(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 862 392**

(51) Int. CI.:

A61K 31/70	(2006.01)	***A61K 31/205***	(2006.01)
A61K 31/505	(2006.01)	***A61K 31/405***	(2006.01)
A61K 9/16	(2006.01)		
A61K 9/14	(2006.01)		
A61P 1/12	(2006.01)		
A61K 31/198	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		
A61K 33/00	(2006.01)		
A61K 33/06	(2006.01)		
A61K 33/20	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2013 PCT/US2013/025294**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13119917**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2013 E 13747028 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020 EP 2812007**

(54) Título: **Composiciones y métodos para tratar diarrea**

(30) Prioridad:

08.02.2012 US 201261596480 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2021

(73) Titular/es:

UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC. (100.0%)
223 Grinter Hall
Gainesville, FL 32611, US

(72) Inventor/es:

VIDYASAGAR, SADASIVAN;
OKUNIEFF, PAUL y
ZHANG, LURONG

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Composiciones y métodos para tratar diarrea

Antecedentes de la invención

La infección por Rotavirus es la causa principal de enfermedades diarreicas graves y deshidratación en bebés y niños pequeños a través del mundo. Los síntomas de la infección por rotavirus incluyen diarrea acuosa, deshidratación grave, fiebre, y vómito. La infección por rotavirus también puede resultar en las lesiones del yeyuno produciéndose el daño máximo en el día tres post-inoculación, y en algunos casos, provocando una reducción del área superficial de la vellosidad del 30 % al 50 % de lo normal (Rhoads *et al.* (1996) *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 14(3):175-181).

El mecanismo fisiopatológico por el cual el rotavirus induce diarrea es a través de la acción de una proteína-4 no específica a enterotoxina (NSP4) en las células epiteliales del intestino delgado. La NSP4 moviliza el Ca^{2+} intracelular en el epitelio de la cripta tanto del intestino delgado como del grueso para imitar los efectos secretores del carbacol agonista colinérgico (CCh) en potenciar la secreción de fluido dependiente de AMPc.

Se sabe que el aumento en el AMPc intracelular ($[AMPc]_i$) y Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$ median la secreción de Cl^- y/o HCO_3^- en la diarrea asociada con las condiciones tanto infectivas como inflamatorias (Zhang *et al*. (2007) *J Physiol* 581(3):1221-1233). El gradiente osmótico generado por la secreción de cloruro tiene como resultado un movimiento pasivo de agua en el lumen intestinal, provocando así una hez acuosa. La secreción de Cl^- con movimiento pasivo de agua se produce en menor cantidad durante la digestión y absorción normal, lo que es esencial para un adecuado mezclado, agitación y propulsión suave a través del lumen intestinal. En un intestino delgado normal absorbente, hay un equilibrio fino entre la absorción que ocurre en la región de la célula vellosa y la secreción de las células de cripta. Un desequilibrio que resulta de una absorción disminuida, secreción aumentada, o un efecto combinado pueden tener como resultado la diarrea.

Los canales de cloruro activados con calcio (CaCC) participan en procesos fisiológicos importantes. La transfección de células epiteliales con pequeño ARN de interferencia específico contra cada una de las proteínas de membrana que son reguladas por IL-4 revela que el TMEM16A, un miembro de una familia de proteína putativa de membrana de plasma con una función desconocida, está asociada con la corriente de cloruro dependiente de calcio (Caputo *et al.* (2008) *Science* 322(5901):590-594). El TMEM16A se expresa ampliamente en tejidos de mamíferos, incluyendo epitelios traqueales, intestinales y glandulares, células de músculo liso, y células intersticiales de Cajal en el tracto gastrointestinal (Namkung *et al*., *J. Biol. Chem.* 286(3):2365-2374).

La absorción de la glucosa luminal por los enterocitos en el intestino delgado sigue al transporte activo secundario (Hediger *et al*. (1994) *Physiol. Rev.* 74(4):993-1026; Wright *et al*. (2004) *Physiology (Bethesda)* 19:370-376). El transportador de sodio-glucosa (SGLT-1) tiene una estequiometría de 2:1, transportando así dos iones de sodio por una molécula de glucosa a través de la membrana luminal (Chen *et al*. (1995) *Biophys. J.* 69(6):2405-2414). El transporte de sodio glucosa fuertemente acoplado está impulsado por el gradiente electroquímico de Na^+ formado por la actividad de Na-K-ATPasa. La absorción de Na^+ electrogénico, mediada por SGLT-1 provoca un arrastre de disolvente, llevando así a una absorción pasiva de agua desde el lumen.

El mantenimiento de la hidratación es un elemento crítico en el tratamiento de las enfermedades diarreicas incluyendo la diarrea inducida por rotavirus. Actualmente, la diarrea secretora se trata con una bebida oral de rehidratación (ORD) - una solución salina que contiene sodio y una cantidad significativa de glucosa y otras moléculas de azúcar. La glucosa siempre ha sido un sostén principal tanto en los fluidos enterales como parenterales para corregir los defectos de absorción de electrolitos y nutrientes asociados con las condiciones de la enfermedad. Las ORD se diseñan para corregir la pérdida de líquidos y electrolitos en la diarrea secretora, basándose en la teoría de que con la captación activa y asociada de sodio y glucosa en el intestino delgado, hay una entrada subsiguiente de agua que sigue el movimiento del estado absorbido.

Aunque las ORD proporcionen un adelanto significativo en el tratamiento de cólera y otras condiciones diarreicas, hay una necesidad de mejorar su eficiencia. La formulación mejorada se necesita debido a la baja velocidad de rehidratación proporcionada por las formulaciones de ORD existentes. La velocidad de rehidratación en pacientes diarreicos no está al paso con la velocidad de pérdida de electrolitos. Las formulaciones existentes de ORD han demostrado ser ineficaces en el tratamiento de diarrea inducida por rotavirus, mientras que permanece desconocida la causa exacta de la ineficacia. Por consiguiente, existe una necesidad de formulaciones mejoradas de ORD para el tratamiento de diarrea.

El documento US2012/077748A1 (Vidyasagar Sadasivan et al.) desvela composiciones terapéuticas que se dice que son de uso en el tratamiento o la mejora de lesiones a la mucosa del intestino delgado. En realizaciones preferidas, la composición comprende uno o más nutrientes y/o electrolitos que adquieren o retienen capacidad de absorción considerable.

Gutiérrez C. *et al*. (Journal of Health, Population and Nutrition, vol. 25, n.º 3, 2007, páginas 278-284) describen un

estudio que investiga si una solución de rehidratación oral (ORS) en la cual la glucosa se reemplaza por L-glutamina (L-glutamina ORS) es más eficaz que la solución de rehidratación basada en glucosa convencional recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS-ORS) en la reducción del volumen de heces y el tiempo a rehidratar en diarrea aguda.

Haider R. *et al.* (BMJ, vol. 308, 1994, páginas 624-626) describe un estudio que evalúa el riesgo de hiperglicemia con dos soluciones de rehidratación oral convencionales que contienen carbohidratos en comparación con una solución sin carbohidratos durante la rehidratación de pacientes diabéticos con diarrea aguda. El estudio concluye que las soluciones de rehidratación orales que contienen glucosa, polvo de arroz o glicina pueden administrarse de forma segura a pacientes diabéticos con diarrea aguda y algo de deshidratación.

Breve sumario

La presente invención proporciona composiciones y métodos terapéuticos para su uso en métodos para diarrea, para proporcionar rehidratación, para corregir desequilibrios de electrolitos y fluidos, y/o para mejorar la función del intestino delgado.

En una realización de la divulgación se proporciona una composición formulada para la administración enteral, en donde la composición no contiene glucosa. En una realización preferida, la composición se formula como una bebida de rehidratación oral (ORD). En otra realización preferida, la composición está en una forma de polvo, y puede ser reconstituida en agua para uso como una ORD.

En una realización, la composición de la presente divulgación comprende uno o más ingredientes seleccionados de aminoácidos libres; electrolitos; di-péptidos y/u oligo-péptidos; vitaminas; y opcionalmente, agua, vehículos terapéuticamente aceptables, excipientes, agentes tamponantes, agentes saborizantes, colorantes y/o conservantes. En una realización, la osmolaridad total de la composición es de aproximadamente 100 mosm a 250 mosm. En una realización, la composición tiene un pH de aproximadamente 2,9 a 7,3.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un tratamiento que comprende administrar, a través de una vía enteral, a un sujeto en necesidad de tal tratamiento, una cantidad eficaz de una composición de la divulgación. La composición puede administrarse una vez o muchas veces cada día. En una realización preferida, la composición se administra por vía oral.

En una realización preferida, la presente invención proporciona tratamiento de diarrea inducida por la infección por rotavirus y/o NSP4. En otra realización preferida, la presente divulgación da como resultado una disminución de la secreción de Cl^- y/o HCO_3^- y/o una absorción mejorada de fluidos.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la cinética de saturación para el transporte de glucosa acoplada a Na^+ y 3-O-metilglucosa acoplada a Na^+ (3-OMG). (**A**) El aumento en la concentración de glucosa en el lumen da como resultado un aumento dependiente de la concentración en I_{sc}. El ajuste no lineal de la curva con el modelo de Michaelis-Menten para la cinética de la enzima muestra $V_{máx}$ = 3,3 ± 0,19 µeq·h^{-1}·cm^{-2} y K_m = 0,24 ± 0,06 mM. (**B**) El aumento de la concentración en lumen de 3-OMG da como resultado un aumento dependiente de la concentración en I_{sc} con un $V_{máx}$ = 1,9 ± 0,13 µeq·h^{-1}·cm^{-2} y K_m = 0,22 ± 0,07 mM. Aumentar la concentración de 3-OMG en tejidos pretratados con H-89 da como resultado una disminución significativa en $I_{sc,}$ cuando se compara con esa de los tejidos no pretratados con H-89. (**C**) La adición de concentraciones aumentadas de 3-OMG en tejidos pretratados con florizina no mostró respuesta a la glucosa. Los valores se obtienen de n = 6 tejidos.

