículo o complejo de administración según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición según la reivindicación 10 para uso en un método para administrar un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, a las células/la superficie mucosa, o permitir la absorción de un agente terapéutico en una superficie mucosa, que comprende administrar a un individuo el vehículo o complejo de administración según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición según la reivindicación 10.
- 50 13. El vehículo o complejo de administración según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición según la reivindicación 10 para uso en un método para potenciar/aumentar la semivida de un agente terapéutico en un individuo, que comprende administrar al individuo un complejo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una composición según la reivindicación 10.

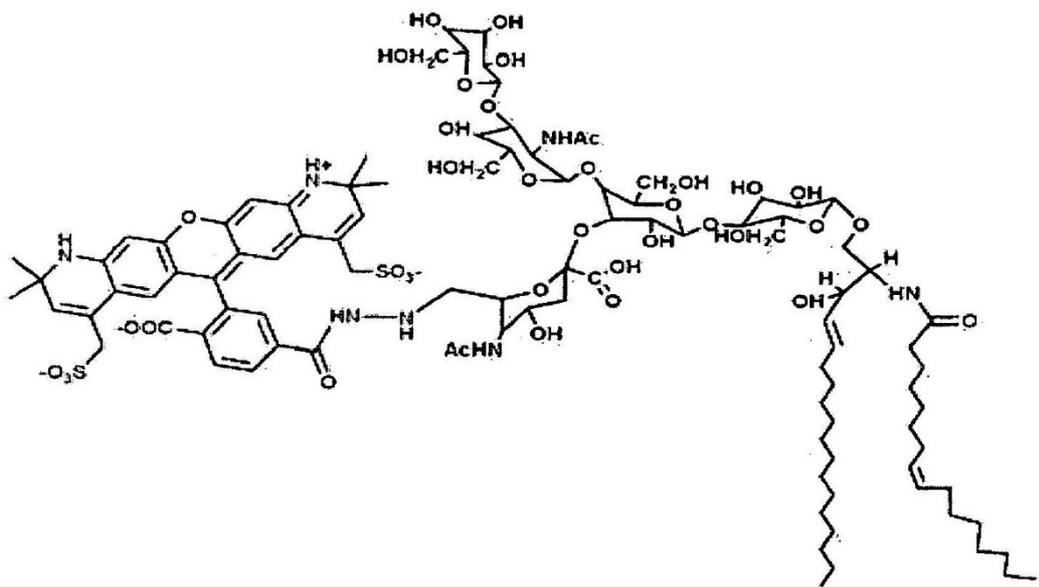
- 5
14. El vehículo o complejo de administración según se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una composición según la reivindicación 10, para uso en un método para tratar una enfermedad o afección en un individuo que lo necesita, que comprende administrar una cantidad eficaz del complejo de gangliósido-agente terapéutico al individuo, en donde una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para mitigar/reducir el grado al cual ocurre la enfermedad o afección en el individuo.
 15. El vehículo, complejo o composición de administración para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde el vehículo, complejo o composición de administración se administra por vía enteral/no parenteral.
 16. El vehículo, complejo o composición de administración para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde el vehículo, complejo o composición de administración se administra por vía parenteral.

A.



C12:0-Alexa-GM1

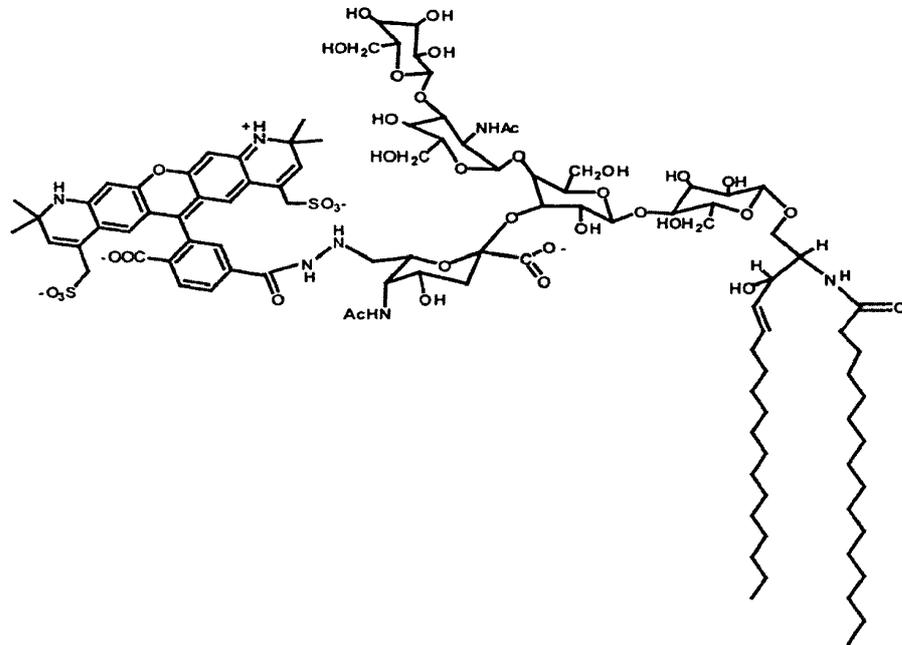
B.



C16:1-Alexa-GM1

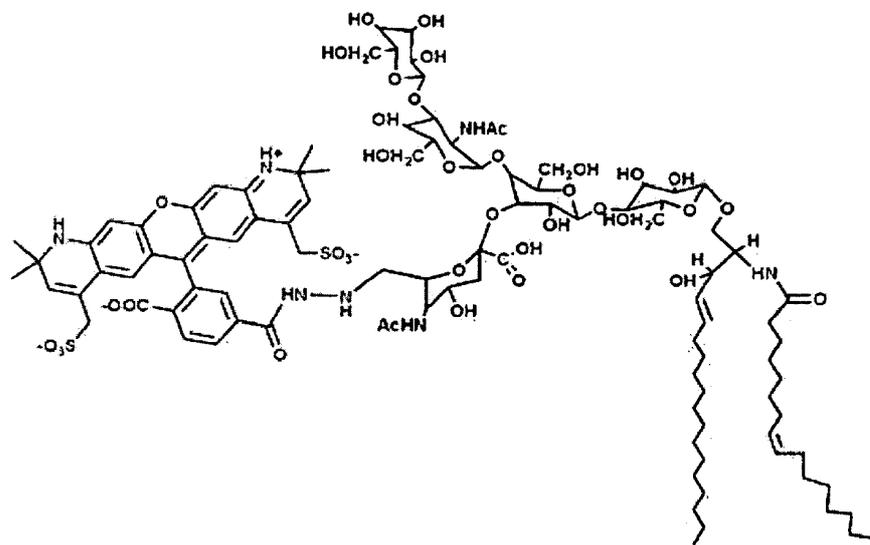
Fig. 1-1

C.



C16:0-Alexa-GM1

D.

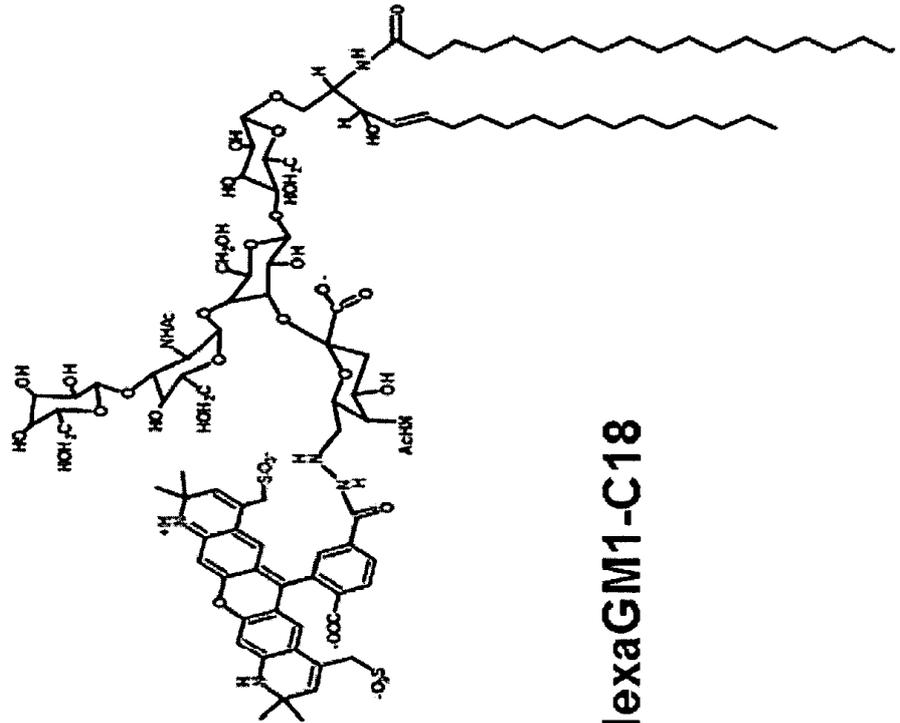


C20:0-Alexa-GM1

Fig. 1-2

B. C18-Alexa-GM1

Clasificación intracelular
imágenes de células vivas



AlexaGM1-C18

Rab5-
GFP



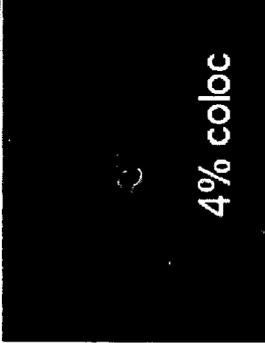
1,2% coloc

Rab7-
GFP



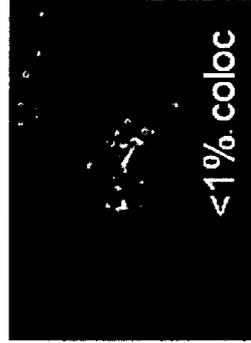
58% coloc

Rab11-
GFP



4% coloc

Golgin97
-GFP



<1% coloc

Fig. 2-2

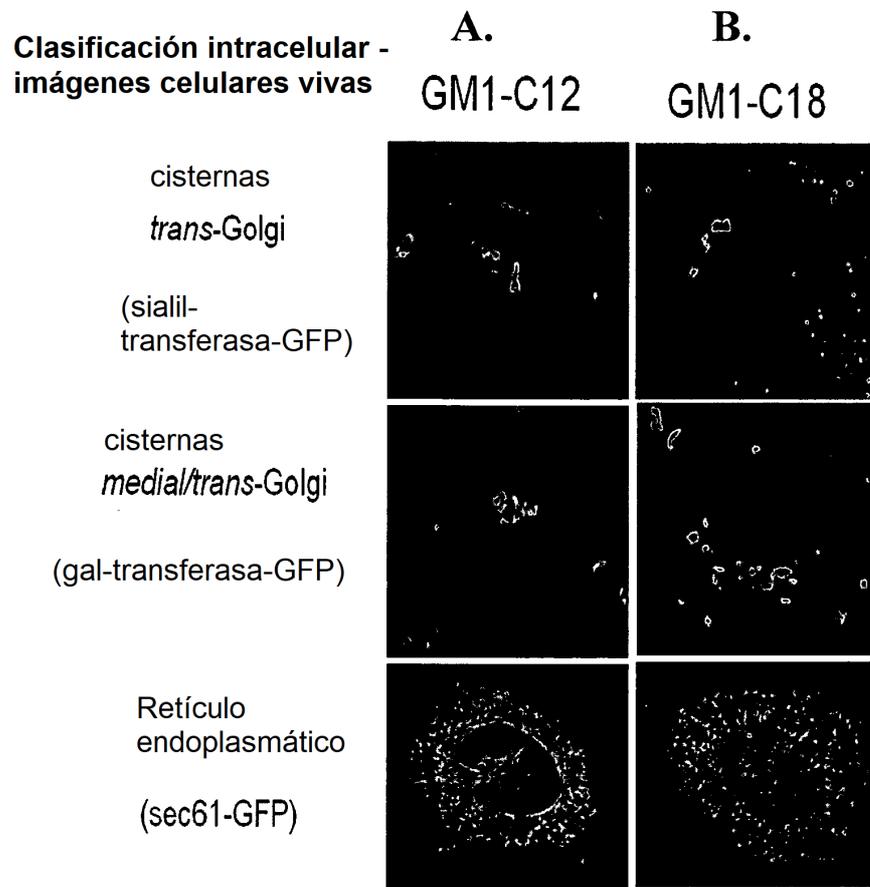


Fig. 3

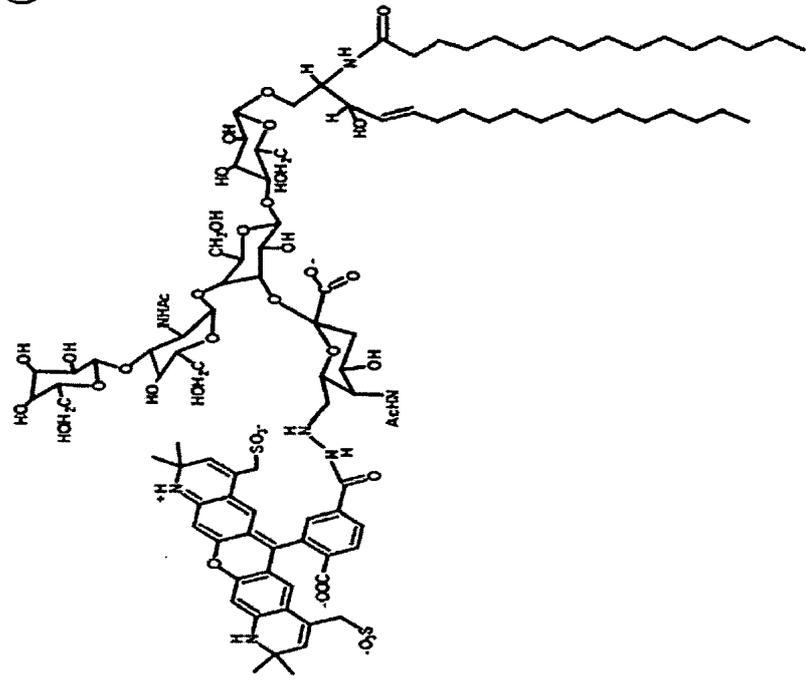
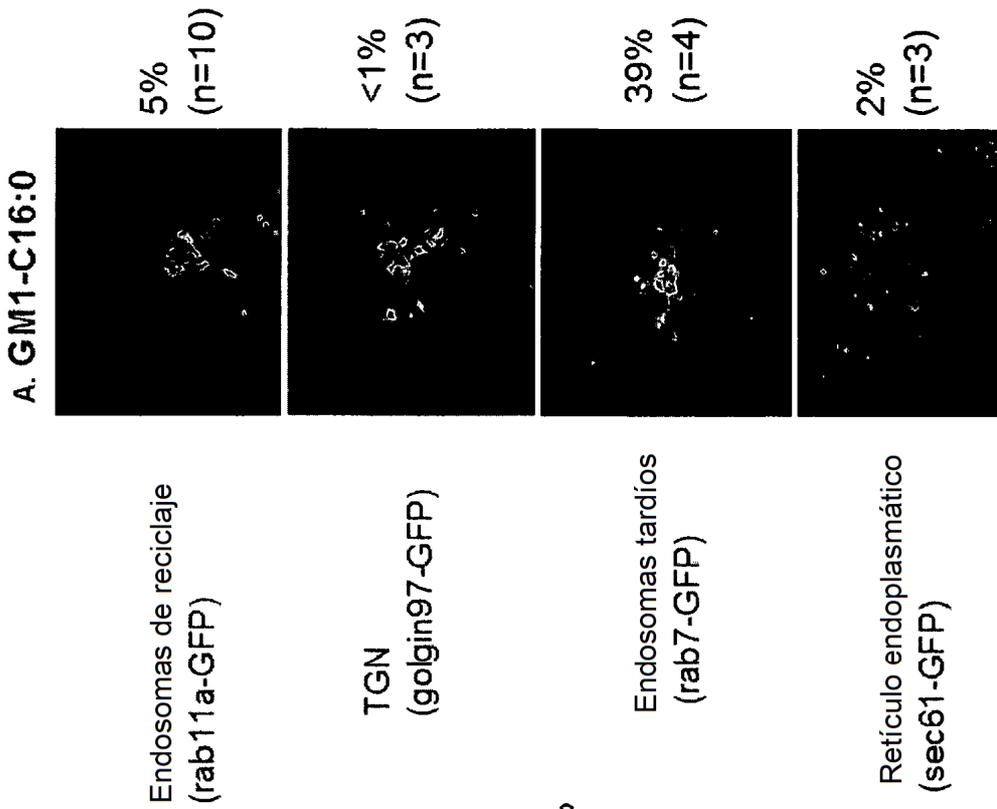


