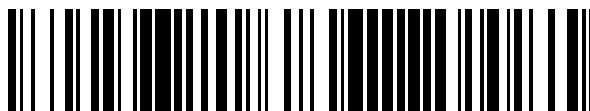


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 864 667**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2014** **PCT/US2014/051532**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015** **WO15024022**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2014** **E 14836047 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.03.2021** **EP 3033108**

54 Título: **Péptidos diseñados para la modulación de la barrera de unión estrecha**

30 Prioridad:

16.08.2013 US 201361866818 P

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

14.10.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF ROCHESTER (100.0%)
601 Elmwood Avenue Box URV
Rochester, NY 14642, US

72 Inventor/es:

MILLER, BENJAMIN, L.;
DE BENEDETTO, ANNA;
BECK, LISA, A. y
ANDERSON, ELIZABETH, A.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 864 667 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

Péptidos diseñados para la modulación de la barrera de unión estrecha

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. de serie 61/866,818, presentada el 16 de agosto de 2013,

- 5 Esta invención se realizó con el apoyo de los Institutos Nacionales de Salud con el número de concesión 5 T32 AR007472-25. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre esta invención.

Campo tecnológico

- 10 En este documento se describen péptidos aislados apropiados de ruptura de una barrera epitelial, formulaciones transepiteliales de fármacos o vacunas, vehículos de administración de fármacos para administrar estas formulaciones y métodos de uso de estas formulaciones de ruptura de una barrera epitelial.

Antecedentes

- 15 La barrera epitelial intacta (por ejemplo, piel) es importante para la salud, ya que funciona para excluir agentes químicos, antígenos y patógenos exógenos del cuerpo (De Benedetto et al., "Skin Barrier Disruption: A Requirement for Allergen Sensitization?", J. Invest. Dermatol. 132:949-963 (2012); O'Neill et al., "Tight Junction Proteins and the Epidermis", Exp. Dermatol. 20:88-91 (2011); Kubo et al., "Epidermal Barrier Dysfunction and Cutaneous Sensitization in Atopic Diseases", J. Clin. Invest. 122:440-447 (2012)). Como tal, impide la administración transdérmica de agentes terapéuticos y vacunas. Para abordar este problema, se ha realizado un esfuerzo extenso y sostenido para desarrollar péptidos que penetran en las células para facilitar la administración transdérmica (Milletti, "Cell-Penetrating Peptides: Classes, Origin, and Current Landscape", Drug Discov. Today 17:850-860 (2012); Stanzl et al., "Fifteen Years of Cell-Penetrating, Guanidinium-Rich Molecular Transporters: Basic Science, Research Tools, and Clinical Applications", Acc. Chem. Res. 46(12):2944-54 (2013)). Si bien este esfuerzo ha producido muchos éxitos notables, una estrategia alternativa es debilitar de manera reversible las interacciones entre las células, lo que permite la administración paracelular sin el uso de péptidos que penetran en las células.

- 25 La barrera paracelular en las capas de células epiteliales se sella mediante uniones estrechas ("TJ"). En la piel, las TJ se forman en el estrato granuloso ("SG") (Yoshida et al., "Functional Tight Junction Barrier Localizes in the Second Layer of the Stratum Granulosum of Human Epidermis", J. Dermatol. Sci. 71(2):89-99 (2013)) e incluso puede persistir en el estrato córneo ("SC") (Haftik et al., "Compartmentalization of the Human Stratum Corneum by Persistent Tight Junction-Like Structures", Exp. Dermatol. 20:617-621 (2011); Sugawara et al., "Tight Junction Dysfunction in the Stratum Granulosum Leads to Aberrant Stratum Corneum Barrier Function in Claudin-1-Deficient Mice", J. Dermatol. Sci. 70(1): 12-18 (2013)). Las TJ y el SC actúan en conjunto para formar la barrera epidérmica.

- 30 Las TJ forman hebras de conjuntos de proteínas en un cinturón ecuatorial alrededor de las células epiteliales. Las claudinas forman un puente sobre el citoesqueleto de actina en la cara citoplasmática (a través de las proteínas de la zona ocluida en la placa TJ), atraviesan la membrana plasmática e interactúan con las claudinas en las células vecinas. Hasta ahora se han identificado al menos 23 claudinas de mamíferos (Van Itallie et al., "Claudin Interactions In and Out of the Tight Junction", Tissue Barriers 1(3): e25247 (2013)). Las claudinas son tetraspaninas, con dos asas extracelulares y un dominio C-terminal citoplasmático largo. En la superficie celular, las claudinas forman dímeros a través de sus dominios extracelulares que se ensamblan con los de la membrana celular opuesta, formando hebras incrustadas en ambas membranas celulares (Kaufmann et al., "Visualization and Quantitative Analysis of Reconstituted Tight Junctions Using Localization Microscopy", PLoS ONE 7:e31128 (2012)). El número y el carácter de estas hebras determina la fuerza de la barrera paracelular. La expresión diferencial de los miembros de la familia de la claudina adapta las características de permeabilidad para cada barrera tisular (intestino frente a piel frente a barrera hematoencefálica) (Anderson et al., "Physiology and Function of the Tight Junction", Cold SpringHarb Perspect Biol. 1(2):a002584-a002584 (2009)). Varias otras proteínas de membrana, incluidas occludina ("Occludin"), tricelulina y JAM-A también participan en el complejo TJ y contribuyen a la función de barrera y a la regulación (Kirschner et al., "Contribution of Tight Junction Proteins to Ion, Macromolecule, and Water Barrier in Keratinocytes", J. Invest. Dermatol. 133:1161-1169 (2013); Cording et al., "In Tight Junctions, Claudins Regulate the Interactions Between Occludin, Tricellulin and MarvelD3, Which, Inversely, Modulate Claudin Oligomerization", J. Cell Sci. 126:554-564 (2013)).

- 35 La claudina 1 ("Cldn1") se expresa en gran medida en el epitelio pulmonar, los queratinocitos epidérmicos y las células dendríticas que pueblan la epidermis (Kast et al., "The Broad Spectrum of Interepithelial Junctions in Skin and Lung", J. Allergy Clin. Immunol. 130:544-546 (2012); Kubo et al., "External Antigen Uptake by Langerhans Cells With Reorganization of Epidermal Tight Junction Barriers", J. Exper. Med. 206:2937-2946 (2009)). El aumento de la expresión de Cldn1 *in vitro* mejora la barrera de permeabilidad paracelular (Pfeiffer et al., "Claudin-1 Induced Sealing of Blood-Brain Barrier Tight Junctions Ameliorates Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis", Acta Neuropathol. 122:601-614 (2011); Inai et al., "Claudin-1 Contributes to the Epithelial Barrier Function in MDCK Cells", European J. Cell Biol. 78:1-7 (1999)). En humanos, se ha informado una deficiencia hereditaria de Cldn1 en el síndrome de ictiosis-hipotricosis-colangitis esclerosante neonatal, que resulta en ictiosis grave y colestasis neonatal (Hadj-Rabia et al., "Claudin-1 Gene Mutations in Neonatal Sclerosing Cholangitis Associated With Ichthyosis: A Tight

Junction Disease", *Gastroenterology* 127:1386-1390 (2004)). Los ratones que carecen de Cldn1 mueren por deshidratación dentro de un día de nacimiento, lo que indica que la proteína es esencial para la barrera cutánea (Yoshida et al., "Functional Tight Junction Barrier Localizes in the Second Layer of the Stratum Granulosum of Human Epidermis", *J. Dermatol. Sci.* 71(2):89-99 (2013); Furuse et al., "Claudin-Based Tight Junctions are Crucial for the Mammalian Epidermal Barrier: A Lesson From Claudin-1-Deficient Mice", *J. Cell Biol.* 156:1099-1111 (2002)). De manera similar, los pacientes con dermatitis atópica ("AD") tienen una mayor pérdida de agua transepidermica y permeabilidad paracelular en la piel no lesionada, y también tienen una expresión de Cldn1 marcadamente reducida (De Benedetto, "Tight Junction Defects in Patients With Atopic Dermatitis", *J. Allergy Clin. Immunol.* 127:773-786.e7 (2010)). El documento US2013/0045267 describe métodos de modulación de la expresión de claudina-1 con el fin de regular la formación de uniones estrechas en queratinocitos u otros tipos de células. El documento WO2013/026896 describe péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de o derivada de una proteína claudina para su uso como agente farmacéutico. Heidi K. Baumgartner et al., "A d-Peptide Analog of the Second Extracellular Loop of Claudin-3 and -4 Leads to Mislocalized Claudin and Cellular Apoptosis in Mammary Epithelial cells", *Chemical Biology & Drug Design* 77, 2, 124-126 (2011) examina el papel de la segunda asa extracelular en claudinas en la adhesión celular mediante el diseño de un péptido pequeño que imita una secuencia conservada dentro de subtipos específicos de claudina "clásica". Denise Zwanziger et al., "A Peptidomimetic Tight Junction Modulator to Improve Regional Analgesia", *Molecular Pharmaceutics*, 9, 6, 1785-1794 (2012) discute los desarrollos de un modulador específico de claudina-1 a través del diseño e investigación del péptido C1C2 derivado de la claudina-1.

Se ha demostrado que los péptidos sintéticos derivados de la secuencia de las asas extracelulares de las proteínas TJ (claudinas y Occludin) rompen la función de barrera a alta concentración por varios grupos de investigación (Wong et al., "A Synthetic Peptide Corresponding to the Extracellular Domain of Occludin Perturbs the Tight Junction Permeability Barrier", *J. Cell Biol.* 136:399-409 (1997); Mrsny et al., "A Key Claudin Extracellular Loop Domain Is Critical for Epithelial Barrier Integrity", *Am. J. Path.* 172:905-915 (2008); Baumgartner et al., "A d-Peptide Analog of the Second Extracellular Loop of Claudin-3 and -4 Leads to Mislocalized Claudin and Cellular Apoptosis in Mammary Epithelial Cells", *Chem. Biol. & Drug Des.* 77:124-136 (2011); Zwanziger et al., "A Peptidomimetic Tight Junction Modulator to Improve Regional Analgesia", *Mol. Pharm.* 9:1785-1794 (2012)). Un péptido de la segunda asa extracelular de claudinas 3 y 4 induce la localización errónea de la claudina y la apoptosis (Baumgartner et al., "A d-Peptide Analog of the Second Extracellular Loop of Claudin-3 and -4 Leads to Mislocalized Claudin and Cellular Apoptosis in Mammary Epithelial Cells", *Chem. Biol. & Drug Des.* 77:124-136 (2011); Beeman et al., "Occludin Is Required for Apoptosis When Claudin-Claudin Interactions are Disrupted", *Cell Death Dis.* 3:e273 (2012)). En células T84 (carcinoma humano trasplantable), se demostró que la aplicación de 25 μ M del péptido Cldn1 (53-80) de rata inhibe la formación de TJ inducida por calcio, y 200 μ M fue capaz de romper las TJ intactas (Mrsny et al., "A Key Claudin Extracellular Loop Domain Is Critical for Epithelial Barrier Integrity", *Am. J. Path.* 172:905-915 (2008)). No se requirieron cisteínas para la ruptura de TJ. El péptido Cldn1 de rata (53-81, C54,64S) rompió las barreras de TJ perineural de Caco-2, HEK-293 y de rata *in vivo* a 200-300 μ M (Zwanziger et al., "A Peptidomimetic Tight Junction Modulator to Improve Regional Analgesia", *Mol. Pharm.* 9:1785-1794 (2012)). Zwanziger, et al. observaron que este péptido tiene una estructura de hoja β cuando se solubiliza con SDS como lo demuestra el dicroísmo circular. El péptido Cldn1 de rata (53-81, C54,64S) colocaliza con Cldn1 y es internalizado por células HEK-293 subconfluentes (Zwanziger et al., "Claudin-Derived Peptides are Internalized Via Specific Endocytosis Pathways", *Ann. NY Acad. Sci.* 1257:29-37 (2012)).

Se requirió una concentración relativamente alta de péptidos probados para inducir la alteración en la apariencia de TJ y aumentar la permeabilidad paracelular en estos estudios previos. No se han identificado previamente péptidos derivados de claudina capaces de romper las TJ a concentraciones bajas o submicromolares. Aparte del conocimiento del dominio de la segunda asa de claudina-1 y su secuencia de aminoácidos, hasta la fecha no se han identificado las características estructurales responsables de la ruptura.

Además, la administración transepitelial (incluida la transdérmica) de agentes terapéuticos o antígenos grandes y/o hidrofílicos no es sencilla debido, por ejemplo, a las funciones de barrera dual de la piel y las mucosas. Un pequeño subconjunto de fármacos de molécula pequeña puede atravesar fácilmente las barreras de las células epiteliales a través del transporte transcelular en virtud de su pequeño tamaño e hidrofobicidad. Las moléculas más grandes o hidrofílicas no atraviesan espontáneamente las membranas celulares y son excluidas por las barreras paracelulares de unión estrecha. La ruptura de la barrera controlada y reversible que permitiría la administración no invasiva de fármacos y vacunas sin aguja es particularmente deseable para antígenos o agentes terapéuticos basados en péptidos/proteínas que no atraviesan fácilmente las membranas celulares.

En este documento se describen péptidos y formulaciones dirigidas a superar estas y otras limitaciones de la técnica.

Resumen

Según los aspectos ilustrados en este documento, se proporciona un agente que rompe transitoriamente la claudina-1 dentro de uniones estrechas. El agente comprende un péptido que incluye una estructura secundaria de hoja β autoensamblada y consiste en la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDLLNLSSTLQATR (SEQ ID NO: 5).

También se describe en este documento un agente que rompe transitoriamente la claudina-1 dentro de uniones estrechas. El agente incluye un péptido que tiene al menos un 40 % de residuos de aminoácidos polares no cargados y una estructura secundaria de hoja β autoensamblada. El péptido no consiste en la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDSSLNLSSTLQATR (SEQ ID NO: 1), SCVSQSTGQIQCKVFDSSLNLSSTLQAT (SEQ ID NO:2), SSVSQSTGQIQSKVFDSSLNLSSTLQAT (SEQ ID NO:3), o SCVSQSTGQ[I/V]QCKVFDSSLNLSSTLQAT (SEQ ID NO:4).

Según otros aspectos ilustrados en este documento, se proporciona una formulación de fármaco transepitelial. La formulación de fármaco transepitelial incluye un portador farmacéuticamente apropiado; una cantidad eficaz de un agente terapéutico; un agente que rompe transitoriamente la claudina-1 dentro de uniones estrechas, en la que el agente comprende un péptido que incluye una estructura secundaria de hoja β autoensamblada y consiste en la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDSSLNLSSTLQATR (SEQ ID NO: 5); y un surfactante seleccionado del grupo que consiste en Pluronic® F-127, Pluronic® F-68, Tween 80, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 184 y poloxámero 188.

Según otros aspectos ilustrados en este documento, se proporciona una formulación de vacuna transepitelial. La formulación de vacuna transepitelial incluye un portador farmacéuticamente apropiado; una cantidad eficaz de un antígeno o de una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno presente en el portador y, opcionalmente, uno o más adyuvantes; un agente que rompe transitoriamente la claudina-1 dentro de uniones estrechas, en la que el agente comprende un péptido que incluye una estructura secundaria de hoja β autoensamblada y consiste en la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDSSLNLSSTLQATR (SEQ ID NO: 5); y un surfactante seleccionado del grupo que consiste en Pluronic® F-127, Pluronic® F-68, Tween 80, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 184 y poloxámero 188.

También se describe un péptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDSSLNLSSTLQATR (SEQ ID NO: 5), SILTGVSTLDQSLKQLSNFSQAVSTQSSR (SEQ ID NO:6), GGMSCVSTGQIQCKV (SEQ ID NO:7), SCVSQSTGQIQCKV (SEQ ID NO:8), RRGSCVSTGQIRRR (SEQ ID NO: 9), ISGVQCCQTKQSS (SEQ ID NO: 10), RRGVCSSSQGRR (SEQ ID NO:11), LWMSSVSTGQIQSKVFD (SEQ ID NO:12), MSSVSTGQIQSKVFD (SEQ ID NO:13), MSSVSTGQIQSKV (SEQ ID NO:14), MSSVSTGQ (SEQ ID NO:15), ISMSQVVSQSGVSDKFST (SEQ ID NO:16), SIMSGKQSSVQSQVT (SEQ ID NO:17), VMSSTSQ (SEQ ID NO:18), VSSSSQ (SEQ ID NO:19), SILTGVST (SEQ ID NO:20), SSVSQSTG (SEQ ID NO:21), GQIQSKVG (SEQ ID NO:22), LNLSTLQG (SEQ ID NO:23), NSVVQSTG (SEQ ID NO:24), GQMQSKVG (SEQ ID NO:25), o SCVSQSTGQIQCKVFDSSLNLSSTLQATR (SEQ ID NO:26).

Según otros aspectos ilustrados en este documento, se proporciona una composición farmacéutica que incluye un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos SSVSQSTGQIQSKVFDSSLNLSSTLQATR (SEQ ID NO: 5), un portador farmacéuticamente apropiado, y un surfactante seleccionado del grupo que consiste en Pluronic® F-127, Pluronic® F-68, Tween 80, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 184 y poloxámero 188.

También se describe un parche transdérmico que incluye (i) un agente que rompe transitoriamente la claudina-1 dentro de uniones estrechas como se describe en este documento, (ii) una formulación de fármaco transepitelial como se describe en este documento, o (iii) una formulación de vacuna transepitelial como se describe en este documento.

Según otros aspectos ilustrados en este documento, se proporciona una formulación para su uso en un método de ruptura de una barrera epitelial. El método incluye aplicar a un sitio epitelial una cantidad de un agente que rompe transitoriamente la claudina-1 dentro de las uniones estrechas como se describe en este documento, donde la aplicación es eficaz para romper la claudina-1 en las células epiteliales presentes en el sitio y de ese modo romper la formación de la barrera en el sitio epitelial, en el que el agente comprende un péptido que incluye una estructura secundaria de hoja β autoensamblada y consiste en la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDSSLNLSSTLQATR (SEQ ID NO: 5).

En este documento descrito, también se proporciona un método de administración de una formulación de fármaco transepitelial a un sujeto. El método incluye aplicar la formulación de fármaco transepitelial como se describe en este documento a un sitio epitelial en el sujeto.

En este documento descrito, también se proporciona un método de administración de una formulación de vacuna transepitelial a un sujeto. El método incluye aplicar la formulación de vacuna transepitelial como se describe en este documento a un sitio epitelial en el sujeto.

Los aspectos ilustrados en este documento usan péptidos con propiedades fisicoquímicas definidas para romper reversiblemente la función de TJ, que controla la difusión paracelular en las células epiteliales. Estos péptidos representan una nueva clase de amiloide funcional no patógeno. Como se describe en este documento, la estructura de los péptidos disruptores de TJ y su mecanismo de acción se examinó mediante el estudio de las características biológicas y biofísicas del péptido humano homólogo hCldn1 (53-81, C54,64S) (SEQ ID NO: 5) (referido en este documento como "Péptido 1a"). Se encontró que, cuando se solubiliza en presencia de surfactante, el péptido 1a rompe las TJ en células cultivadas a una concentración dos órdenes de magnitud menor que la reportada previamente para péptidos Cldn1 (Mrsny et al., "A Key Claudin Extracellular Loop Domain Is Critical for Epithelial Barrier Integrity",

Am. J. Path. 172:905-915 (2008); Zwanziger et al., "A Peptidomimetic Tight Junction Modulator to Improve Regional Analgesia", Mol. Pharm. 9:1785-1794 (2012)). La caracterización biofísica indica que el péptido 1a puede formar fibrillas de tipo amiloide ricas en estructura secundaria de hoja β . Como se describe en este documento, un péptido codificado previamente desconocido con contenido de aminoácidos, hidrofobicidad y pl, pero secuencia aleatoria (designado como Péptido 2a), también adopta una conformación de hoja β , forma fibrillas y rompe TJ.

Como se muestra en los Ejemplos, *infra*, se sintetizaron péptidos basados en Cldn1 y se analizaron sus propiedades estructurales y biofísicas, así como su capacidad para alterar las TJ. Usando una línea celular epitelial bronquial humana (16HBE), se sintetizaron el péptido claudina y su análogo codificado, los cuales rompen las TJ de una manera dependiente de la dosis en concentraciones de un orden de magnitud inferior a lo que se ha informado con otros péptidos Cldn1. La exposición a péptidos también rompe la función de barrera paracelular, lo que permite la difusión de moléculas que varían en tamaño y alcance desde la fluoresceína hasta un anticuerpo terapéutico, sin evidencia de citotoxicidad. La resistencia eléctrica transepitelial ("TER") se recupera después de la eliminación de los péptidos. La exposición a péptidos altera los patrones de expresión de Cldn1 y ocludina, como se observa mediante tinción de inmunofluorescencia. Cuando se solubilizó en surfactante, tanto un péptido Cldn1 como su correspondiente análogo codificado formaron fibrillas espontáneamente. El dicroísmo circular y la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier demuestran que estas fibrillas son ricas en estructura secundaria de hoja β , y la difracción de rayos X en polvo es consistente con estructuras β cruzadas. Estas fibrillas se unen a la tioflavina T, un tinte que se considera diagnóstico de amiloide. La observación de que el péptido codificado funciona al menos tan bien como la secuencia Cldn1 en la ruptura de la barrera, además de adoptar una conformación similar, indica la existencia de una clase completamente nueva de péptidos formadores de amiloide, y descubre una nueva estrategia para mejorar la administración transepitelial de moléculas terapéuticas.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1C son ilustraciones esquemáticas de TJ en la epidermis, así como claudina-1, péptido 1 y péptido 2 (que se describen con más detalle a continuación) (Figuras 1A y 1B), así como una tabla de otros péptidos que muestran evidencia de autoensamblaje (Figura 1C). Los esquemas de TJ en la epidermis, Cldn1 en TJ y péptidos usados en los experimentos descritos en este documento se muestran en las figuras 1A-1B. La figura 1B es un esquema ampliado que muestra que las TJ epidérmicas forman una barrera paracelular entre los queratinocitos en la SG. Los SC y TJ actúan en conjunto para formar la barrera cutánea; L, célula de Langerhans; SS, estrato espinoso; SB, estrato basal; BM, membrana basal. Cldn1 se autoensambla e interactúa con otras proteínas TJ principalmente a través de su primer asa extracelular en el espacio paracelular. El extremo C-terminal de Cldn1 está anclado al citoesqueleto de actina a través de las proteínas de la placa TJ citoplasmática. El péptido 1 representa la mitad de la primera asa extracelular de Cldn1 humana, con sus residuos Cys mutados a Ser (hCldn1 (53-81, C54,64S)) (SEQ ID NO:5). El péptido 2 es una secuencia codificada (SEQ ID NO: 6). R = H o biotina-N-propargilglicina. Péptidos de ejemplo adicionales que han mostrado evidencia de autoensamblaje y son útiles de acuerdo con las realizaciones ilustradas en este documento se encuentran en la figura 1C.