La **Figura 2** muestra un flujo unidireccional y neto de Na^+ (**A**) y Cl^- (**B**). (**A**) La incubación de tejidos de intestino delgado con glucosa a una concentración de 0, 0,6, o 6 mM da como resultado una diferencia no significativa en $J_{ms}Cl^-$. La glucosa induce un aumento en $J_{sm}Cl^-$ en el intestino delgado. Específicamente, $J_{sm}Cl^-$ es significativamente mayor en la presencia de glucosa 0,6 y 6 mM, cuando se compara con el de glucosa 0 mM. A glucosa 0 mM, se observa una absorción significativa de Cl^- (cuando se compara con el nivel de absorción de Cl^- a glucosa 0,6 mM y 6 mM), mientras que a glucosa 0,6 mM y 6 mM, se observa secreción de Cl^-. (**B**). A glucosa 0 mM, se observa la absorción neta de Na^+ en los tejidos del intestino delgado. Se observa una mínima absorción de Na^+ a glucosa 0,6 mM, mientras que se observa una absorción significativa de Na^+ a glucosa 6 mM. Los flujos unidireccionales (J_{ms} y J_{sm}) no muestran una diferencia significativa a glucosa 0, 0,6 o 6 mM. Los valores se obtienen de n = 8 tejidos.

La **Figura 3** muestra los efectos de glucosa y 3-O-metil-glucosa en los niveles intracelulares de AMPc en la fracción celular vellosa, de cripta y entera del íleon. (**A**) El tratamiento con forskolina aumenta significativamente los niveles intracelulares de AMPc en las células de cripta y vellosas de una manera similar. (**B**) La incubación de las células con glucosa 8 mM tiene como resultado un aumento significativo de los niveles intracelulares de AMPc en las células vellosas, pero no en las células de cripta. (**C**) La incubación del raspado mucoso que consiste tanto de células epiteliales vellosas como de cripta con glucosa y 3-O-metil-glucosa, respectivamente, tiene como resultado un aumento significativo en los niveles intracelulares de AMPc. La incubación de células con 3-O-metil-glucosa a 6 mM tiene como resultado un aumento pequeño pero significativo en los niveles intracelulares de AMPc. La

incubación de células con diferentes concentraciones de glucosa produces efectos similares en los niveles intracelulares de AMPc. Las columnas representan los valores medios y las barras muestran la S.E.M. Los valores son obtenidos de n=4 diferentes ratones repetidos por triplicado. Los niveles de AMPc se normalizan a niveles de proteína de las respectivas fracciones y se expresan como pmol (mg de proteína)$^{-1}$. * P < 0,001 en comparación con el grupo después de la adición de forskolina o glucosa; #P < 0,01 en comparación entre células vellosas tratadas con salina y tratadas con glucosa. NS = no significativo (comparaciones múltiples de Bonferroni).

La **Figura 4** muestra los efectos de la glucosa y 3-O-metil-glucosa en los niveles intracelulares de Ca^{2+} en células Caco-2. (**A**) La incubación de células Caco-2 con glucosa 0,6 mM tiene como resultado un aumento en la fluorescencia, cuando se compara con el control. La incubación con glucosa 6 mM tiene como resultado un aumento significativo en la fluorescencia, cuando se compara con ese del control y glucosa 0,6 mM. En células preincubadas (por un periodo de 45 minutos) con ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético) (BAPTA-AM), la glucosa no puede estimular un aumento en el nivel intracelular de Ca^{2+}. La incubación con 3-OMG tiene como resultado un aumento significativamente menor estimulado por glucosa en los niveles intracelulares de Ca^{2+} que ese de la glucosa a concentraciones similares. (**B**) Gráficos representativos que muestran un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} estimulados por glucosa a una concentración de 0,6 mM y 6 mM.

La **Figura 5** muestra los resultados de experimentos de pH estat que muestran la secreción de HCO_3^- dependiente de Cl^- e independiente de Cl^-. (**A**) En ausencia de glucosa, hay un nivel mínimo de secreción de HCO_3^- independiente de Cl^-. En presencia de glucosa 6 mM, la retirada de Cl^- del lumen no tiene como resultado una disminución significativa en la secreción de HCO_3^-. (**B**) Efecto del inhibidor de intercambio de anión y bloqueador del canal de anión en la secreción de HCO_3^-. Los experimentos se realizaron en presencia de Cl^- del lumen. En ausencia de glucosa, la adición de ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-estilbenodisulfónico (DIDS) 100 µM elimina la secreción de HCO_3^- mientras que ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoico (NPPB) 10 µM no tiene ningún efecto inhibidor en la secreción de HCO_3^-. En presencia de glucosa 6 mM, el NPPB, pero no el DIDS, inhibe la secreción de HCO_3^-. Los valores se obtienen de n = 6 tejidos de diferentes ratones. P < 0,001.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones terapéuticas para su uso en métodos para tratar diarrea, para proporcionar rehidratación, para corregir desequilibrios de electrolitos y fluidos, y/o para mejorar la función del intestino delgado.

En una realización, la presente divulgación proporciona una composición formulada para la administración enteral, en donde la composición no contiene glucosa. En una realización preferida, la composición se formula como una bebida oral de rehidratación (ORD). En otra realización preferida, la composición está en forma de polvo, y puede reconstituirse en agua para uso como una ORD.

En una realización, la composición de la presente divulgación comprende uno o más ingredientes seleccionados de aminoácidos libres; electrolitos; di-péptidos y/u oligo-péptidos; vitaminas; y opcionalmente, agua, vehículos terapéuticamente aceptables, excipientes, agentes tamponantes, agentes saborizantes, colorantes, y/o conservantes. En una realización, la osmolaridad total de la composición es de aproximadamente 100 mosm a 250 mosm. En una realización, la composición tiene un pH de aproximadamente 2,9 a 7,3. En una realización, la presente divulgación proporciona un tratamiento que comprende administrar, a través de una vía enteral, a un paciente o sujeto necesitado de tal tratamiento, una cantidad eficaz de una composición de la divulgación. La composición puede administrarse una vez o muchas veces cada día. En una realización preferida, la composición se administra por vía oral.

En una realización preferida, la presente invención proporciona tratamiento de diarrea inducida por la infección por rotavirus y/o NSP4. En otra realización preferida, la presente divulgación da como resultado una disminución de la secreción de Cl^- y/o HCO_3^- y/o una absorción mejorada de fluidos.

Inducción de Secreción de Anión por Glucosa

De acuerdo con la presente divulgación, se ha descubierto que la glucosa de lumen induce una secreción iónica neta en el intestino delgado. Específicamente, la glucosa induce una secreción de cloruro activo mediado por un aumento en los niveles intracelulares de AMPc y Ca^{2+}. También, el transporte neto de Na^+ en el intestino delgado es absorbente a altas concentraciones de glucosa. Además, la glucosa tiene como resultado la secreción de bicarbonato en el intestino delgado.

Los inventores presentes han demostrado que un aumento en el nivel intracelular de AMPc media la secreción de Cl^- y/o HCO_3^-. La secreción de Cl^- y/o HCO_3^- está mediada en gran medida por los canales iónicos del regulador de conductancia de transmembrana de fibrosis quística (CFTR), que tienen muchos sitios de fosforilación potencial de serina y treonina (~ 20). La proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa C (PKC) son conocidas por activar los canales de anión de CFTR. En estudios de fijación de membranas, ha sido mostrado que los canales de CFTR son desactivados ("desacelerados") rápidamente a menos que sean continuamente activados por PKA, significando la importancia del PKA en la activación de CFTR. Coherente con esta observación, el pretratamiento de las células de intestino delgado con un potente inhibidor de PKA, H89, tiene como resultado una reducción significativa en el aumento neto estimulado por glucosa en *Isc*.

Los antagonistas de PKA han demostrado inhibir la expresión de la proteína SGLT1 después de la exposición a glucosa (Dyer *et al*. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270(16):3377-3388). Los canales de CFTR se activan por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), llevando a la secreción de anión. El aumento estimulado por glucosa en I_{sc} en el intestino delgado está mediado parcialmente por el transporte iónico mediado por CFTR.

Los agonistas de glucosa así como de PKA (tal como AMPc) han demostrado aumentar el tráfico de SGLT1 a la membrana de borde del cepillo (Wright *et al*. (1997) *J. Exp. Biol.* 200(Pt 2):287-293; Dyer *et al*. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270(16):3377-3388). La disminución en Vmáx indica una disminución total en la corriente, lo que representa una disminución en el transporte de glucosa. La disminución en Vmáx podría resultar de una reducción del número total de SGTL1 de transportador de glucosa, que se encuentra en su mayor parte en las células epiteliales vellosas. La pérdida de vellosidad tiene como resultado una pérdida significativa de transportador disponible para tomar glucosa en las células.

Se ha descubierto que incubar enterocitos con glucosa aumenta los niveles intracelulares de AMPc. Se observa un aumento más grande en el nivel de AMPc intracelular inducido por glucosa en células vellosas más que en células de cripta. Incubando enterocitos con forskolina aumentan los niveles intracelulares de AMPc tanto en las células de cripta como en las vellosas (figura 3A). El transporte de glucosa mediado por SGLT1 se produce principalmente en las células vellosas en lugar de en las células de cripta, porque un mayor número de SGLT-1 está ubicado en la región de vellosidad más que en la región de cripta (Knickelbein *et al*. (1988) *J. Clin. Invest.* 82(6):2158-2163). Por consiguiente, aumentar las concentraciones de glucosa en las células de cripta no tiene como resultado un aumento en la respuesta de AMPc (figura 3B).