Fig. 4-1

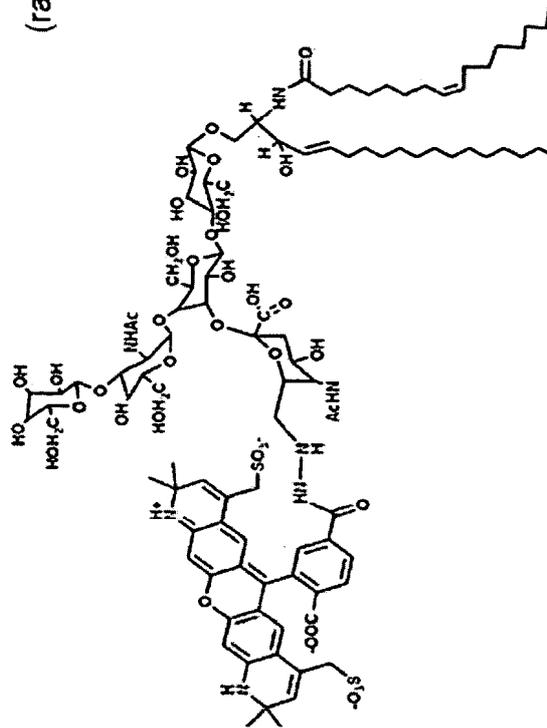
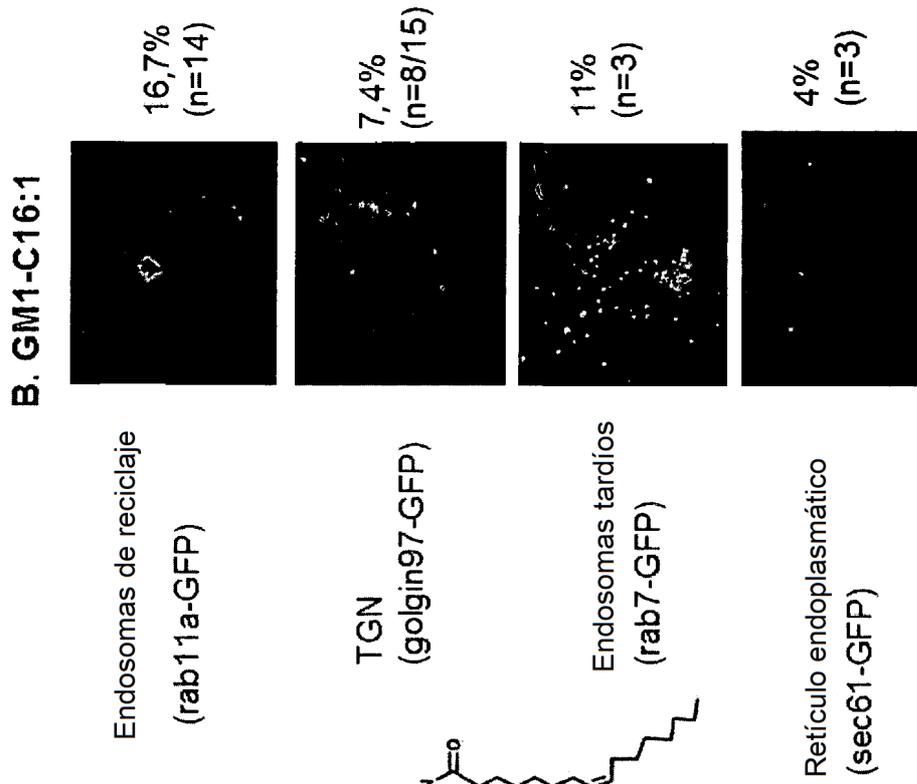


Fig. 4-2

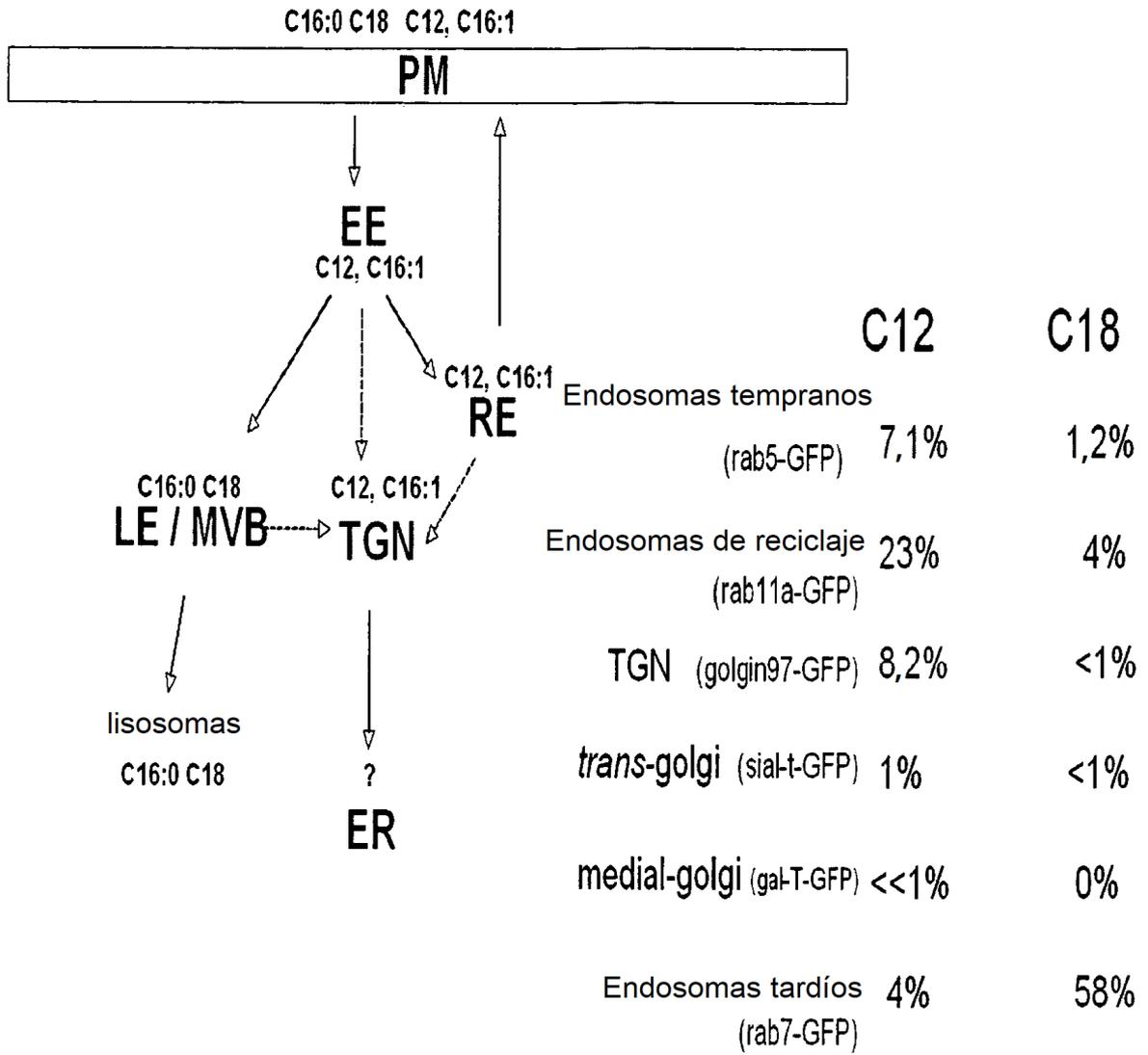


Fig. 5

Experimentos de transcitosis

1) Se añade lípido GM1 a la membrana apical de células MDCK polarizadas e incubadas durante 1,5 horas a 37C

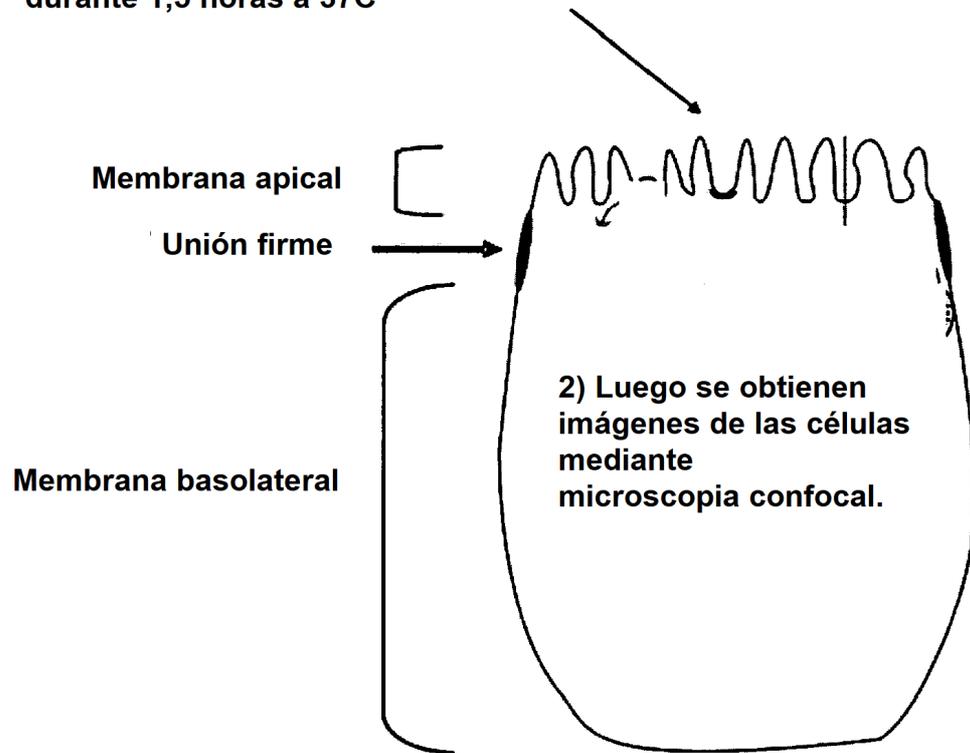


Fig. 6-1

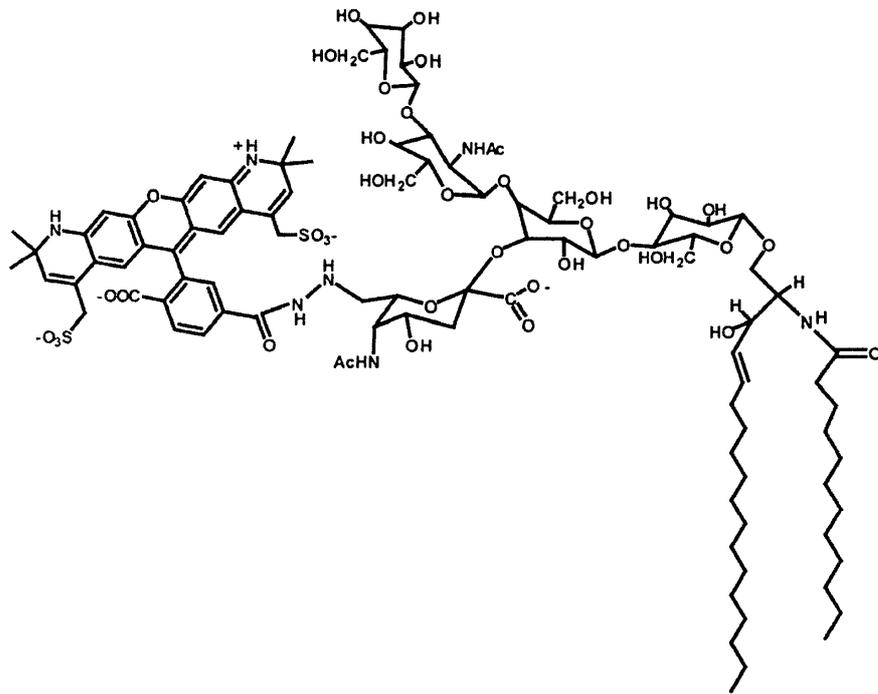


Fig. 6-2

C12-Alexa568 GM1 de "cadena corta" es transcrito a las membrans tardías a las membras laterales en células MDCK

Se muestra la sección transversal media de células polarizadas con C12-GM1 etiquetando la membrana lateral

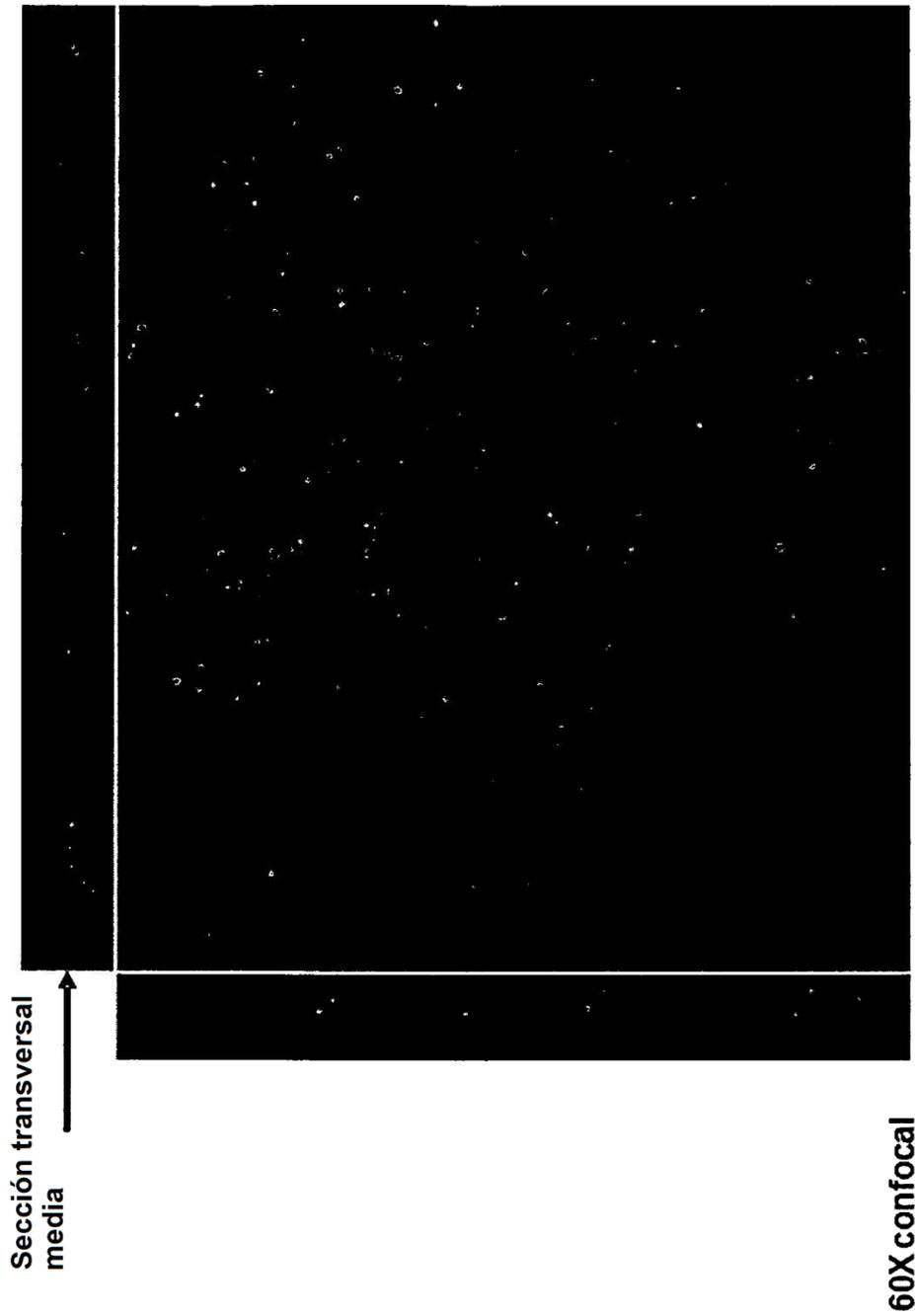


Fig. 7-1

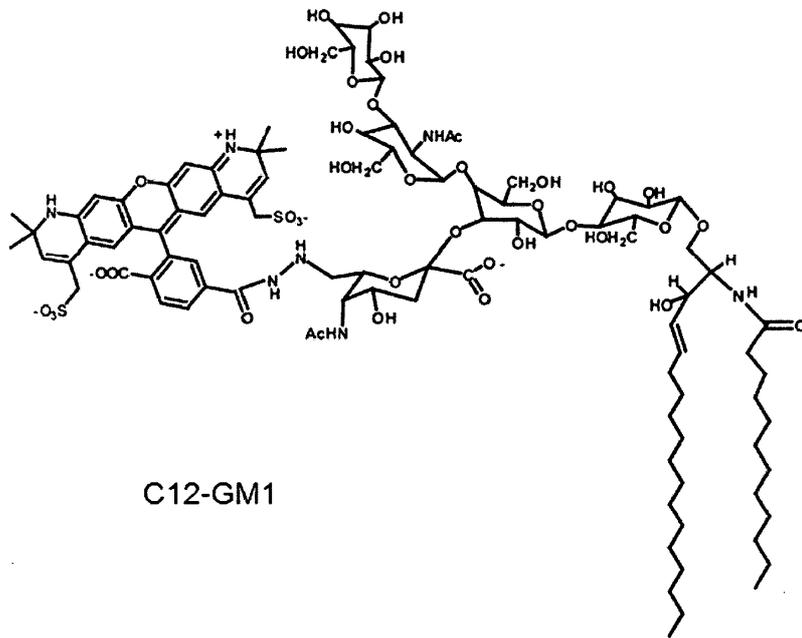


Fig. 7-2

C12-Alexa568 GM1 de "cadena corta" es transcrito a las membranas basales en células MDCK.