Las figuras 2A-2B muestran imágenes de microscopía de inmunofluorescencia de proteínas TJ en células 16HBE. Las células 16HBE no tratadas se tiñeron para: Claudina 1 (Cldn1, verde) y zona ocludens-1 (ZO-1, rojo) (Figura 2A), así como Claudina 4 (Cldn4, verde) y ocludina (Ocln, rojo) (Figura 2B). Se usaron los siguientes anticuerpos (Invitrogen): anti-Claudina I de conejo, # 18-7362; anti-Claudina 4 de ratón, # 32-9400; anti-Ocln de conejo, # 71-1500; anti-ZO-1 de ratón, # 33-9100; anti-Ocln de ratón, # 33-1500; anti-conejo Alexafluor®-488, # A21206; anti-conejo Alexafluor®-568, # A10042; anti-ratón Alexafluor®-488, # A21202; antimouse Alexafluor®-568, # A10037. Barra de escala = 25 μ m.

Las figuras 3A-3E son gráficos que representan resultados experimentales de resistencia eléctrica transepitelial ("TER") y ensayos de permeabilidad para el péptido 1a (péptido Cldn1) y 2a (péptido codificado), que muestran una reducción dependiente de la dosis en la función de barrera. Se midió TER (Figuras 3A y 3B) durante la exposición al péptido. Los datos se normalizaron al control del vehículo (n = 8). La figura 3C muestra resultados experimentales en los que, después de 24 horas de exposición, se determinó la difusión paracelular de fluoresceína sódica o FITC-dextrano (FD-40) al medio basolateral después de 30 minutos (n = 4). Las concentraciones de surfactante se mantuvieron constantes en ausencia (vehículo) y presencia del péptido. Las barras de error representan el error estándar de la media ("SEM"); * indica significación estadística relativa al vehículo (P < 0.05, prueba T de dos colas); y ND significa que no hay datos disponibles. La figura 3D muestra un gráfico de barras de resultados experimentales que demuestra que la aplicación del péptido 1a (péptido Cldn1) y 2a (péptido codificado) facilita la difusión de un anticuerpo monoclonal terapéutico (168 kD). Después de 24 horas de exposición al vehículo o péptido (concentración constante del surfactante), se aplicó apicalmente mAb Synagis marcado con fluorescencia apicalmente y se determinó la difusión al medio basolateral después de 30 minutos o 18 horas (n = 4). Las barras de error representan SEM, y * indica significación estadística relativa al vehículo (P < 0.05, prueba T de dos colas). La figura 3E muestra la permeabilidad de FITC-dextrano después de 18 horas de difusión para los péptidos 1a y 2a. Se agregó fluoresceína dextrano (40 kD) en PBS al medio apical después de 24 h de exposición al péptido 1a de Cldn1 o al péptido codificado 2a (concentración apical final de FD-40 de 600 μ g/mL). Se recogió medio basolateral después de 18 horas de incubación y se normalizó la fluorescencia al control positivo (células lisadas con Triton-X100 al 1 %).

Las figuras 4A-4B son gráficos que representan resultados experimentales de TER y ensayos de permeabilidad para péptidos marcados 1b y 2b. Los resultados de la figura 4A indican que los péptidos marcados provocan la ruptura de la barrera, medida por la disminución de TER. Se muestra un experimento representativo ($n = 2$). La figura 4B muestra la permeabilidad a la fluoresceína para los péptidos marcados 1b y 2b.

- 5 Las figuras 5A-5C son gráficos de barras de resultados experimentales. Las figuras 5A-5B son gráficos de barras de resultados que muestran que la función TJ se recupera en cultivos de 16HBE después de la eliminación de péptidos. No se observaron alteraciones en el metabolismo de WST1 con 1, 4, 12 (experimento representativo mostrado en la figura 5A) o 24 horas de exposición a los péptidos 1a y 2a. (U, medio sin tratar; V, vehículo; L, células lisadas; 1a (Cldn1, sección central del gráfico, 0.024-12 μM); o 2a (Codificado, sección derecha del gráfico, 0.024 a 12 μM)). La figura 5B muestra resultados que demuestran que la función de barrera se recupera después de eliminar los péptidos 1a (sección izquierda del gráfico, 0.024 a 12 μM) o 2a (sección derecha del gráfico 0.024 a 12 μM); las barras claras indican los valores medios de TER después de la exposición al péptido, mientras que las barras oscuras indican los valores medios de TER después del lavado del péptido y una incubación adicional de 24 h. Las líneas horizontales grises indican los valores medios de TER para el vehículo. Las barras de error representan la SEM ($n = 4$). La figura 5C muestra los resultados relacionados con el estudio de oligómeros citotóxicos mediante el ensayo WST1 (tomado de 130908RM). Las reservas de péptidos se diluyeron en medio tibio y se agregaron directamente a las células sin incubación. Después de 12 h de exposición, se agregó el reactivo WST1 y se evaluó colorimétricamente la actividad metabólica celular. Los oligómeros amiloides son intermedios de plegamiento transitorio que pueden causar toxicidad a través de la ruptura de la membrana, mientras que las fibrillas son termodinámicamente estables. Como se esperaba, se observó citotoxicidad después de la incubación de células con concentraciones bajas de 1a (1.2 μM) y 2a (200 nM) recién diluidas que tenían suficiente oportunidad de equilibrarse. (Las barras oscuras indican el péptido 1a, las barras claras el péptido 2a).

- 25 La figura 6A-6H muestran imágenes de inmunofluorescencia que demuestran que el péptido 1a de CLDN1 y el péptido 2a mezclado rompen las TJ en cultivos de 16HBE. Imágenes de inmunofluorescencia de superposición de Cldn1 (verde) y Ocln (rojo) endógenas en TJ (Figuras 6A-6D). El péptido Cldn1 marcado (rojo) (1b) y codificado (2b) se colocaliza con Cldn1 endógeno (verde) en cultivos de 16HBE después de 4 horas de exposición (Figuras 6E-6H). Las imágenes corresponden a los cultivos incubados con lo siguiente: Las figuras 6A y 6E, medios sin tratar; Las figuras 6B y 6F, control de vehículo que contiene 0.006 % de Pluronic® F-127 y 0.03 % de DMSO; 7C y 7G, 2.4 μM 1b; o 7D y 7H, 2.4 μM 2b. Barra de escala = 25 μm .

- 30 Las figuras 7A-7F son imágenes que muestran que los péptidos 1a (Cldn1) y 2a (codificado) forman fibrillas de hasta 1 μm de longitud visualizadas por TEM y cristales en forma de aguja de hasta 680 μm de longitud en cuestión de horas. Se muestra lo siguiente: 1a (figuras 7A, 7C y 7E) y 2a (figuras 7B, 7D y 7F): TEM (figuras 7A-7D), barra de escala = 100 nm; cristales (Figuras 7E y 7F), barra de escala = 100 μm .

- 35 Las figuras 8A-8E son gráficos de resultados que muestran que las fibrillas de 1a (estrella) y 2a (cuadrado) tienen estructura de hoja β . La figura 8A-8C, así como gráficos que muestran los resultados de los experimentos de CD (Figura 8D) y los espectros FITR de los péptidos marcados 1b y 2b (Figura 8E). La difracción de rayos X en polvo de fibrillas liofilizadas (Figura 8A) indica espaciamientos d de 4.6 Å, característico del espaciado periódico del esqueleto en la estructura de hoja β extendida. La estructura de hoja β significativa es evidente por los mínimos a 218 nm en diámetro circular (Figura 8B). El pico de amida I a 1628 cm^{-1} en los espectros de transmisión FTIR (Figura 8C) es característico de las hojas β antiparalelas. La figura 8D muestran los resultados de un experimento de CD. CD de los péptidos marcados 1b y 2b (1 μM). Los péptidos se diluyeron en solución reguladora de fosfato 48 horas antes de tomar los espectros (en una cubeta de 1 cm de longitud de recorrido). La figura 8E incluye gráficos que muestran los espectros FTIR de los péptidos marcados 1b y 2b.

- 45 La figura 9 muestra la difracción de rayos X de los cristales del péptido 1a (fuente de rayos X interna). Los cristales se cultivaron en PBS que contenía glicerol al 25 %, durante 24 horas. Los cristales planos y en forma de aguja dieron patrones de difracción similares, con reflejos de 4.3 (izquierda) y 3.7 (derecha) Å resaltados.

- 50 Las figuras 10A-10B son gráficos que muestran los resultados de la unión de tioflavina T de 1 y 2. Se prepararon reservas de péptidos 20x en pluronic® F-127 al 0.12 % y se incubaron 24 horas a temperatura ambiente. Las reservas se diluyeron en ya sea medio PBS (Figura 10A) o DMEM (Figura 10B) que contenía suero al 1 % que contenía tioflavina T 10 μM y se incubaron a 4 °C, durante 48 horas antes de la fluorimetría. Todas las concentraciones probadas mostraron fluorescencia de tioflavina T estadísticamente significativa en comparación con el control del vehículo ($P < 0.005$, $n = 4$). Las barras de error representan desviaciones estándar. Tener en cuenta que los ejes Y no están en la misma escala.

- 55 Las figuras 11A-11F son gráficos que ilustran los resultados experimentales de los experimentos de permeabilidad a la luciferasa. Se trataron ratones (4 ratones por grupo) después de la anestesia en la cavidad nasal con vehículo solo (Pluronic F127 al 0.006 % en solución salina) o con concentraciones variables de péptido. Después de 12 o 24 horas, se aplicó una solución de 10 microgramos de luciferasa. A continuación, se obtuvieron imágenes de los ratones en diversos momentos para determinar la cantidad de luciferasa que quedaba en la cavidad nasal. Como se muestra en

las figuras 11A-11F, la aplicación del péptido 1A dio como resultado una tendencia de mayores cantidades de luciferasa perdidas de la cavidad nasal, consistente con un aumento de la permeabilidad mediado por péptidos.

Las figuras 12A-12E son gráficos que muestran resultados experimentales de experimentos de inmunización con hemaglutinina de influenza. Se trataron ratones (4 ratones por grupo) en la cavidad nasal con vehículo solo (Pluronic F127 al 0.006 % en solución salina), vehículo más hemaglutinina (HA) de la influenza o vehículo más HA más un agente permeabilizante (péptidos 1A o 2A, o potenciador derivado de semen de la infección por virus (SEVI)). Los títulos de anticuerpos contra HA en suero se evaluaron los días 18, 28 y 35 después del tratamiento, y se determinaron IgG e IgA específicas de HA en el lavado bronquial el día 48 después del tratamiento. Tanto los títulos de anticuerpos séricos (Figuras 12A-12C) como los anticuerpos específicos de HA en el lavado bronquial (Figuras 12D y 12E) muestran una tendencia de mejora en presencia de péptidos 1A o 2A, consistente con un aumento dependiente de péptidos en la liberación de antígenos.

Las figuras 13A-13D muestran vistas en perspectiva desde abajo (Figura 13A) y en sección transversal (Figuras 13B, 13C y 13D) de una realización de un parche transdérmico según los aspectos ilustrados en este documento.

Descripción detallada

Los aspectos ilustrados en este documento se refieren a agentes que alteran la función de barrera de unión estrecha ("TJ") en células epiteliales, particularmente en aquellas células epiteliales que expresan claudina-1 ("Cldn1"), así como composiciones y productos que incluyen tales agentes, y usos de estos.

El término epitelio se usa en su sentido habitual y se refiere al epitelio, la capa exterior de células que cubre todas las superficies libres y abiertas del cuerpo, incluidas las membranas cutáneas (piel) y mucosas. El término transepitelial se refiere a la entrada de una sustancia tal como un fármaco, vacuna o agente activo a través del epitelio, incluida la aplicación tópica directa y la aplicación usando un material de soporte tal como un parche.

Los péptidos y composiciones descritos en este documento también son útiles para alterar la permeabilidad de los vasos sanguíneos y la barrera hematoencefálica.

De acuerdo con lo anterior, según los aspectos ilustrados en este documento, se proporciona un agente que rompe transitoriamente la claudina-1 dentro de las TJ. El agente comprende un péptido que incluye una estructura secundaria de hoja β autoensamblada y consiste en la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDLLNLSSTLQATR (SEQ ID NO: 5).

De los péptidos descritos en este documento, en una realización, el péptido tiene baja solubilidad en medios acuosos en ausencia de surfactante. En otra realización, el péptido es insoluble en medio acuoso en ausencia de surfactante.

Los péptidos descritos en este documento se pueden asociar o unir a claudina-1 nativa dentro de la TJ.

En una realización, el péptido descrito en este documento tiene una secuencia de aminoácidos que no se encuentra de forma natural en la claudina-1.

Por ejemplo, los péptidos descritos en este documento pueden ser una forma codificada de una secuencia de aminoácidos de claudina-1, donde la secuencia de aminoácidos de claudina-1 incluye al menos 6 residuos de aminoácidos de una región de asa extracelular de claudina-1.

Como se usa en este documento, una forma "codificada" de un péptido se refiere a un péptido que tiene el mismo o sustancialmente el mismo contenido de aminoácidos (es decir, una o dos sustituciones dependiendo de la longitud del péptido) como el péptido fuente o de referencia (por ejemplo, fragmento de claudina-1 de origen natural), pero una secuencia primaria diferente de residuos de aminoácidos.

En los péptidos descritos en este documento, la secuencia de aminoácidos de claudina-1 de la que se deriva el péptido codificado puede ser una proteína de claudina-1 de mamífero. En una realización, la secuencia de aminoácidos de claudina-1 de la que se deriva el péptido codificado es una proteína claudina-1 humana. La secuencia de aminoácidos de claudina-1 puede incluir una o más sustituciones de cisteína a serina.

En los péptidos descritos en este documento, el péptido codificado puede tener la misma hidrofobicidad y/o pI que el péptido del que se deriva.

En este documento se describen péptidos codificados que incluyen la secuencia de aminoácidos de SILTGVSTLDQSLKQLSNFSQAVSTQSSR (SEQ ID NO:6), ISGVQCCQTKQSS (SEQ ID NO:10), RRGVCSSSQGR (SEQ ID NO:11), ISMSQVVSQSGVSDKFST (SEQ ID NO:16), SIMSGKQSSVQSQVT (SEQ ID NO:17), VSMSSSTQ (SEQ ID NO:18), VSSSSQ (SEQ ID NO:19), o SILTGVST (SEQ ID NO:20).

También se describe en este documento un agente que incluye una pluralidad de péptidos y la pluralidad de péptidos forma una o más fibrillas. En una realización, uno o más de los péptidos experimentan un autoensamblaje espontáneo

en ensamblajes supramoleculares estructurados. En otra realización, uno o más de los péptidos experimentan un ensamblaje conjunto en fibrillas amiloides estructuradas.

La secuencia de aminoácidos de los péptidos descritos en este documento puede incluir al menos 45 %, al menos 46 %, al menos 47 %, al menos 48 %, al menos 49 %, al menos 50 %, al menos 51 %, al menos 52 %, al menos 53 %, al menos 54 %, al menos 55 %, al menos 56 %, al menos 57 %, al menos 58 %, al menos 59 %, al menos 60 %, al menos 61 %, al menos 62 %, al menos 63 %, al menos 64 %, al menos 65 %, al menos 66 %, al menos 67 %, al menos 68 %, al menos 69 %, al menos 70 %, al menos 71 %, al menos 72 %, al menos 73 %, al menos 74 %, al menos 75 %, al menos 76 %, al menos 77 %, al menos 78 %, al menos 79 %, al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, o al menos 90 % de residuos de aminoácidos no cargados.

En los péptidos descritos en este documento, la secuencia de aminoácidos del péptido puede incluir al menos un residuo de aminoácido hidrófobo. En una realización, el péptido incluye al menos dos residuos de aminoácidos hidrofóbicos. En una realización, el péptido incluye al menos un 25 % o al menos un 30 % de contenido de residuos de aminoácidos hidrofóbicos. En una realización, el péptido incluye al menos un 31 % de contenido de residuos de aminoácidos hidrofóbicos.

La secuencia de aminoácidos del péptido puede incluir una secuencia de aminoácidos de al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, o al menos 30 residuos de aminoácidos. En una realización, el péptido incluye una secuencia de aminoácidos de 6 a 30 residuos de aminoácidos. En una realización, el péptido incluye una secuencia de aminoácidos de 6 a 29 residuos de aminoácidos. En una realización, el péptido incluye una secuencia de aminoácidos de menos de 53 residuos de aminoácidos.

En una realización, el péptido no es una secuencia polipeptídica de una proteína claudina 1 de origen natural. En una realización, el péptido no es una secuencia polipeptídica de un dominio de asa extracelular (por ejemplo, el segundo dominio de asa extracelular) de una proteína claudina 1 de origen natural. En una realización, el péptido no es una secuencia polipeptídica de una proteína claudina 1 de origen natural, o un dominio de asa extracelular de la misma, que incluye una o más sustituciones de cisteína a serina.

[PÁRRAFO EN BLANCO]

[PÁRRAFO EN BLANCO]

Los péptidos descritos en este documento pueden incluir la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDLLNLSSTLQATR (SEQ ID NO: 5), SILTGVSTLDQSLKQLSNFSQAVSTQSSR (SEQ ID NO:6), GGMSCVQSSTGQIQCKV (SEQ ID NO:7), SCVQSSTGQIQCKV (SEQ ID NO:8), RRGSCVQSQSGRR (SEQ ID NO: 9), ISGVQCCQTKQSS (SEQ ID NO: 10), RRGVCSSSQGRR (SEQ ID NO:11), LWMSSVSQSTGQIQSKVFD (SEQ ID NO:12), MSSVSQSTGQIQSKVFD (SEQ ID NO:13), MSSVSQSTGQIQSKV (SEQ ID NO:14), MSSVSQST (SEQ ID NO:15), ISMSQVSVQSGVSDKFST (SEQ ID NO:16), SIMSGKQSSVQSQVT (SEQ ID NO:17), VSMSSTSQ (SEQ ID NO:18), VSSSSQ (SEQ ID NO:19), SILTGVST (SEQ ID NO:20), SSVSQSTG (SEQ ID NO:21), GQIQSKVG (SEQ ID NO:22), LNLSTLQG (SEQ ID NO:23), NSVVQSTG (SEQ ID NO:24), GQMMSKVG (SEQ ID NO:25), o SCVQSSTGQIQCKVFDLLNLSSTLQATR (SEQ ID NO:26). El péptido puede incluir GGMSCVQSST-11 12 GQIQCK (SEQ ID NO:28); GGSCVQS (SEQ ID NO:29); RRGSCVQSSTGQIQCKGRR (SEQ ID NO:30), o RRGISGVQCCQTKQSSGRR (SEQ ID NO:31).

También el péptido descrito, puede incluir un residuo de aminoácido de metionina adicional en la posición N-terminal. El péptido puede incluir una versión modificada de SEQ ID NO: 26 y la secuencia de aminoácidos de MSCVQSSTGQIQCKVFDLLNLSSTLQATR (SEQ ID NO:27). Esta misma modificación se puede realizar en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-31. Se contemplan otras modificaciones en los extremos N- y/o C-terminales del péptido, que incluyen, por ejemplo, palmitoilo, Nilo, Npg o combinaciones de los mismos. Aunque se describen modificaciones de ejemplo, se contemplan otras modificaciones.

También se describen en este documento péptidos que están en forma aislada. En una realización, el péptido aislado incluye la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDLLNLSSTLQATR (SEQ ID NO: 5), SILTGVSTLDQSLKQLSNFSQAVSTQSSR (SEQ ID NO:6), GGMSCVQSSTGQIQCKV (SEQ ID NO:7), SCVQSSTGQIQCKV (SEQ ID NO:8), RRGSCVQSQSGRR (SEQ ID NO: 9), ISGVQCCQTKQSS (SEQ ID NO: 10), RRGVCSSSQGRR (SEQ ID NO:11), LWMSSVSQSTGQIQSKVFD (SEQ ID NO:12), MSSVSQSTGQIQSKVFD (SEQ ID NO:13), MSSVSQSTGQIQSKV (SEQ ID NO:14), MSSVSQST (SEQ ID NO:15), ISMSQVSVQSGVSDKFST (SEQ ID NO:16), SIMSGKQSSVQSQVT (SEQ ID NO:17), VSMSSTSQ (SEQ ID NO:18), VSSSSQ (SEQ ID NO:19), SILTGVST (SEQ ID NO:20), SSVSQSTG (SEQ ID NO:21), GQIQSKVG (SEQ ID NO:22), LNLSTLQG (SEQ ID NO:23), NSVVQSTG (SEQ ID NO:24), GQMMSKVG (SEQ ID NO:25), o SCVQSSTGQIQCKVFDLLNLSSTLQATR (SEQ ID NO:26). También se describen péptidos aislados que incluyen la secuencia de aminoácidos de GGMSCVQSSTGQIQCK (SEQ ID NO:28); GGSCVQS (SEQ ID NO:29); RRGSCVQSSTGQIQCKGRR (SEQ ID NO:30), o RRGISGVQCCQTKQSSGRR (SEQ ID NO:31).

Los péptidos descritos en este documento (incluidos los péptidos aislados) también se pueden presentar en forma de un péptido de fusión que incluye, además, una segunda secuencia de aminoácidos acoplada a los péptidos de la invención mediante un enlace peptídico. La segunda secuencia de aminoácidos puede ser una etiqueta de purificación, tal como poli-histidina (His₆-), una glutatión-S-transferasa (GST-) o una proteína de unión a maltosa (MBP-), que ayuda en la purificación pero que posteriormente puede ser eliminada, es decir, escindida del péptido después de la recuperación. Se pueden introducir sitios de escisión específicos de proteasa (es decir, en una secuencia enlazante escindible) entre la etiqueta de purificación y el péptido deseado. El producto peptídico deseado se puede purificar más para eliminar las etiquetas de purificación escindidas.