Incluso a baja concentración (*por ejemplo*, glucosa 0,6 mM que es aproximadamente la mitad de su $V_{máx}$), la glucosa de lumen induce la secreción neta de anión. A mayores concentraciones de glucosa, la absorción de sodio es predominante. Una concentración aumentada de glucosa de lumen aumenta los niveles intracelulares de AMPc y Ca^{2+}. Estudios previos han demostrado que la K_m para el transporte de glucosa acoplado a Na^+ está en el intervalo de 0,2 a 0,7 mM (Lo & Silverman (1998) *J. Biol. Chem.* 273(45):29341-29351).

La presencia de un aumento residual mediado por glucosa en *Isc* en células pretratadas con H-89 indica que existen rutas independientes de PKA en la secreción de anión inducida por glucosa. La secreción de anión electrogénico a través del intestino delgado está mediada por los canales iónicos, que pueden ser clasificados basándose en sus mecanismos de activación, tal como la activación por AMPc, Ca^{2+}, volumen celular y potencial de membrana.

También se ha encontrado que la glucosa del lumen induce un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+}. También, la secreción de Cl^- inducida por glucosa es mediada por las rutas dependientes de PKA así como independientes de PKA. Esto indica que, además de CFTR, los canales de cloruro activados con calcio (CaCC) también juegan un papel en la secreción de anión inducida por glucosa.

Además, la glucosa estimula la secreción electrogénica de HCO_3^-. Las células del intestino delgado incubadas con glucosa exhiben un mayor nivel de secreción de HCO_3^- en solución que contiene Cl^- de lumen que en una solución libre de Cl^- de lumen (figuras 4A y 4B). Estos resultados indican que los canales de anión median la secreción de HCO_3^- en la presencia de glucosa. También, la adición de glucosa tiene como resultado una ligera disminución en el intercambio de Cl^--HCO_3^-, cuando se compara con las células sin adición de glucosa. Esta disminución puede ser secundaria a un aumento en el nivel intracelular de AMPc con glucosa. Esto también indica que la glucosa induce la secreción mediada por el canal de anión e inhibe el intercambio electroneutro de Cl^--HCO_3^-.

Además, las células de intestino delgado fueron incubadas con un bloqueador del canal aniónico (NPPB 100 mM) y un inhibidor de intercambio aniónico (DIDS 100 mM), respectivamente. Hubo una inhibición significativa de la secreción de HCO_3^- inducida por glucosa, mediada por el canal de anión por NPPB (100 mM) (4,2 ± 0,7 frente a 7,6 ± 1,5 $mEq.h^{-1}.cm^{-2}$).

En presencia de inhibidores de canal aniónico, la secreción residual de HCO_3^- aún se observa. Esto indica que está presente el intercambio de Cl^--HCO_3^- en la secreción mediada por glucosa. Esto también indica que un nivel intracelular elevado de calcio podría inhibir la actividad del intercambiador 3 de sodio-hidrógeno (NHE3) durante la función digestiva normal así como en ciertas condiciones de la enfermedad. Esto también indica que la SGLT1 juega un papel doble en la regulación de la absorción de sodio y, en un algún momento, estimulando un defecto secretor y/o de absorción.

El descubrimiento del mecanismo secretor inducido por glucosa puede usarse en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales incluyendo diarrea. Los pacientes con enfermedades diarreicas agudas tienen comúnmente una absorción de glucosa deteriorada que se produce en el tracto gastrointestinal superior. La presencia de carbohidratos no absorbidos puede ejercer un efecto osmótico en el intestino, llevando a la diarrea. Además, la glucosa aumenta los niveles intracelulares de Ca^{2+} y/o AMPc e induce la secreción de aniones. El efecto secretor de la glucosa ha sido anteriormente sub-estudiado o enmascarado por la concurrente absorción de Na^+-glucosa. También, debido a sus efectos secretores, la administración de glucosa particularmente exacerba las enfermedades gastrointestinales con

una absorción deteriorada de Na^+-glucosa, tal como la enfermedad de Crohn y la enteritis inducida por irradiación o quimioterapia que se asocian con un acortamiento de las vellosidades, y por lo tanto, una absorción extremadamente comprometida.

Durante la infección por rotavirus, aunque hay una absorción predominante de Na^+ acoplada a glucosa a través del co-transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT-1) que se expresa principalmente en las células vellosas, hay una significativa secreción de Cl^- activada por calcio a través del canal de cloruro activado por calcio (CaCC o TMEM-16a) en el intestino delgado. Además, la glucosa intracelular activa el cloruro activado por calcio y la secreción de fluidos. La proteína no estructural (NSP4) es una entero-toxina producida por rotavirus. Se ha descubierto que la glucosa y NSP4, cuando se administran juntos, tienen como resultado una secreción sostenida de cloruro en las células. Como resultado, las formulaciones existentes de ORD que contienen una cantidad significativa de glucosa aumentan además la secreción de cloruro estimulada por calcio, empeorando así la diarrea inducida por el rotavirus.

Composiciones terapéuticas

En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones terapéuticas para su uso en métodos para tratar diarrea, para proporcionar rehidratación, para corregir los desequilibrios de electrolitos y fluidos, y/o para mejorar la función del intestino delgado.

En una realización de la divulgación, la composición se formula para la administración enteral y no contiene glucosa. En una realización preferida, la composición se formula como una bebida oral de rehidratación. En otra realización preferida, la composición está en una forma de polvo y puede reconstituirse en agua para su uso como una bebida oral de rehidratación.

En una realización adicional, la composición no contiene ningún sustrato de transportadores de glucosa. En una realización específica más, la composición no contiene agonistas de co-transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT-1) incluyendo, pero no limitado a, análogos de glucosa (*por ejemplo*, agonistas de glucosa no metabolizables para SGLT-1) y otros carbohidratos (tales como azúcares).

Diversos sustratos de SGLT-1 son conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, análogos de glucosa no metabolizables tales como α-metil-D-glucopiranósido (AMG), 3-O-metilglucosa (3-OMG), desoxi-D-glucosa y α-metil-D-glucosa; y galactosa. Los sustratos de los transportadores de glucosa (por ejemplo, SGLT-1) pueden ser seleccionarse basándose en ensayos de agonista como se conoce en la técnica. También, pueden hacerse modificaciones estructurales de la glucosa y otros carbohidratos (tales como azúcares) para obtener sustratos de transportadores de glucosa (*por ejemplo*, SGLT-1).

En una realización, la composición no contiene glucosa. En una realización adicional, la composición no contiene carbohidratos (tales como di-, oligo-, o polisacáridos) u otros compuestos que pueden ser hidrolizados en glucosa o un sustrato de transportadores de glucosa (por ejemplo, SGLT-1).

En una realización de la divulgación, la composición comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, uno o más ingredientes seleccionados de aminoácidos libres; electrolitos; di-péptidos y/u oligo-péptidos; vitaminas; y opcionalmente, agua, vehículos terapéuticamente aceptables, excipientes, agentes tamponantes, agentes saborizantes, colorantes, y/o conservantes.

En otra realización alternativa de la divulgación, la composición comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, uno o más ingredientes seleccionados de aminoácidos libres; electrolitos; di-péptidos y/u oligo-péptidos; vitaminas; y, opcionalmente agua, vehículos terapéuticamente aceptables, excipientes, agentes tamponantes, agentes saborizantes, colorantes, y/o conservantes;
en donde los sustratos de transportadores de glucosa (*por ejemplo*, SGLT-1) (tales como, glucosa, análogos de glucosa) y/o compuestos (tales como carbohidratos) que pueden ser hidrolizados en un sustrato de transportadores de glucosa (*por ejemplo*, SGLT-1), si están presentes en la composición, están presentes en una concentración total menor que 0,05 mM o cualquier concentración menor que 0,05 mM incluyendo, pero no limitado a, menor que 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,008, 0,005, 0,003, 0,001, 0,0005, 0,0003, 0,0001, 10^{-5}, 10^{-6}, o 10^{-7} mM. En una realización, la composición anti-diarrea no contiene azúcar. En otra realización, la composición anti-diarrea no contiene sustratos transportadores de glucosa (*por ejemplo*, SGLT-1) (tales como, glucosa, análogos de glucosa) y/o compuestos (tales como carbohidratos) que pueden ser hidrolizados en un sustrato de transportadores de glucosa (*por ejemplo*, SGLT-1).

Los aminoácidos útiles para la composición anti-diarrea de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano y tirosina.

En una realización, la divulgación objeto proporciona una composición anti-diarrea, en donde la composición comprende, consiste esencialmente en, o consiste en los aminoácidos libres lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano, y serina; y opcionalmente, dipéptidos u oligopéptidos hechos de uno o más

aminoácidos libres seleccionados de lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano, y serina, vehículos terapéuticamente aceptables, electrolitos, agentes tamponantes, conservantes, y agentes saborizantes.

En una realización, los aminoácidos contenidos en la composición anti-diarrea están en la forma L. En una realización, los aminoácidos libres contenidos en la composición terapéutica pueden estar presentes en formas neutras o de sal.

En una realización, la composición terapéutica comprende además uno o más electrolitos seleccionados de Na^+, K^+, Ca^{2+}, HCO_3^-, y Cl^-. En una realización, la composición terapéutica comprende cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de calcio, y/o cloruro de potasio.