Se muestra la sección transversal de la membrana basal de células polarizadas con C12-GM1 etiquetando la membrana

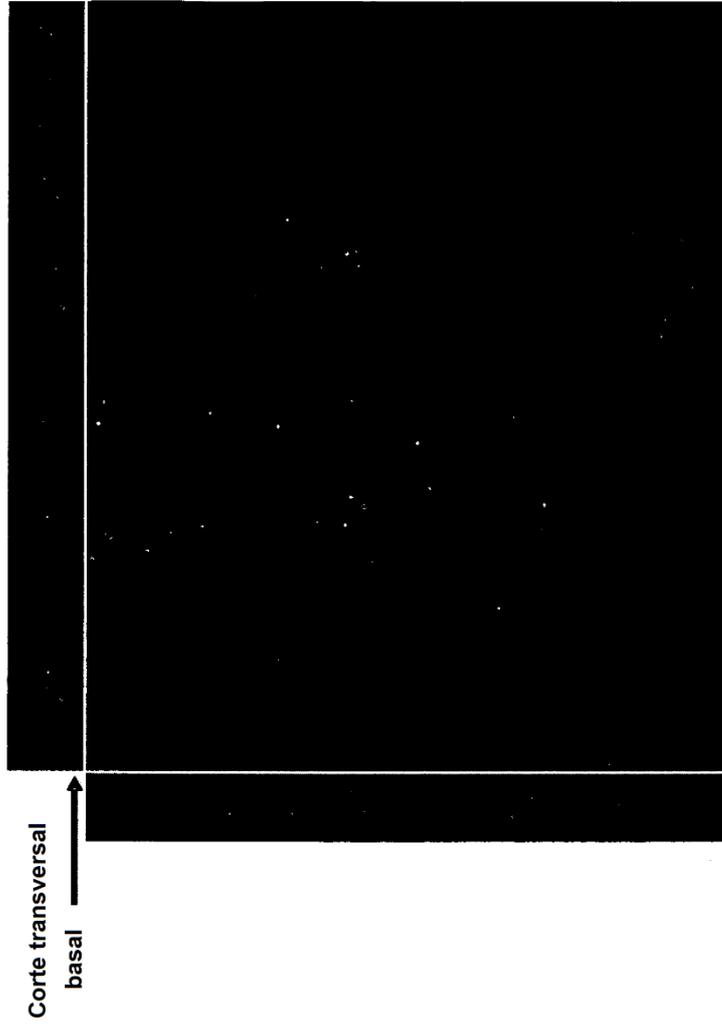


Fig. 8-1

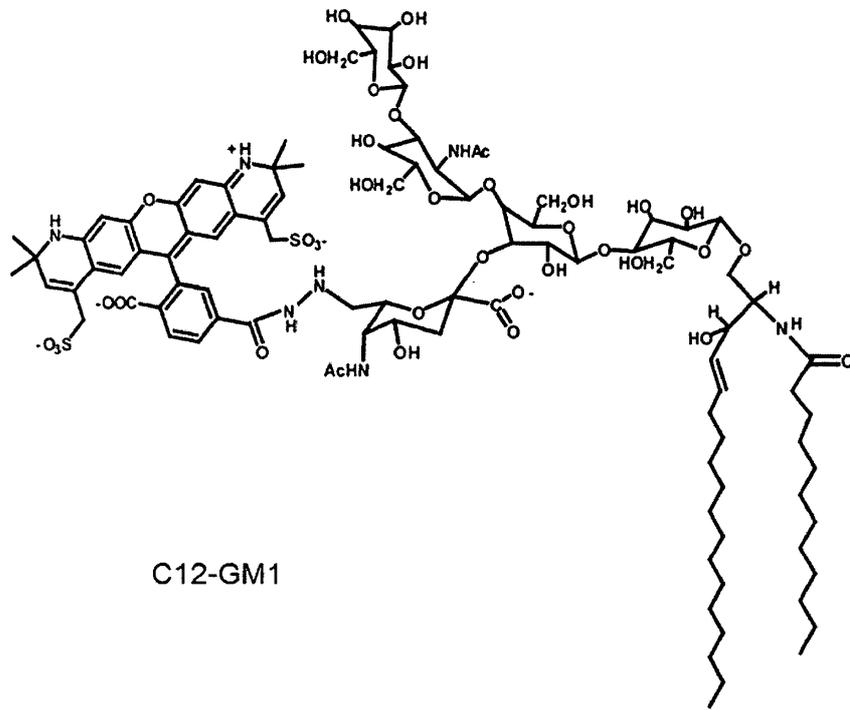


Fig. 8-2

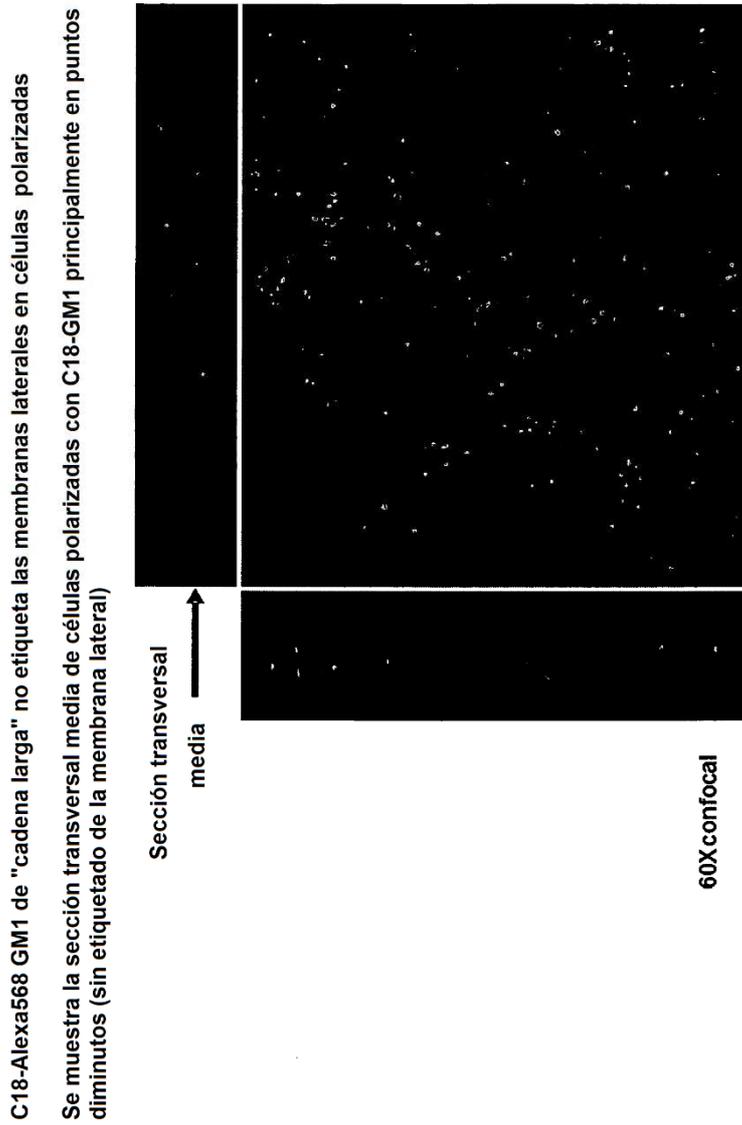


Fig. 9-1

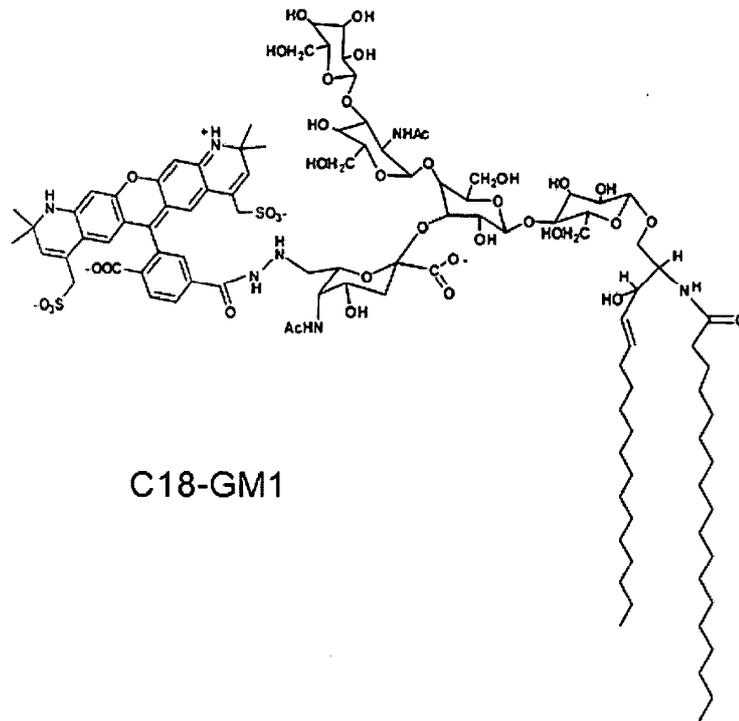


Fig. 9-2

C18-Alexa568 GM1 de "cadena larga no etiqueta membranas laterales en células polarizadas

Se muestra la sección transversal media de células polarizadas con C18-GM1 principalmente en puntos diminutos (sin etiquetado de la membrana lateral)

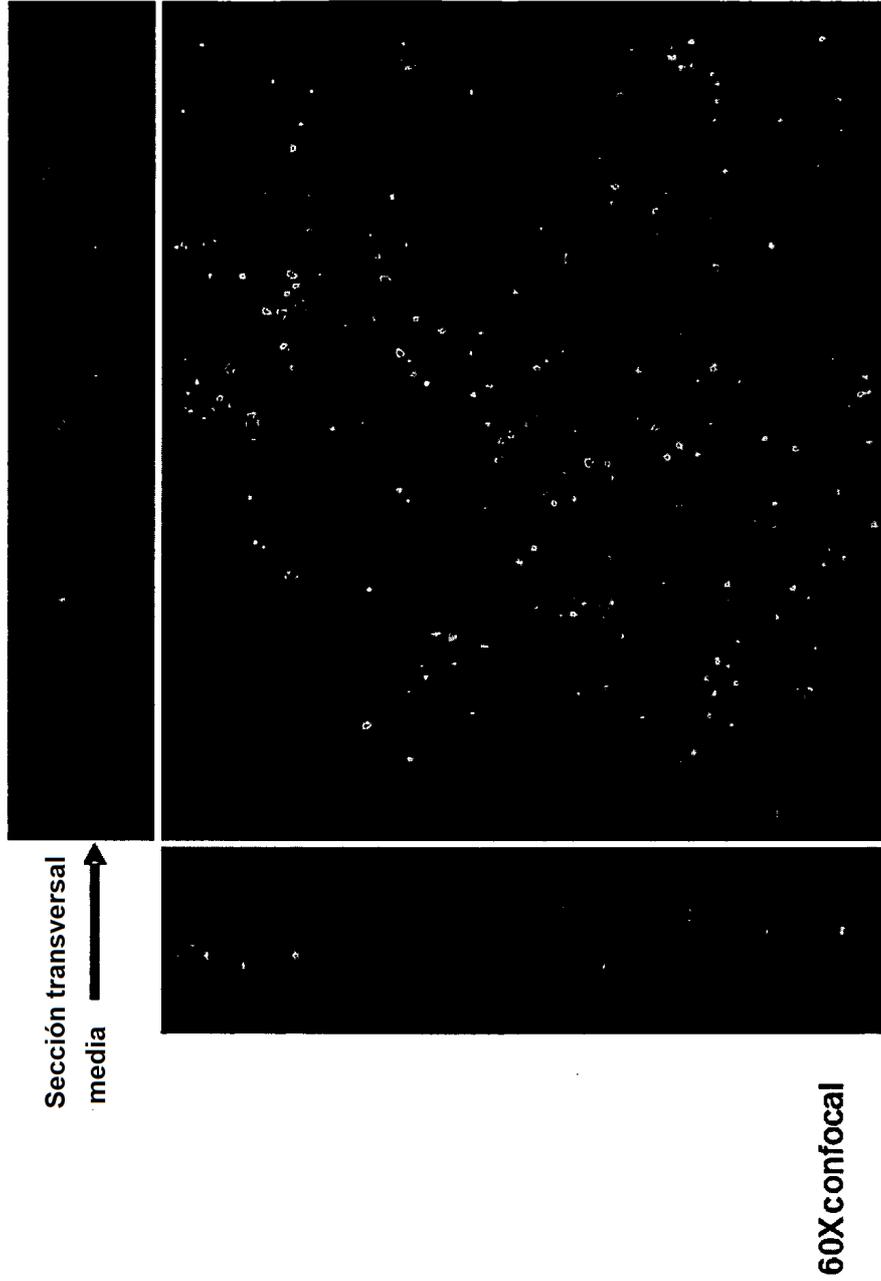


Fig. 10-1

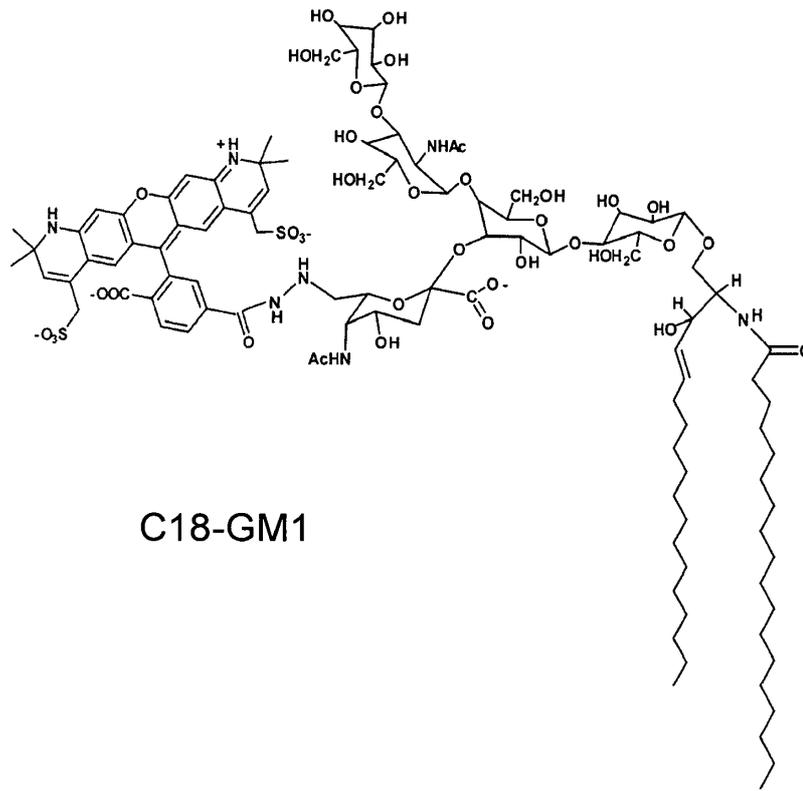
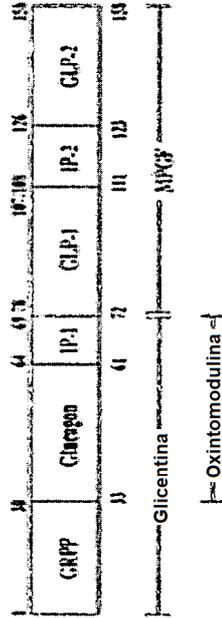


Fig. 10-2

GLP1 deriva de proglucagón por escisión post-traducción al péptido activo.