Según un enfoque, los péptidos descritos en este documento se pueden sintetizar mediante operaciones estándar de síntesis de péptidos. Estos incluyen protocolos de síntesis de Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) y tBoc (terc-butiloxycarbonilo) que se pueden llevar a cabo en instrumentos automatizados de síntesis de péptidos en fase sólida, incluidos, sin limitación, los sintetizadores Applied Biosystems 431 A, 433 A y Peptide Technologies Symphony. o sintetizadores de péptidos en fase sólida automatizados Sonata o CEM Liberty a gran escala. También se contempla el uso de instrumentos alternativos de síntesis de péptidos. Los péptidos preparados usando síntesis en fase sólida se recuperan en una forma sustancialmente pura.

Los péptidos descritos en este documento también se pueden preparar usando sistemas de expresión recombinantes seguidos de la separación y purificación de los péptidos preparados de forma recombinante. Generalmente, esto implica insertar una molécula de ácido nucleico codificante en un sistema de expresión al que la molécula es heteróloga (es decir, no está normalmente presente). Una o más moléculas de ácido nucleico deseadas que codifican un péptido descrito en este documento se pueden insertar en el vector. La molécula de ácido nucleico heteróloga se inserta en el sistema de expresión o vector en la orientación del sentido apropiado (5'-3') y el marco de lectura correcto en relación con el promotor y cualquier otra molécula reguladora 5' y 3'.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos descritos en este documento se pueden preparar mediante síntesis en fase sólida usando, por ejemplo, el método de la fosforamidita y los componentes básicos de la fosforamidita derivados de 2'-desoxinucleósidos protegidos. Para obtener el oligonucleótido deseado, los componentes básicos se acoplan secuencialmente a la cadena de oligonucleótidos en crecimiento en el orden requerido por la secuencia del producto. Una vez completado el ensamblaje de la cadena, el producto se libera de la fase sólida a la solución, se desprotege, se recolecta y por lo general se purifica usando HPLC. Los límites de la síntesis en fase sólida son apropiados para preparar oligonucleótidos de hasta aproximadamente 200 nt de longitud, que codifican péptidos del orden de aproximadamente 65 aminoácidos o menos. Los extremos del oligonucleótido sintetizado se pueden diseñar para incluir un sitio de escisión de enzima de restricción específico para facilitar la unión del oligonucleótido sintetizado en un vector de expresión.

Para péptidos más largos, los oligonucleótidos se pueden preparar mediante síntesis en fase sólida y luego las secuencias de oligonucleótidos sintéticos se ligan entre sí usando diversas técnicas. Las técnicas recombinantes para la fabricación de genes sintéticos completos se revisan, por ejemplo, en Hughes et al., "Chapter Twelve - Gene Synthesis: Methods and Applications", *Methods in Enzymology* 498:277-309 (2011).

Una vez que se selecciona un vector de expresión apropiado, las secuencias de ácido nucleico deseadas se clonan en el vector usando procedimientos de clonación estándar en la técnica, como describen Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Laboratory, Cold Springs Harbor, N.Y. (1989), o la Patente de los Estados Unidos No. 4,237,224 de Cohen and Boyer. A continuación, se introduce el vector en un huésped apropiado.

Se puede usar una variedad de sistemas huésped-vector para expresar de forma recombinante los péptidos descritos en este documento. Principalmente, el sistema de vectores debe ser compatible con el huésped usado. Los sistemas huésped-vector incluyen, sin limitación, los siguientes: bacterias transformadas con ADN de bacteriófago, ADN de plásmido o ADN de cósmido; microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; sistemas de células de mamíferos infectados con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas de células de insectos infectados con virus (por ejemplo, baculovirus); y células vegetales infectadas por bacterias. Los elementos de expresión de estos vectores varían en su fuerza y especificidades. Dependiendo del sistema de vector huésped usado, se puede usar uno cualquiera de un número de elementos de transcripción y traducción apropiados para llevar a cabo este y otros aspectos descritos en este documento.

Cuando es deseable lograr la expresión heteróloga de un péptido según los aspectos ilustrados en este documento, las moléculas de ADN que codifican estos productos se pueden administrar a la célula. Básicamente, esto incluye proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifique el producto deseado y luego introducir la molécula de ácido nucleico en la célula en condiciones eficaces para expresar el producto deseado en la célula. Preferiblemente, esto se logra insertando la molécula de ácido nucleico en un vector de expresión antes de que se introduzca en la célula.

Los péptidos purificados se pueden obtener mediante varios métodos. El péptido se puede producir en forma purificada (preferiblemente al menos aproximadamente 80 % u 85 % puro, o al menos aproximadamente 90 % o 95 % puro) mediante técnicas convencionales. Dependiendo de si se hace que la célula huésped recombinante secrete el péptido en el medio de crecimiento (véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,596,509 de Bauer et al.), El péptido se puede aislar y purificar por centrifugación (para separar los componentes celulares del sobrenadante que contiene el

péptido secretado) seguido de precipitación secuencial con sulfato de amonio del sobrenadante. La fracción que contiene el péptido se somete a filtración en gel en una columna de dextrano o poliacrilamida de tamaño apropiado para separar los péptidos de otras proteínas. Si es necesario, la fracción peptídica se puede purificar adicionalmente mediante HPLC.

Alternativamente, si el péptido de interés no se secreta, se puede aislar de las células recombinantes usando esquemas estándar de aislamiento y purificación. Esto incluye romper las células (por ejemplo, mediante sonicación, congelación, prensa francesa, etc.) y luego recuperar el péptido de los restos celulares. La purificación se puede lograr usando los procedimientos de centrifugación, precipitación y purificación descritos anteriormente. El uso de etiquetas de purificación, descritas anteriormente, puede simplificar este procedimiento. Una vez que se recuperan los péptidos descritos en este documento, se pueden usar para preparar una composición como se describe en este documento.

Independientemente de la realización, los agentes según los aspectos descritos en este documento se pueden administrar mediante una composición o formulación farmacéutica. De acuerdo con lo anterior, otro aspecto ilustrado en este documento incluye composiciones o formulaciones farmacéuticas que incluyen uno o más péptidos o agentes peptídicos según los aspectos ilustrados en este documento, un portador farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente activo.

Los péptidos o agentes peptídicos descritos en este documento pueden estar presentes en una cantidad apropiada para romper la función de TJ en las células epiteliales. Por ejemplo, el agente peptídico puede estar presente en una cantidad en peso de aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 25 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 15 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 10 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 5 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 4 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 3 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 2 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 1 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 25 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 15 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 10 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 5 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 4 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 3 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 2 %, aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 1 %, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 25 %, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 15 %, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 10 %, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 5 %, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 4 %, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 3 %, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 2 %, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 1 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 25 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 15 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 10 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 5 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 4 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 3 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 2 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 1 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 25 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 15 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 4 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 3 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 2 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 25 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 15 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 4 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 %, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1 %. El agente peptídico puede estar presente a una concentración de menos de aproximadamente 500 μM , menos de aproximadamente 400 μM , menos de aproximadamente 300 μM , menos de aproximadamente 200 μM , menos de aproximadamente 100 μM , menos de aproximadamente 50 μM , menos de aproximadamente 40 μM , menos de aproximadamente 30 μM , menos de aproximadamente 0 μM , menos de aproximadamente 15 μM , menos de aproximadamente 10 μM , menos de aproximadamente 9 μM , menos de aproximadamente 8 μM , menos de aproximadamente 7 μM , menos de aproximadamente 6 μM , menos de aproximadamente 5 μM , menos de aproximadamente 4 μM , menos de aproximadamente 3 μM , menos de aproximadamente 2 μM , menos de aproximadamente 1 μM , menos de aproximadamente 0.9 μM , menos de aproximadamente 0.8 μM , menos de aproximadamente 0.7 μM , menos de aproximadamente 0.6 μM , menos de aproximadamente 0.5 μM , menos de aproximadamente 0.4 μM , menos de aproximadamente 0.3 μM , menos de aproximadamente 0.2 μM , menos de aproximadamente 0.1 μM , menos de aproximadamente 0.09 μM , menos de aproximadamente 0.08 μM , menos de aproximadamente 0.07 μM , menos de aproximadamente 0.06 μM , menos de aproximadamente 0.05 μM , menos de aproximadamente 0.04 μM , menos de aproximadamente 0.03 μM , menos de aproximadamente 0.02 μM , o menos de aproximadamente 0.01 μM .

Como se usa en este documento, el término "agente activo" significa un agente que se pretende que tenga un efecto en un individuo. Los agentes activos incluyen, sin limitación, agentes terapéuticos que están destinados para su uso en el diagnóstico, cura, tratamiento o prevención de enfermedades. El término "fármaco" y "agente terapéutico" se usan indistintamente y se pretende que tengan su interpretación más amplia como cualquier sustancia

terapéuticamente activa que se administra a un organismo vivo para producir un efecto deseado, normalmente beneficioso. En general, esto incluye agentes terapéuticos en todas las áreas terapéuticas principales, incluyendo, pero no limitando a, antiinfecciosos, antibióticos, agentes antivirales, analgésicos, fentanilo, sufentanilo, buprenorfina, combinaciones de analgésicos, anestésicos, anoréxicos, antiarrítmicos, agentes antiasmáticos, terbutalina, anticonvulsivantes, antidepresivos, antidiabéticos, antidiarreicos, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, preparados antimigrañosos, mareo por movimiento, escopolamina, ondansetrón, antinauseosos, antineoplásicos, fármacos antiparkinsonianos, cardiosestimulantes, dobutamina, antipruriginosos, antipsicóticos, antipiréticos, antiespasmódicos, gastrointestinales y urinarios, anticolinérgicos, simpaticomiméticos, derivados de xantina, preparaciones cardiovasculares, bloqueantes de los canales de calcio, nifedipina, betabloqueantes, beta-agonistas, salbutamol, ritodrina, antiarrítmicos, antihipertensivos, derivados de xantina, preparaciones cardiovasculares, bloqueadores de los canales de calcio, nifedipina, betabloqueadores, betaagonistas, salbutamol, ritodrina, antiarrítmicos, antihipertensivos, atenolol, inhibidores de la ACE, diuréticos, vasodilatadores, coronarios, periféricos y cerebrales, estimulantes del sistema nervioso central, inhibidores, diuréticos, vasodilatadores, coronarios, periféricos y cerebrales, estimulantes del sistema nervioso central, preparados para la tos y el resfriado, descongestionantes, diagnósticos, hormonas, hormona paratiroidea, hormona del crecimiento, insulina, hipnóticos, inmunosupresores, relajantes musculares, parasimpaticolíticos, parasimpaticomiméticos, antioxidantes, nicotina, prostaglandinas, psicoestimulantes, sedantes, tranquilizantes, antioxidantes que actúan sobre la piel, caretenoides, ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E, agentes antiarrugas, retinoides, retinol (alcohol de vitamina A), alfa hidroxiácidos, beta hidroxiácidos, ácido salicílico, combinación de hidroxiácidos y polihidroxiácidos, y colágeno hidrolizado y soluble, ácido hialurónico, agentes anticelulíticos, aminofilinas, agentes blanqueadores de la piel, ácido retinoico, hidroquinona, peróxidos, preparaciones o extractos botánicos y combinaciones de los mismos. Los agentes terapéuticos adicionales incluyen uno o más agentes antigénicos que están presentes en una composición de vacuna. Los agentes antigénicos pueden incluir proteínas o polipéptidos, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, lipopolisacáridos, etc., que están destinados a inducir una respuesta inmune contra un patógeno, célula infectada o célula caracterizada por un estado patológico (por ejemplo, célula cancerosa).

El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier adyuvante, portador, excipiente o estabilizador apropiado, y puede estar en forma sólida o líquida, tal como comprimidos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones. En determinadas realizaciones según los aspectos ilustrados en este documento, el portador puede estar en forma de loción, crema, gel, emulsión, ungüento, solución, suspensión, espuma o pasta.

En una realización, el portador incluye una emulsión de aceite en agua. En una realización, el portador incluye trometano etanol, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol, acrilatos, carbopol, agua purificada, alcohol bencílico, alcohol cetílico, ácido cítrico, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, alcohol oleílico, cetoestearilsulfato de sodio, hidróxido de sodio, alcohol estearílico, vaselina blanca, aceite mineral, carbonato de propileno, cera blanca, parafina o cualquier combinación de los mismos.

Las composiciones y/o portadores según los aspectos ilustrados en este documento también pueden estar en forma de soluciones acuosas que incluyen un surfactante, particularmente cuando los agentes que alteran la función de barrera de TJ son insolubles o solo parcialmente solubles en los portadores acuosos. Los surfactantes apropiados según los aspectos ilustrados en este documento incluyen, por ejemplo, polioles surfactantes no iónicos. En una realización, el surfactante es Pluronic® F-127. Se pueden usar otros aditivos surfactantes o solubilizantes conocidos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, solubilizantes como Tween 20 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán), Tween 40 (monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitán), Tween 80 (monooleato de polioxietileno (20) sorbitán), Pluronic® F-127, Pluronic® F-68 (copolímeros de bloque de polioxietileno polioxipropileno), PEG (polietilenglicol), surfactantes no iónicos tales como polisorbato 20 u 80 o poloxámero 184 o 188, polímeros Pluronic®, otros copolímeros de bloque y quelantes como EDTA y EGTA.

Las composiciones según los aspectos ilustrados en este documento también pueden incluir formulaciones de surfactantes pulmonares adaptadas para el suministro al epitelio pulmonar. Por ejemplo, las formulaciones apropiadas que se pueden modificar para su uso de acuerdo con los aspectos ilustrados en este documento incluyen las descritas en los documentos WO 2013/120058 y WO 2008/011559. Tales composiciones pueden formar fácilmente vesículas liposomales que pueden usarse para administrar todas las clases de agentes descritos en este documento a un paciente. La administración de tales composiciones puede ser cualquier enfoque apropiado para la administración del agente terapéutico a un tejido diana, incluyendo aspiración, instilación en las vías respiratorias, aerosolización, nebulización, instilación intranasal, instilación oral o nasogástrica, inyección intraperitoneal, o inyección intravascular. El tejido diana puede ser tejido pulmonar o un tejido sistémico. El agente o agentes que se van a administrar pueden ser cualquier agente farmacéutico o terapéutico, incluidos los descritos en este documento.

Los surfactantes y/o aditivos descritos en este documento se pueden usar solos o en combinación en cantidades en peso de, por ejemplo, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 5.0 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 4.0 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 3.0 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 2.0 %, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 1.0 %, aproximadamente 0.005 a aproximadamente 5.0 %, aproximadamente 0.005 a aproximadamente 4.0 %, aproximadamente 0.005 a aproximadamente 3.0 %, aproximadamente 0.005 a aproximadamente 2.0 %, aproximadamente 0.005 a aproximadamente 1.0 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5.0 %, aproximadamente 0.01 a

- aproximadamente 4.0 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 3.0 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 2.0 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.0 %, aproximadamente 0.025 a aproximadamente 5.0 %, aproximadamente 0.025 a aproximadamente 4.0 %, aproximadamente 0.025 a aproximadamente 3.0 %, aproximadamente 0.025 a aproximadamente 2.0 %, aproximadamente 0.025 a aproximadamente 1.0 %, aproximadamente 0.05 a aproximadamente 5.0 %, aproximadamente 0.05 a aproximadamente 4.0 %, aproximadamente 0.05 a aproximadamente 3.0 %, aproximadamente 0.05 a aproximadamente 2.0 %, o aproximadamente 0.05 a aproximadamente 1.0 %. En una realización, la composición comprende aproximadamente 0.12 % de surfactante (por ejemplo, Pluronic® F-127). En una realización, la composición comprende aproximadamente un 0.006 % de surfactante (por ejemplo, Pluronic® F-127).
- Las composiciones según los aspectos ilustrados en este documento pueden incluir un portador apropiado, como se describe anteriormente. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para la administración tópica (como se describió anteriormente con respecto a las formulaciones transepiteliales, transdérmicas o transmucosas) o por cualquier otro medio apropiado. Por ejemplo, las composiciones se pueden formular para administración por vía oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, por instilación intranasal, por implantación, por instilación intracavitaria o intravesical, intraocular, intraarterial, intralesional, transdérmica o por aplicación a las membranas mucosas. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. El (los) portador (es) puede estar presente en una cantidad en peso de, por ejemplo, aproximadamente 10 a aproximadamente 99 %, aproximadamente 20 a aproximadamente 99 %, aproximadamente 30 a aproximadamente 99 %, aproximadamente 40 a aproximadamente 99 %, aproximadamente 50 a aproximadamente 99 %, aproximadamente 60 a aproximadamente 99 %, aproximadamente 70 a aproximadamente 99 %, aproximadamente 80 a aproximadamente 99 %, aproximadamente 90 a aproximadamente 99 %.
- Las composiciones descritas en este documento incluyen un péptido como se describe en este documento junto con uno o más de un portador, surfactante y opcionalmente uno o más agentes terapéuticos farmacéuticamente aceptables, como se describe anteriormente. Por ejemplo, el portador puede estar presente en una cantidad del 40-99 % en peso, el surfactante puede estar presente en una cantidad de hasta el 5 % en peso de la composición y el péptido puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0.000001 a aproximadamente 25 % en peso de la composición.
- Por lo general, una composición contendrá desde aproximadamente 0.01 a aproximadamente 90 por ciento (por ejemplo, hasta aproximadamente 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90 por ciento) en peso del (los) agente (s) activo (s)), junto con los adyuvantes, portadores, y/o excipientes. Por ejemplo, el agente terapéutico puede estar presente en una cantidad en peso de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 90 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 80 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 70 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 60 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 40 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 30 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 %, o aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 %, 0.1 a aproximadamente 90 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 80 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 70 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 60 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 50 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 40 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 30 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 %, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 %.
- Si bien las necesidades individuales pueden variar, la determinación de los intervalos óptimos de cantidades eficaces de cada componente está dentro del conocimiento de la técnica. Las dosis típicas del agente terapéutico comprenden aproximadamente 0.01 a aproximadamente 100 mg/kg-peso corporal. Otras dosificaciones pueden comprender aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 mg/kg-peso corporal o aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg-peso corporal. Los expertos en la técnica también pueden determinar fácilmente el régimen de tratamiento para la administración de los agentes. Es decir, la frecuencia de administración y el tamaño de la dosis se pueden establecer mediante la optimización de rutina, preferiblemente mientras se minimizan los efectos secundarios.
- Las composiciones y/o portadores según los aspectos ilustrados en este documento pueden incluir una vesícula artificial. La vesícula artificial puede ser cualquier vesícula artificial apropiada conocida para los expertos en la técnica. En determinadas realizaciones según los aspectos ilustrados en este documento, la vesícula artificial puede ser una micropartícula, nanopartícula o similares. Esto será conocido para los expertos en la técnica y puede incluir cualquier material apropiado (por ejemplo, BSA, microgeles de polímero de sílice). En una realización, la vesícula artificial es un liposoma o una micela.
- Los liposomas son vesículas compuestas por una o más bicapas lipídicas ordenadas concéntricamente que encapsulan una fase acuosa. Normalmente no tienen fugas, pero pueden tener fugas si se produce un orificio o un poro en la membrana, si la membrana se disuelve o se degrada, o si la temperatura de la membrana aumenta a la temperatura de la fase de transición. Los métodos actuales de administración de fármacos a través de liposomas requieren que el portador de liposomas finalmente se vuelva permeable y libere el fármaco encapsulado en el sitio objetivo. Esto se puede lograr, por ejemplo, de una manera pasiva en la que la bicapa de liposomas se degrada con el tiempo a través de la acción de diversos agentes en el cuerpo. Cada composición de liposomas tendrá una semivida

característica en la circulación o en otros sitios del cuerpo y, de este modo, controlando la semivida de la composición de liposomas, se puede regular algo la velocidad a la que se degrada la bicapa.

En contraste con la liberación pasiva del fármaco, la liberación activa del fármaco implica el uso de un agente para inducir un cambio de permeabilidad en la vesícula del liposoma. Las membranas de los liposomas se pueden construir de modo que se desestabilicen cuando el entorno se vuelve ácido cerca de la membrana del liposoma (véase, por ejemplo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851 (1987); Biochemistry 28:908 (1989)). Cuando los liposomas son endocitosados por una célula diana, por ejemplo, se pueden dirigir a endosomas ácidos que desestabilizarán el liposoma y darán como resultado la liberación del fármaco.

Alternativamente, la membrana del liposoma se puede modificar químicamente de modo que se coloque una enzima como revestimiento sobre la membrana, enzima que desestabiliza lentamente el liposoma. Dado que el control de la liberación del fármaco depende de la concentración de enzima colocada inicialmente en la membrana, no existe una forma realmente eficaz de modular o alterar la liberación del fármaco para lograr la administración del fármaco "a demanda". El mismo problema existe para los liposomas sensibles al pH en que tan pronto como la vesícula del liposoma entre en contacto con una célula diana, será envuelta y una caída en el pH conducirá a la liberación del fármaco.

Se pueden preparar diferentes tipos de liposomas según Bangham et al., J. Mol. Biol. 13:238-252 (1965); la Patente de los Estados Unidos No. 5,653,996 de Hsu et al.; la Patente de los Estados Unidos No. 5,643,599 de Lee et al.; la Patente de los Estados Unidos No. 5,885,613 de Holland et al.; la Patente de los Estados Unidos No. 5,631,237 de Dzau et al.; y la Patente de los Estados Unidos No. 5,059,421 de Loughrey et al..

Al igual que los liposomas, las micelas también se han usado en la técnica para la administración de fármacos. Se han descrito un número de formulaciones de micelas diferentes en la bibliografía para su uso en proteínas o polipéptidos de administración, y se han descrito otras que son apropiadas para la administración de ácidos nucleicos. Cualquier formulación de micelas apropiada se puede adaptar para la administración de los aspectos terapéuticos de proteína o polipéptido o ácidos nucleicos ilustrados en este documento. Las micelas de ejemplo incluyen, sin limitación, las descritas, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 6,210,717 de Choi et al.; y la Patente de los Estados Unidos No. 6,835,718 de Kosak.

Otro aspecto ilustrado en este documento es una formulación de fármaco transepitelial (por ejemplo, transdérmica o transmucosa). La formulación del fármaco incluye un portador farmacéuticamente aceptable, una cantidad eficaz de un agente terapéutico y un agente que rompe transitoriamente la claudina-1 dentro de uniones estrechas de acuerdo con los aspectos ilustrados en este documento.

Los aspectos ilustrados en este documento también son útiles en la administración controlada de fármacos de polipéptidos y proteínas y otros fármacos macromoleculares. Estas sustancias macromoleculares tienen por lo general un peso molecular de al menos aproximadamente 300 dalton, y más por lo general un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 300 a 40,000 dalton. En una realización, el producto terapéutico tiene un tamaño de al menos 300 dalton. En otra realización, el producto terapéutico tiene un tamaño de al menos 500 dalton. En otra realización más, el producto terapéutico tiene un tamaño de no menos de 300 dalton.