En ciertas realizaciones, cada aminoácido libre puede estar presente en una concentración de 4 mM a 40 mM, o a cualquier valor entre los mismos, en donde la osmolaridad total de la composición es de aproximadamente 100 mosm a 250 mosm. La expresión "consiste esencialmente en", como se usa en el presente documento, limita el alcance de los ingredientes y etapas a los materiales o etapas especificados y a ésos que no afectan sustancialmente las características básicas y novedosas de la presente invención, por ejemplo, las composiciones y los métodos para el tratamiento de enfermedades y afecciones gastrointestinales (que, en ciertas realizaciones, es el tratamiento de diarrea, tal como diarrea inducida por rotavirus), para proporcionar rehidratación, para corregir desequilibrios de electrolitos y fluidos, y/o para mejorar la función del intestino delgado. Por ejemplo al usar "consiste esencialmente en", la composición terapéutica no contiene ningún ingrediente inespecífico incluyendo, pero no limitado a, aminoácidos libres inespecíficos, di-, oligo-, o polipéptidos ni las proteínas; mono-, di-, oligo-, ni los polisacáridos; ni los carbohidratos que tienen un efecto directo beneficioso o adverso terapéutico en el tratamiento de enfermedades y condiciones gastrointestinales (que, en ciertas realizaciones, es el tratamiento de diarrea, tal como diarrea inducida por rotavirus) para proporcionar rehidratación, para corregir el desequilibrio de electrolitos y fluidos y/o para mejorar la función del intestino delgado.

También, al usar la expresión "consiste esencialmente en", la composición puede comprender sustancias que no tienen efectos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades y condiciones gastrointestinales (que, en ciertas realizaciones, es el tratamiento de diarrea, tal como diarrea inducida por rotavirus) para proporcionar rehidratación, para corregir desequilibrios de electrolitos y fluidos y/o para mejorar la función del intestino delgado; tales ingredientes incluyen vehículos, excipientes, agentes saborizantes, colorantes, y conservantes etc. que no afectan al tratamiento de enfermedades y afecciones gastrointestinales (que, en una realización, es el tratamiento de diarrea), para proporcionar rehidratación, para corregir desequilibrios de electrolitos y/o para mejorar la función del intestino delgado.

El término "oligopéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido que consiste de tres a veinte aminoácidos.

El término "oligosacárido", como se usa en el presente documento, se refiere a un sacárido que consiste de tres a veinte monosacáridos. El término "carbohidratos", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que tienen la fórmula general de $C_n(H_2O)_n$, en donde n es un número entero que comienza a partir de 1; e incluye monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

La osmolaridad total de la composición es de aproximadamente 100 mosm a 250 mosm, o cualquier valor entre los mismos incluyendo, pero no limitado a, 120 mosm a 220 mosm, 150 mosm a 200 mosm, y a 130 mosm a 180 mosm.

En otra realización de la divulgación, la osmolaridad total de la composición es de aproximadamente 230 mosm a 280 mosm, o cualquier valor entre los mismos. En una realización de la divulgación, la osmolaridad total es de aproximadamente 250 a 260 mosm. En otra realización de la divulgación, la composición tiene una osmolaridad total que es cualquier valor más bajo que 280 mosm.

En ciertas realizaciones, la composición tiene un pH de aproximadamente 2,9 a 7,3, o cualquier valor entre los mismos incluyendo, pero no limitado a, un pH de 3,3 a 6,5, 3,5 a 5,5, y 4,0 a 5,0.

En ciertas realizaciones, la composición tiene un pH de aproximadamente 7,1 a 7,9, o cualquier valor entre los mismos. Preferentemente, la composición tiene un pH de aproximadamente 7,3 a 7,5, más preferentemente, de aproximadamente 7,2 a 7,4, o más preferentemente, de aproximadamente 7,2.

En ciertas realizaciones de la divulgación, la composición no contiene uno o más de los ingredientes seleccionados del oligo-, polisacáridos y carbohidratos; oligo-, o polipéptidos o proteínas; lípidos; ácidos grasos de cadena pequeña, media o larga; y/o alimentos que contienen uno o más de los nutrientes antes mencionados.

Tratamiento de Enfermedades y Afecciones Gastrointestinales

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona métodos para el tratamiento de enfermedades y afecciones gastrointestinales. En ciertas realizaciones, la presente invención puede usarse para tratar diarrea, para proporcionar rehidratación, para corregir desequilibrios de electrolitos y fluidos y/o para mejorar la función del intestino delgado. En

una realización preferida, la presente invención proporciona tratamiento de diarrea inducida por rotavirus. En otra realización preferida, la presente invención proporciona tratamiento de diarrea inducida por NSP4.

En una realización de la divulgación, el método comprende administrar, a través de una ruta enteral, a un sujeto necesitado de tal tratamiento, una cantidad eficaz de una composición de la divulgación. La composición puede administrarse una vez o muchas veces cada día. En una realización, la composición se administra por vía oral.

En una realización preferida, la presente divulgación proporciona una secreción disminuida de Cl^- y/o HCO_3^- y/o una absorción mejorada de fluidos.

El término "tratamiento" o cualquier variación gramatical del mismo (*por ejemplo*, tratar, tratando, y tratamiento *etc.*), como se usan en el presente documento, incluyen pero no se limitan a, aliviar o mejorar un síntoma de una enfermedad o afección; y/o reducir la gravedad de una enfermedad o afección. En ciertas realizaciones, el tratamiento incluye uno o más de lo siguiente: aliviar o mejorar la diarrea, reducir la gravedad de la diarrea, reducir la duración de la diarrea, promover la curación intestinal, proporcionar rehidratación, corregir desequilibrios de electrolitos, mejorar la curación de la mucosa del intestino delgado, y aumentar la altura de las vellosidades en un sujeto que tiene diarrea.

La expresión "cantidad eficaz" como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que es capaz de tratar o mejorar una enfermedad o afección, o de otro modo, es capaz de producir un efecto terapéutico pretendido.

El término "sujeto" o "paciente", como se usa en el presente documento, describe un organismo, incluyendo mamíferos tales como primates, a los que puede ser proporcionado el tratamiento con las composiciones según la presente invención. Las especies de mamíferos que puede beneficiarse de los métodos desvelados de tratamiento incluyen, pero no se limitan a, monos, chimpancés, orangutanes, humanos, monos; animales domesticados tales como perros, gatos; ganado vivo tal como caballos, ganado, cerdos, ovejas, cabras, pollos; y animales tales como ratones, ratas, conejillos de indias y hámsteres.

En una realización, el sujeto humano es un bebé de menos de un año de edad, o de cualquier edad más joven de un año de edad, tal como de 10 meses de edad, 6 meses de edad, y 4 meses de edad. En otra realización, el sujeto humano es un niño de menos de cinco años de edad, o de cualquier edad más joven que de cinco años de edad, tal como de cuatro años de edad, de tres años de edad, y de dos años de edad. En una realización de la divulgación, el sujeto necesitado de tratamiento de la presente divulgación padece diarrea.

La presente invención puede usarse para tratar diarrea. En ciertas realizaciones, la presente invención puede usarse para tratar diarrea provocada por infecciones patogénicas incluyendo, pero no limitadas a, infecciones por virus, incluyendo, pero no limitados a, rotavirus, virus de Norwalk, citomegalovirus, y hepatitis; bacterias incluyendo, pero no limitadas a, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*; parásitos incluyendo, pero no limitados a, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium*. En una realización preferida, la presente invención puede usarse para tratar diarrea inducida por rotavirus.

En ciertas realizaciones, la presente invención puede usarse para tratar diarrea provocada por lesión en el intestino delgado provocada por, por ejemplo, infección, toxinas, sustancias químicas, alcohol, inflamación, enfermedades autoinmunitarias, cáncer, quimio-, radiación, terapia de protón, y cirugía gastrointestinal.

En ciertas realizaciones, la presente invención puede usarse en el tratamiento de diarrea provocada por enfermedades incluyendo, pero no limitadas a, las enfermedades inflamatorias de intestinos (IBD) incluyendo la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa; síndrome de intestino irritable (IBS); enteropatía autoinmunitaria; enterocolitis; y las enfermedades celíacas.

En ciertas realizaciones, la presente invención puede usarse en el tratamiento de diarrea provocada por cirugía gastrointestinal; resección gastrointestinal; trasplante de intestino delgado; trauma post-quirúrgico; y la enteritis inducida por terapia de radiación, de quimio, y de protón.

En otra realización, la presente invención puede usarse para tratar diarrea relacionada con alcohol. En otra realización, la presente invención puede ser utilizada para tratar la diarrea de viajero y/o diarrea provocada por intoxicación alimenticia.

En ciertas realizaciones, la presente invención puede usarse en el tratamiento de diarrea provocada por lesión a la mucosa del intestino delgado, por ejemplo, condiciones diarreicas en las cuales hay una reducción en la altura de la vellosidad, disminución en las áreas superficiales de la mucosa en el intestino delgado, y atrofia de las vellosidades, por ejemplo, desgaste parcial o total de la región vellosa y borde del cepillo. En ciertas realizaciones, la presente invención puede usarse en el tratamiento de diarrea provocada por lesión a las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado, incluyendo la capa de mucosa del duodeno, del yeyuno, y del íleon.

En una realización, la presente invención puede usarse para tratar diarrea secretora. En ciertas realizaciones, la presente invención puede usarse para tratar diarrea secretora mediada a través de los canales de CFTR y/o los

canales de CaCC (*por ejemplo*, TMEM-16a). En una realización, la presente invención puede usarse para tratar diarrea aguda y/o crónica.

En una realización, la presente invención puede usarse para tratar diarrea provocada por mala absorción de nutrientes. En una realización, la presente invención puede usarse para tratar diarrea secretora provocada por un nivel reducido o actividad funcional de transportadores de glucosa tal como SGLT-1.

Como se usa en el presente documento, el término "diarrea" se refiere a una afección en la que tres o más defecaciones sin formar, sueltas o aguadas se producen dentro de un período de 24 horas. La "diarrea aguda" se refiere a condiciones diarreicas que no duran más de cuatro semanas. La "diarrea crónica" se refiere a condiciones diarreicas que duran más de cuatro semanas.

En una realización, la presente divulgación no implica la administración de uno o más de los siguientes ingredientes seleccionados de glucosa, análogos de glucosa, sustratos de transportadores de glucosa (*por ejemplo*, SGLT-1), di-, oligo-, o polisacáridos; carbohidratos; o moléculas que pueden ser hidrolizadas en glucosa o un sustrato de transportadores de glucosa (*por ejemplo*, SGLT-1).