Transcripción ARNm de proglucagón:



Páncreas: Glucagón, MPGF

Intestino: Glucentina, Oxintomodulina, GLP-1, GLP-2, IP-2

GRPP= Polipéptido pancreático relacionado con glucentina

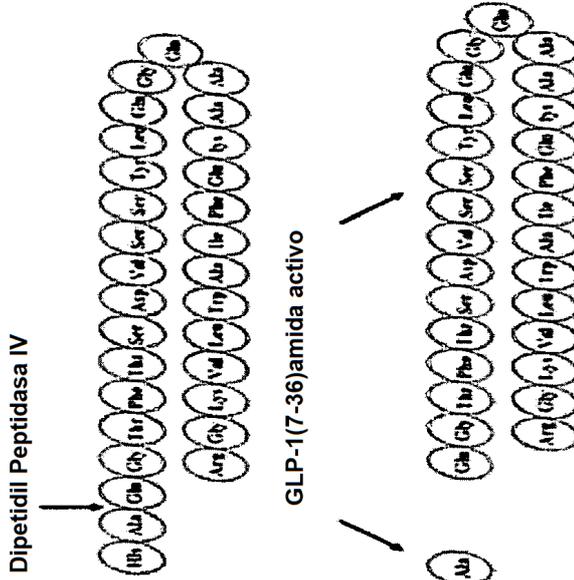
GLP-1= Péptido 1 tipo glucagón

GLP-2= Péptido 2 tipo glucagón

IP-1= Péptido 1 interviniente

IP-2= Péptido 2 interviniente

MPGF- Fragmento ProGlucagón principal



GLP-1(9-36)amida inactivo

Fig. 11-1

ES 2 798 257 T3

1 mksiyfvagl fvmlvqgswq rslqdteeks rsfsasqadp lsdpdqmned krhsqgtfts
61 dyskyldsrr agdfvqwlmn tkrrnrnniak rhdeferhae gtftsdvssy legqaakefi
121 awlvkgr^{^^} grrdfpeevaive elgrrhadgs fsdemntild nlaardfinw liqtkitdrk

Fig. 11-2

Las ceramidas de cadena corta se colocalizan con PM, endosoma de reciclaje y las ceramidas de cadena larga-TGN se localizan con el endosoma tardío

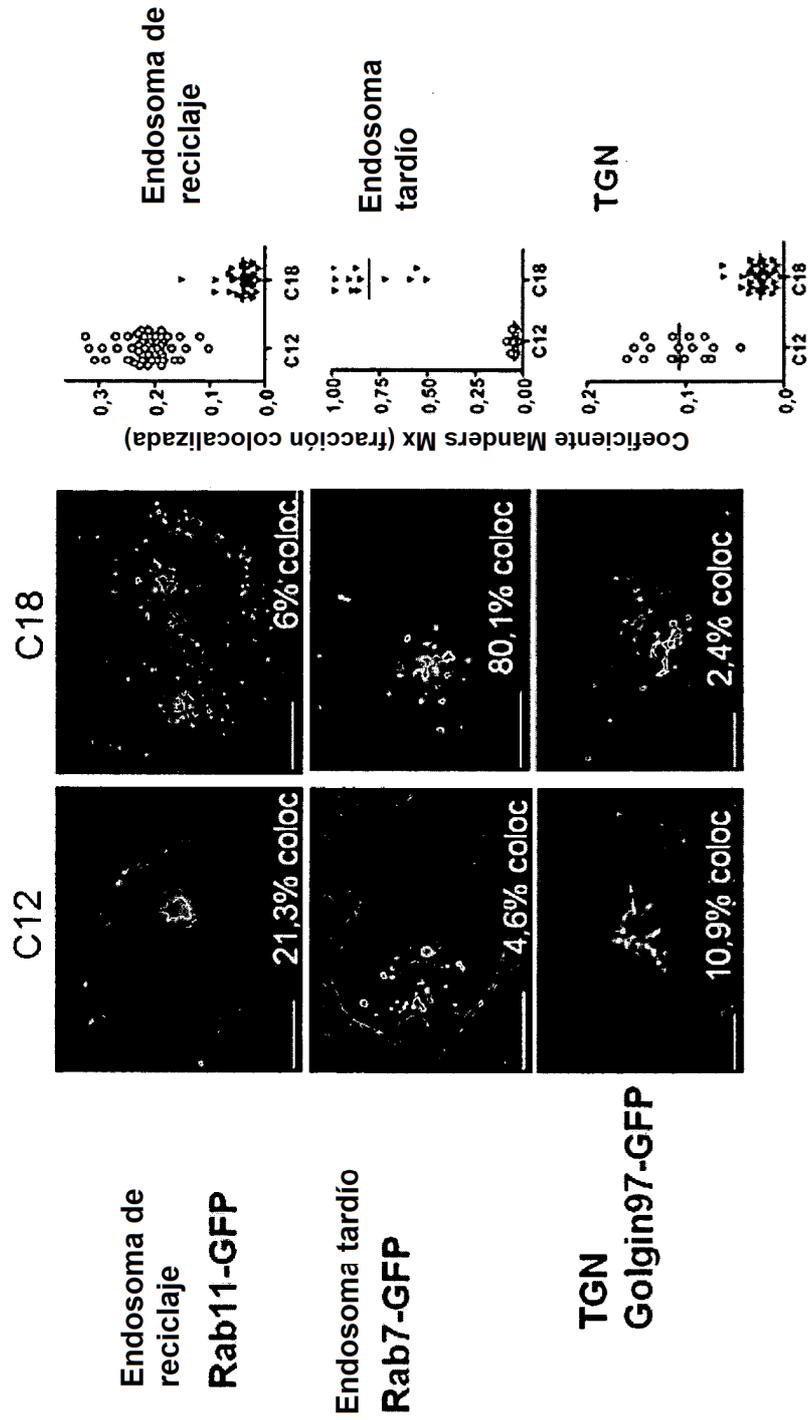
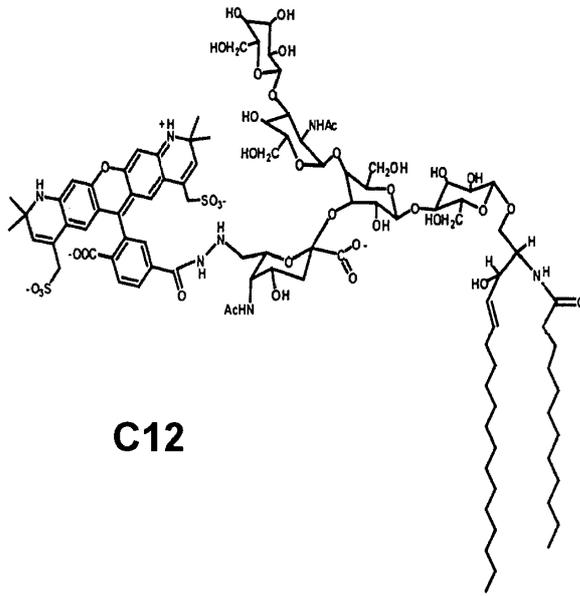
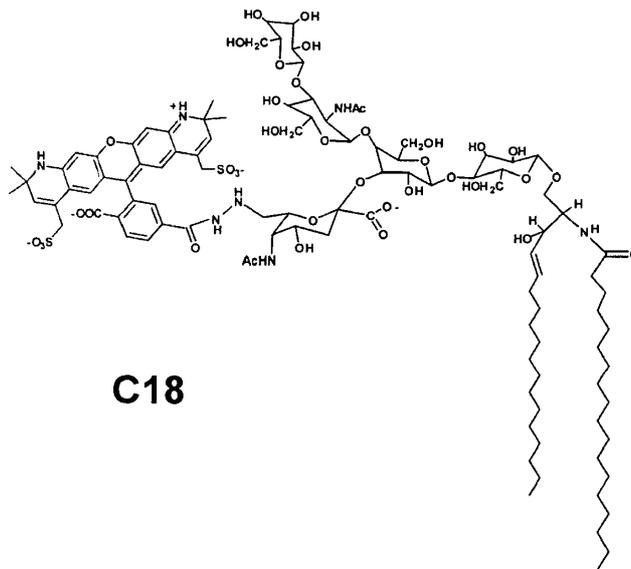


Fig. 12-1



C12



C18

Fig. 12-2

El punto de quiebre es la presencia de un doble enlace en el ácido graso de la cadena de ceramida

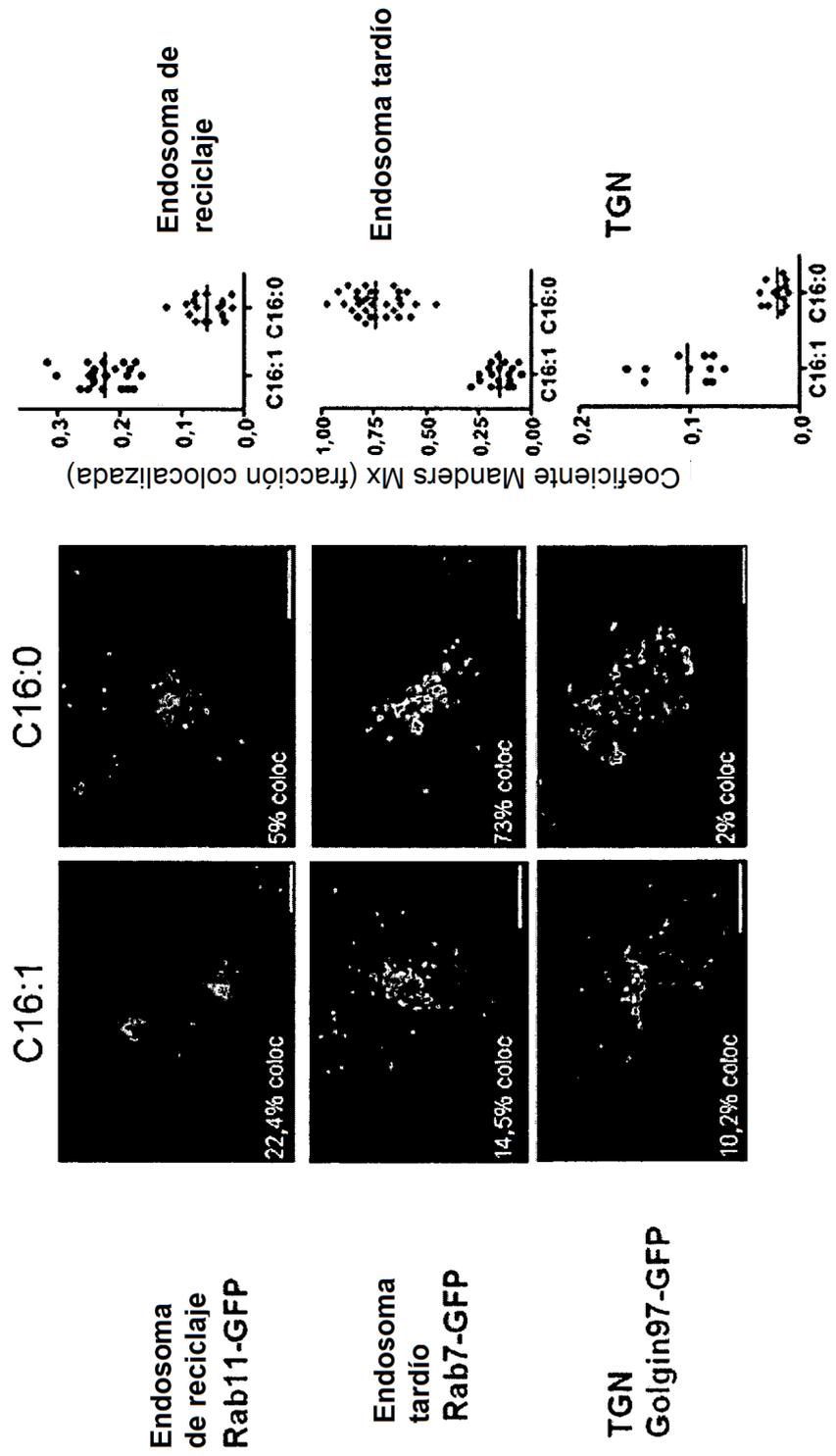
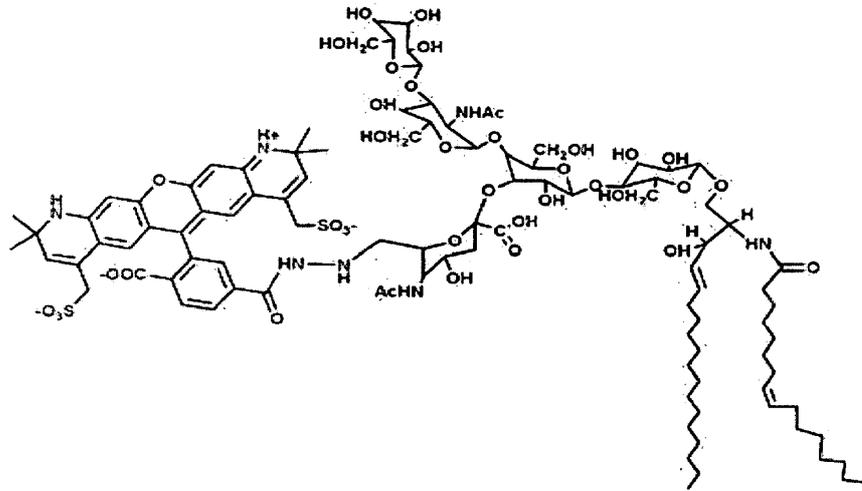
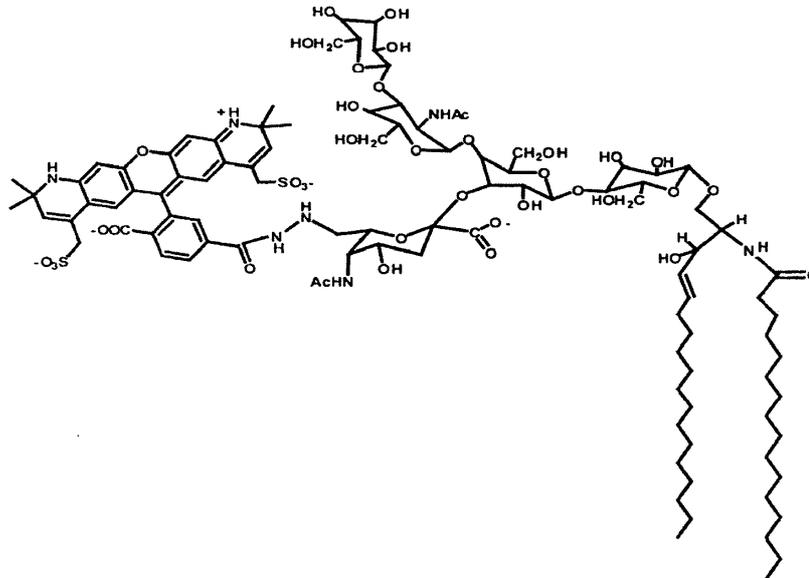


Fig. 13-1



C16:1



C16:0

Fig. 13-2

Cuando se aplican juntas, las dos ceramidas se clasifican de manera diferencial

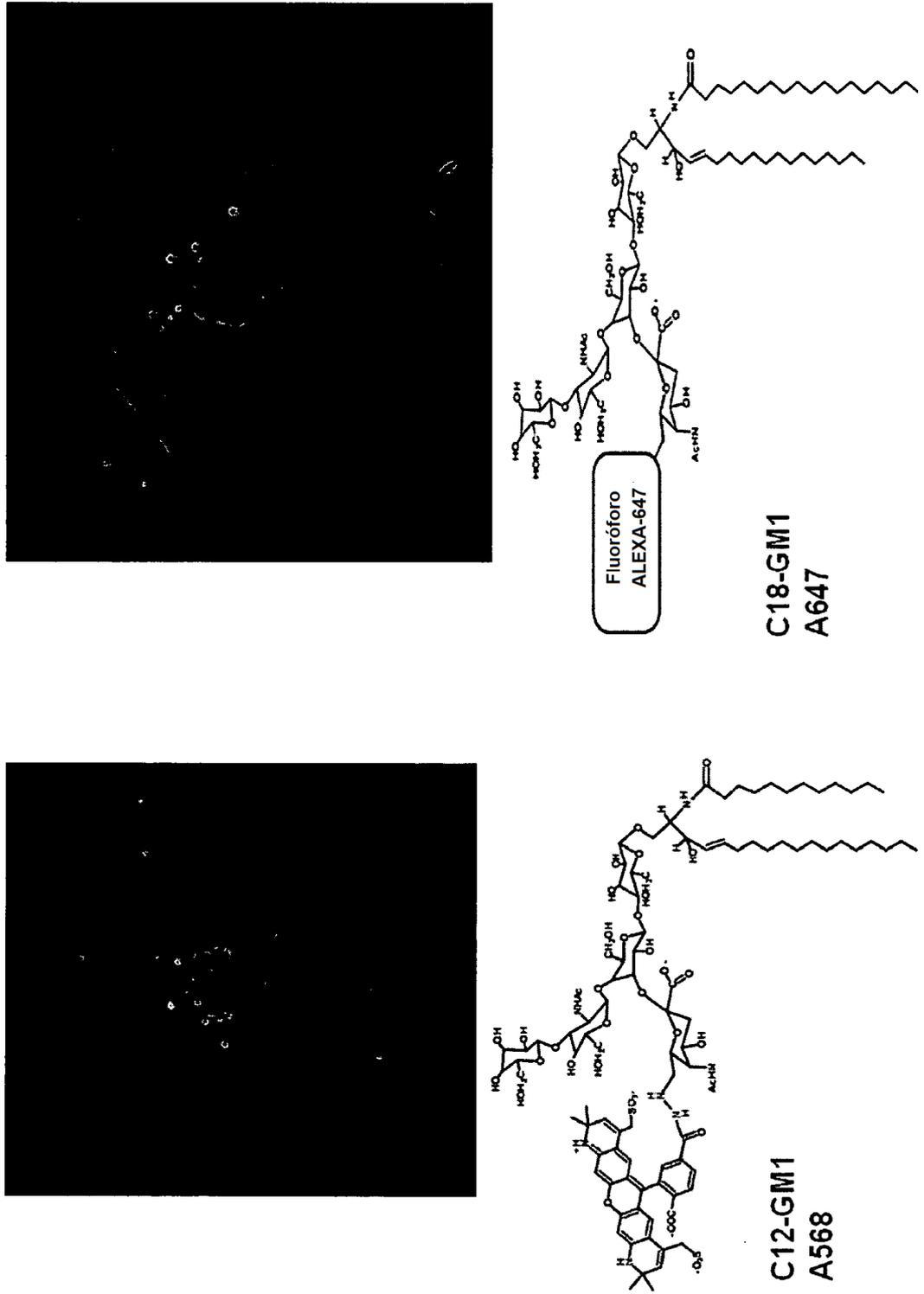


Fig. 14

Los dos grupos principales de fluoróforo Alexa no afectan la distribución de GM1 en estado estable