Los ejemplos específicos de péptidos, proteínas y macromoléculas en este intervalo de tamaño incluyen, sin limitación, LHRH, análogos de LHRH tales como buserelina, gonadorelina, nafarelina y leuprolida, GHRH, GHRF, insulina, insulotropina, heparina, calcitonina, octreotida, endorfina, TRH, NT-36 (nombre químico: N = [[(s) -4-oxo-2-azetidini] carbonil] -L-histidil-L-prolinamida), liprecina, hormonas pituitarias (por ejemplo, HGH, HMG, HCG, acetato de desmopresina, etc.), folículo luteoides, α ANF, factores de crecimiento tales como factor de liberación del factor de crecimiento (GFRF), β MSH, somatostatina, péptido natriurético auricular, bradisinina, somatotropina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, asparaginasa, sulfato de bleomicina, quimopapaína, colecistoquinina, gonadotropina coriónica, corticotropina (ACTH), factor de crecimiento epidérmico, eritropoyetina, epoprostenol (inhibidor de la agregación plaquetaria), hormona estimulante del folículo, glucagón, hirulog y otros análogos de hirudina, hialuronidasa, interferón, factores de crecimiento similares a la insulina, interleucina 1, interleucina-2, menotropinas (urofolitropina (FSH) y LH), oxitocina, estreptoquinasa, activador del plasminógeno tisular, uroquinasa, vasopresina, desmopresina, análogos de ACTH, ANP, inhibidores del aclaramiento de ANP, antagonistas de la angiotensina II, antagonistas de bradisinina, CD4, ceredasa, CSF, encefalinas, fragmentos FAB, supresores de péptidos IgE, IGF-1, neuropéptido Y, factores neurotróficos, oligodesoxinucleótidos y sus análogos tales como ARN antisentido, ADN antisentido y ácidos nucleicos antigénicos, péptidos opiáceos, factores estimulantes de colonias, hormona paratiroidea y agonistas, antagonistas de la hormona paratiroidea, antagonistas de las prostaglandinas, pentigetida, proteína C, proteína S, ramoplanina, inhibidores de renina, timosina alfa-1, trombolíticos, TNF, vacunas, análogos de antagonistas de vasopresina, alfa-1 antitripsina (recombinante), y TGF-beta.

De acuerdo con lo anterior, otro aspecto ilustrado en este documento se refiere a un método de administración de una composición farmacéutica como se describe en este documento. El método implica aplicar una composición farmacéutica como se describe en este documento a un sitio epitelial en un sujeto. También se contempla un método de administración de una formulación de fármaco transepitelial a un sujeto. El método implica aplicar una formulación de fármaco transepitelial según los aspectos ilustrados en este documento a un sitio epitelial de un sujeto.

Alternativamente, la composición farmacéutica puede ser una vacuna. En una realización, la vacuna es una formulación de vacuna transepitelial que se beneficiaría de la ruptura de TJ en el sitio de administración de la vacuna. La formulación de vacuna transepitelial puede ser una formulación apropiada para la administración en cualquier sitio epitelial, incluidas las membranas cutáneas (por ejemplo, transdérmica) y mucosas. En una realización, la formulación de vacuna transepitelial es una formulación de vacuna transdérmica. La vacuna transdérmica a menudo se presenta en forma de un parche que lleva el usuario, por lo que la humedad del cuerpo del receptor de la vacuna permite la administración de los agentes activos a través de la piel (es decir, en el lugar de aplicación).

Las formulaciones de vacunas transepiteliales de los aspectos ilustrados en este documento pueden incluir un portador farmacéuticamente apropiado, una cantidad eficaz de un antígeno o molécula de ácido nucleico que codifica antígeno presente en el portador, opcionalmente uno o más adyuvantes y un agente que rompe transitoriamente la función de la claudina-1 dentro de uniones estrechas, en las que el agente comprende un péptido que incluye una estructura secundaria de hoja β autoensamblada y consiste en la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDSSLNLSSTLQATR (SEQ ID NO: 5), y un surfactante seleccionado del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDSSLNLSSTLQATR (SEQ ID NO: 5), y un surfactante seleccionado del grupo que consiste en Pluronic® F-127, Pluronic® F-68, Tween 80, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 184 y poloxámero 188. La formulación se presenta en el vehículo de administración transepitelial, como se conoce en la técnica.

La vacunación, por ejemplo, en la superficie epidérmica puede lograrse dirigiendo a las células de Langerhan en la epidermis con agentes según los aspectos ilustrados en este documento. Se han usado estrategias similares para apuntar a las células M en las superficies mucosas con péptidos específicos de claudina-4 (Lo et al., "M Cell Targeting by a Claudin 4 Targeting Peptide Can Enhance Mucosal IgA Responses", BMC Biotech. 12:7 (2012)).

Cualquier antígeno apropiado o molécula de ácido nucleico que codifica antígeno, o una combinación de los mismos, se puede usarse en las formulaciones de vacunas de los aspectos ilustrados en este documento. Las clases de ejemplo de antígeno de vacuna incluyen, sin limitación, un alérgeno, una subunidad inmunogénica derivada de un patógeno, una partícula similar a un virus, una partícula de virus atenuado o una glicoproteína o glicolípido conjugado con un polipéptido inmunogénico. Las moléculas de ácido nucleico que codifican antígenos pueden estar en forma de ADN desnudo o vectores de expresión, así como vectores de transformación infecciosa.

En determinadas realizaciones, el antígeno (por ejemplo, alérgeno) se acopla al adyuvante.

Se pueden modificar un número de formulaciones de vacunas transepiteliales conocidas para incluir un agente que altera la función de barrera de TJ en las células epiteliales.

Una formulación de vacuna transdérmica de ejemplo que se puede modificar se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,420,176 de Lisiewicz et al.. Por ejemplo, el portador puede comprender uno o más de azúcar, polilisina, polietilenimina, derivados de polietilenimina y liposomas, juntos con sus derivados. Un portador preferido de este tipo es una polietilenimina manosilada. Se cree que el sistema de administración transdérmica DermaVir emplea este tipo de portadores.

Otro ejemplo de formulación de vacuna transdérmica que se puede modificar se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,869,607 de Buschle et al.. Por ejemplo, el portador puede comprender una solución o emulsión que está sustancialmente libre de iones de sales inorgánicas e incluye una o más sustancias solubles en agua o emulsionables en agua capaces de hacer que la vacuna sea isotónica o hipotónica (por ejemplo, maltosa, fructosa, galactosa, sacarosa, alcohol de azúcar, lípidos; o combinaciones de los mismos), y un adyuvante que sea un policatión (por ejemplo, polilisina o poliarginina) opcionalmente modificado con un grupo de azúcar. El adyuvante, según una realización, puede ser una combinación de un policatión y un oligodesoxinucleótido inmunoestimulador CpG o no CpG. Una forma de este adyuvante es el adyuvante Intercell IC31.

Aún otra formulación de vacuna de ejemplo que se puede modificar se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 7,247,433 de Rose. Por ejemplo, las partículas similares al virus del HPV se podrían administrar con un portador farmacéuticamente aceptable y con o sin *E. coli* LT R192G como adyuvante.

Como se indicó anteriormente, las formulaciones (incluidas las formulaciones de vacunas) según los aspectos ilustrados en este documento se pueden administrar mediante aspiración, instilación en las vías respiratorias, aerosolización, nebulización, instilación intranasal, instilación oral o nasogástrica, inyección intraperitoneal o inyección intravascular. La administración pulmonar de formulaciones de vacunas según los aspectos ilustrados en este documento se puede llevar a cabo según técnicas conocidas para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Lu et al., "Pulmonary Vaccine Delivery", Expert Rev. Vaccines 6(2): 213-226 (2007)). Una formulación de vacuna de ejemplo que se puede modificar se describe en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2013/0183336. Los dispositivos apropiados para administrar formulaciones de vacunas según los aspectos ilustrados en este documento incluyen, por ejemplo, nebulizadores (véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2013/0032140).

Como se indicó anteriormente, tales formulaciones de vacunas según los aspectos ilustrados en este documento pueden incluir surfactantes. Además de los indicados anteriormente, los surfactantes apropiados para su uso de acuerdo con los aspectos ilustrados en este documento incluyen aquellos que son apropiados para su uso en formulaciones de vacunas apropiadas para administración pulmonar (véase, por ejemplo, Lu et al., "Pulmonary Vaccine Delivery", Expert Rev. Vaccines 6(2): 213-226 (2007), los documentos WO 2013/120058, y WO 2008/011559).

De acuerdo con lo anterior, un aspecto adicional de los aspectos ilustrados en este documento se refiere a un método de administración de una formulación de vacuna transepitelial a un sujeto. El método implica aplicar la formulación de vacuna transepitelial de los aspectos ilustrados en este documento a un sitio epitelial en el sujeto.

La región del epitelio (por ejemplo, piel) que se va a tratar de acuerdo con los aspectos ilustrados en este documento depende del propósito previsto para la administración. Por ejemplo, para la administración transdérmica de fármacos o vacunas, el fármaco o la vacuna se pueden administrar a una región de la piel como la parte superior del brazo, la espalda o similares. El fármaco o la vacuna también se pueden administrar a través de otras rutas como se describe en este documento.

Otro aspecto más de los aspectos ilustrados en este documento se refiere a un dispositivo o parche de administración transdérmica. El dispositivo de administración transdérmica de fármacos incluye un agente o una vacuna transdérmica o formulación de fármaco según los aspectos ilustrados en este documento. En una realización, el parche transdérmico incluye un material de respaldo, un material adhesivo en contacto con una primera porción del material de respaldo; y un material de almacenamiento de fármaco que comprende el agente o vacuna transdérmica o formulación de fármaco, donde el material de almacenamiento de fármaco está en contacto con una segunda porción del material de respaldo. En una realización, el parche también incluye un material de revestimiento desprendible que se retira tras la aplicación a la piel.

Se puede usar cualquier material de respaldo apropiado conocido en la técnica de los parches transdérmicos (tal como un material respirable) de acuerdo con los aspectos ilustrados en este documento. El respaldo es flexible de manera que el dispositivo se adapta a la piel. Los materiales de soporte de ejemplo incluyen materiales de soporte flexibles convencionales usados para cintas sensibles a la presión, tales como polietileno, particularmente polietileno de baja densidad, polietileno lineal de baja densidad, polietileno de alta densidad, poliéster, tereftalato de polietileno, fibras de nailon orientadas al azar, polipropileno, copolímero de etileno-acetato de vinilo, poliuretano, rayón y similares. También son apropiados los soportes estratificados, tales como los compuestos de polietilenoaluminio-polietileno. El soporte debe ser sustancialmente inerte a los ingredientes del material de almacenamiento de fármacos.

Adhesivos apropiados para su uso con los aspectos ilustrados en este documento con cualquier adhesivo dermatológicamente aceptable. Los ejemplos de adhesivos dermatológicamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, acrílicos, cauchos naturales y sintéticos, etileno acetato de vinilo, poli (alfa-olefinas), viniléteres, siliconas, copolímeros de los mismos y mezclas de los mismos. En una realización, la primera capa adhesiva incluye un adhesivo de silicona (por ejemplo, adhesivo de silicona BIO-PSA 7-4302 disponible comercialmente de Dow Corning®).

El parche transdérmico puede incluir opcionalmente uno o más revestimientos de liberación para propósitos de almacenamiento o manipulación. En la técnica se conocen muchos revestimientos de liberación apropiados. El revestimiento de liberación puede estar hecho de un material polimérico que puede metalizarse opcionalmente. Los ejemplos de materiales poliméricos apropiados incluyen, pero no se limitan a, poliuretano, acetato de polivinilo, cloruro de polivinilideno, polipropileno, policarbonato, poliestireno, polietileno, tereftalato de polietileno (PET), tereftalato de polibutileno, papel y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, el revestimiento de liberación está siliconado. En otras realizaciones, el revestimiento de liberación se recubre con fluoropolímero, tal como PET recubierto con fluoropolímero (por ejemplo, SCOTCHPAK™ 9744 de 3M™).

El material de almacenamiento de fármacos puede ser cualquier material dermatológicamente aceptable apropiado para su uso como material de almacenamiento de fármacos o depósito en un parche transdérmico. Por ejemplo, el material de almacenamiento de fármacos puede ser un polímero. Los ejemplos de polímeros incluyen película de poliolefina microporosa (por ejemplo, SOLUPOR® de SOLUTECH™), películas de acrilonitrilo, polietilnaftaleno, tereftalato de polietileno (PET), poliimida, poliuretano, polietileno, polipropileno, etileno-acetato de vinilo (EVA), copolímeros de los mismos y mezclas de los mismos. En una realización, el polímero es EVA. En otra realización, el polímero es EVA que tiene un contenido en peso de acetato de vinilo en el intervalo de aproximadamente 4 % a aproximadamente 19 %. En una realización preferida, el polímero es EVA que tiene un contenido de acetato de vinilo en peso de aproximadamente el 9 %. El material de almacenamiento de fármacos también puede incluir un material termosellable para unirlos a otros componentes. Como ejemplo, la capa permeable termosellable puede ser una membrana de EVA, tal como COTRAN™ 9702, disponible comercialmente de 3M™.

Con referencia ahora a las figuras 13A a 13D, la figura 13A es una vista en perspectiva de una realización de un parche transdérmico según los aspectos ilustrados en este documento. La figura 13B es una sección transversal del parche transdérmico 10 a lo largo del eje C de la figura 13A. En una realización, el parche transdérmico 10 incluye soporte 12, material adhesivo 14 y material de almacenamiento de fármacos 16. Además, el parche transdérmico 10 puede incluir opcionalmente un revestimiento desprendible 18, que se retira tras su aplicación a la piel, como se

muestra en la figura 13C. La figura 13D es una vista en sección transversal del parche transdérmico 10 a lo largo del eje D de la figura 13A.

También se contemplan otros dispositivos de administración que incluyen composiciones según los aspectos ilustrados en este documento. Tales dispositivos incluyen los apropiados para la administración de composiciones según los aspectos ilustrados en este documento mediante aspiración, instilación en las vías respiratorias, aerosolización, nebulización, instilación intranasal, instilación oral o nasogástrica, inyección intraperitoneal o inyección intravascular. Los dispositivos de ejemplo incluyen inhaladores o nebulizadores (véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2013/0032140).

Otro aspecto ilustrado en este documento se refiere a un método de ruptura de una barrera epitelial. El método implica aplicar a un sitio epitelial una cantidad de un agente según los aspectos ilustrados en este documento que es eficaz para romper la claudina-1 en los queratinocitos presentes en el sitio, rompiendo así la formación de la barrera en el sitio epitelial. También se contemplan métodos de ruptura de una barrera epitelial aplicando a un sitio epitelial una composición farmacéutica descrita en este documento, rompiendo así la formación de la barrera en el sitio epitelial.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar realizaciones de la materia objeto reivindicada en este documento, pero de ninguna manera se pretende que limiten su alcance.

Materiales y métodos para ejemplos

Materiales

Resina Tentagel Rink Amida, Rapp Polymere; Aminoácidos y activadores de Fmoc, P3 Biosystems o Advanced Chemtech; DMF seco y piperidina, AlfaAesar; DIPEA, TCI America; los medios de cultivo celular, el kit EdU y los reactivos de marcado de fluorescencia eran de Life Technologies (Gibco, Invitrogen); anticuerpos, Invitrogen; WST1, Clon Clontech; Transwells, Corning; biotina, propargilamina, KBr, Pluronic F-127® y todos los demás reactivos eran de Sigma.

Síntesis de péptidos:

Se usaron métodos estándar de síntesis de péptidos Fmoc en fase sólida. El péptido 1 (R-SSVSQSTGQIQSKVFDLSLLNSSTLQATR-NH₂) (SEQ ID NO:5) y una secuencia codificada correspondiente, el péptido 2 (R-SILTVGVSTLDQSLKQLSNFSQAVSTQSSR-NH₂) (SEQ ID NO: 6) fueron sintetizados con una etiqueta de biotina-N-propargil glicina (b) o N-terminal (a) para su posterior etiquetado. La resina Tentagel Rink Amida (0.25 mmol/g, tamaño de malla de 90 µm, Rapp Polymere) se cargó manualmente a temperatura ambiente (5 eq. de Fmoc-R, 4.9 eq. de HBTU, 10 eq. de DIPEA, doble acoplamiento). Se sintetizó Aβ₄₀ en Tentagel Wang (0.3 mmol/g, tamaño de malla de 90 µm, Rapp Polymere) y FKFE₂ (FKFEFKFE-NH₂) en resina de poliestireno MBHA Rink amida (0.2 mmol/g, tamaño de malla de 90 µm, Adv. Chemtech). La síntesis de péptidos en fase sólida de Fmoc se realizó en un sintetizador de microondas Liberty CEM usando acoplamientos dobles o triples después de residuos β-ramificados y ya sea HBTU (para el péptido 2) o HATU (para el péptido 1) como activador. Para los péptidos no marcados, se eliminó el Fmoc terminal y se dejó desprotegido el extremo N-terminal. Para los péptidos marcados, se agregó Nil mediante síntesis de submonómeros peptoides: la resina para los péptidos marcados se lavó con DMF libre de amina, se bromoacetiló con 20 eq. de ácido bromoacético y 24 eq. de diisopropilcarbodiimida durante 20 minutos, se lavó con DMF y DCM libres de amina y bromo desplazado con propargilamina (20 eq.). La biotina se acopló doblemente usando 2.5 eq. de biotina, 2.45 eq. de HATU, 5 eq. de DIPEA en NMP/DMF/DMSO 5:4:1.

Los péptidos se escindieron con ácido trifluoroacético al 70 %/DCM al 28 %/triisopropilsilano al 1 %/H₂O al 1 % durante una hora, se lavó la resina con TFA puro y se combinó con el cóctel de escisión. El TFA se eliminó mediante evaporación rotatoria y el péptido se recogió mediante precipitación con éter. Los péptidos se almacenaron a -80 °C hasta su purificación. Las pellas de péptidos se disolvieron en DMSO mínimo y luego se desnaturalizaron en guanidina HCl 7.2 M (≥ 25 % DMSO) con sonicación a 55 °C, durante 20 minutos. El producto en bruto desnaturalizado se incubó a 55 °C hasta la purificación por cromatografía líquida de alta presión ("HPLC") (columna C18 semipreparativa de Waters a 55 °C en un HPLC Shimadzu LD-6A) usando un gradiente de H₂O/acetonitrilo que contenía TFA al 0.1 %. La HPLC analítica (columna C18 a 55 °C, usando una HPLC Shimadzu LC-2010A) para evaluar la pureza solo se pudo obtener inmediatamente después de la purificación. Los péptidos tenían una pureza ≥ 90 %. Se realizó HPLC analítica de 1a y 1b, así como 2a y 2b. Si bien ambos péptidos funcionan como picos individuales mediante HPLC analítica inmediatamente después de la purificación, ni 1a ni 2a fueron detectables mediante HPLC analítica después de la preparación en Pluronic F-127®. Este comportamiento es típico de los péptidos autoensamblados, que forman espontáneamente una estructura demasiado grande para entrar en la columna analítica C18. No se pudo lograr una desagregación confiable del material autoensamblado con los métodos estándar usados para otros amiloides, tales como TFA/HFIP o NaOH (LeVine "Alzheimer's β-Peptide Oligomer Formation at Physiologic Concentrations", Anal. Biochem. 335:81-90 (2004); Teplow, "Preparation of Amyloid β-Protein for Structural and Functional Studies", In Methods in Enzymology Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates, Part C. Elsevier Academic Press, Boston, pp 20-33, (2006); Zhao et al., "Amyloid-β Peptide Is a Substrate of the Human 20S Proteasome", ACS Chem. Neurosci.

1:655-660 (2010); Cao et al., "Ester to Amide Switch Peptides Provide a Simple Method for Preparing Monomeric Islet Amyloid Polypeptide under Physiologically Relevant Conditions and Facilitate Investigations of Amyloid Formation", J. Am. Chem. Soc. 132:4052-4053 (2010)). Los péptidos 1a y 2a contienen solo una única fenilalanina ($\epsilon_{257.5} = 195 \text{ cm}^{-1}/\text{M}$), y el uso de Pluronic F-127® excluye el análisis a 214 nm por espectrofotometría UV. Por lo tanto, las concentraciones de péptidos se determinaron después de la solubilización mediante un ensayo de BCA.

La masa se determinó mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción láser asistida por matriz ("MALDI-TOF") (usando matriz de ácido α -ciano-4-hidroxycinamina y modo positivo lineal en un Bruker Autoflex III). Los péptidos purificados se liofilizaron para su almacenamiento. MALDIMS del péptido 1a midió una masa monoisotópica de 3080.59 y una masa observada ((m+1)/z) de 3085.42. MALDI-MS del péptido 2a midió una masa monoisotópica de 3080.59 y una masa observada ((m+1)/z) de 3084.80. MALDI-MS del péptido marcado 1b midió una masa monoisotópica de 3401.71 y una masa observada ((m+1)/z) de 3405.10. MALDI-MS del péptido marcado 2b midió una masa monoisotópica de 3401.71 y una masa observada ((m+1)/z) de 3407.22.

Antes de su uso, se prepararon fibrillas de péptidos en solución salina tamponada con fosfato filtrada y estéril que contenía Pluronic F-127® al 0.12 % mediante sonicación a 55 °C, durante 20 minutos. Las concentraciones de péptidos se determinaron mediante un ensayo de BCA (Pierce). Se prepararon reservas de péptidos 20x en pluronic F-127/PBS al 0.12 %, luego se diluyeron 20x en solución reguladora fosfato, PBS o DMEM que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 1 % y se incubaron a 37 °C, durante 18-24 horas antes de la exposición celular o biofísica. análisis, manteniendo una concentración constante de surfactante (0.006 % Pluronic® F127) para muestras de vehículos y péptidos.

Dicroísmo circular (CD)

Se prepararon reservas de péptidos 2 mM en solución reguladora fosfato 10 mM, pH 7.4, que contenía Pluronic® F-127 al 0.12 %. Estas reservas se diluyeron con solución reguladora fosfato 1 mM, pH 7.4 a 100 μM y 1 μM y se incubaron durante 3 días a 25 °C. Los espectros se obtuvieron a 25 °C en cubetas de cuarzo en un espectrofotómetro Aviv CD, escaneando durante 4 s por paso de 2.0 nm usando un ancho de banda de 2.0 nm. Los datos no se suavizaron.