En ciertas realizaciones alternativas, la presente divulgación comprende administrar uno o más ingredientes seleccionados de glucosa; análogos de glucosa; sustratos de transportadores de glucosa (*por ejemplo*, SGLT-1); di-, oligo-, o polisacáridos; carbohidratos; o moléculas que pueden ser hidrolizadas en glucosa o un sustrato de transportadores de glucosa (*por ejemplo*, SGLT-1), en donde la concentración total de estos ingredientes es menor que 0,05 mM o cualquier concentración menor que 0,05 mM incluyendo, pero no limitado a, menor que 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,008, 0,005, 0,003, 0,001, 0,0005, 0,0003, 0,0001, 10^{-5}, 10^{-6}, o 10^{-7} mM.

Formulaciones y Administración

La presente divulgación proporciona composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición objeto y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua. La composición terapéutica también puede comprender excipientes, agentes saborizantes, colorantes, y conservantes etc. que no afectan tratamiento de enfermedades y afecciones gastrointestinales (que, en una realización, es el tratamiento de diarrea), para proporcionar rehidratación, para corregir desequilibrios de electrolitos y fluidos, y/o para mejorar la función del intestino delgado.

En una realización, la composición terapéutica y todos los ingredientes contenidos en la misma son estériles. En ciertas realizaciones preferidas, la composición se formula como una bebida, o la composición está en una forma de polvo y puede reconstituirse en agua para su uso como una bebida.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el compuesto. Ejemplos de vehículos farmacéuticas adecuadas se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tales composiciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición terapéutica, junto con una cantidad conveniente de vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo enteral de administración.

La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico como se especifica en las reivindicaciones que comprende uno o más recipientes rellenos de uno o más de los ingredientes, por ejemplo, compuesto, vehículo, o las composiciones farmacéuticas de la invención. Los ingredientes de la composición pueden envasarse separadamente o pueden mezclarse juntos. El kit puede comprender además instrucciones para administrar la composición a un paciente.

Materiales y métodos

Preparación de animales

Ratones macho, alimentados de forma normal, de 8 semanas de edad, NIH suizos, se sacrifican por inhalación de CO_2, seguido de dislocación cervical. El intestino delgado se retira suavemente, y el segmento se lava y se limpia en solución de Ringer enfriada en hielo. Después la mucosa se separa de la serosa y las capas musculares pelando a través del plano submucoso como se describió anteriormente (Zhang *et al*. (2007) *J Physiol* 581(3):1221-1233). Después de la exsanguinaciones, la mucosa ileal es obtenida de un segmento de 10 cm cercano al ciego. Todos los experimentos son aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee de la Universidad de Florida.

Mediciones Bio-eléctricas

Los estudios de transporte iónico se realizan sobre láminas ileales. Después los tejidos se montan entre dos mitades de una cámara Ussing tipo Lucite con 0,3 cm^2 de áreas superficiales expuestas (P2304, Physiologic Instruments, San Diego, CA, EE.UU.). Se usa solución normal de Ringer (NaCl 115 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, K_2HPO_4 4,8 mM, KH_2PO_4 2,4 mM, $MgCl_2$ 1,2 mM y $CaCl_2$ 1,2 mM) burbujeado con 95 % de O_2: 5 % de CO_2 bilateralmente como una solución de

baño para los tejidos y la temperatura se mantiene constante a 37 °C. Las cámaras son equilibradas para eliminar las fuerzas osmóticas e hidrostáticas. La resistencia debido al fluido también es compensada. Los tejidos se dejan estabilizar. La corriente basal de corto circuito (I_{sc}) y la conductancia (G) correspondiente se registran usando un dispositivo de sujeción de voltaje/corriente controlada por computadora (VCC MC-8, Physiologic Instruments).

Estudios de flujo

Se usa un isótopo de sodio, ^{22}Na, para estudiar el flujo de Na a través de la mucosa en condiciones basales seguido de adición de glucosa. Los tejidos pareados a la conductancia se diseñan para estudiar el flujo seroso a mucoso (J_{sm}) que representa la función secretora, y el flujo mucoso a seroso (J_{ms}) que representa la función absorbente. ^{22}Na se añade en el lado diseñado del tejido y muestras de 500µl son recolectadas cada 15 minutos desde el otro lado. En un conjunto separado de tejidos ^{36}Cl se añade a cualquiera del lado seroso o mucoso. Se añade glucosa de concentración 8 mM en la cámara para estimulación completa, y se registran los cambios correspondientes en I_{sc} y en la conductancia. La conductividad se registra basándose en la ley de Ohm.

Se recogen tres muestras en cada condición. Se cuenta la radioactividad utilizando un contador gamma. Los tejidos con conductancia menor que 10 % de cambio se igualan y se calcula el promedio $J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$.

Estudios de inhibidor de proteína quinasa A (PKA)

Los tejidos apareados con una conductancia y corriente similar son tratados con o sin H-89 100 µM (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA), un inhibidor irreversible de la proteína quinasa A (PKA). Los tejidos son incubados con H-89 durante 30 minutos. Se añaden concentraciones en aumento de glucosa (0,015 – 8 mM) cada 5 minutos y se anota el pico de la corriente. Se calcula la constante de saturación cinética para el correspondiente K_m y $V_{máx}$ para los tejidos tratados y sin tratar.

Cultivo celular de Caco-2

Las células de Caco-2 se diferencian post-confluencia en células con características funcionales del epitelio ileal fetal. Las células Caco-2 producen microvellosidades y tienen una expresión aumentada de proteínas de transporte específicas del intestino delgado incluyendo SGLT1 y por lo tanto se usan ampliamente como un sistema modelo para estudiar la función de enterocitos.

Las células Caco-2 se obtienen de ATTC y se cultivan en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FCS) y aminoácidos no esenciales al 1 % a 37 °C y 5 % de CO_2. Las células Caco-2 son pasadas 20-25 veces y sembradas (2 x 10^5 células/placa) en placas de Petri de 5 cm y cultivadas hasta el 80 % de confluencia, cuando la concentración de FCS cambia al 5 %. Las células se cultivan durante otros 10 días antes de que sean utilizadas para los estudios funcionales.

Microscopía de fluorescencia confocal de Ca^{2+}

Las células Caco2 cultivadas en cubreobjetos redondos de 25 mm se montan en la cámara de baño RC-21BR conectado a un adaptador de fase serie 20 (Warner Instruments, CT EE.UU.). Las células se mantienen a 37 °C usando un controlador de calentamiento de tablero de un solo canal (TC-324B, Warner Instruments, CT EE.UU.). Las células se cargan con el tinte indicador de calcio fluorescente Fluo-8 AM (n.º de Cat 0203, TEFLab, Inc., Austin, TX EE.UU.) a una concentración de 0,5 µM a temperatura ambiente y se incubaron durante 45 minutos. La microscopía de exploración de láser confocal se realiza usando un microscopio invertido Fluoview 1000 IX81 (Olympus, Tokio, Japón) y un objetivo U Plan S-Apo 20×. La fluorescencia se registra por láseres de argón con excitación a 488 nm y emisión a 515 nm. Las imágenes fluorescentes se recogen con microscopio de exploración confocal. Las soluciones ya sea de Ringer, solución de Ringer que contiene glucosa o solución de glucosa-Ringer que contiene BAPTA-AM se añaden al baño usando un sistema de perfusión de multi-válvula (VC-8, Warner instruments, Hamden CT, EE.UU.) controlado usando un controlador de válvula VC-8 (Warner instruments, Hamden CT, EE.UU.). Se registraron los cambios y se midió la fluorescencia para diversas células. Las células se lavaron con solución de Ringer y el experimento se repitió con el uso de 3-O-metilglucosa y carbecol (control positivo).

Mediciones de AMPc colorimétricas

Raspados frescos de mucosa aislada de células epiteliales ileales se lavaron tres veces en solución de Ringer conteniendo Ca^{2+} 1,2 mM a 37 °C. Las células lavadas después se dividieron en dos grupos y se trataron ya sea con solución salina o glucosa 6 mM y se incubaron durante 45 minutos. Las células se trataron con HCl 0,1 M para detener la actividad de fosfodiesterasa endógena. Los lisados se usaron después para el ensayo de AMPc usando el kit de inmunoensayo directo de AMPc (Calbiochem, EE.UU.).

El ensayo cuantitativo de AMPc usa un anticuerpo policlonal a AMPc que se une al AMPc en las muestras en una manera competitiva. Después de una incubación simultánea a temperatura ambiente, los reactivos en exceso se lavaron y se añadieron los sustratos. Después de un corto tiempo de incubación, la reacción se detuvo y el color

amarillo generado se leyó a 405 nm. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de AMPc en patrones y muestras. Los niveles de AMPc se normalizan a los niveles de proteína de fracciones respectivas y se expresan en pmol (mg de proteína)$^{-1}$.

Las células tratadas con forskolina se usan como control positivo. Las células tratadas con glucosa y forskolina se incuban durante 45 minutos. Todos los ensayos se realizan por triplicado y se repitieron hasta n = 4 ratones diferentes.

EJEMPLOS

A continuación están los ejemplos que ilustran procedimientos y realizaciones para practicar la invención. Todos los porcentajes son en peso, y todas las proporciones de mezcla de disolventes son por volumen a menos que se indique lo contrario.

EJEMPLO 1 - AUMENTO ESTIMULADO POR GLUCOSA EN I_{SC} EN EL ÍLEON

Este Ejemplo muestra que la glucosa estimula un aumento en I_{sc} en el íleon de ratón. Específicamente, la adición de glucosa (8 mM) al lado del lumen tiene como resultado un aumento significativo en I_{sc} cuando se compara con su nivel basal (3,4 ± 0,2 frente a 1,1 ± 0,1 μEq.h^{-1}.cm^{-2}). El I_{sc} obtenido usando los estudios de cámara de Ussing es una suma del movimiento neto iónico a través del epitelio (I_{sc} = $J_{net}Na^+$ + $J_{net}Cl^-$ + J_{net} HCO_3^- - $J_{net}K^+$).