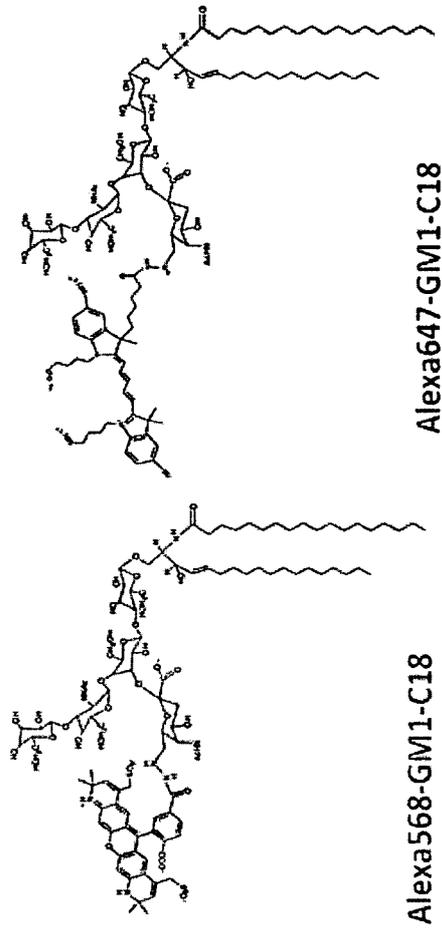


Fig. 15

GM1 con cadena corta pero las ceramidas de cadena larga no ingresan en los túbulos de clasificación

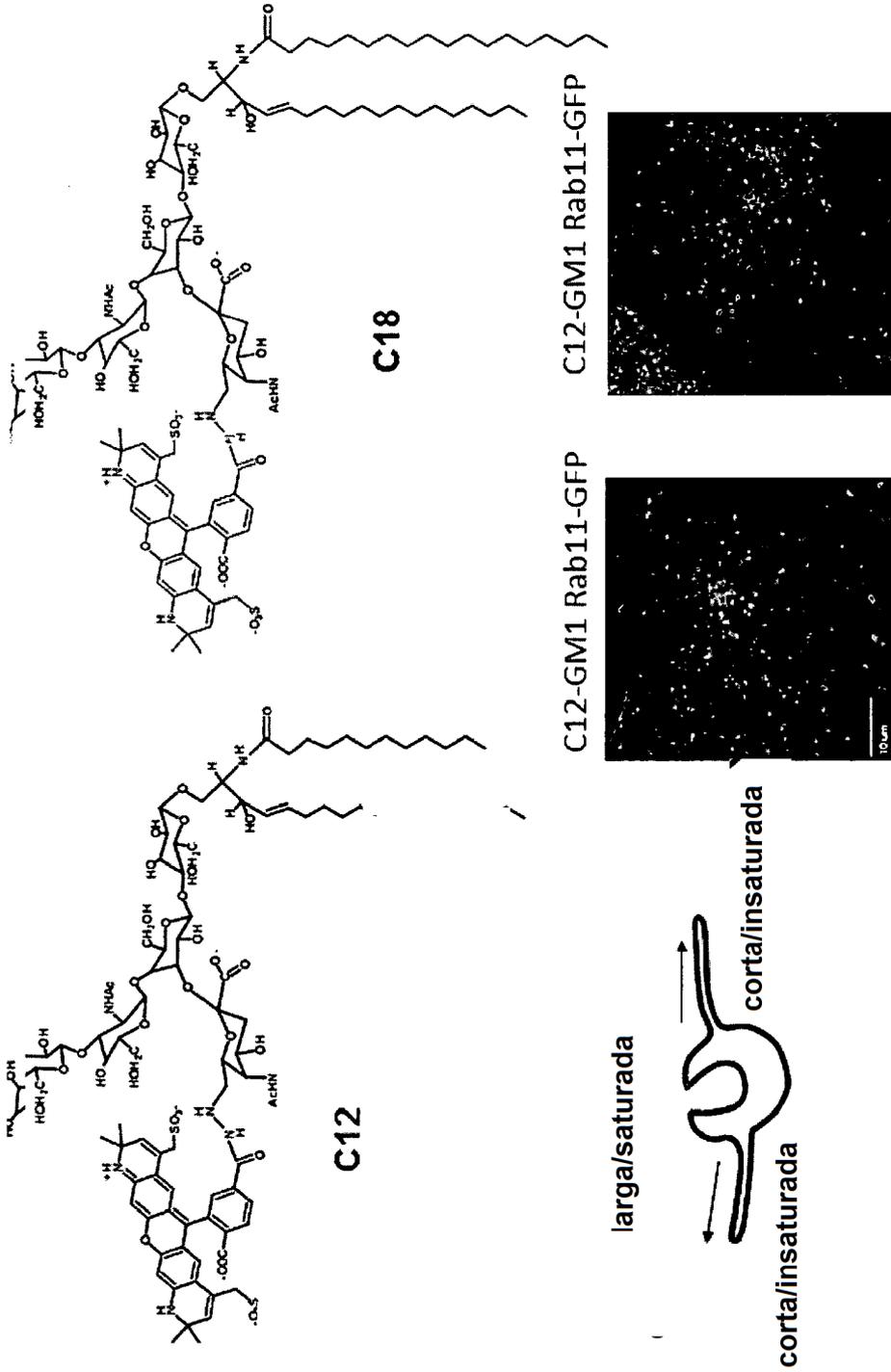
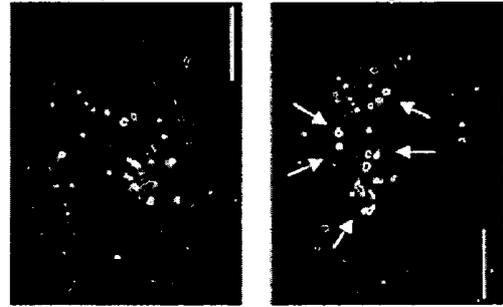
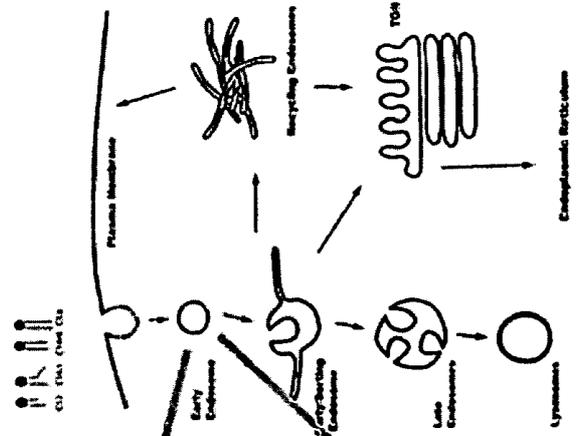
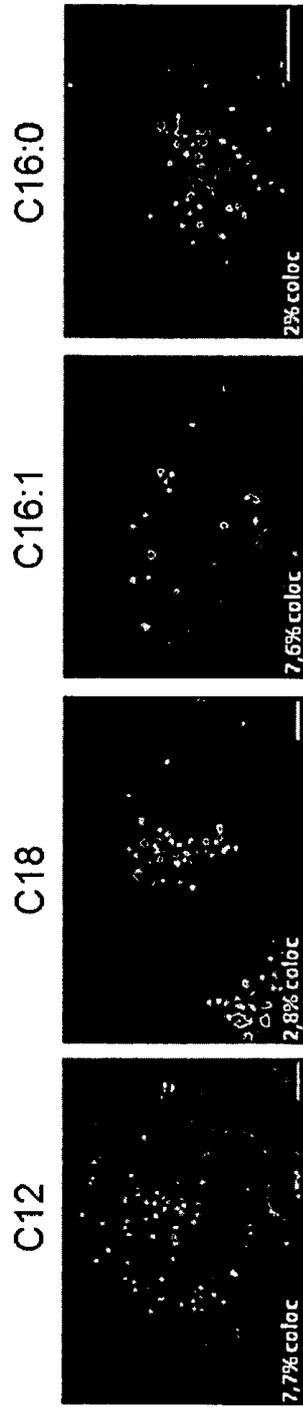