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X (XRD)

Se incubaron fibrillas peptídicas (100 μM) durante una semana a 37 °C en PBS, se recogieron por centrifugación, se lavaron con HCl 2 mM y se liofilizaron muestras duplicadas. Para FTIR, se prepararon pellas de KBr y se tomaron 512 exploraciones en un espectrómetro Shimadzu FTIR usando una resolución de 2 cm^{-1} . Se restó el fondo y se normalizaron los espectros; no se aplicó suavizado. Los estudios de difracción de polvo se realizaron en un difractómetro de rayos X Bruker X8 APEX II en the Cornell Center for Materials Research.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y cristales peptídicos

Se aplicaron 10 μL de fibrillas maduras 120 μM en PBS a rejillas de cobre revestidas con carbón de malla 200 durante 5 minutos. Las rejillas se lavaron con agua destilada tres veces para eliminar el exceso de sales y se tiñeron con 10 μL de acetato de uranilo al 5 % filtrado durante 5 minutos. El exceso de solución se eliminó por capilaridad después de cada etapa y las rejillas se secaron antes de su uso. Se obtuvieron imágenes de las fibrillas usando un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 7650 en modo de alto contraste usando un voltaje de aceleración de 80 kV. Los cristales de péptidos se cultivaron a 4 °C en gotas invertidas que contenían PBS con glicerol al 25 % y Pluronic F-127® al 0.02-0.04 %.

Tioflavina T

Se prepararon reservas de péptidos en Pluronic F-127®/PBS al 0.12 % y se equilibraron a temperatura ambiente durante 48 horas. Estas reservas se diluyeron 20 veces en tioflavina T 10 μM en PBS o DMEM que contenía suero al 1 % y se almacenaron a 4 °C, durante 24 horas. La fluorescencia se midió en placas de 384 pocillos de fondo Greiner μ -Clear en un lector de placas de fluorescencia Tecan M1000 ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 482 \text{ nm}$, con un ancho de rendija de 10 nm).

Cultivo de células

Se cultivaron células epiteliales bronquiales humanas (16HBE) sobre poliestireno recubierto de colágeno en DMEM que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %, HEPES 10 mM, penicilina, estreptomycin y anfotericina con medio fresco cada 2-3 días. Las células se sembraron en placa a la densidad indicada y se cultivaron durante el período indicado. Los péptidos se diluyeron 20x en DMEM (Gibco #31053 que contenía L-glutamina 2 mM pero que carecía de rojo fenol) que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 1 % y se incubaron a 37 °C, durante 18 horas antes de la exposición. Las concentraciones de Pluronic F-127 (0.006 % en medios de cultivo celular) fueron consistentes entre los controles de vehículo y las muestras que contienen péptidos. Las células se aclimataron al mismo medio durante 18 horas antes de la exposición al péptido.

Ensayos funcionales:

Para experimentos de permeabilidad y resistencia eléctrica transepitelial (TER), cuyos resultados se muestran en las figuras 4A-4B, respectivamente, las células se sembraron en placa a una densidad de 75.000 por pocillo trans de 0.33 cm² (Corning TW, poro 0.4 µm, poliéster) y se cultivaron durante 5-6 días antes de la aclimatación/exposición al péptido. Las mediciones de TER se tomaron con electrodos de palillos chinos usando un voltmetro de World Precision Instruments y se expresan como la medida (resistencia celular - resistencia de un inserto TW sin células)/área de superficie del inserto TW. La TER se midió antes de la exposición al péptido (tiempo = 0) y en los puntos de tiempo indicados posteriormente. Después de la medición de 24 horas, se lisó un TW de control con Triton X-100 al 1 %. Para el ensayo de flujo de permeabilidad, se agregó 1/10 de volumen de fluoresceína sódica al 0.2 % o una mezcla de FITC-dextrano de 40 kD (concentración apical final de 600 mg/ml) y anticuerpo monoclonal Synagis marcado con Alexafluor®-568 a la cámara apical y las células se incubaron a 37 °C, durante 30 minutos o 18 horas. El anticuerpo monoclonal Synagis se marcó con Alexafluor®-568-succinimidil éster según las instrucciones del fabricante, se eliminó el fluoróforo sin reaccionar mediante filtración centrífuga y el anticuerpo marcado se volvió a suspender en PBS que contenía dextrano de 40 kD marcado con FITC. La fluorescencia en el medio basolateral se leyó en un lector de placas de fluorescencia Tecan M1000 usando placas de 384 pocillos de fondo Greiner µ-Clear (λ_{ex} = 494 nm y λ_{em} = 512 nm para fluoresceína y FITC-dextrano y λ_{ex} = 578 nm y λ_{em} = 605 nm para Alexafluor®-568 usando un ancho de rendija de 10 nm). Los resultados se muestran en la figura 3E. El error se presenta como el error estándar de la media, y la significancia relativa al control del vehículo se indica donde $P < 0.05$ usando una prueba t de dos colas. Para los experimentos de permeabilidad a la fluoresceína y TER, $n = 8$. Para la recuperación de la barrera después del lavado del péptido y la permeabilidad del anticuerpo monoclonal marcado con FD-40 y Alexafluor® ("AF-mAb"), $n = 4$.

Citotoxicidad:

Para las mediciones de citotoxicidad, las células se sembraron con una densidad de 7,500 por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante un día antes de la aclimatación en DMEM que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 1 %. Las células se expusieron al vehículo o péptido durante 4, 12 o 24 horas. Las células de control se lisaron con Triton X-100 al 1 % durante 15 minutos como control negativo. Se agregó 10x reserva WST1 (Clontech) a cada pocillo y las células se incubaron durante 12 minutos a 37 °C. Se retiró el medio y se leyó inmediatamente la absorbancia de WST1 en un lector de placas Perkin Elmer UV/Vis (WST1 A₄₅₀ - fondo A₆₂₀). El error se presenta como el error estándar de la media y la significación relativa al control no tratado se indica ($P < 0.05$). Para los experimentos de citotoxicidad, $n = 4$. Se presentan datos representativos.

Inmunofluorescencia:

Para el marcaje inmunohistoquímico, las células se sembraron en placa a una densidad de 1.2×10^5 células por cubreobjetos de 1.2 cm² en una placa de 12 pocillos y se cultivaron en DMEM que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % durante 4-5 días. Un día antes de la exposición al péptido, el medio se cambió a DMEM/suero al 1 %. Las células se expusieron al péptido durante 4 o 12 horas a 37 °C. Los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS que contenía calcio (Gibco), se fijaron en metanol frío y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1 % antes de la tinción. El fluoróforo se conjugó con péptidos marcados con propargil-glicina usando un kit ClickIt EdU según las instrucciones del fabricante (omitiendo la exposición celular a EdU). Para la tinción inmunofluorescente, las células se incubaron durante una hora con anticuerpos primarios (anticuerpo policlonal anti-claudina 1 1:500 y antioccludina monoclonal 1:400), se lavaron con PBS y se tiñeron con anticuerpos secundarios Alexafluor®-488 anti-conejo y Alexafluor®-568 anti-ratón (1:1000). El anticuerpo Cldn1 usado reconoció un epítipo en el C-terminal y no reaccionó de forma cruzada con los péptidos. Los cubreobjetos se montaron en Vectastain que contenía DAPI y se tomaron las imágenes en un microscopio de fluorescencia Olympus BX60. Las imágenes Cldn1 y Ocldn se tomaron usando el software SPOT sin más manipulación digital.

Ejemplo 1: caracterización de péptidos estructurados y ruptura de uniones estrechas en células epiteliales

Para obtener información sobre la estructura de los péptidos disruptores de TJ y su mecanismo de acción, las características biológicas y biofísicas del péptido humano homólogo hCldn1 (53-81, C54,64S) (SEQ ID NO: 5) (denominado en este documento "1a" o péptido "1a") se examinó. Se encontró que, cuando se solubiliza en presencia de surfactante, 1a rompe las TJ en células cultivadas en una concentración dos órdenes de magnitud menor que la reportada previamente para péptidos Cldn1 (Mrsny et al., "A Key Claudin Extracellular Loop Domain Is Critical for Epithelial Barrier Integrity", *Am. J. Path.* 172:905-915 (2008); Zwanziger et al., "A Peptidomimetic Tight Junction Modulator to Improve Regional Analgesia", *Mol. Pharm.* 9:1785-1794 (2012)). La caracterización biofísica indica que 1a puede formar fibrillas de tipo amiloide ricas en estructura secundaria de hoja β . Un péptido codificado previamente desconocido (al que se hace referencia en este documento como "2a" o péptido "2a") con contenido de aminoácidos, hidrofobicidad y pl idénticos con respecto a 1a, pero secuencia aleatoria, también adopta una conformación de hoja β , forma fibrillas y rompe TJ.

Cuando se preparó directamente en solución reguladora o medio de cultivo celular, el péptido 1a (véanse, las figuras 1A-1B) no se comportó bien. Organogeles autoportantes formados en dimetilsulfóxido. Aunque el péptido codificado 2a se diseñó inicialmente como un control negativo, este péptido mostró un comportamiento físico similar al 1a,

formando agregados en solución reguladora sola y también organogeles en DMSO. El cribado de una serie de surfactantes para facilitar la formación de una estructura peptídica estable para mejorar la manipulación reveló que la inclusión de Pluronic® F-127 al 0.12 % (Khattak et al., "Pluronic F127 as a Cell Encapsulation Material: Utilization of Membrane-Stabilizing Agents", *Tissue Eng.* 11:974-983 (2005)) permitió la solubilización y la posterior dilución de ya sea 1a o 2a en solución reguladora o medio de cultivo celular sin precipitación visible.

Se usaron células epiteliales bronquiales humanas (16HBE) para modelar la función de barrera de TJ. Las células 16HBE desarrollan una barrera TJ (resistencia eléctrica transepitelial, TER = 800-1500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ en suero de ternera inactivado por calor al 10 %) que persiste durante 14 días. Las células 16HBE sirven como un modelo de barrera de TJ epitelial más robusto que los queratinocitos humanos primarios, que logran diversos grados de diferenciación terminal (por ejemplo, función de barrera de TJ) y esto disminuye en 24 horas. En el medio de suero bajo usado para la exposición a péptidos, las células 16HBE alcanzaron una TER de 350 - 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ que se mantuvo estable durante 3-4 días. La expresión en la superficie celular de Cldn1, Cldn4, Occln y ZO-1 se observó de forma consistente mediante tinción por inmunofluorescencia (Figuras 2A-2B).

Se aplicaron péptidos apicalmente a barreras de TJ intactas para modelar la aplicación tópica. Ambos péptidos 1a y 2a mostraron una ruptura de la barrera dependiente de la dosis de las TJ de 16HBE (Figuras 3A-3C). Se observó una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en la TER con concentraciones de 1a tan bajas como 240 nM en 24 horas o en 8 horas con 1a 12 μM . Una caída del 65.9 ± 6.9 % en la TER después de 24 horas de incubación con 1a 2.4 μM coincidió con aumentos en la permeabilidad de las sondas marcadas de 4.1 ± 0.9 veces (fluoresceína, 0.4 kDa) y 11.2 ± 0.9 veces (FITC-dextrano, 40 kDa ("FD-40")). 1a 12 μM mejoró la permeabilidad para fluoresceína y FD-40 en 6.7 ± 1.3 veces y 16.8 ± 1.9 veces, respectivamente.

El péptido codificado 2a, que tiene el mismo tamaño, pl y composición de aminoácidos, pero una secuencia única, también rompió la barrera de TJ de una manera dependiente de la dosis. La exposición a 2a 2.4 μM durante 24 horas disminuyó la TER en 80 ± 2.4 % y, de acuerdo con lo anterior, aumentó la permeabilidad a la fluoresceína 5.6 ± 0.4 veces y la permeabilidad a FD-40 25.3 ± 1.6 veces. La exposición a 2a 12 μM provocó una ruptura de TJ casi completa, con una disminución de 92 ± 1.6 % en la TER, un aumento de 16.4 ± 2.2 veces en la permeabilidad a la fluoresceína y un aumento de 30.5 ± 3.0 veces en la permeabilidad de FD-40 después de 24 horas de exposición. Este resultado demuestra que el péptido codificado fue tan eficaz como la secuencia 1a basada en Cldn1 para la ruptura de TJ.

Informes anteriores describieron la aplicación de 100-300 μM de péptidos Cldn1 de rata homólogos bilateralmente para lograr efectos de permeación de fluoresceína y TER comparables (Mrsny et al., "A Key Claudin Extracellular Loop Domain Is Critical for Epithelial Barrier Integrity", *Am. J. Path.* 172:905-915 (2008); Zwanziger et al., "A Peptidomimetic Tight Junction Modulator to Improve Regional Analgesia", *Mol. Pharm.* 9:1785-1794 (2012)). Es posible que las potencias aumentadas observadas en estos experimentos se deban a diferencias en la conformación de péptidos que podrían resultar de los métodos de manipulación de péptidos. El protocolo descrito en este documento trae el enfoque basado en péptidos para la ruptura de la barrera en un intervalo de concentración más práctico.

La permeación de un anticuerpo terapéutico marcado (Synagis, 168 kD) también se incrementó mediante la ruptura de TJ mediada por péptidos (Figura 3D). La penetración del anticuerpo se incrementó 2.5 ± 0.2 veces y 3.2 ± 0.4 veces en el péptido 1a 2.4 y 12 μM , respectivamente. De nuevo, se observó una permeación ligeramente mejor usando el péptido 2a, con un aumento de 4.9 ± 0.4 veces y 5.6 ± 0.9 veces usando 2.4 y 12 μM , respectivamente.

El surfactante Pluronic F-127® que se agregó al vehículo para asegurar que los péptidos entraran en solución no interrumpieran las TJ, como lo demuestra la falta de efecto sobre la TER o los ensayos de permeabilidad ("Vehículo", Figuras 3A-3D y 4A). Los péptidos no relacionados probados en el mismo intervalo de concentración ($\text{A}\beta_{40}$ monomérico 2-12 μM o (FKFE)₂) tampoco disminuyeron la TER. Para asegurar que la ruptura de la barrera no se debiera a efectos citotóxicos, los cultivos subconfluentes se expusieron a péptidos o vehículo durante 1, 4, 12 (experimento representativo mostrado en la figura 5A) o 24 horas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el metabolismo de WST1 a ninguna concentración de péptido o tiempo de exposición. Después de lavar el péptido o el vehículo, los valores de TER aumentaron gradualmente, lo que indica que los cultivos de 16HBE recuperan la función de barrera (Figura 5B). Juntos, estos resultados indican que la ruptura de TJ es específica del péptido y no es citotóxica para los cultivos de 16HBE.

Usando tinción por inmunofluorescencia, se observó que ambos péptidos 1a y 2a inducían cambios similares en la localización de la proteína TJ (Figuras 6A-6H). El patrón de panal característico de Cldn1 y Occln fue evidente en células no tratadas o tratadas con vehículo. Se observó que la localización de Cldn1 y Occln se alteró 12 horas después de la exposición a 1a o 2a (Figura 6C y 6D). Las alteraciones de la tinción TJ en la periferia celular coinciden con agregados y/o tinción Cldn1 difusa. El tamaño y el número de estas regiones de Cldn1 y Occln mal localizados aumentaron con la concentración de péptidos. Estas imágenes confirman que la red TJ está interrumpida en regiones con localización alterada de Cldn1.

Para comprender mejor el mecanismo de la ruptura de TJ, se sintetizaron los péptidos marcados 1b y 2b. Los péptidos 1b y 2b se construyeron con una etiqueta N-terminal que contenía un residuo de N-propargil glicina para el marcaje bioortogonal mediante cicloadición catalizada por cobre posterior a la exposición al péptido. Se pensó que este

enfoque tendría menos probabilidades de alterar las características de autoensamblaje del péptido en contraposición a la adición directa de un fluoróforo.

Se esperaba que los péptidos marcados se unieran a las estructuras de TJ en los límites celulares y se colocaran en el patrón de panal característico (similar al observado por Mrsny et al. for rat Cldn1 (53-80) (Mrsny et al., "A Key Claudin Extracellular Loop Domain Is Critical for Epithelial Barrier Integrity", *Am. J. Path.* 172:905-915 (2008)). Alternativamente, podrían colocarse con Cldn1 en un patrón de tinción puntiforme indicativo de endocitosis, según lo observado por Zwanziger et al. (Zwanziger et al., "Claudin-Derived Peptides are Internalized Via Specific Endocytosis Pathways", *Ann. NY Acad. Sci.* 1257:29-37 (2012)), quienes informaron que un Cldn1 de rata marcado con TAMRA (53-81, C54,64S) fue sometido a endocitosis mediante una combinación de captación mediada por clatrina y macropinocitosis en la primera hora de exposición. En cambio, tanto 1b como 2b formaron agregados polidispersos de escala de μm asociados con las células, incluso a concentraciones tan bajo como 240 nM. Poca o ninguna tinción puntiforme de péptido colocalizado y Cldn1 celular se observó en los primeros momentos. Después de 4 horas de incubación, algo de Cldn1 celular se colocó con agregados de péptidos. En muchos casos, se observaron huecos en el patrón de panal de abeja de Cldn1 celular en la periferia celular que rodea los grupos de péptidos marcados (Figura 6G y 6H), fuertemente indicativos de ruptura de TJ. Se infirieron los efectos dependientes de péptidos observados sobre la función de barrera como resultado de cambios en la localización de Cldn1, en lugar de que el péptido se intercala directamente en estructuras de TJ intactas. Dados estos resultados, se justificó una caracterización adicional de las propiedades biofísicas de 1a y 2a y sus estructuras autoensambladas. Ambos péptidos 1a y 2a formaron espontáneamente fibrillas en PBS (con una concentración final de Pluronic® F-127 de 0.006 %). Las fibrillas de 1a (Figura 7A y 7C) eran uniformes, de 8.2 ± 0.7 nm de ancho sin torsión aparente y frecuentemente agrupadas en haces alineados. Las fibrillas de 2a tenían 4.1 ± 0.4 nm de ancho (Fig. 7B y 7D), pero adoptaron una morfología diferente, con ligeras torsiones y formando haces retorcidos de dos o más hebras y matrices en forma de banda de estos haces retorcidos. Se observaron fibrillas de hasta $1 \mu\text{m}$ en ambas preparaciones mediante TEM.

Cuando se diluyó a 200-300 μM en PBS o PBS que contenía glicerol como crioprotector, se formaron cristales de 1a en horas (Figura 7E). Se observaron formas cristalinas tanto de aguja como de placa. Los cristales de 1a dieron un patrón de difracción de fibrillas con reflejos de 4.3 Å y 3.7 Å en una fuente de rayos X (figura 9), pero la difracción fue de calidad insuficiente para permitir la determinación de la estructura de alta resolución. La difracción de rayos X en polvo (XRD, Figura 8A) produjo patrones similares para 1a y 2a. Ambos mostraron un espaciado d de 4.6 Å, característico de la hoja β extendida, mientras que el péptido 2a tenía la reflexión adicional de 9.9 Å indicativa de la estructura β cruzada. La cristalinidad limitada de la muestra 1a impidió la resolución de esta reflexión. La reflexión adicional de 3.9 Å en 2a indica un giro periódico en la estructura cruzada- β (Inouye et al., "Structure of Core Domain of Fibril-Forming PHF/Tau Fragments", *Biophys. J.* 90:1774-1789 (2006)) consistente con las fibrillas observadas TEM.

Se observó una estructura secundaria significativa mediante dicroísmo circular (CD) para ambos péptidos 1a y 2a cuando se solubilizaron en Pluronic® F-127 y se diluyeron en PBS (Figura 8B). Los mínimos a 220 nm pueden indicar la presencia de múltiples elementos estructurales secundarios, tales como α/β o hoja β/β u hoja de β /giro de β , en lugar de una conformación estrictamente α -helicoidal (para la cual se esperan mínimos a 210 y 222 nm) o conformación exclusivamente de hoja β (mínimo esperado 215-218 nm). Se observaron espectros de dicroísmo circular similares tanto para 1a como para 2a a concentraciones tan bajas como 1 μM (Figura 8D), que representan el límite de detección del espectrómetro usado. Este resultado implica que estos péptidos están estructurados en su forma monomérica o que la concentración crítica (C_r) es excesivamente baja (en comparación, C_r para $A\beta_{42}$ es aproximadamente 1 μM (Hu et al., "Amyloid Seeds Formed by Cellular Uptake, Concentration, and Aggregation of the Amyloid-Beta Peptide", *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A.* 106:20324-20329 (2009))). Se cree que las concentraciones umbral de ejemplo para los péptidos 1 y 2 son $<1 \mu\text{M}$; la actividad funcional del péptido 1a a 240 nM indica que su C_r podría ser incluso menor. El entorno anfipático proporcionado por el surfactante o las membranas podría jugar un papel en la formación de la estructura. El surfactante podría alterar significativamente el equilibrio de las fibrillas y el carácter ultraestructural en comparación con las fibrillas solubles en agua.

Como otra línea de evidencia para confirmar la estructura de la hoja β , los espectros FTIR de fibrillas liofilizadas tanto de 1a como de 2a eran virtualmente idénticos (Figura 8C), con picos a 1664 cm^{-1} y 1628 cm^{-1} . Los grupos carbonilo del esqueleto desacoplados muestran por lo general un pico de alrededor de 1650 cm^{-1} en la región de amida de los espectros FTIR. El cambio desde 1650 cm^{-1} a 1628 cm^{-1} indica acoplamiento vibratorio de oxígenos de carbonilo a través de su alineación en láminas β extendidas (Zandomenighi et al., "FTIR Reveals Structural Differences Between Native β -Sheet Proteins and Amyloid Fibrils", *Prot. Sci.* 13:3314-3321 (2009); Shivan et al., "Distinct β -Sheet Structure in Protein Aggregates Determined by ATR-FTIR Spectroscopy", *Biochem.* 52 (31):5176-5183 (2013)). A veces se observa un pico de alrededor de 1694 cm^{-1} para las hojas β antiparalelas, pero este pico no era obvio. El pico de amida II a 1544 cm^{-1} apoya la presencia de una estructura secundaria ordenada. Los espectros FTIR de los péptidos marcados 1b y 2b se muestran en la figura 8E.