No hay mecanismos de absorción de Na^+ (mediados por ENaC) o secretores de Na^+ conocidos en el intestino delgado. El tratamiento del lado mucoso del intestino delgado con amilorida 10 μM, un inhibidor de canal de sodio epitelial, no produce efecto en I_{sc}.

Por lo tanto, el I_{sc} basal de 1,1 ± 0,1 μEq.h^{-1}.cm^{-2} se debe principalmente a la actividad del regulador de conductancia de transmembrana de fibrosis quística (CFTR) de la corriente de la cripta y secretora de K^+.

Para determinar la cinética de saturación del transporte de glucosa acoplado a Na^+, se añaden concentraciones en aumento de glucosa de hasta 8 mM al lado del lumen en la presencia de Na^+ 140 mM. Las concentraciones en aumento de glucosa tienen como resultado una velocidad mejorada pero saturable de I_{sc} (Fig. 1A), con un K_m de 0,24 ± 0,03 mM y una $V_{máx}$ de 3,6 ± 0,19 μeq·h^{-1}·cm^{-2} para glucosa. A concentraciones de glucosa que varían de 0,5 a 0,7 mM, la cinética de saturación de la glucosa muestra signos tempranos de saturación; sin embargo, un aumento continuo en las concentraciones de glucosa da como resultado un aumento continuo en I_{sc}, produciendo de esta manera un corte en la curva de saturación de glucosa a concentraciones de 0,5 a 0,7 mM.

EJEMPLO 2 - AUMENTO ESTIMULADO POR 3-O-METIL-GLUCOSA EN I_{SC}

Este Ejemplo investiga si las cinéticas de saturación de glucosa observadas en el Ejemplo 1 se deben al transporte mediado por SGLT1 pero no debido al metabolismo de glucosa en las células epiteliales. Específicamente, la 3-O-metil-glucosa (3-OMG), una forma deficientemente metabolizada de la glucosa, se añade al lado del lumen para estudiar la cinética de saturación del transporte de glucosa acoplado a Na^+.

La Figura 1B muestra la cinética de saturación de 3-OMG, con una $V_{máx}$ de 2,3 ± 0,13 μeq·h^{-1}·cm^{-2} y una K_m de 0,22 ± 0,07 mM). La adición de 3-OMG tiene como resultado una disminución significativa en $V_{máx}$ (2,3 ± 0,13 μeq·h^{-1}·cm^{-2} frente a 3,4 ± 0,2 μeq·h^{-1}·cm^{-2}) sin un cambio en K_m en el transporte de glucosa acoplado a Na^+, cuando se compara con ese de la glucosa. Similar a la glucosa, se observa un corte con 3-OMG a concentraciones 0,5 a 0,7 mM (figura 1B).

EJEMPLO 3 - I_{SC} ESTIMULADO CON GLUCOSA EN PRESENCIA DE H-89

Basándose en los mecanismos de transporte actualmente conocidos, el aumento estimulado por glucosa en I_{sc} puede resultar de la secreción de anión electrogénica o absorción de Na^+ electrogénica.

La proteína quinasa A (PKA), también conocida como la proteína quinasa dependiente de AMPc, se requiere en la activación de los canales de CFTR. Para estudiar la función para la PKA en el aumento inducido por glucosa en I_{sc}, los tejidos se montan en cámaras Ussing y se incuban con H-89, un inhibidor de PKA, durante 45 minutos. Posteriormente, los tejidos se usan para estudiar la cinética de saturación de la glucosa.

En presencia de H-89, la glucosa muestra una $V_{máx}$ de 0, 8 ± 0,06 μEq.cm^{-2}.h^{-1} y una K_m de 0,58 ± 0,08 mM. El corte en la curva de saturación de glucosa (observado cuando los tejidos ileales se incuban con glucosa a concentraciones que varían de 0,5 a 0,7 mM) desaparece junto con las células ileales son pretratadas con H-89, con un cambio de la curva de saturación a la derecha (figura 1C). Los resultados indican la inhibición de los procesos de transporte dependientes de PKA a bajas concentraciones de glucosa.

Similar a la curva de saturación de glucosa, la 3-OMG también muestra una corriente sensible a PKA. La curva de saturación de 3-OMG (con incubación H-89) no es significativamente diferente de aquella observada con glucosa (con

incubación de H-89) (figuras 1A y B).

Tabla 1 Cambios en la cinética de saturación en glucosa y 3-O-metil-glucosa en presencia y ausencia de H-89 - un inhibidor de PKA

	$V_{máx}$	K_m	$V_{máx}$	K_m
Inhibidores de PKA	-	-	H-89	H-89
Glucosa	3,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1
3-OMG	2,7 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1
*Parte de la corriente estimulada por glucosa y 3-OMG se elimina en presencia de PKA. Los resultados son de n= 8 tejidos.				

Los resultados indican que la corriente que se inhibe por la PKA (mostrada en la Tabla 1) resultada del transporte de glucosa acoplado a Na^+, en lugar de otros metabolismos intracelulares que implican glucosa (Tabla 1).

La PKA juega un papel significativo en la secreción de aniones mediada por AMPc y la absorción de glucosa y Na^+ mediada por SGLT1. La presencia de corriente insensible a H-89 indica que la glucosa estimula la secreción de aniones no mediada por PKA (tal como la secreción mediada por Ca^{2+} intracelular).

EJEMPLO 4 - ELIMINACIÓN DEL AUMENTO EN I_{SC} ESTIMULADO POR GLUCOSA EN PRESENCIA DE FLORIZINA

Para investigar si la inhibición del transporte de glucosa elimina la corriente sensible a PKA, se realizaron experimentos usando florizina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, EE.UU.), un inhibidor reversible competitivo de SGLT1. Específicamente, tejidos ileales montados en una cámara Ussing son tratados con florizina 100 µM del lado del lumen y se realizaron estudios de saturación de glucosa.

Los resultados muestran que el aumento en I_{sc} estimulado por glucosa y/o por 3-OMG se elimina completamente en presencia de florizina (figura 1C). Los resultados indican que la actividad del transportador de glucosa a través de SGLT1 es esencial para la corriente sensible e insensible a PKA.

EJEMPLO 5 - EFECTO DE LA GLUCOSA EN EL FLUJO UNIDIRECCIONAL Y NETO DE SODIO

Las mediciones isotópicas de Na^+ se realizan usando ^{22}Na a una velocidad de estado estacionario de transferencia de cualquiera de la mucosa a serosa J_{ms} o serosa a mucosa J_{sm}. El flujo neto de Na^+ se calcula usando la ecuación: $J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$. + J_{net} indica la absorción neta; mientras que -J_{net} indica la secreción neta.

En ausencia de glucosa (0 mM), los tejidos del intestino delgado muestran la absorción neta de sodio (1,8 ± 0,3 $mEq.h^{-1}.cm^{-2}$). La absorción de Na^+ se elimina en presencia de glucosa 0,6 mM. Sin embargo, la adición de glucosa 6 mM tiene como resultado un aumento significativo en *Jnet* Na^+ (3,2 ± 0,5 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$), indicando la absorción neta de sodio. Los flujos unidireccionales de Na^+ no muestran diferencia significativa a glucosa 0, 0,6 y 6 mM (figura 2B).

EJEMPLO 6 - EFECTO DE LA GLUCOSA EN EL FLUJO UNIDIRECCIONAL Y NETO DE CLORURO

El cambio en I_{sc} a glucosa 0,6 mM se calcula como 1,1 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$ (2,2 ± 0,3 - 1,1 ± 0,1 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$) y el cambio en I_{sc} a glucosa 6 mM se calcula como 2,2 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$ (3,4 ± 0,2 - 1,1 ± 0,1 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$). El aumento en I_{sc} con concentraciones en aumento de glucosa no puede explicarse completamente basándose en los valores de J_{net} Na^+ (basados en los valores a glucosa 0,6 y 6 mM).

Las mediciones de flujo isotópico para Cl^- se realizan usando ^{36}Cl para determinar si el flujo de Cl^- cuenta para una porción del I_{sc} que no puede atribuirse a $J_{net}Na^+$. *El* $J_{net}Cl^-$ calculado en ausencia de glucosa muestra la absorción de Cl^- (2 ± 0,3 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$). El nivel de absorción de sodio (1,8 ± 0,3 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$) es comparable a aquel del cloruro (2,0 ± 0,3 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$) en ausencia de glucosa, indicando la absorción de Na^+ y Cl^- electroneutro.

La adición de glucosa 0,6 mM o 6 mM en el lado de la mucosa tiene como resultado una secreción neta de Cl^- (figura 2A). El $J_{net}Cl^-$ a glucosa 0,6 mM (-3,6 ± 0,8 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$) y glucosa 6 mM (-4,0 ± 1,4 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$) no son significativamente diferentes.

Los resultados muestran que hay un aumento significativo en $J_{sm}Cl^-$ en presencia de glucosa (a glucosa 0,6 y 6 mM) ($J_{sm}Cl^-$ 16,9 ± 0,7 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$ y 17 ± 0,7 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$, respectivamente), cuando se compara con $J_{sm}Cl^-$ en ausencia de glucosa (11,9 ± 0,4 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$) (figura 2A). Los resultados indican que se produce una secreción de Cl^- significativa a una concentración de glucosa tan baja como 0,6 mM. El aumento en la concentración de glucosa no tiene como resultado un aumento en la secreción de Cl^-.