Fig. 16

Endosomas tempranos - Rab 5



Puntos de tiempo temprano
5 minutos a 37°C

Tanto C18 como C12 ingresan
mediante endosomas tempranos

C12
C18
Endosoma temprano
Rab5-GFP

Fig. 17-1

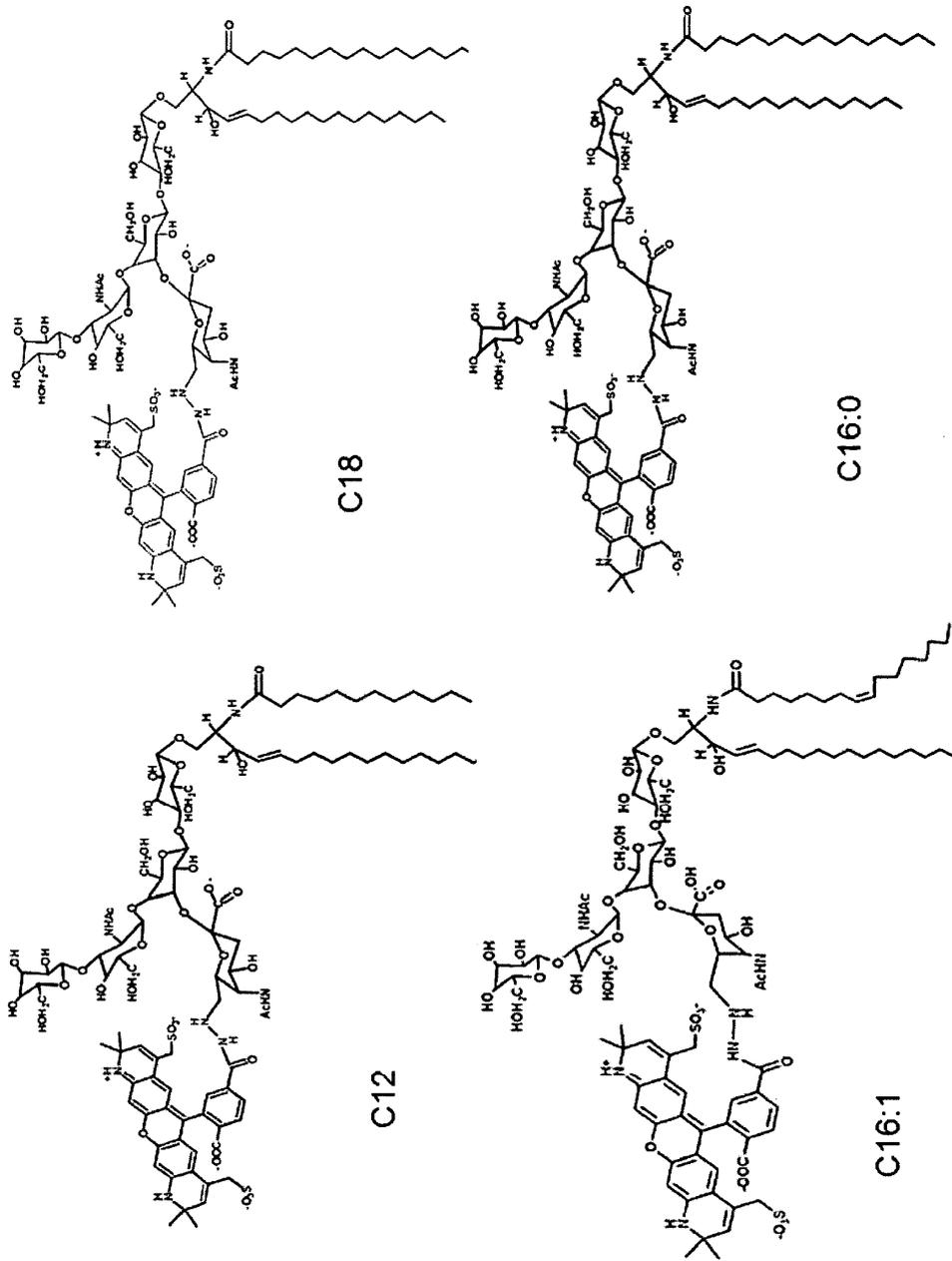


Fig. 17-2

La reticulación por CT no afecta el tráfico de ceramidas de cadena larga

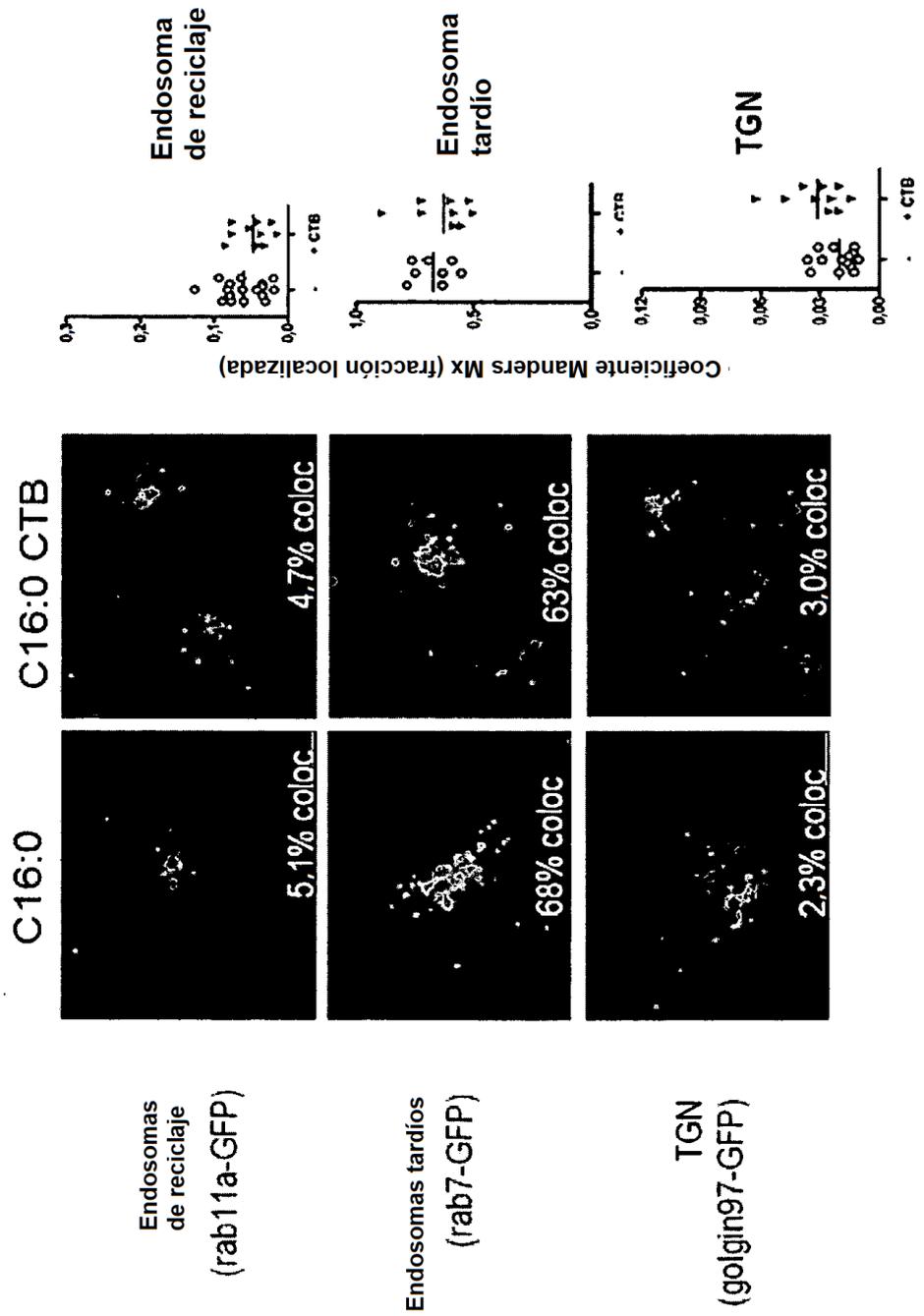


Fig. 18-1

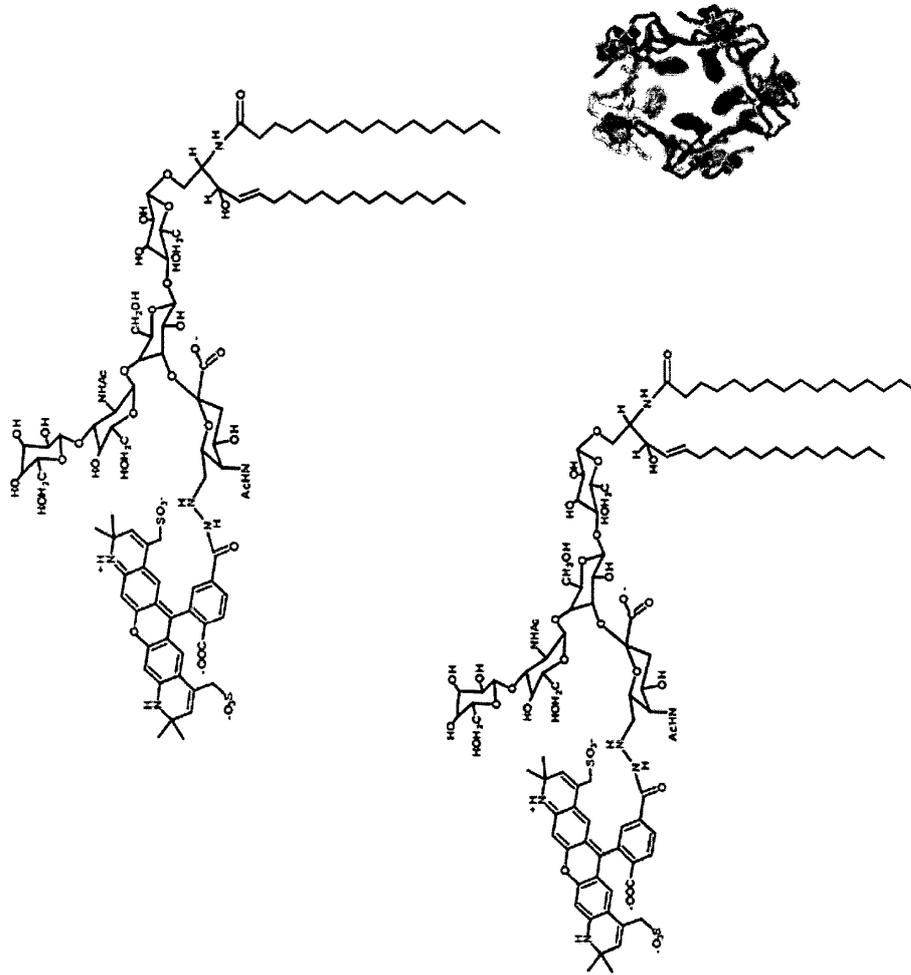


Fig. 18-2

La reticulación por CT redistribuye las ceramidas "torcidas" de RE a LE pero el tráfico hacia TGN permanece inalterado

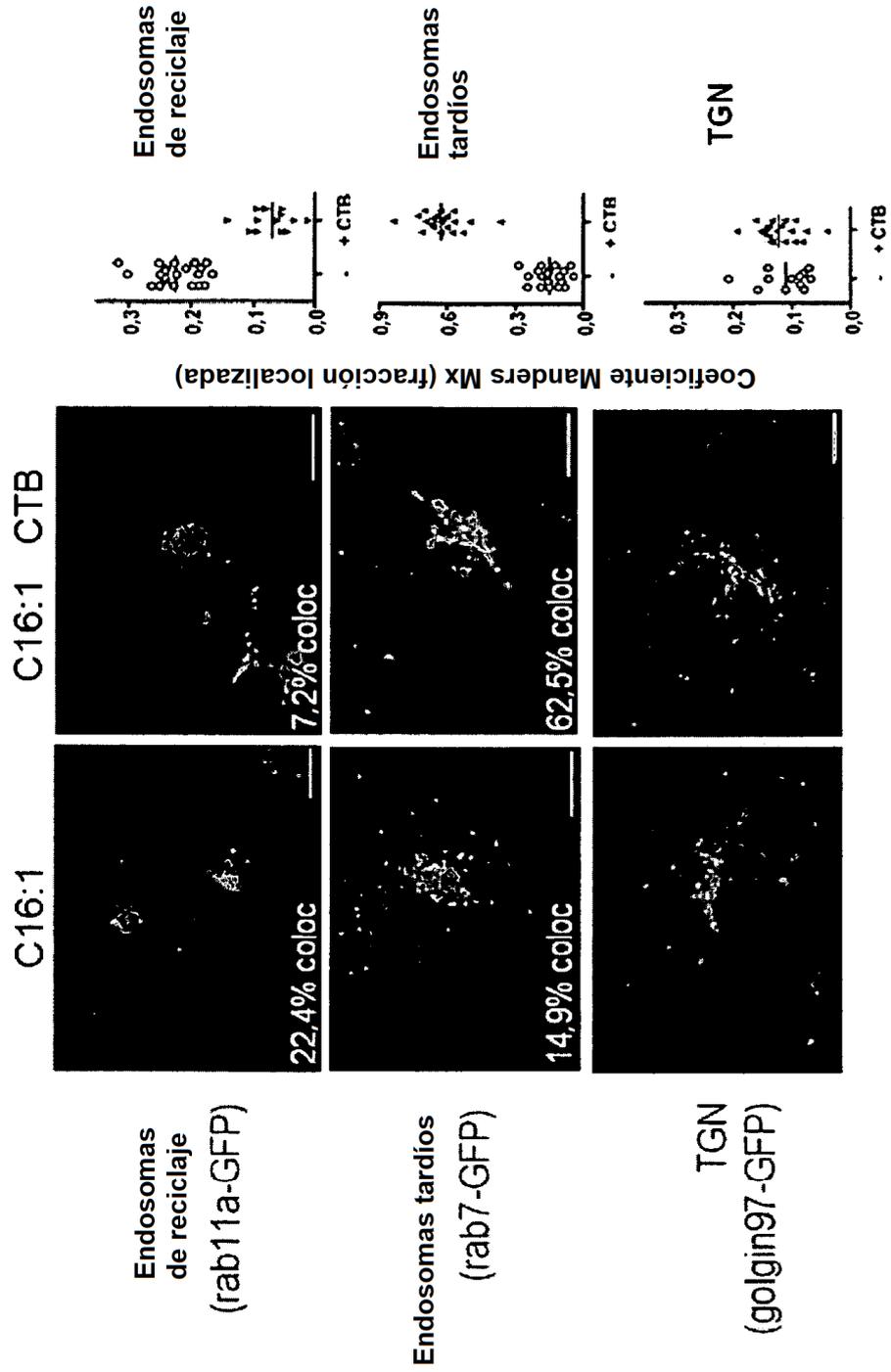


Fig. 19-1

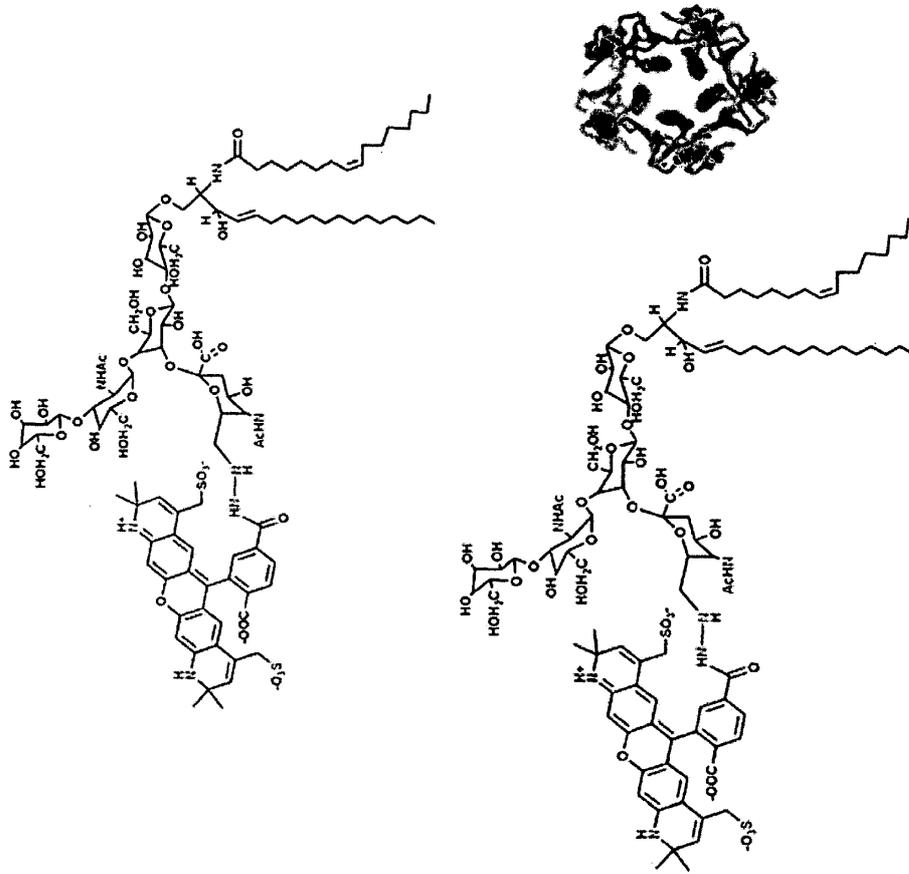


Fig. 19-2

Estos resultados no pueden ser estocásticos:
2 posibilidades para redistribución de RE a LE

La reticulación a GM1 endógeno podría arrastrar el marcador GM1 hacia LE - la cadena larga es dominante

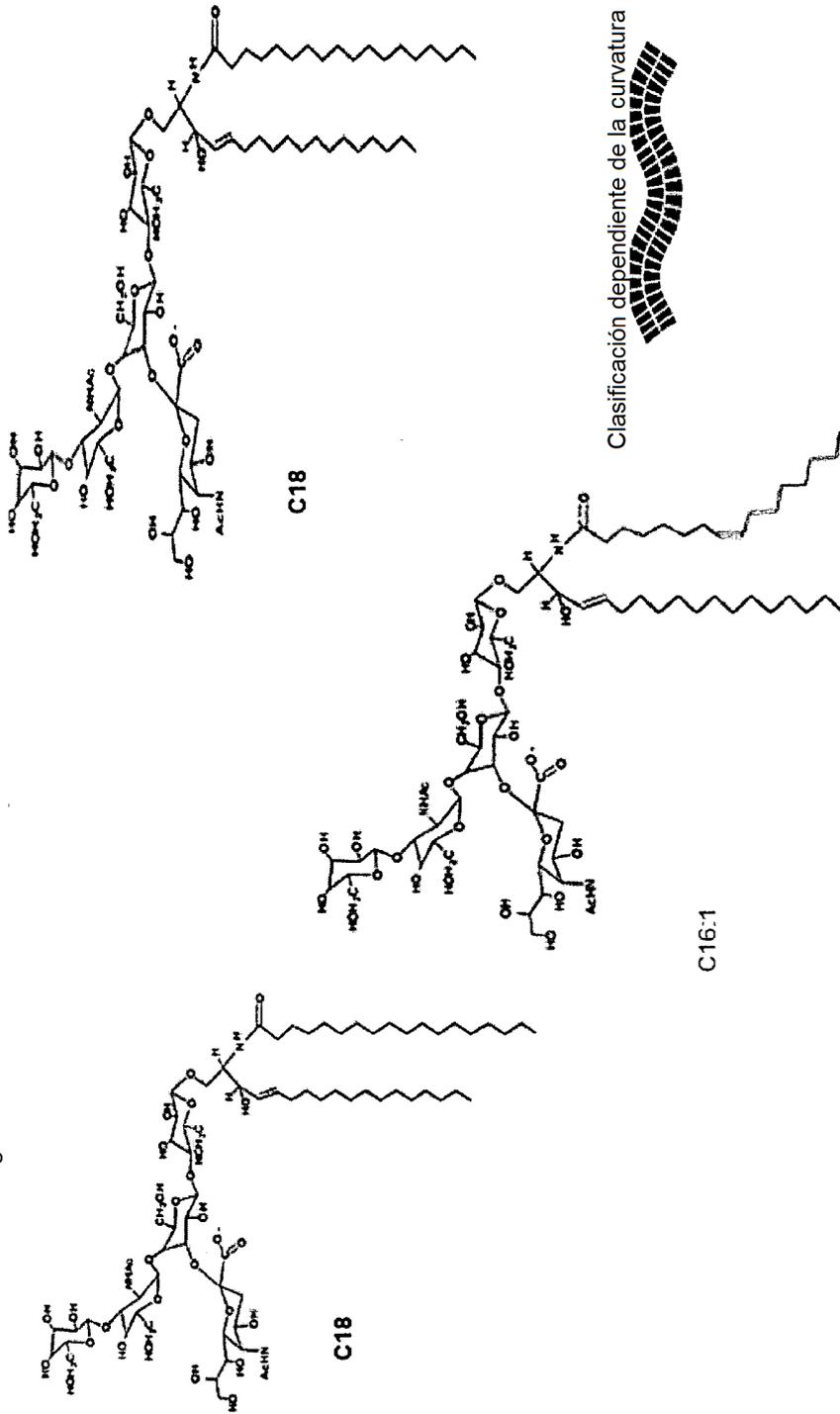
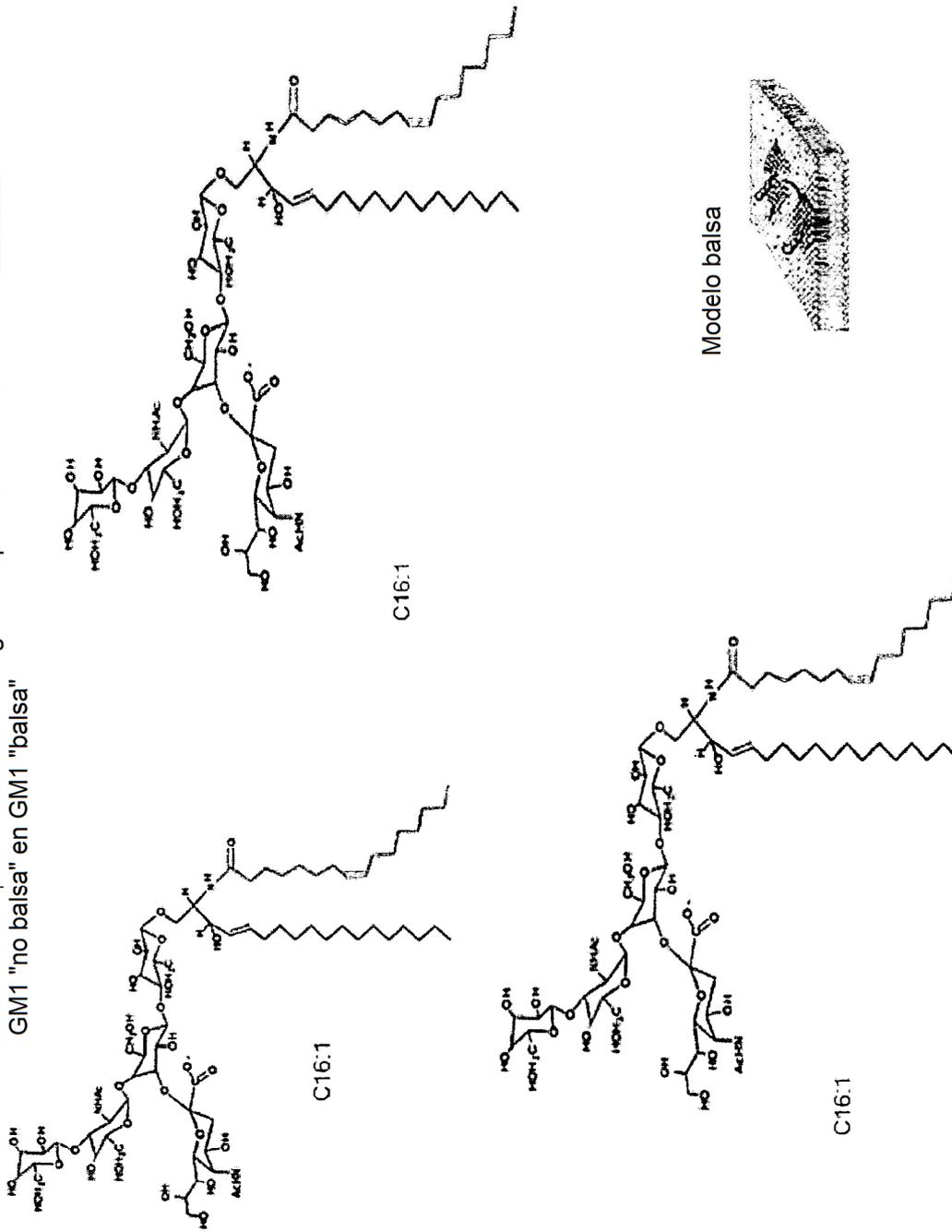