La unión de tioflavina T puede indicar la presencia de la conformación β cruzada (Biancalana et al., "Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils", *Biochimica et Biophysica Acta* 1804:1405-1412 (2010)). Fibrillas de péptidos se unieron a la tioflavina T cuando se diluyó en ya sea solución reguladora o medio de cultivo celular. Ambos péptidos 1a y 2a (ya preparados en Pluronic® F-127 al 0.12 %) mostraron la máxima fluorescencia inmediatamente después de la dilución, por lo que no se pudo determinar la cinética de formación de fibrillas. La unión

de la tioflavina T fue estadísticamente significativa ($P < 0.005$) a concentraciones de péptidos tan bajas como 240 nM. Las fibrillas 2a mostraron un orden de magnitud más de fluorescencia de tioflavina T que las fibrillas 1a, lo que indica una diferencia morfológica en el empaquetamiento de las fibrillas. Considerados en su totalidad, los resultados de la caracterización biofísica de 1a y 2a indican claramente que estas fibrillas peptídicas tienen una estructura β cruzada compatible con amiloide. La unión de tioflavina T de 1a y 2a se muestra en las figuras 10A-10B.

La citotoxicidad asociada con la exposición a amiloide surge de la formación de oligómeros citotóxicos Laganowsky et al., "Atomic View of a Toxic Amyloid Small Oligomer", *Science* 335:1228-1231 (2012)) o del secuestro de proteínas metaestables esenciales en la célula. (Olzscha et al., "Amyloid-Like Aggregates Sequester Numerous Metastable Proteins with Essential Cellular Functions", *Cell* 144(1):67-78 (2011)). Se tuvo cuidado de limitar la formación transitoria de oligómeros (Cecchi et al., "The Amyloid-Cell Membrane System. The Interplay Between the Biophysical Features of Oligomers/Fibrils and Cell Membrane Defines Amyloid Toxicity", *Biophys. Chem.* 182:30-43 (2013)) durante la exposición celular al permitir que el autoensamblaje del péptido alcance el equilibrio antes de la aplicación a las células. Se tomó esta precaución porque las fibrillas de péptidos recién diluidas indujeron una citotoxicidad significativa, consistente con la de otros oligómeros amiloides (Véase la figura 5C) (Doran et al., "Turn Nucleation Perturbs Amyloid β Self-Assembly y Cytotoxicity", *J. Mol. Biol.* 421:315-328 (2012)). Estos efectos citotóxicos (Figuras 5A-5B) no se observaron en relación con el control del vehículo dentro del intervalo de concentración funcional y el curso de tiempo usado para los péptidos 1a y 2a en equilibrio. Se concluyó que los efectos funcionales de la exposición a péptidos no se deben a la muerte celular necrótica o al estrés indebido en la homeostasis celular.

En el autoensamblaje de amiloide, la conformación de la hoja β está impulsada por una combinación de interacciones del esqueleto y la cadena lateral: formación de enlaces hidrofóbicos, aromáticos y de hidrógeno. En el núcleo de una fibrilla, las cadenas laterales en la interfaz de dos hojas β se interdigitan para formar una cremallera estérica (Sawaya et al., "Atomic Structures of Amyloid Cross- β Spines Reveal Varied Steric Zippers", *Nature* 447:453-457 (2007); Nelson et al., "Structure of the Cross- β Spine of Amyloid-Like Fibrils", *Nature* 435:773-778 (2005)) que corre paralela al eje de las fibrillas. Los péptidos 1a y 2a tienen un 55 % de residuos polares, sin carga (S, Q, T y N) y un 31 % de residuos hidrofóbicos. Es probable que el autoensamblaje de 1a y 2a se establezca mediante enlaces de hidrógeno de cadena lateral en esta interfaz. La conformación cruzada- β se caracteriza además por una tira de residuos hidrofóbicos que corren paralelos al eje de las fibrillas (Biancalana et al., "Minimalist Design of Water-Soluble Cross- β Architecture", *Proc. Acad. Nat'l. Sci. U.S.A.* 107:3469-3474 (2010)). Los segmentos cortos de la secuencia propensa a amiloide pueden impulsar el autoensamblaje (Tsolis et al., "A Consensus Method for the Prediction of 'Aggregation-Prone' Peptides in Globular Proteins", *PLoS ONE* 8:e54175 (2013); Teng et al., "Short Protein Segments Can Drive a Non-Fibrillizing Protein Into the Amyloid State", *Prot. Eng. Des. Sel.* 22:531-536 (2009)). PEPFOLD modeling (Thevenet et al., "PEP-FOLD: An Updated De Novo Structure Prediction Server for Both Linear and Disulfide Bonded Cyclic Peptides", *Nucleic Acids Res.* 40:W288-W293 (2012)). predice una estructura de horquilla β en el asa de cisteína de los péptidos Cldn1 (residuos 53-65), con residuos hidrofóbicos (I y V) alineados en una cara de la horquilla, lo que podría impulsar el empaquetamiento β cruzado. El análisis retrospectivo usando el método AMYLPRED2 (Tsolis et al., "A Consensus Method for the Prediction of 'Aggregation-Prone' Peptides in Globular Proteins", *PLoS ONE* 8:e54175 (2013)) revela un segmento corto en el péptido 2a (SEQ ID NO: 6), ILTGVST, que se predice que es propenso a amiloide. Varias otras secuencias codificadas también mostraron organogelación en DMSO (véase la figura 1C, así como palmitoil-Nil-GGMSVCVSQSTGQIQCK-NH₂ basado en CLDN1 (SEQ ID NO:28); palmitoil-Nil-GGSCVSQS-NH₂ (SEQ ID NO:29); Npg-Nil-RRGSCVSQSTGQIQCKGRR-NH₂ (SEQ ID NO:30) (Npg = N-(etilendioxi)₂etilaminoglicina); Npg-Nil-RRGISGVQCCQTKQSSGRR) Codificada (SEQ ID NO:31). Por lo tanto, el péptido 2a representa un miembro de un conjunto de secuencias polares no cargadas que se autoensamblan en fibrillas de tipo amiloide. Debido a que el péptido codificado 2a se colocaliza con Cldn1 e induce efectos funcionales equivalentes a 1a, la actividad potenciadora de la permeación no es específica de secuencia. El péptido 2a se autoensambla y tiene el mismo contenido de aminoácidos. Los datos no indican si es la estructura de hoja β de las fibrillas peptídicas en sí o la presentación de donantes/aceptores de enlaces de hidrógeno modelados en una arquitectura β cruzada anfipática que median la asociación con Cldn1 y la ruptura de la unión estrecha. A β ₄₂ altera la función de barrera de las células epiteliales vasculares, induciendo un cambio en la localización de Cldn5 (Marco et al., "Amyloid Beta-Peptide 1-42 Alters Tight Junction Protein Distribution in Brain Microvessel Endothelial Cells", *Neurosci. Lett.* 401:219-224 (2006)). Es una posibilidad intrigante que la mala localización inducida por amiloide de los componentes de TJ pueda ofrecer un mecanismo general para romper la función de TJ y esto puede ser relevante para una serie de enfermedades humanas, incluida la enfermedad de Alzheimer. Se encontró que A β ₄₂ 2.4 μ M rompe las TJ, pero en menor grado que los péptidos 1a y 2a.

La secuencia 1a aislada se autoensambla en estructuras de hoja β en presencia de surfactante. Las fibrillas de tipo amiloide representan un estado de plegamiento termodinámicamente favorable para estos péptidos sintéticos, pero no implican que el amiloide sea una conformación nativa para la proteína Cldn1 intacta. No hay evidencia de que las claudinas u otras proteínas TJ participen en la amiloidosis sistémica. Sin embargo, el amiloide funcional se encuentra en todos los reinos procariotas y eucariotas (Otzen et al., "We Find Them Here, We Find Them There: Functional Bacterial Amyloid", *Cell Mol. Life Sci.* 65:910-927 (2007)). Por ejemplo, los orgánulos de flotabilidad de los microorganismos acuáticos (Bayro et al., "An Amyloid Organelle, Solid-State NMR Evidence for Cross- β Assembly of Gas Vesicles", *J. Biol. Chem.* 287:3479-3484 (2012)) están revestidos con amiloide anfipático, lo que proporciona una barrera hermética a los gases. Cldn1 se autoensambla espontáneamente en la superficie celular (Sasaki et al., "Dynamic Behavior of Paired Claudin Strands Within Apposing Plasma Membranes", *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.*

100:3971-3976 (2003)), y la organización y regulación de TJ están mediadas por una interacción compleja de interacciones proteína-proteína (Rodgers et al., "Epithelial Barrier Assembly Requires Coordinated Activity of Multiple Domains of the Tight Junction Protein ZO-1", J. Cell Sci. 126:1565-1575 (2013)). La Cldn1 nativa podría poseer un carácter de hoja β significativo en la interfase proteína-proteína extracelular, pero el desafiante problema de determinar la estructura de la Cldn1 de longitud completa y/o unida a la membrana deberá resolverse para abordar esta especulación.

Los datos demuestran que estos péptidos se unen a o muy cerca de Cldn1 y parecen alterar el tráfico celular de Cldn1. Se cree que esta localización alterada de Cldn1 provoca la ruptura de TJ y permite que moléculas tan grandes como los anticuerpos atraviesen la barrera en cultivo. La eficacia mejorada de péptidos estructurados tales como 1a y 2a, en relación con los resultados publicados anteriormente con homólogos no humanos, demuestra que su conformación de hoja β puede unirse a Cldn1, aunque no está claro si la unión ocurre en la superficie celular o durante el reciclaje endocítico. El uso de surfactante o membrana para la estructura del péptido podría ser una ventaja. Por ejemplo, la formulación de péptidos Cldn1 con cargas útiles terapéuticas o antígenos de vacuna en liposomas o portadores de micelas se puede llevar a cabo como se describe en este documento.

Los péptidos de ejemplo adicionales que han mostrado evidencia de autoensamblaje y son útiles de acuerdo con las realizaciones ilustradas en este documento se encuentran en la figura 1C

Ejemplo 2: uso de péptidos que rompen la unión estrecha para la administración de luciferasa y antígenos de vacunas

Los experimentos de permeabilidad a la luciferasa se llevaron a cabo como sigue. Se trataron ratones (4 ratones por grupo) después de la anestesia en la cavidad nasal con vehículo solo (Pluronic F127 al 0.006 % en solución salina) o con concentraciones variables de péptido. Después de 12 o 24 horas, se aplicó una solución de 10 microgramos de luciferasa. A continuación, se obtuvieron imágenes de los ratones en diversos momentos para determinar la cantidad de luciferasa que quedaba en la cavidad nasal. Como se muestra en las figuras 11A-11F, la aplicación del péptido 1A dio como resultado una tendencia de mayores cantidades de luciferasa perdidas de la cavidad nasal, consistente con un aumento de la permeabilidad mediado por péptidos.

Los experimentos de inmunización con hemaglutinina de influenza se llevaron a cabo como sigue. Se trataron ratones (4 ratones por grupo) en la cavidad nasal con vehículo solo (Pluronic F127 al 0.006 % en solución salina), vehículo más hemaglutinina (HA) de la influenza o vehículo más HA más un agente permeabilizante (péptidos 1A o 2A, o potenciador derivado de semen de la infección por virus (SEVI)). Los títulos de anticuerpos contra HA en suero se evaluaron los días 18, 28 y 35 después del tratamiento, y se determinaron IgG e IgA específicas de HA en el lavado bronquial el día 48 después del tratamiento. Tanto los títulos de anticuerpos séricos (Figuras 12A-12C) como los anticuerpos específicos de HA en el lavado bronquial (Figuras 12D-12E) muestran una tendencia de mejora en presencia de péptidos 1A o 2A, consistente con un aumento dependiente de péptidos en la liberación de antígenos.

Es importante destacar que en cada uno de los experimentos de liberación de luciferasa y liberación de antígeno, no se observó toxicidad a la dosis más alta de péptido probada (100 micromolar).

Se apreciará que las variantes de las descritas anteriormente y otras características y funciones, o alternativas de las mismas, se pueden combinar en muchos otros sistemas o aplicaciones diferentes. Los expertos en la técnica pueden realizar posteriormente diversas alternativas, modificaciones, variaciones o mejoras actualmente imprevisibles o no previstas, que también se pretende que estén abarcadas por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de fármaco transepitelial que comprende:
un portador farmacéuticamente apropiado;
una cantidad eficaz de un agente terapéutico;
- 5 un agente que rompe transitoriamente la claudina-1 dentro de uniones estrechas, en el que el agente comprende un péptido que incluye una estructura secundaria de hoja β autoensamblada y consiste en la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDSLNLSSSTLQATR (SEQ ID NO: 5); y
un surfactante seleccionado del grupo que consiste en Pluronic® F-127, Pluronic® F-68, Tween 80, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 184 y poloxámero 188.
- 10 2. Una formulación de vacuna transepitelial que comprende:
un portador farmacéuticamente apropiado;
una cantidad eficaz de un antígeno o una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno presente en el portador, y opcionalmente, uno o más adyuvantes;
un agente que rompe transitoriamente la claudina-1 dentro de las uniones estrechas, en la que el agente comprende
- 15 un péptido que incluye una estructura secundaria de hoja β autoensamblada y consiste en la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDSLNLSSSTLQATR (SEQ ID NO: 5); y
un surfactante seleccionado del grupo que consiste en Pluronic® F-127, Pluronic® F-68, Tween 80, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 184 y poloxámero 188.
- 20 3. La formulación de fármaco transepitelial según la reivindicación 1 o la formulación de vacuna transepitelial según la reivindicación 2, en la que la formulación de fármaco es una formulación de fármaco transdérmica o transmucosa, o la formulación de vacuna es una formulación de vacuna transdérmica o transmucosa.
4. La formulación de fármaco transepitelial según la reivindicación 1 o la formulación de vacuna transepitelial según la reivindicación 2, en la que la formulación de fármaco transepitelial o la formulación de vacuna transepitelial comprende una pluralidad de péptidos y en la que la pluralidad de péptidos forma una o más fibrillas.
- 25 5. Una composición farmacéutica que comprende:
un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos SSVSQSTGQIQSKVFDSLNLSSSTLQATR (SEQ ID NO: 5);
un portador farmacéuticamente apropiado; y
un surfactante seleccionado del grupo que consiste en Pluronic® F-127, Pluronic® F-68, Tween 80, polisorbato 20,
- 30 polisorbato 80, poloxámero 184 y poloxámero 188.
6. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, que comprende, además:
un agente terapéutico.
7. Una formulación para su uso en un método de ruptura de una barrera epitelial, el método comprende aplicar a un sitio epitelial una cantidad de la formulación, rompiendo así la formación de la barrera en el sitio epitelial, la formulación
- 35 comprende un surfactante seleccionado del grupo que consiste en Pluronic® F-127, Pluronic® F-68, Tween 80, polisorbato 20, polisorbato 80, poloxámero 184 y poloxámero 188, y un agente que rompe transitoriamente la claudina-1 dentro de las uniones estrechas que es eficaz para romper la claudina-1 en las células epiteliales presentes en el sitio, en el que el agente comprende un péptido que incluye una estructura secundaria de hoja β autoensamblada y consiste en la secuencia de aminoácidos de SSVSQSTGQIQSKVFDSLNLSSSTLQATR (SEQ ID NO: 5).
- 40

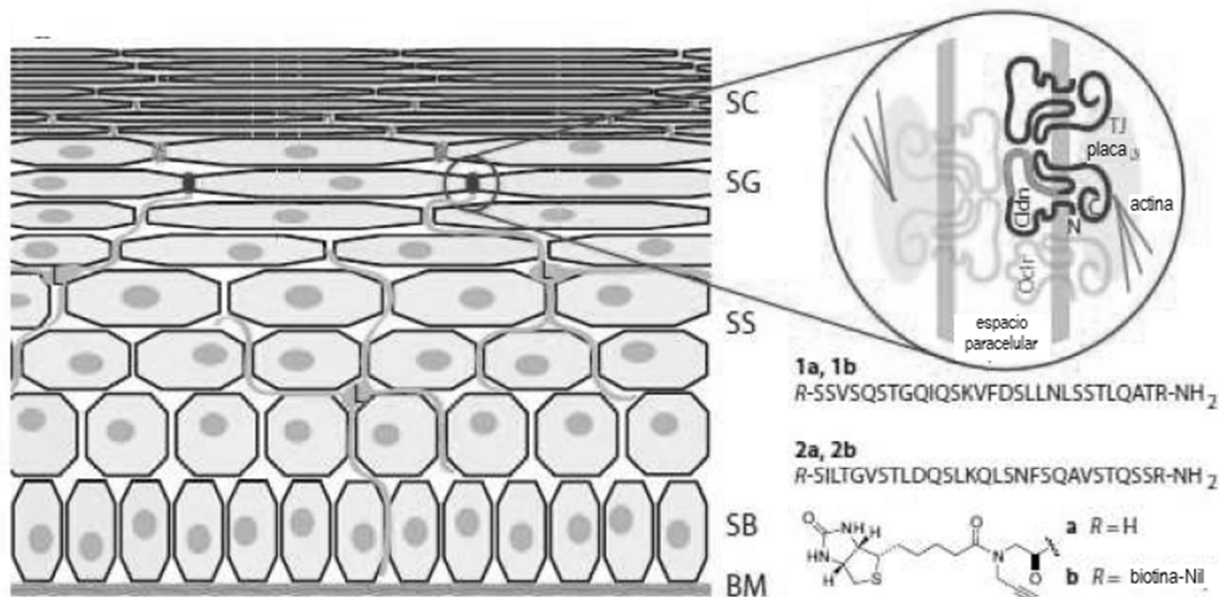
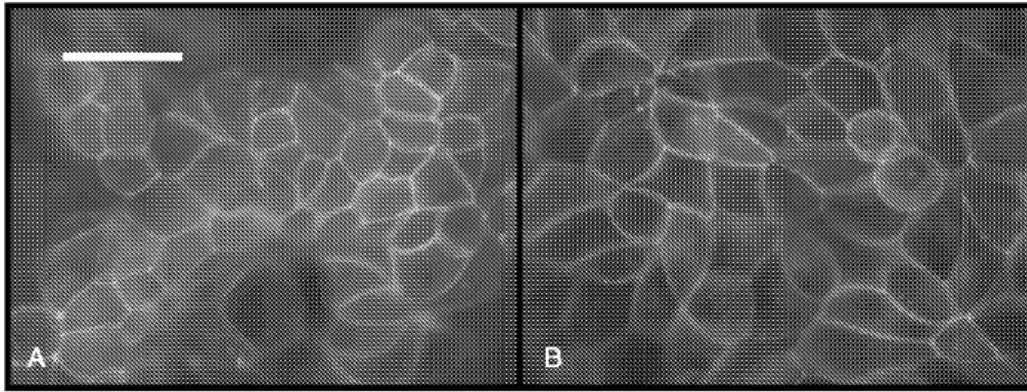


FIG. 1A

FIG. 1B

SEQ ID NO:	Péptido	Polar no cargado	Comportamiento de gel	Observaciones
CLDN1				
5	SSVSQSTGQIQSKVFDSSLNLSSTLQATR	16/29	Sí	EAA6-085A
7	GGMSCVVSQSTGQIQCKV		Sí	p. EAA5-053
8	SCVSQSTGQIQCKV		Sí	EAA4-083A
9	RRGSCVVSQSGRR		Sí	EAA5-013M
12	LWMSSVSQSTGQIQSKVFD	10/20		
13	MSSVSQSTGQIQSKVFD	10/18		CLDN1 52-69, C a S
14	MSSVSQSTGQIQSKV	9/15		CLDN1 52-66, C a S
15	MSSVSQST	6/8		CLDN1 52-59, C a S
Codificado				
6	SILTGVSITLDQSLKQLSNFSQAVSTQSSR	16/29	Sí	EAA6-061B
10	ISGVQCCQTKQSS	9/13	Sí	EAA5-013Jscr
11	RRGVCSSSQGRR	5/12	Sí	EAA5-013Mscr
		(5/6, núcleo)		
16	ISMSQQVSQSGVSDKFST	10/18		scrCLDN1 52-69, C a S
17	SIMSGKQSSVQSQVT	9/15		scrCLDN1 52-66, C a S
				en base a EAA5-013Fscr
18	VMSSTSQ	6/8		scrCLDN1 52-59, C a S
19	VSSSSQ	5/6		en base a EAA5-013Mscr
20	SILTGVSIT	4/8		en base a AMYLPRED2