EJEMPLO 7 - SECRECIÓN DE HCO_3^- EN EL ÍLEON EN AUSENCIA DE GLUCOSA DE LUMEN

Las mediciones eléctricas transepiteliales y los estudios de flujo muestran que la adición de glucosa a los tejidos ileales

induce una secreción significativa de Cl^-. Aunque $J_{net}Cl^-$ a 0,6 y glucosa 6 mM muestra una secreción significativa de aniones, esto no justifica todos los cambios en I_{sc}, especialmente en vista de las diferencias significativas entre los valores de I_{sc} a glucosa 6 mM, 6 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$ (7,5 ± 0,4 - 1,5 ± 0,1 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$) y 0,6 mM.

Los estudios de pH estat se realizan para determinar si la secreción de HCO_3^- contribuye a la porción no justificada de I_{sc}. Al menos dos modos de secreción de HCO_3^- en el intestino delgado de ratón han sido identificados por los presentes inventores: 1) Intercambio de Cl^--HCO_3^- electroneutro, dependiente de Cl^-, y 2) secreción de HCO_3^- electrogénico, independiente de Cl^-.

Los resultados muestran que la secreción de HCO_3^- endógeno no contribuye a la secreción neta de HCO_3^-. Específicamente, se añade una solución débilmente tamponada libre de HCO_3^- a ambos lados de los tejidos montados en una cámara Ussing y ambos lados de los tejidos se burbujean con 100 % O_2. La secreción de HCO_3^- mínima (0,1 ± 0,01 $mEq.h^{-1}.cm^{-2}$, n=12) se registra bajo tales condiciones. La adición posterior de solución tamponada que contiene HCO_3^- al lado basolateral y burbujeando con 95 % de O_2 y 5 % de CO_2 en ese lado tiene como resultado una secreción significativa de HCO_3^- 3,8 ± 0,2 $mEq.h^{-1}.cm^{-2}$ (n =9).

Para determinar si la secreción de HCO_3^- independiente de Cl^- juega un papel en la secreción de HCO_3^- (en ausencia de glucosa de lumen), se realizaron experimentos de pH estat en ausencia de Cl^- de lumen. En la ausencia de Cl^- de lumen, se registró una secreción mínima de HCO_3^- (0,4 ± 0,1 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$) (figura 5A). Los resultados indican que la secreción de HCO_3^- basal en la ausencia de glucosa de lumen se debe principalmente al intercambio de Cl^--HCO_3^- electroneutro dependiente de Cl^-.

EJEMPLO 8 - EFECTO DE LA GLUCOSA DE LUMEN EN LA SECRECIÓN DE HCO_3^- EN EL ÍLEON

Se realizaron experimentos de pH estat para determinar el efecto de la glucosa en la secreción de HCO_3^- dependiente de Cl^-. En presencia de Cl^- de lumen, la adición de glucosa al lado del lumen tiene como resultado una secreción significativa de HCO_3^- (7,6 ± $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$).

La secreción de HCO_3^- en presencia de glucosa puede deberse al intercambio Cl-HCO_3^- electroneutro dependiente de Cl^- de lumen o a la secreción de HCO_3^- mediada por el canal de anión independiente de Cl^-. Para evaluar el mecanismo de la secreción de HCO_3^- estimulada por glucosa, se añade glucosa al lado mucoso. La retirada del Cl^- de lumen no elimina la secreción de HCO_3^- en tejidos incubados con glucosa 6 mM (3,2 ± 0,6 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$) (figura 5A). Los resultados indican que la secreción de HCO_3^- en la presencia de glucosa se debe principalmente a la secreción independiente de Cl^- de lumen, y está mediada por el canal aniónico.

En otro experimento, ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoico 100 µM (NPPB), un bloqueador de canal aniónico no específico, se añade al lado del lumen. El NPPB inhibe la secreción de HCO_3^- independiente de Cl^- de lumen detectado en presencia de glucosa 6 mM (figura 5B). Los resultados indican que la secreción de HCO_3^- estimulada por glucosa está mediada a través del canal de anión.

Para investigar si la secreción de HCO_3^- inducida por glucosa se produce a través de un canal de CFTR, se añade glibenclamida 100 µM al lado del lumen. La glibenclamida inhibe la secreción de HCO_3^- independiente de Cl^- de lumen estimulada por glucosa, indicando que los canales de CFTR median la secreción de HCO_3^- estimulada por glucosa.

EJEMPLO 9 - EFECTO DEL METABOLISMO DE GLUCOSA EN LA SECRECIÓN DE HCO_3^- MEDIADA POR EL CANAL ANIÓNICO

Para evaluar si el metabolismo de glucosa en el tejido del intestino delgado se atribuye a la secreción de HCO_3^- estimulada por glucosa, los tejidos del intestino delgado se incuban con 3-OMG, una forma deficientemente metabolizada de glucosa, en la ausencia de lumen y baño de HCO_3^-. La secreción de HCO_3^- (0,1 ± 0,03 $\mu Eq.h^{-1}.cm^{-2}$) se observa en presencia de 3-OMG (6 mM) y en ausencia del lumen y baño de HCO_3^-.

EJEMPLO 10 - EFECTO DE LA GLUCOSA EN EL NIVEL DE AMPc INTRACELULAR EN EL ÍLEON

En ausencia de glucosa, los lisados celulares de las células vellosas muestran un mayor nivel de AMPc intracelular, cuando se compara con el de las células de cripta. La incubación con forskolina tiene como resultado un aumento significativo en el nivel de $[AMPc]_i$ en las células vellosas y de cripta (figura 3A). Las células tratadas con forskolina se usan como un control positivo.

Para estudiar el efecto de la glucosa en los niveles intracelulares de AMPc, las células vellosas y de cripta se incuban con glucosa 6 mM. La incubación de los lisados de las células vellosas con glucosa tiene como resultado un aumento significativo en el nivel intracelular de AMPc, cuando se compara con el de las células de cripta (figura 3B). Los resultados indican que el aumento del nivel intracelular de AMPc juega un papel en mediar la secreción aniónica estimulada por glucosa. El aumento en $[AMPc]_i$ se observa en células vellosas pero no en células de cripta; esto indica que la maquinaria de transporte de glucosa sólo es necesaria en células epiteliales vellosas completamente maduras y diferenciadas.

Para determinar si el metabolismo de la glucosa tiene un efecto en el nivel intracelular de AMPc, el raspado mucoso del íleon se pre-incubada con 3-OMG durante 45 minutos y después los lisados celulares se usan para medir el nivel intracelular de AMPc.

Similar a la glucosa, la incubación de las células vellosas con 3-OMG a concentraciones de 0,6 y 6 mM tiene como resultado un aumento significativo en el nivel intracelular de AMPc (figura 3C). La incubación de las células vellosas con 3-OMG a 6 mM tiene como resultado un nivel intracelular de AMPc significativamente mayor, cuando se compara con el de la glucosa 6 mM ($P < 0,01$) (figura 3C). Los resultados muestran que el aumento observado en el nivel intracelular de AMPc no está provocado por el metabolismo de glucosa en los tejidos del intestino delgado.

EJEMPLO 11 - EFECTO DE LA GLUCOSA EN CA^{2+} INTRACELULAR EN LÍNEAS CELULARES Caco2

El inhibidor de PKA (H-89) inhibe tanto la secreción de anión estimulada por AMPc como el transporte de glucosa mediado por SGLT1. La presencia de I_{sc} insensible a H-89 (figura 1A y B) indica que los mecanismos independientes de PKA también contribuyen a la secreción inducida por glucosa. Como el AMPc, el Ca^{2+} intracelular es uno de los segundos mensajeros jefe intracelulares implicados en la secreción de aniones.

Para determinar la función del Ca^{2+} intracelular en el aumento estimulado por glucosa en *Isc*, el nivel intracelular de Ca^{2+} se mide en presencia de diferentes concentraciones de glucosa y 3-OMG, respectivamente, y en presencia de BAPTA-AM (ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético) - un quelante intracelular específico del calcio. Las respuestas del Ca^{2+} a la glucosa y 3-OMG en las células cultivadas de Caco2 cargadas con el indicador de Ca^{2+} fluo 8 son vigiladas por microscopía confocal de exploración con láser. La adición de glucosa 0,6 mM al medio del baño inicia la oscilación de Ca^{2+} intracelular (figura 4B). La amplitud de las oscilaciones disminuye con el tiempo. La amplitud pico media de la fluorescencia de calcio (F/Fo) con glucosa 0,6 mM se calcula siendo 1,32 ± 0,1 (n=10).

La oscilación de Ca^{2+} inducida por glucosa no está relacionada con el metabolismo intracelular de la glucosa, ya que la glucosa 0,6 mM 3-OMG induce una oscilación similar de Ca^{2+} (1,2 ± 0,1 (n=10) (figura 4A). La oscilación de Ca^{2+} estimulada por glucosa se elimina al pre-incubar las células con un quelante de Ca^{2+} intracelular de BAPTA-AM durante 45 minutos (1 .01 ± 0,1) (n=10) (figura 4A).

La glucosa se añade a mayor concentración (6 mM) para determinar si el aumento en la concentración de glucosa aumenta la amplitud de la oscilación de Ca^{2+}. Las oscilaciones de Ca^{2+} son significativamente mayores con la adición de glucosa (1,85 ± 0,2 frente a 1,32 ± 0,1) o 3-OMG (1,5 ± 0,1 frente a 1,2 ± 0,2) a 6 mM al medio de baño, cuando se compara con las de la glucosa 0,6 mM o 3-OMG (figura 4A). El aumento estimulado por glucosa en las oscilaciones de Ca^{2+} se elimina completamente al pre-incubar las células con BAPTA-AM (figura 4A). Esto indica que el Ca^{2+} intracelular está implicado en la secreción de aniones inducida por glucosa.