Fig. 20-1

La reticulación podría alterar la biología del lípido de cadena torcida - convierte GM1 "no balsa" en GM1 "balsa"



Modelo balsa

Fig. 20-2

En células que carecen de GM1 - la reticulación de la ceramida "torcida" no tiene ningún efecto sobre el tráfico hacia RE o TGN

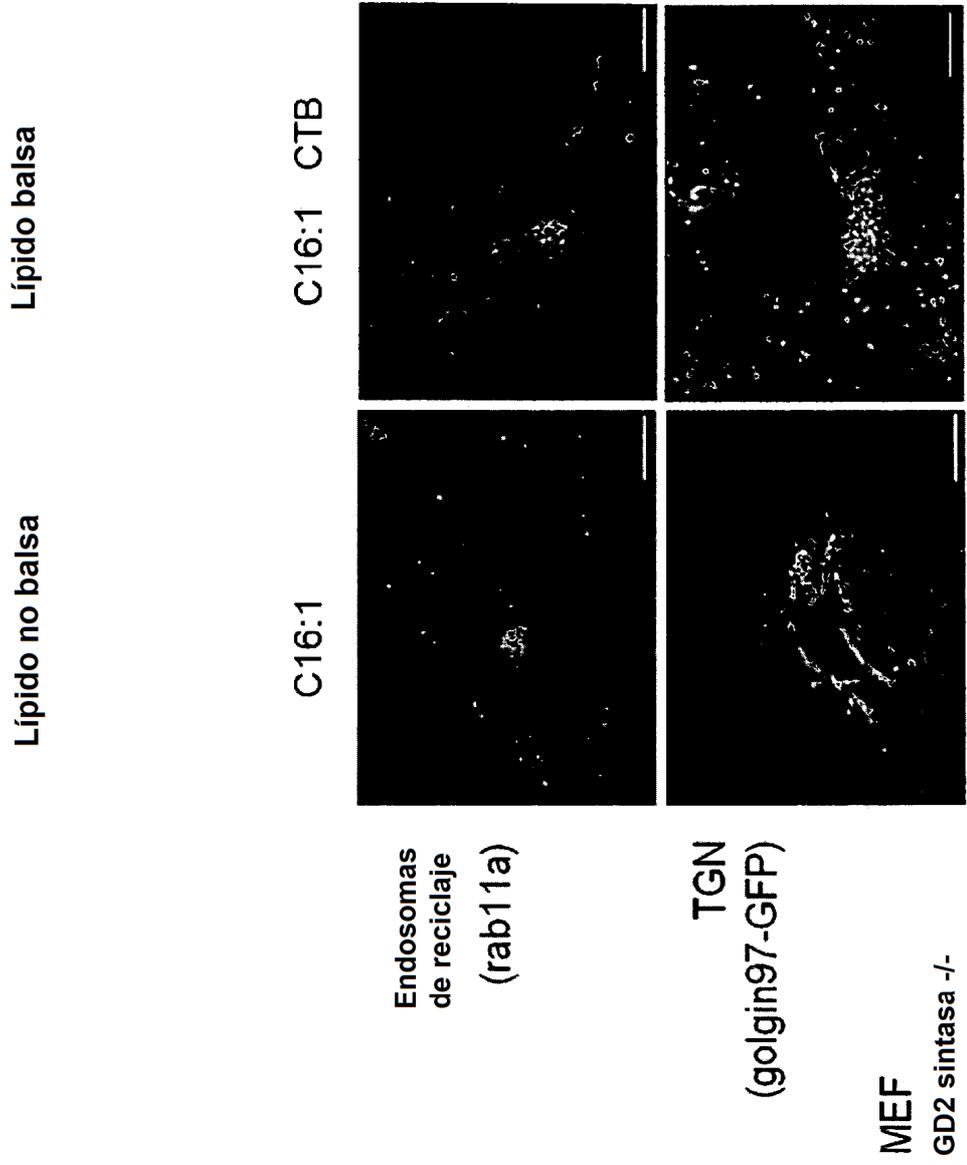


Fig. 21-1

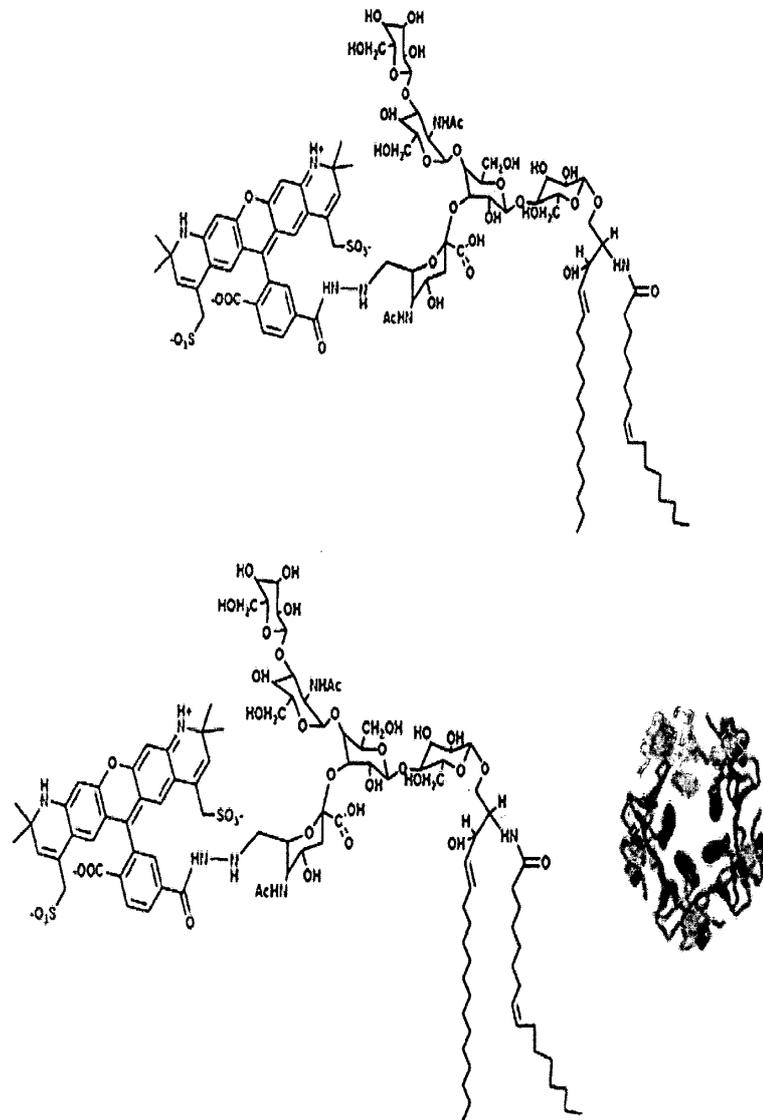


Fig. 21-2

En células que carecen de GM1 - C12-GM1 de cadena corta se desvía fuera de RE después de la reticulación de CTB - pero el tráfico hacia TGN se "rescata"

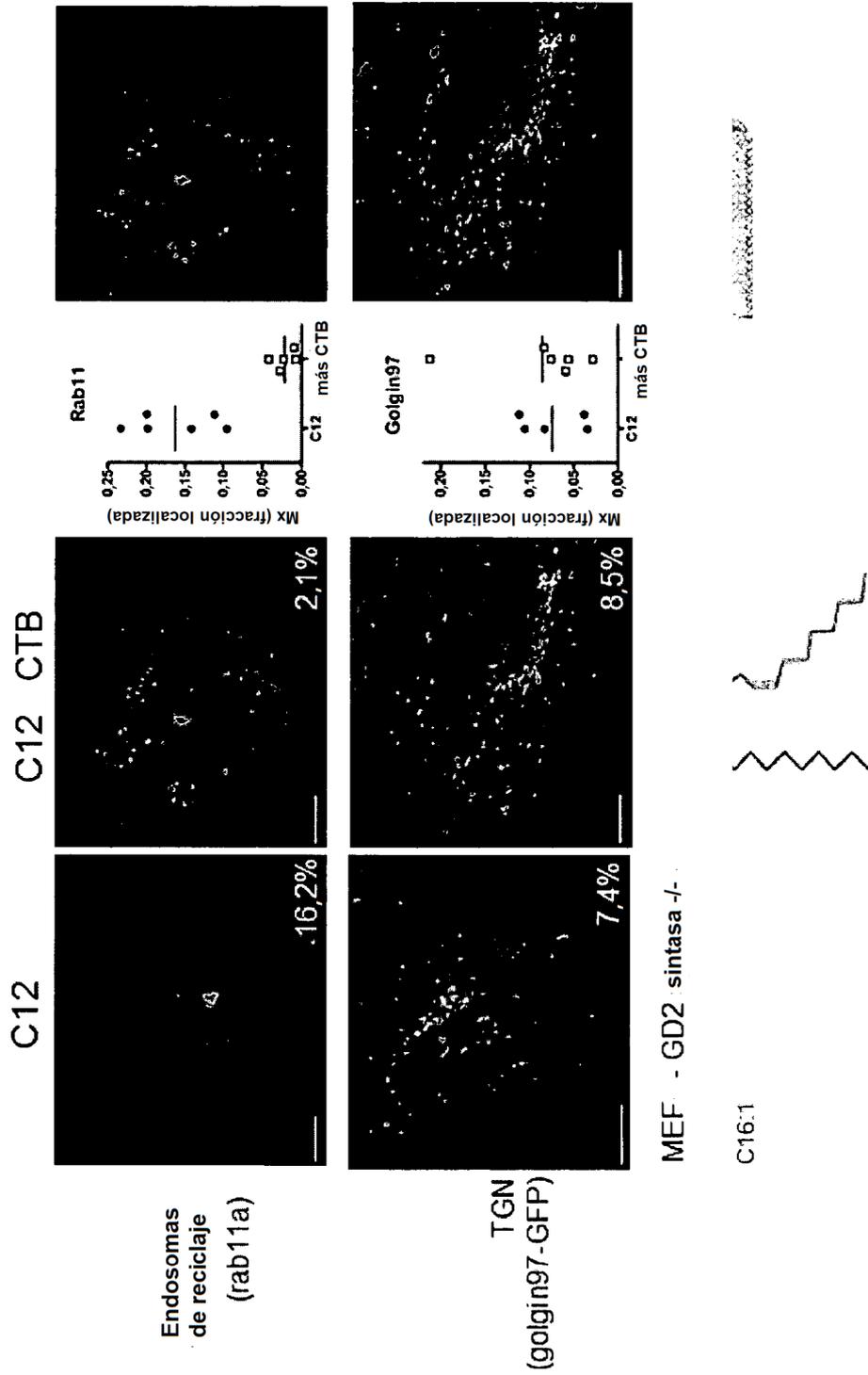


Fig. 22-1

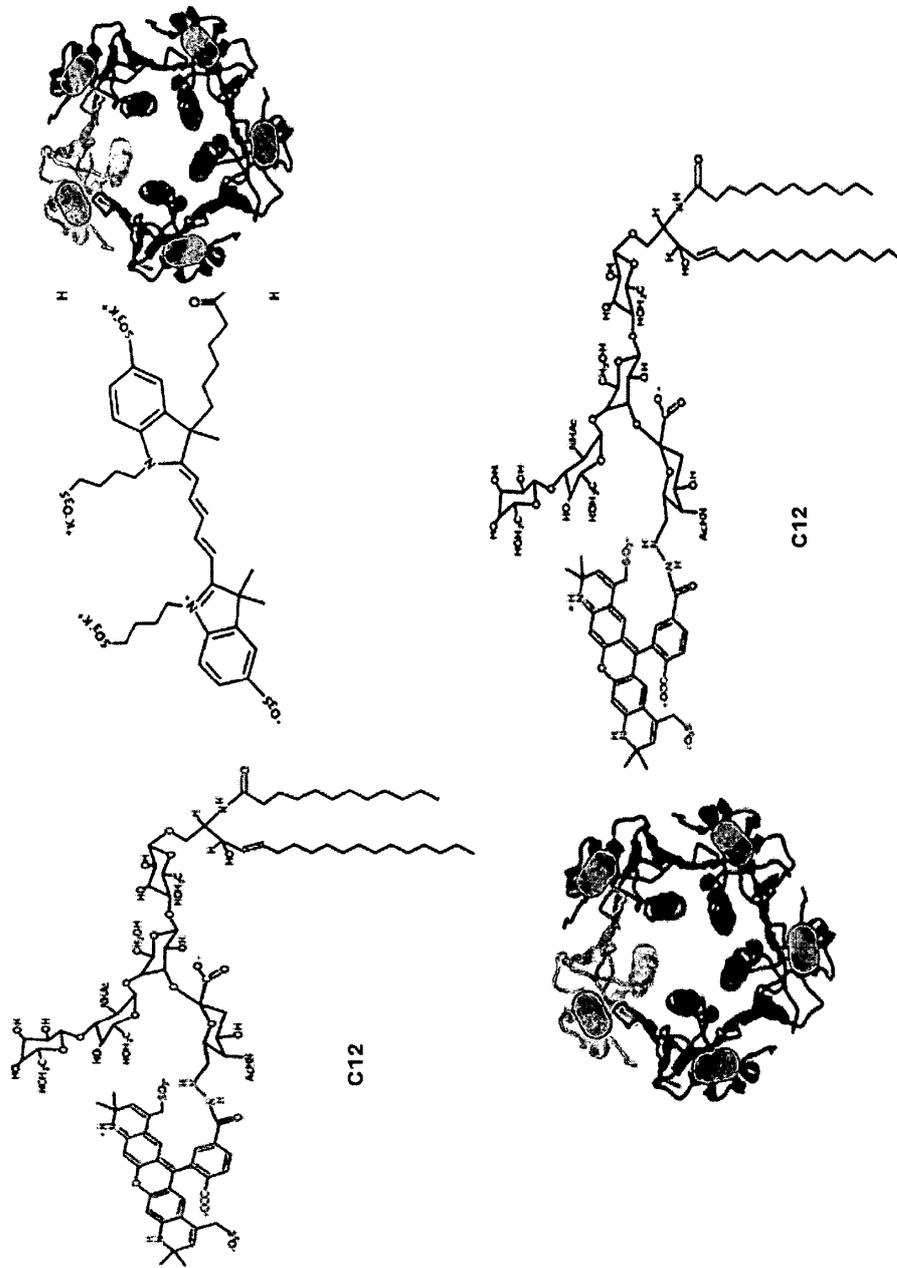


Fig. 22-2

C18 GM1 de cadena larga clasifica fuera de RE o TGN en MEF -
la reticulación no tiene ningún efecto