FIG. 1C



FIGS. 2A-2B

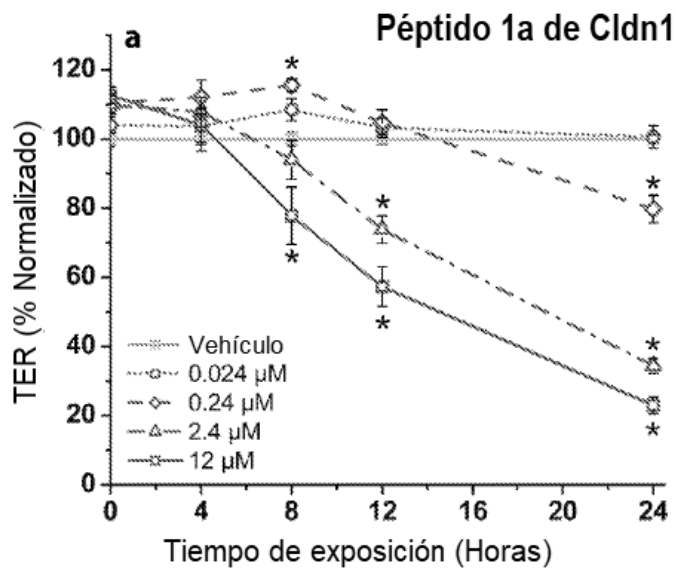


FIG. 3A

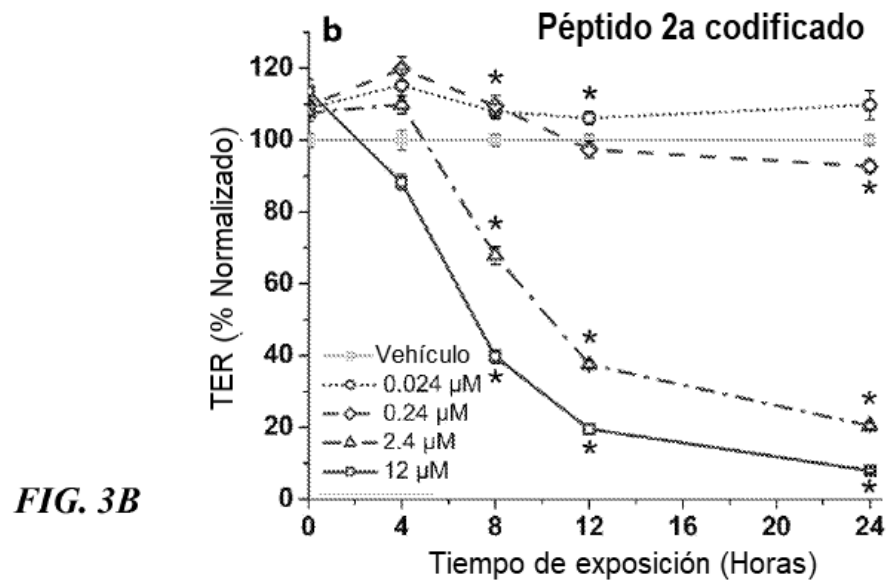


FIG. 3B

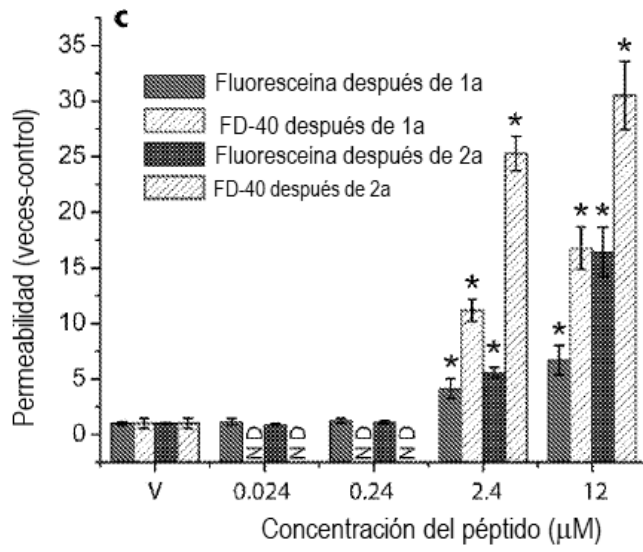


FIG. 3C

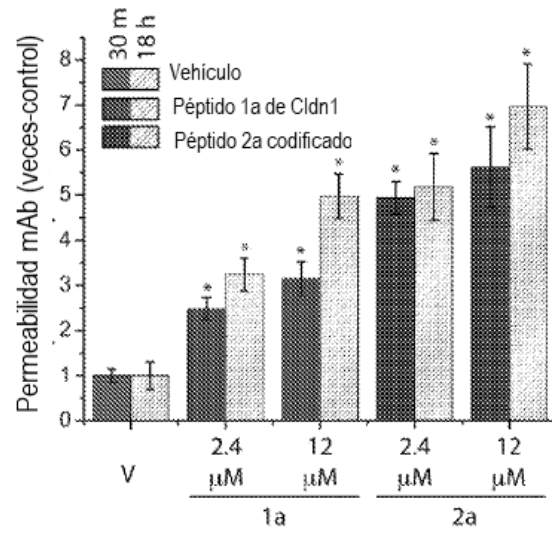


FIG. 3D

**Permeabilidad de FD-40
en 18 horas**

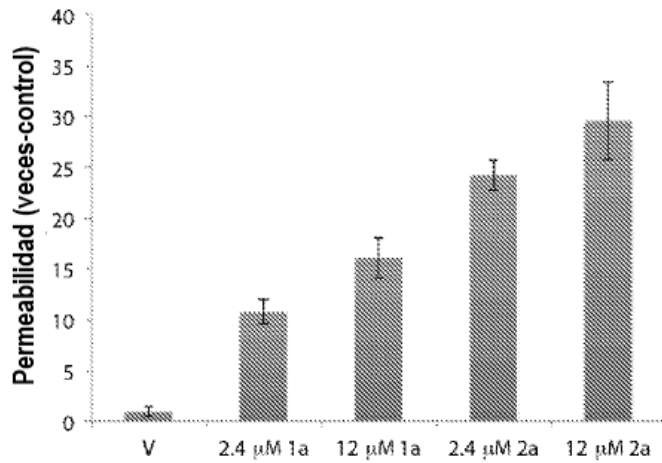


FIG. 3E

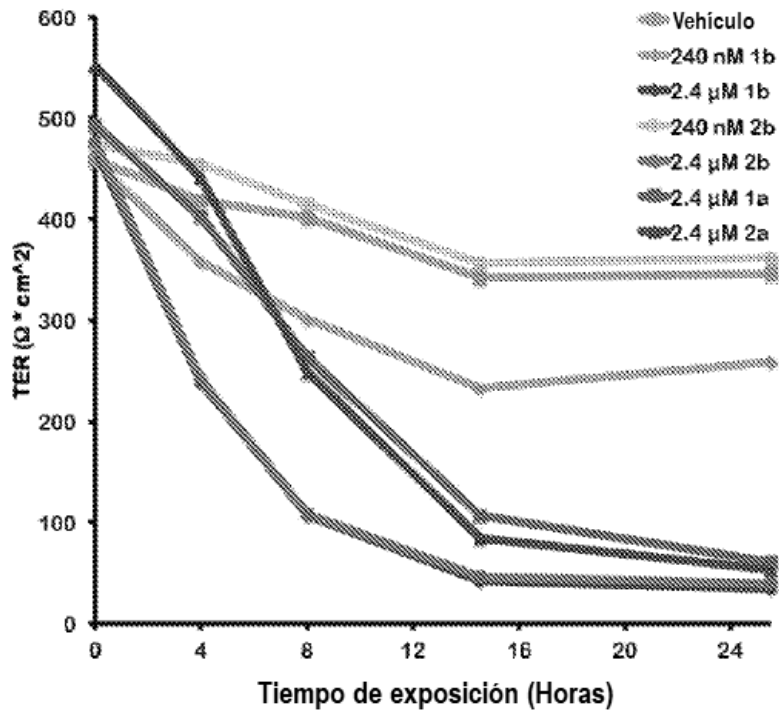


FIG. 4A

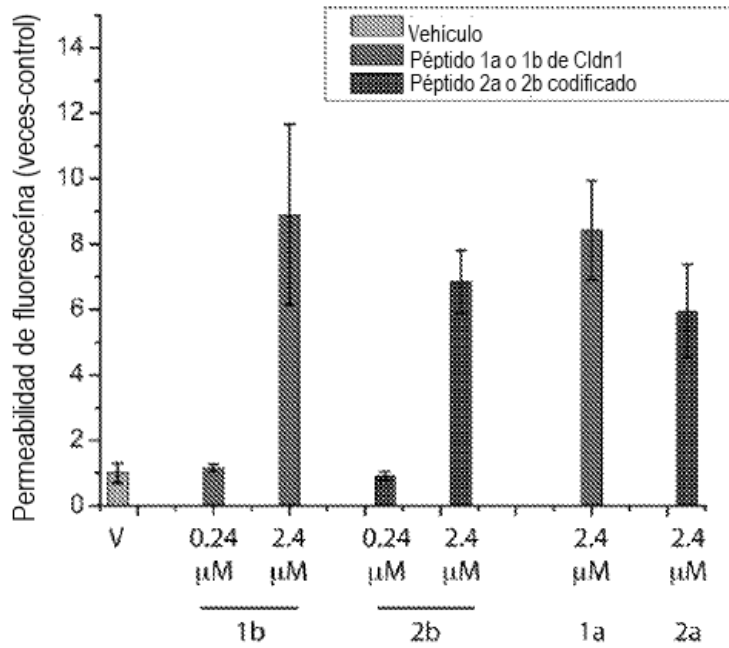


FIG. 4B

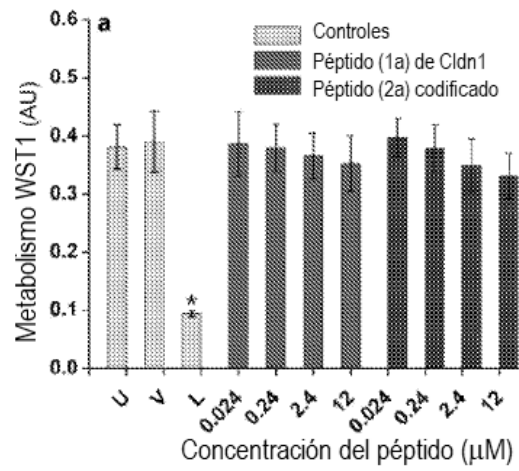


FIG. 5A

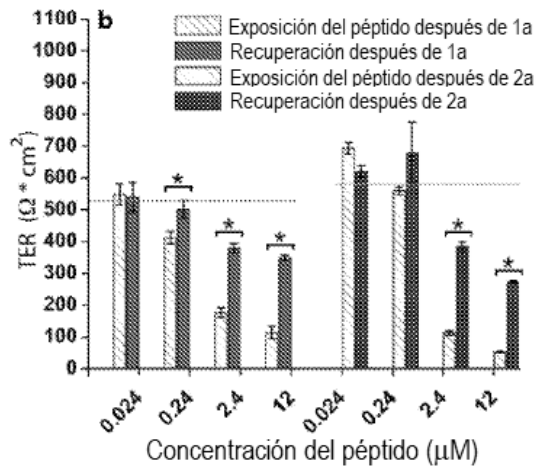


FIG. 5B

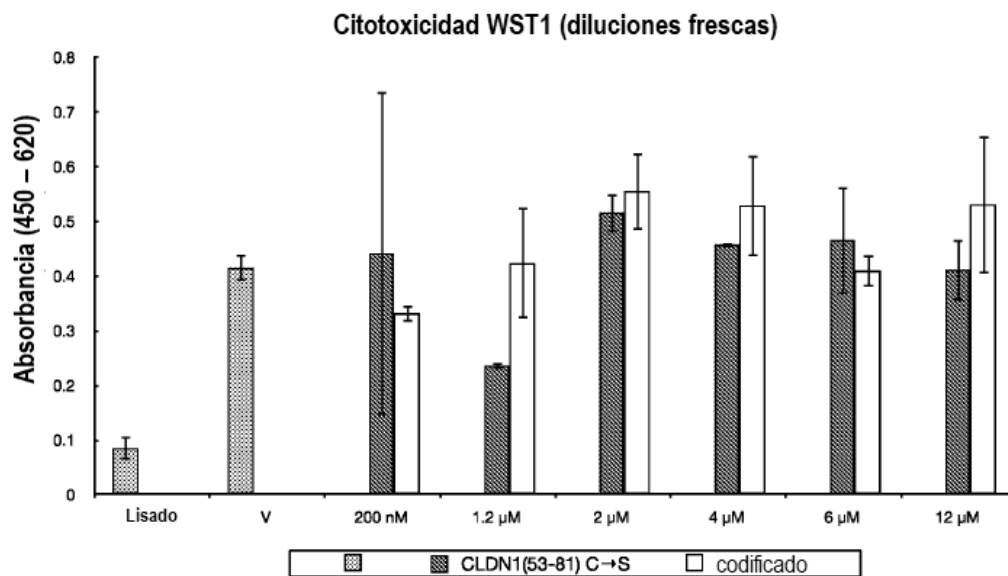
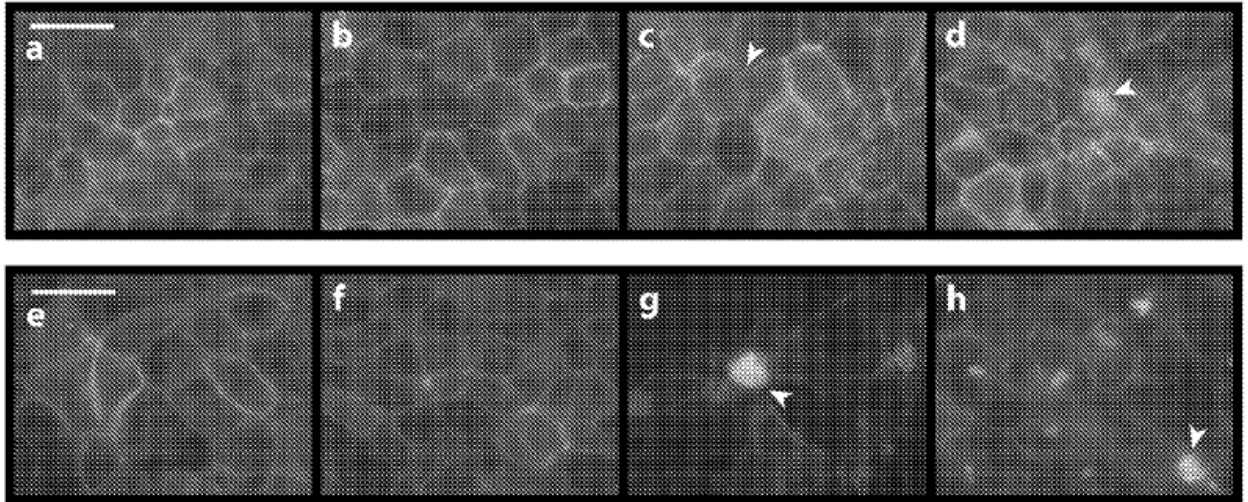


FIG. 5C



FIGS. 6A-6H

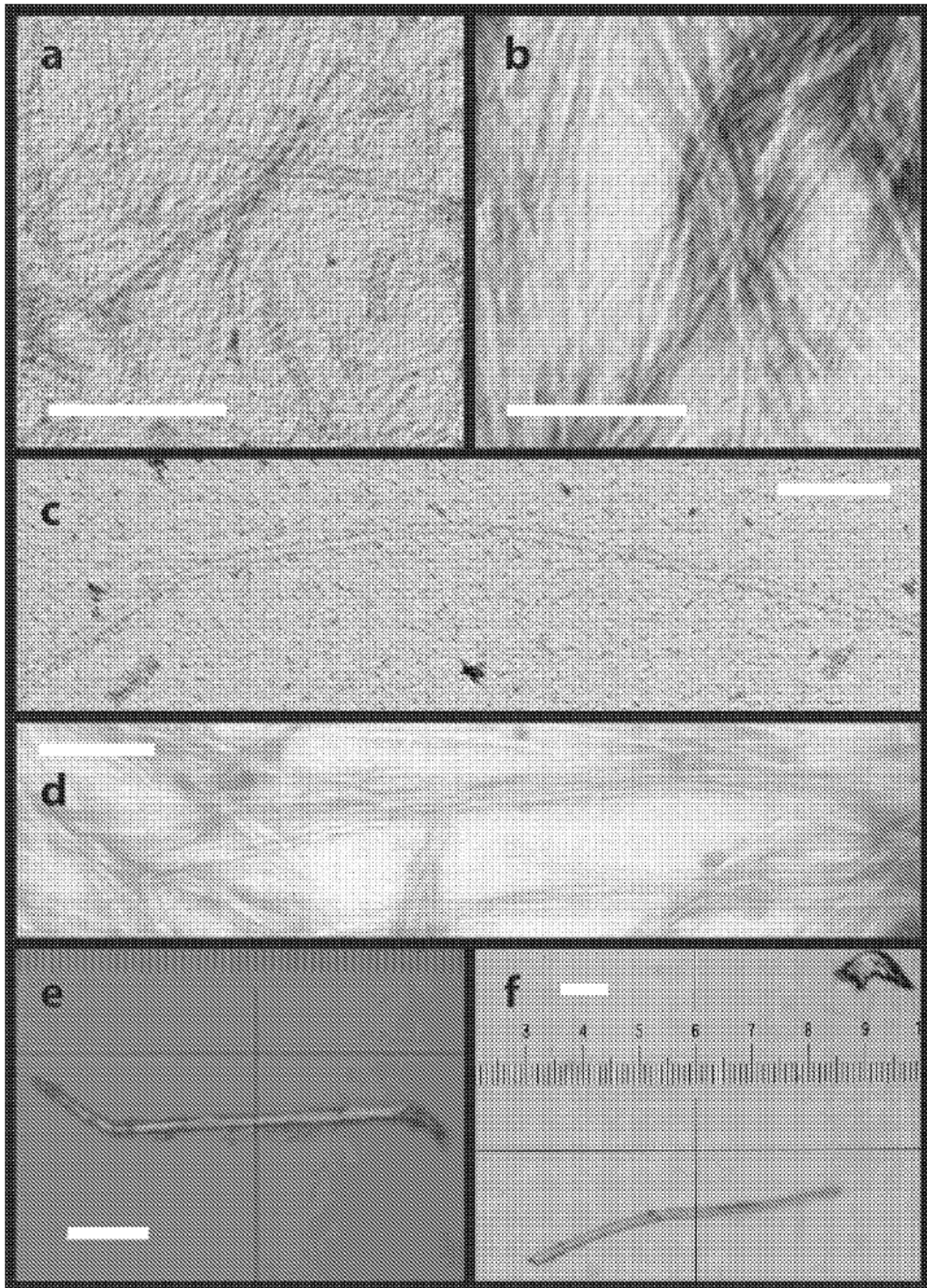


FIG. 7A-7F

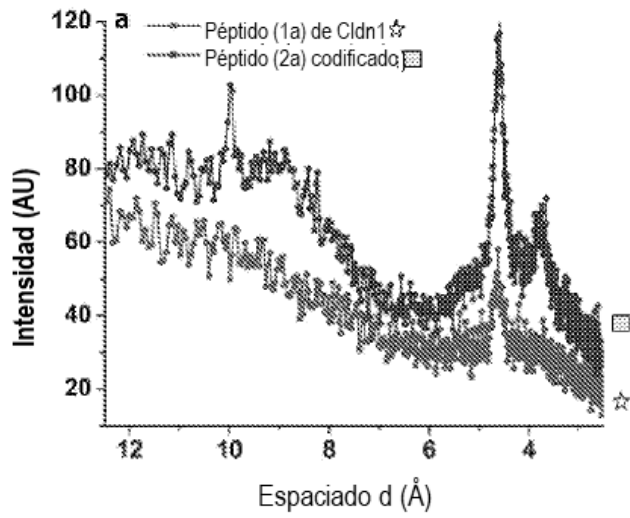


FIG. 8A

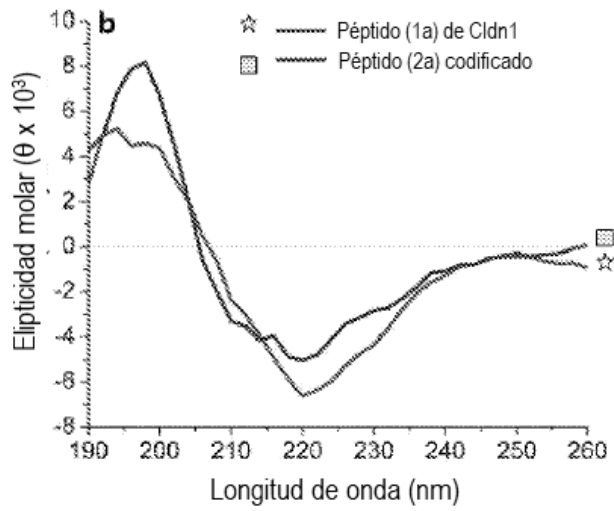


FIG. 8B

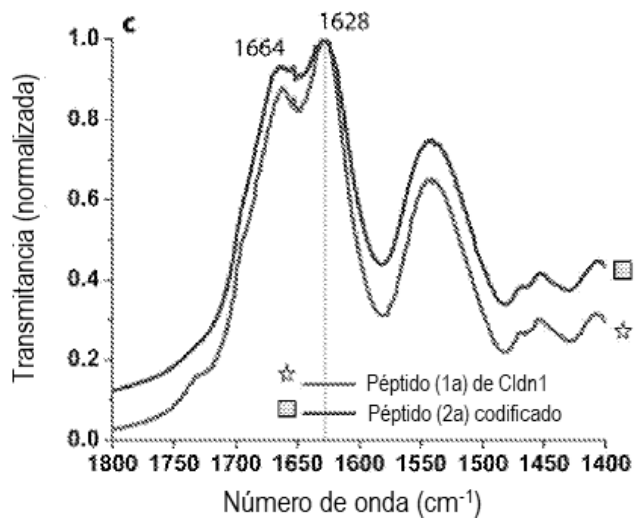


FIG. 8C

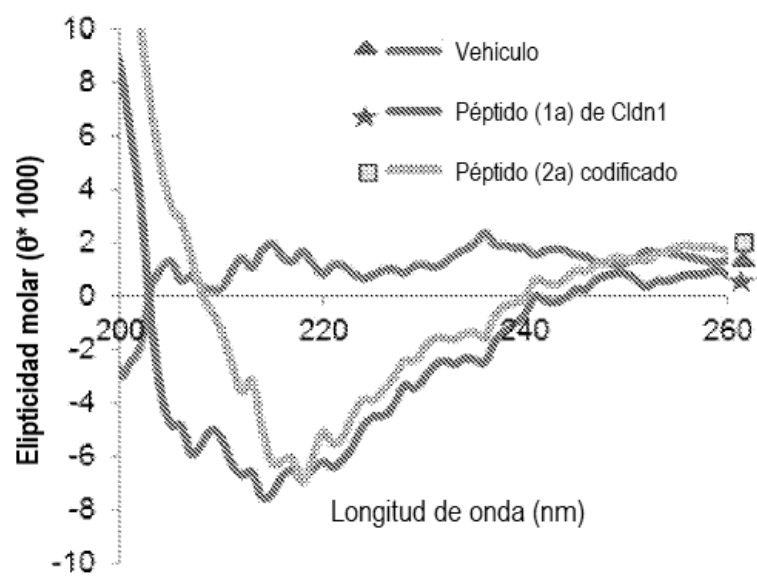


FIG. 8D

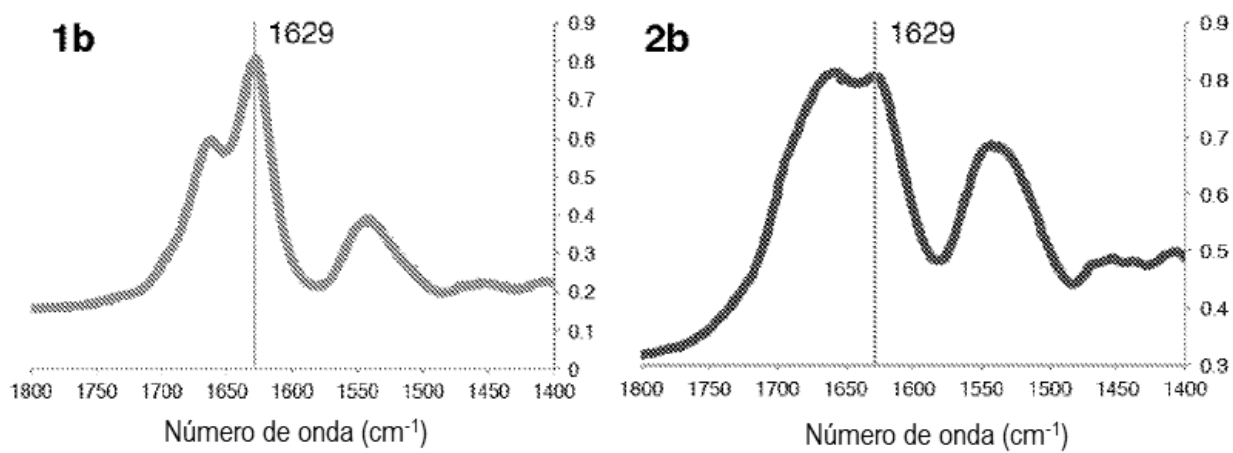


FIG. 8E

Péptido 1a

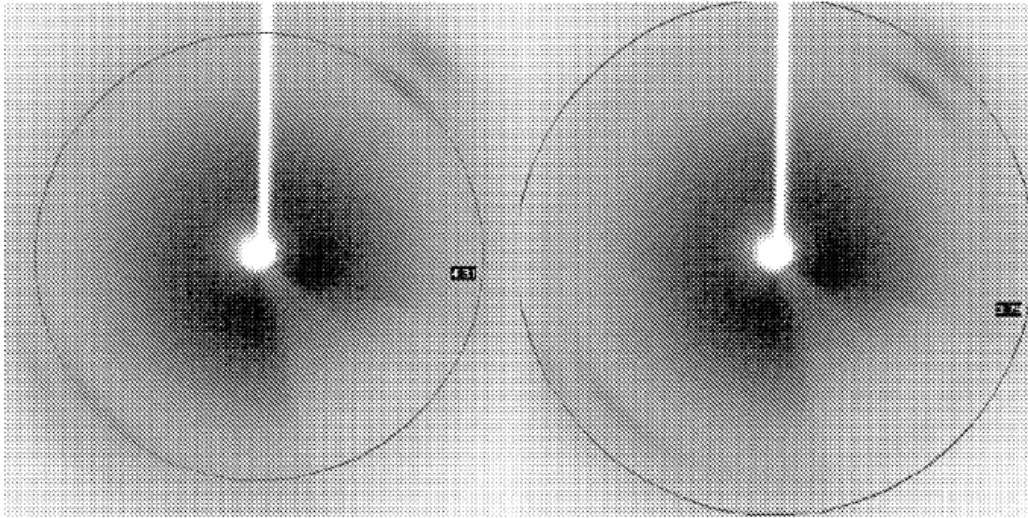


FIG. 9

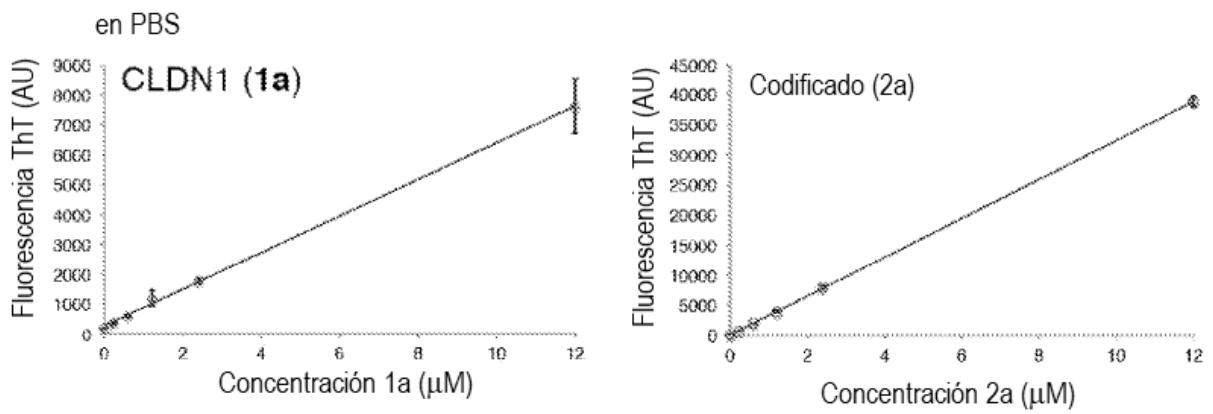


FIG. 10A

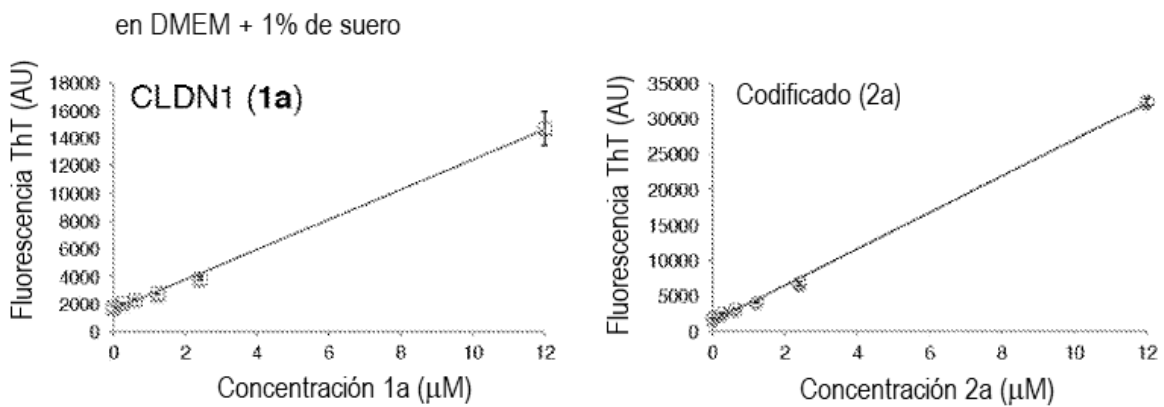


FIG. 10B

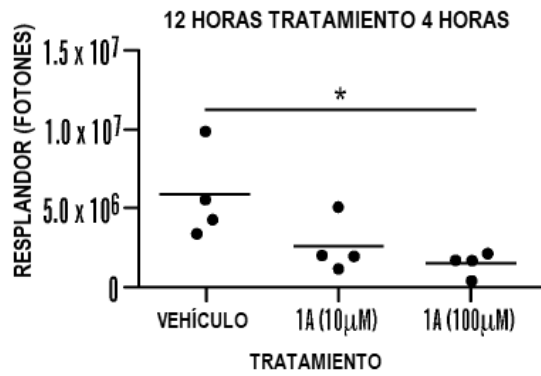


FIG. 11A

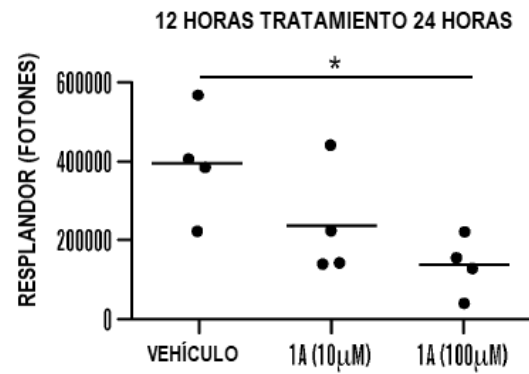


FIG. 11B

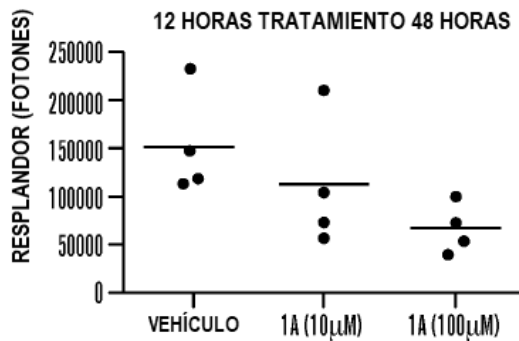


FIG. 11C

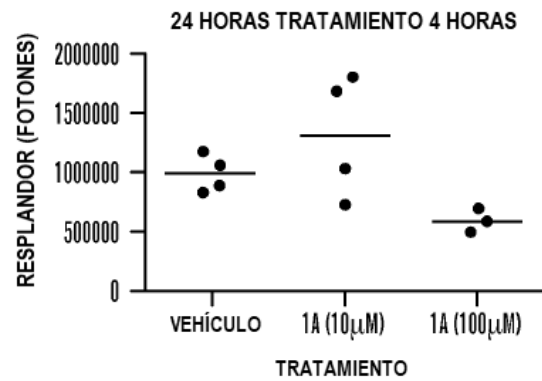


FIG. 11D

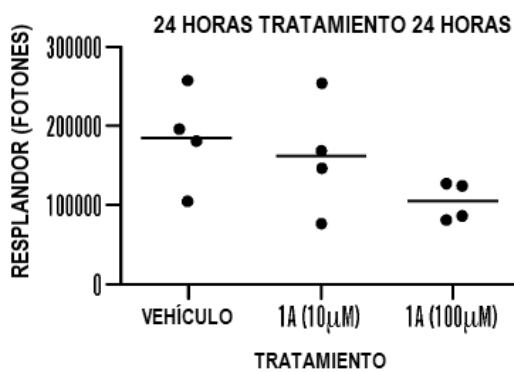


FIG. 11E

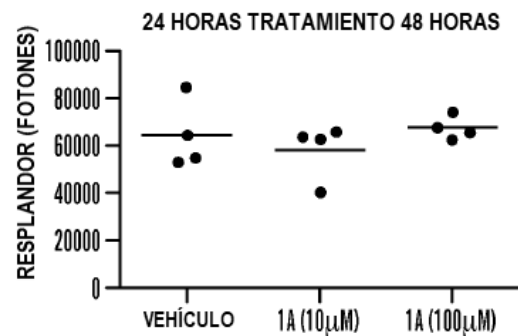


FIG. 11F

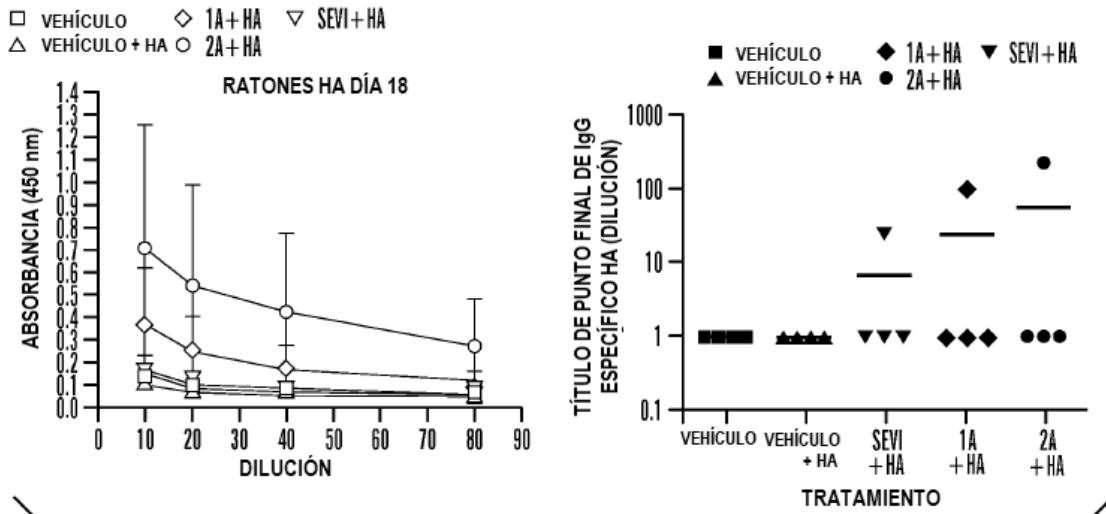


FIG. 12A

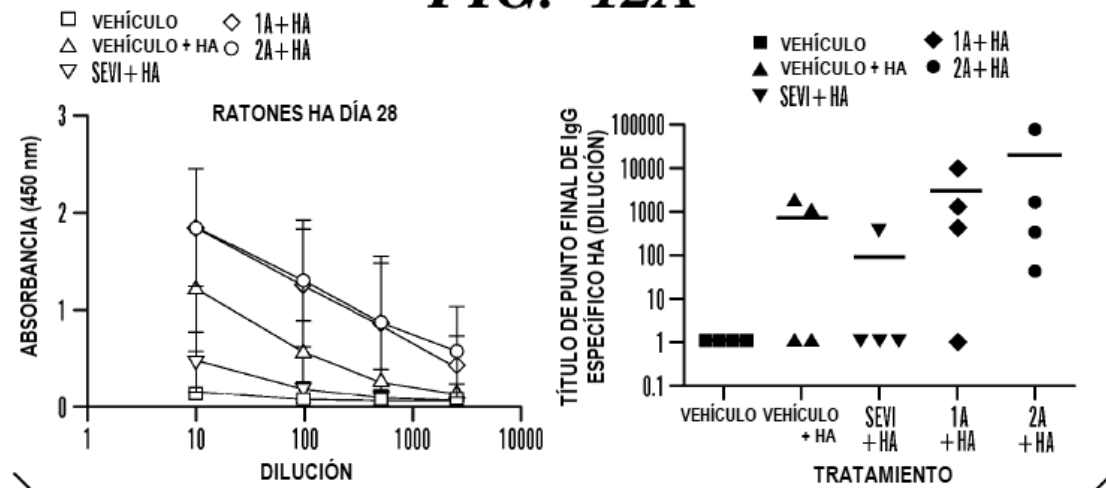


FIG. 12B

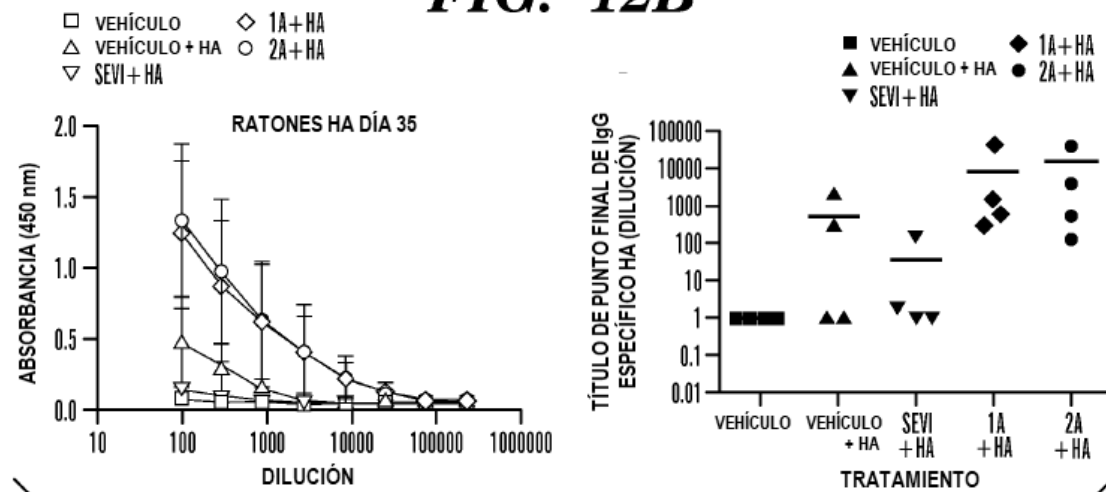


FIG. 12C

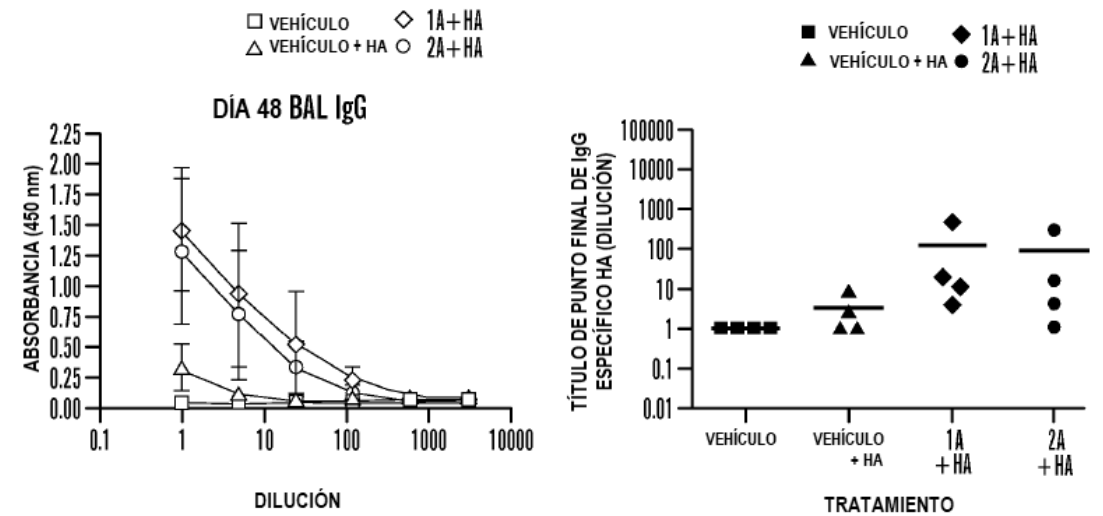


FIG. 12D

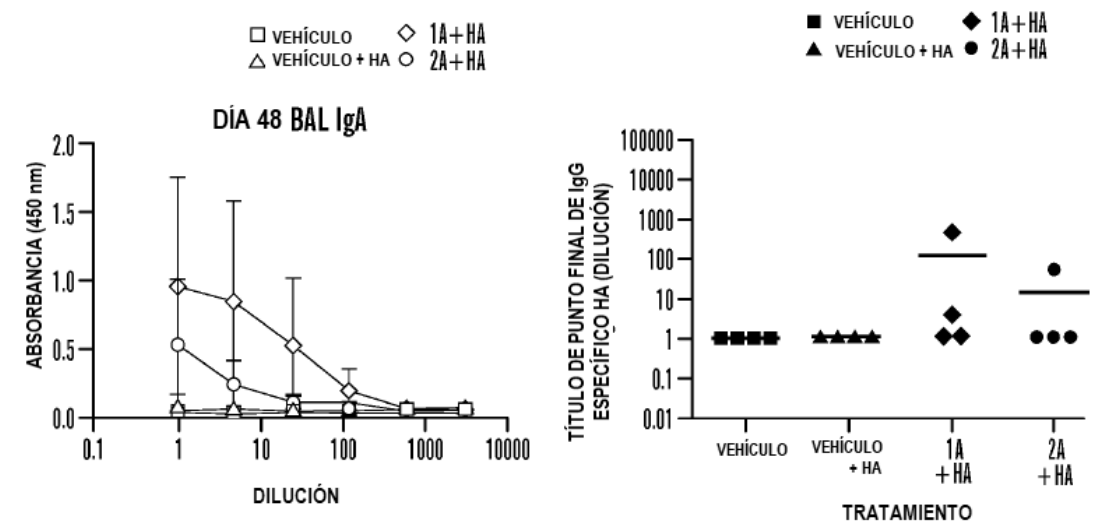


FIG. 12E

FIG. 13A

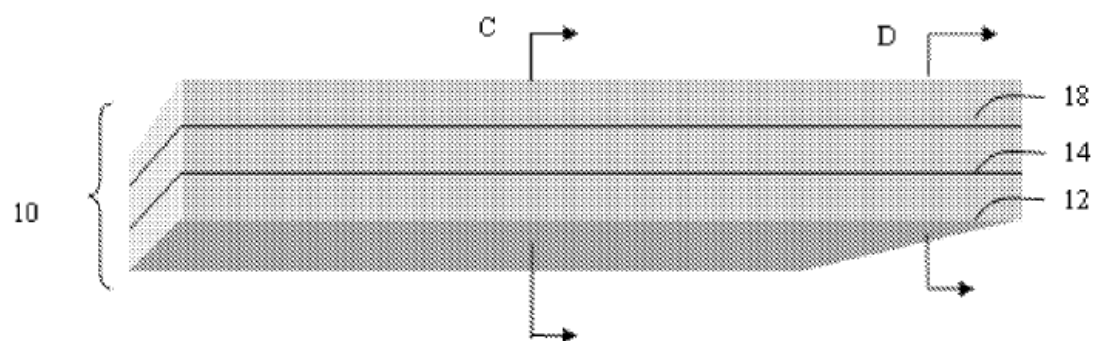


FIG. 13B

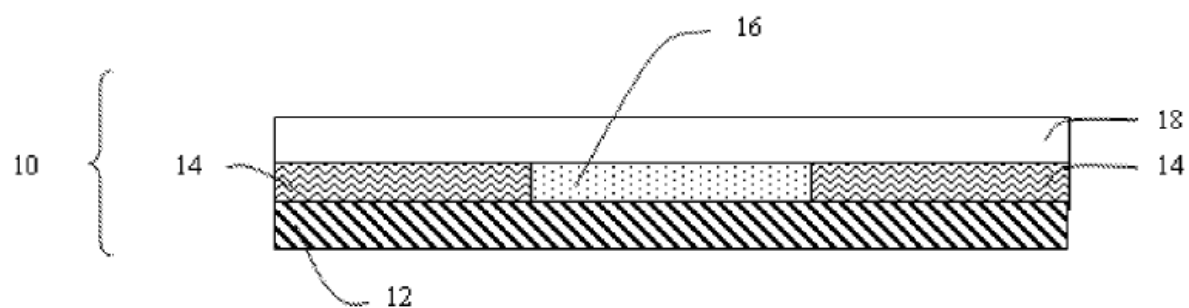


FIG. 13C

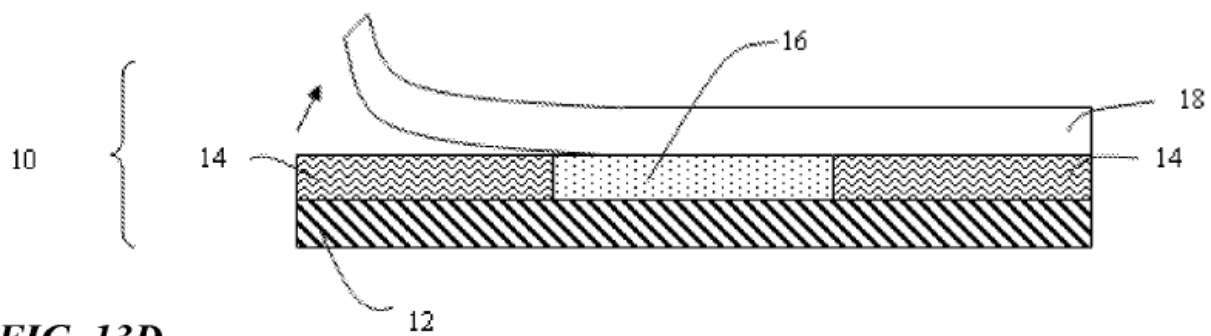


FIG. 13D