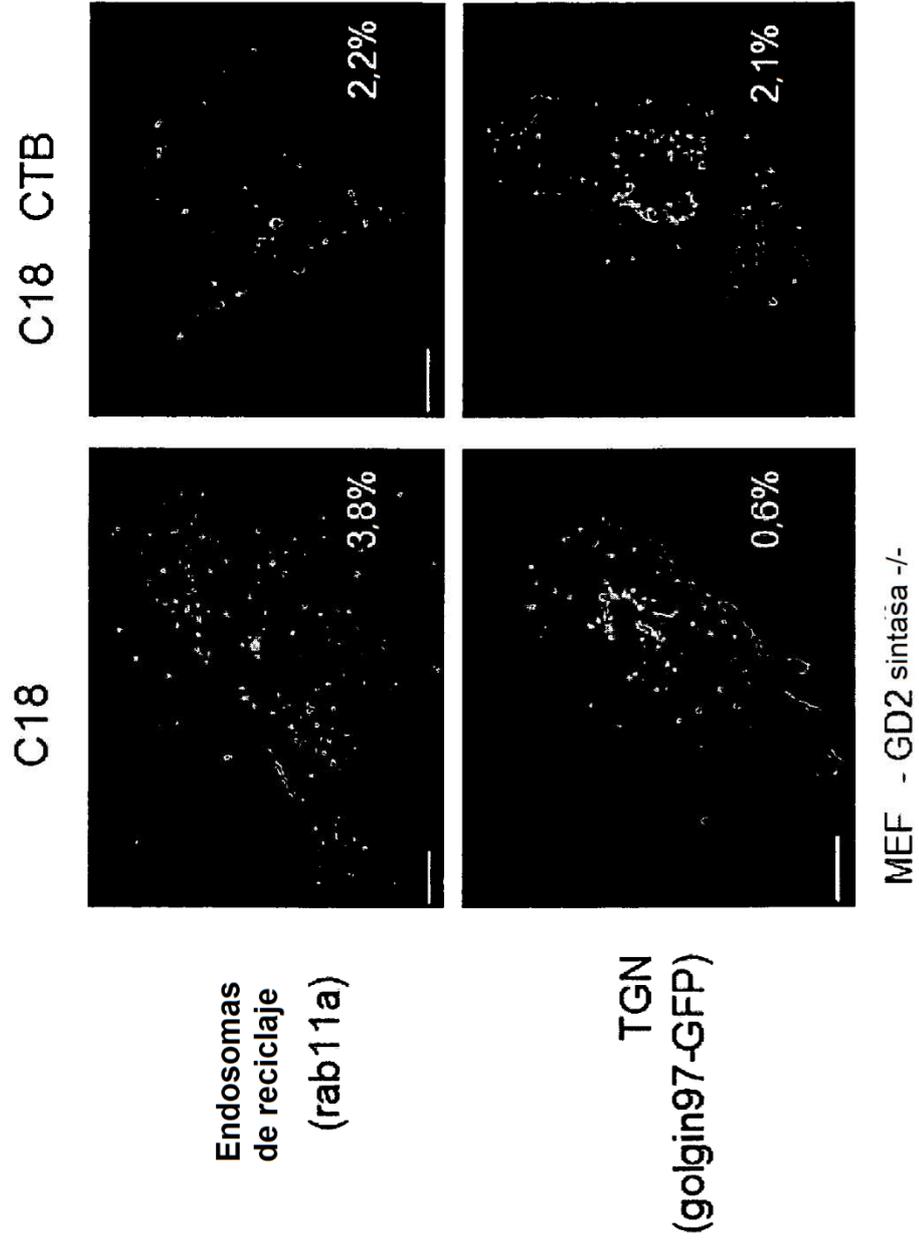


Fig. 23-1

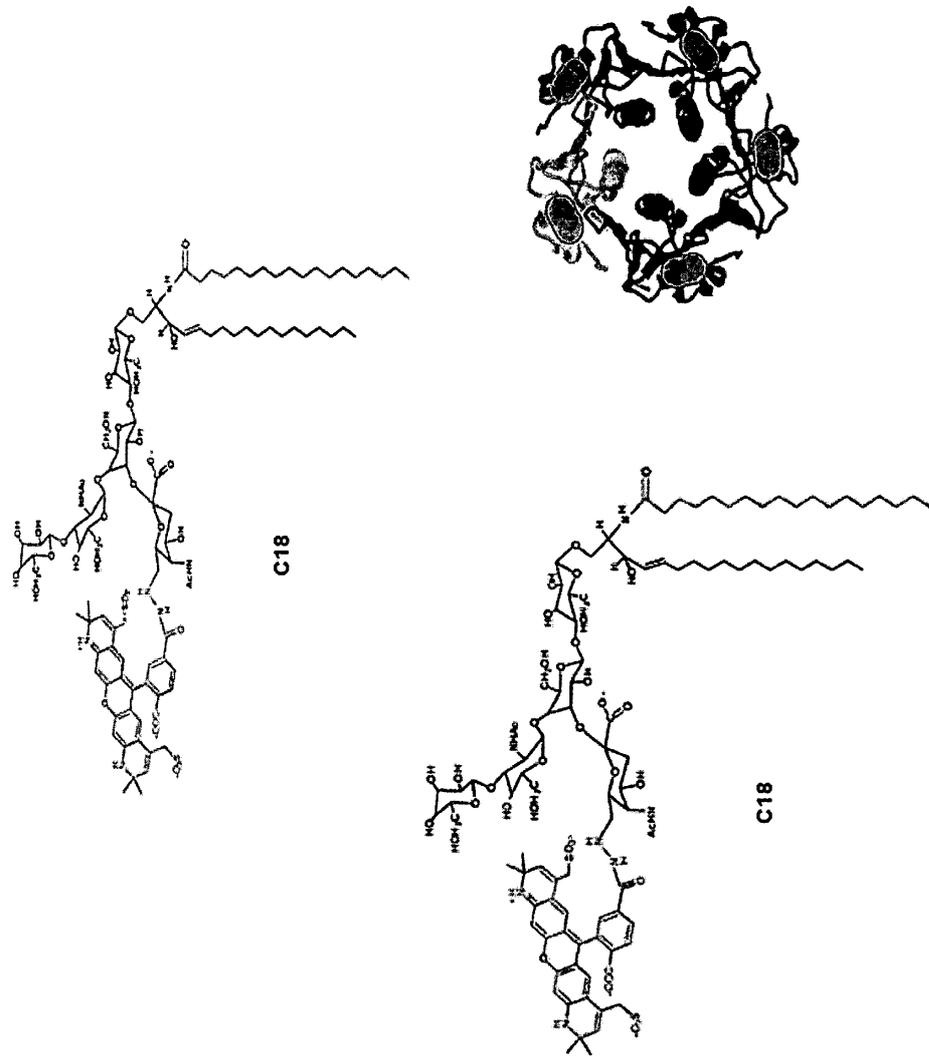


Fig. 23-2

Las ceramidas GM1 de cadena corta e insaturada transportan CT
retrógrado hacia ER

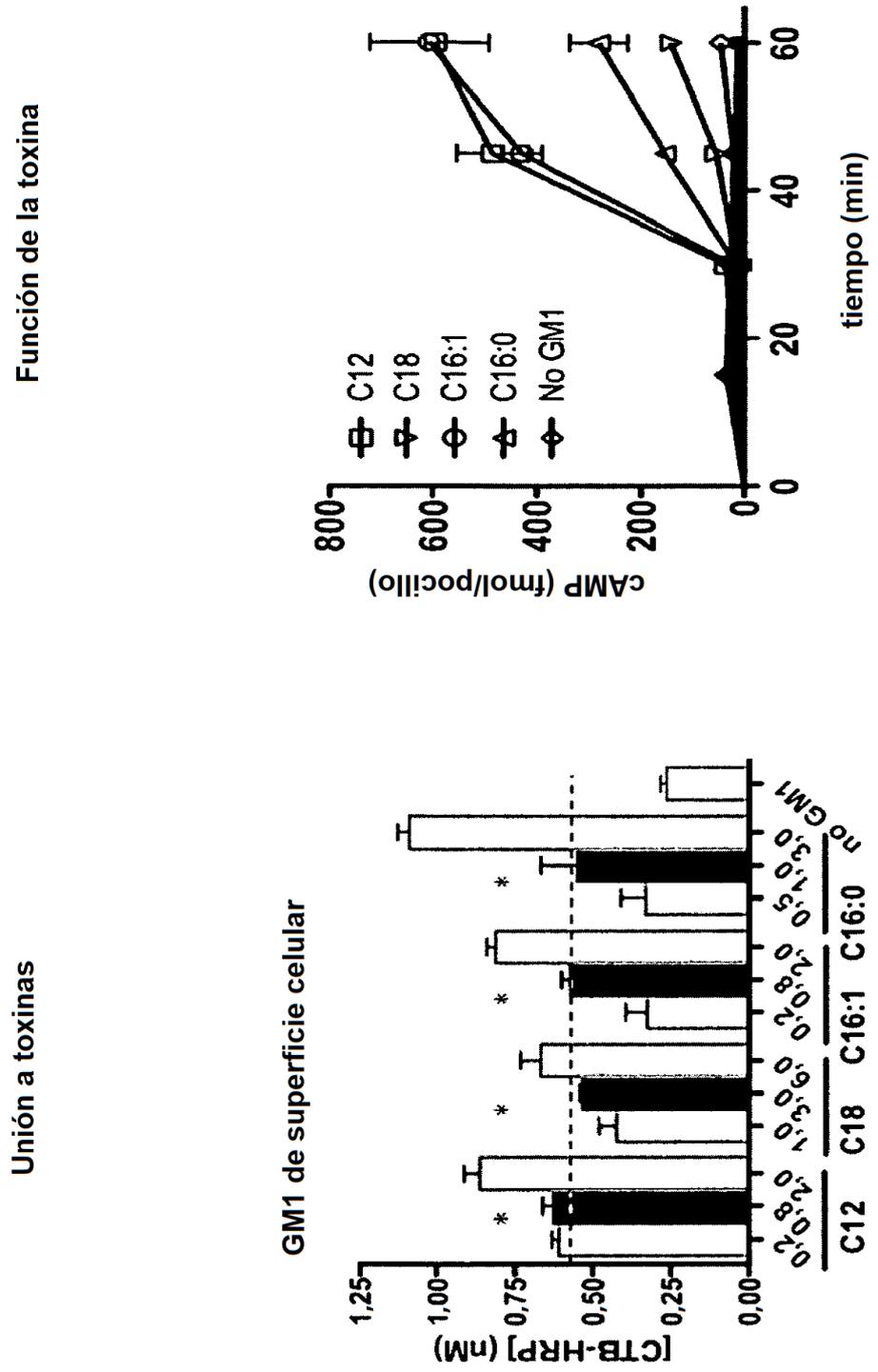


Fig. 24

Brefeldin-A inhibe el transporte de C12-GM1 hacia TGN

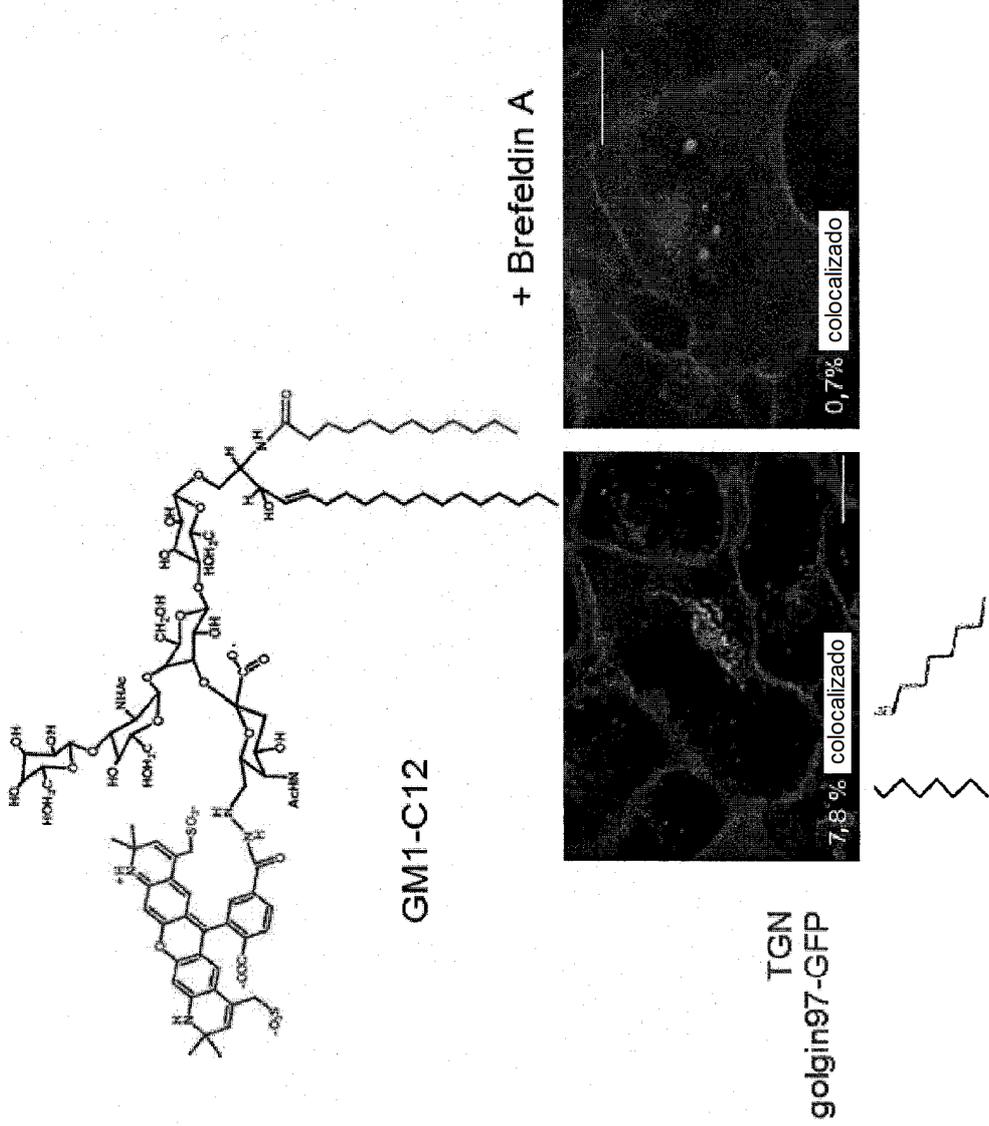


Fig. 26

Curso de tiempo de obtención de imágenes del tráfico de C12-GM1

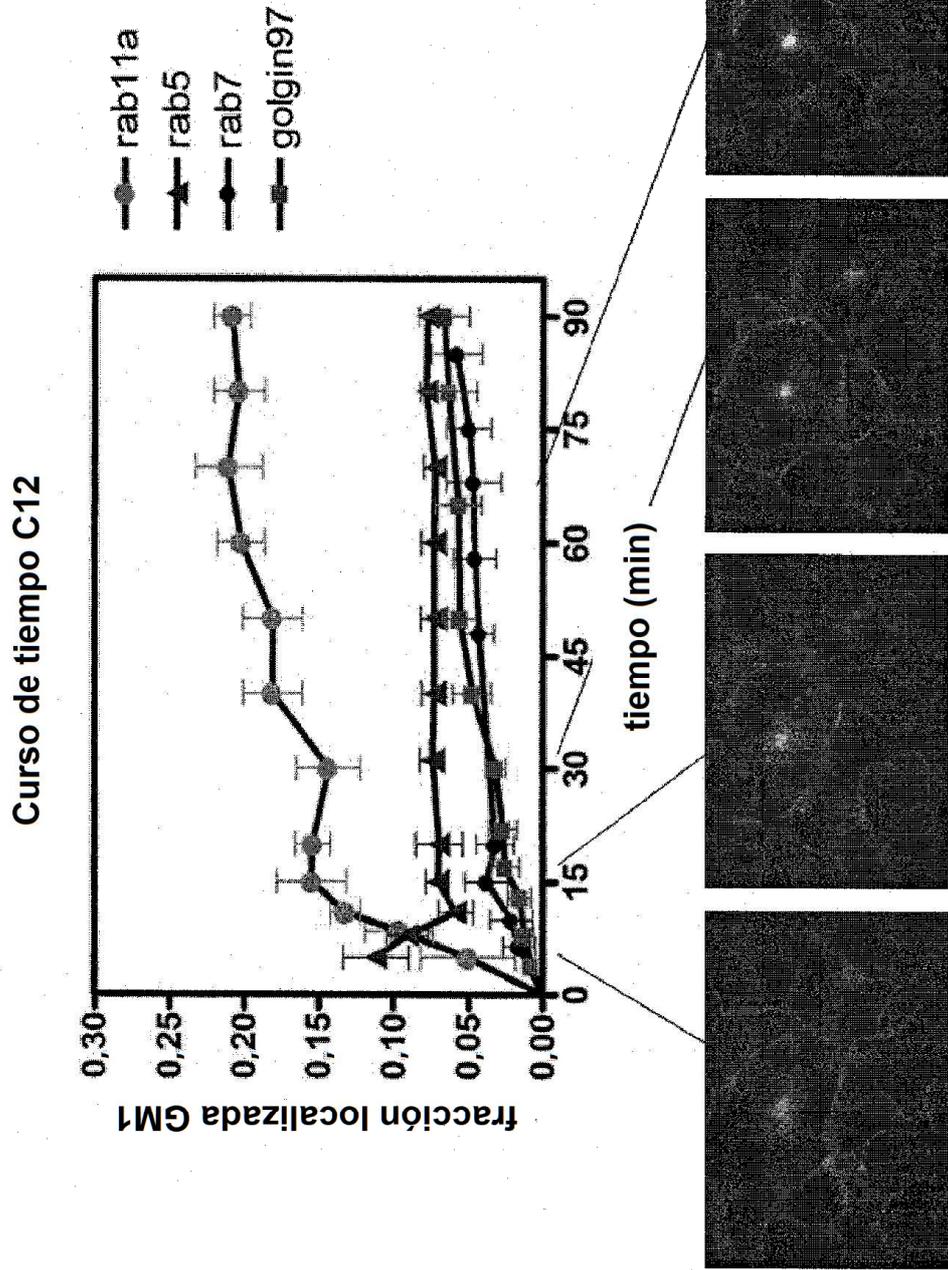


Fig. 27