EJEMPLO 12 - COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE DIARREA

En ciertas realizaciones, este Ejemplo proporciona formulaciones para el tratamiento de diarrea, tal como la diarrea inducida por rotavirus. En una realización, la formulación no comprende glucosa, análogos de glucosa, sustratos de transportadores de glucosa, o moléculas de azúcar.

FORMULACIÓN 1 (Tamaño de la porción 1 botella (237 ml)		
	Cantidad por porción	% del Valor Diario*
L-Valina	276 mg *	
Acido L-aspártico	252 mg *	
L-Serina	248 mg *	
L-Isoleucina	248 mg *	
L-Treonina	225 mg *	
L-Lisina HCL	172 mg *	
L-Glicina	141 mg *	
L-Tirosina	51 mg *	
Otros ingredientes: Agua, Electrolitos		
FORMULACIÓN 2 (Tamaño de la porción 1 botella (237 ml)		
Cantidad por porción		
	% del Valor Diario *	
Grasa Total 0 g	0%	
Sodio 440 mg	18%	
Carbohidrato Total 0 g	0%	
Proteína 2g		
Ingredientes: Agua, Aminoácidos (L-Triptófano, L-Valina, Acido L-aspártico, L-Serina, L-Isoleucina, L-		

Treonina, L-Lisina Clorhidrato, L-Glicina, L-Tirosina), Electrolitos	
Aminoácido	Cantidad mg/porción de 1 botella (237 ml)
L-Lisina HCl	175
Acido L-aspártico	255
L-Glicina	144
L-Isoleucina	251
L-Treonina	228
L-Tirosina	52
L-Valina	281
L-Triptófano	392
L-Serina	252

Los términos "un" y "una" y "el/la" y referencias similares en el contexto para describir la invención deben construirse para cubrir tanto la forma singular como la plural, a menos de que se indique de otra forma o claramente se contradiga por el contexto.

La mención de las escalas de valores en la presente se destina solamente para servir como un método abreviado para mencionar individualmente cada valor por separado que esté dentro de la escala, a menos que se indique de otra forma en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. A menos que se indique de otra manera, todos los valores exactos proporcionados en el presente documento son representativos de valores correspondientes aproximados (por ejemplo, todos los valores exactos ilustrativos proporcionados con respecto a un factor o medición particular pueden considerarse proporcionando también una medición aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", donde sea apropiado).

El uso de cualquier y todos los ejemplos o lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionados en el presente documento, pretenden meramente esclarecer la invención. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe construirse como si indicara que cualquier elemento es esencial para la práctica de la invención a no ser que se mencione explícitamente.

La descripción en el presente documento de cualquier aspecto o realización de la invención usando expresiones como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos está provista para sustentar un aspecto o realización de la invención similar que "consiste en", "cosiste esencialmente en" o "comprende sustancialmente" ese elemento o esos elementos en particular, a menos de que se mencione lo contrario o se contradiga claramente por contexto (por ejemplo, una composición descrita en el presente documento que comprende un elemento en particular debe entenderse como la que describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se mencione otra cosa o se contradiga claramente por contexto).

Debe entenderse que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento son únicamente para fines ilustrativos.

REFERENCIAS

Zhang H, Ameen N, Melvin JE, & Vidyasagar S (2007) Acute inflammation alters bicarbonate transport in mouse ileum. *J Physiol* 581(3):1221-1233.

Hediger MA & Rhoads DB (1994) Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. (Traducido del inglés) *Physiol. Rev.* 74(4):993-1026 (en ing.).

Wright EM, Loo DD, Hirayama BA, & Turk E (2004) Surprising versatility of Na+-glucose cotransporters: SLC5. (Traducido del inglés) *Physiology (Bethesda)* 19:370-376 (en ing.).

Chen XZ, Coady MJ, Jackson F, Berteloot A, & Lapointe JY (1995) Thermodynamic determination of the Na+: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. (Traducido del inglés) *Biophys. J.* 69(6):2405-2414 (en ing.).

Torres-Pinedo R, Rivera CL, & Fernandez S (1966) Studies on infant diarrhea. II. Absorption of glucose and net fluxes of water and sodium chloride in a segment of the jejunum. (Traducido del inglés) *J. Clin. Invest.* 45(12):1916-1922 (en ing.).

Davidson GP, Gall DG, Petric M, Butler DG, & Hamilton JR (1977) Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets. Intestinal structure and transport. (Traducido del inglés) *J. Clin. Invest.* 60(6):1402-1409 (en ing.).

Nalin DR*, et al.* (1979) Oral rehydration and maintenance of children with rotavirus and bacterial diarrhoeas. (Traducido del inglés) *Bull. World Health Organ.* 57(3):453-459 (en ing.).

Lorrot M & Vasseur M (2007) How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? (Traducido del inglés) *Virol J* 4:31 (en ing.).

Chapman MJ*, et al.* (2009) Glucose absorption and gastric emptying in critical illness. (Traducido del inglés) *Crit Care* 13(4):R140 (en ing.).

Telch J*, et al.* (1981) Intestinal glucose transport in acute viral enteritis in piglets. (Traducido del inglés) *Clin Sci*

(Lond) 61(1):29-34 (en ing.).
Lo B & Silverman M (1998) Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na+/Glucose cotransporter SGLT1. Evidence that this region participates in the Na+ and voltage dependence of the transporter. (Traducido del inglés) *J. Biol. Chem.* 273(45):29341-29351 (en ing.).
Wright EM, Hirsch JR, Loo DD, & Zampighi GA (1997) Regulation of Na+/glucose cotransporters. (Traducido del inglés) *J. Exp. Biol.* 200(Pt 2):287-293 (en ing.).
Dyer J, Vayro S, King TP, & Shirazi-Beechey SP (2003) Glucose sensing in the intestinal epithelium. (Traducido del inglés) *Eur. J. Biochem.* 270(16):3377-3388 (en ing.).
Gribble FM (2008) RD Lawrence Lecture 2008: Targeting GLP-1 release as a potential strategy for the therapy of Type 2 diabetes. (Traducido del inglés) *Diabet. Med.* 25(8):889-894 (en ing.).
Gustavsson N*, et al.* (Synaptotagmin-7 as a positive regulator of glucose-induced glucagon-like peptide-1 secretion in mice. (Traducido del inglés) *Diabetologia* 54(7):1824-1830 (en ing.).
Eissele R*, et al.* (1992) Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. (Traducido del inglés) *Eur. J. Clin. Invest.* 22(4):283-291 (en ing.).
Elliott RM*, et al.* (1993) Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. (Traducido del inglés) *J. Endocrinol.* 138(1):159-166 (en ing.).
Herrmann C*, et al.* (1995) Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. (Traducido del inglés) *Digestion* 56(2):117-126 (en ing.).
Knickelbein RG, Aronson PS, & Dobbins JW (1988) Membrane distribution of sodium-hydrogen and chloride-bicarbonate exchangers in crypt and villus cell membranes from rabbit ileum. *J. Clin. Invest.* 82(6):2158-2163.
Vidyasagar S, Rajendran VM, & Binder HJ (2004) Three distinct mechanisms of HCO3- secretion in rat distal colon. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(3):C612-621.
Coon S, Kekuda R, Saha P, & Sundaram U (Reciprocal regulation of the primary sodium absorptive pathways in rat intestinal epithelial cells. (Traducido del inglés) *Am J Physiol Cell Physiol* 300(3):C496-505 (en ing.).
Hu Z*, et al.* (2006) MAPKAPK-2 is a critical signaling intermediate in NHE3 activation following Na+-glucose cotransport. (Traducido del inglés) *J. Biol. Chem.* 281(34):24247-24253 (en ing.).
Turner JR & Black ED (2001) NHE3-dependent cytoplasmic alkalinization is triggered by Na(+)-glucose cotransport in intestinal epithelia. (Traducido del inglés) *Am J Physiol Cell Physiol* 281(5):C1533-1541 (en ing.).
Donowitz M & Li X (2007) Regulatory binding partners and complexes of NHE3. (Traducido del inglés) *Physiol. Rev.* 87(3):825-872 (en ing.).
Zachos NC, Kovbasnjuk O, & Donowitz M (2009) Regulation of intestinal electroneutral sodium absorption and the brush border Na+/H+ exchanger by intracellular calcium. (Traducido del inglés) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165:240-248 (en ing.).
Zachos NC*, et al.* (2009) NHERF3 (PDZK1) contributes to basal and calcium inhibition of NHE3 activity in Caco-2BBe cells. (Traducido del inglés) *J. Biol. Chem.* 284(35):23708-23718 (en ing.).
Donowitz M*, et al.* (2009) NHE3 regulatory complexes. (Traducido del inglés) *J. Exp. Biol.* 212(Pt 11):1638-1646 (en ing.).
Zhu X*, et al.* (Elevated Calcium Acutely Regulates Dynamic Interactions of NHERF2 and NHE3 Proteins in Opossum Kidney (OK) Cell Microvilli. (Traducido del inglés) *J. Biol. Chem.* 286(40):34486-34496 (en ing.).
Caputo A*, et al.* (2008) TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. (Traducido del inglés) *Science* 322(5901):590-594 (en ing.).
Namkung W, Phuan PW, & Verkman AS (TMEM16A inhibitors reveal TMEM16A as a minor component of calcium-activated chloride channel conductance in airway and intestinal epithelial cells. (Traducido del inglés) *J. Biol. Chem.* 286(3):2365-2374 (en ing.).
Engle MJ, Goetz GS, & Alpers DH (1998) Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. (Traducido del inglés) *J. Cell. Physiol.* 174(3):362-369 (en ing.).
Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, & Estes MK (1996) Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. (Traducido del inglés) *Science* 272(5258):101-104 (en ing.).
Rhoads JM*, et al.* (1996) Can a super oral rehydration solution stimulate intestinal repair in acute viral enteritis? (Traducido del inglés) *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 14(3):175-181 (en ing.).

REIVINDICACIONES

1. Una composición terapéutica estéril para su uso en un método para el tratamiento de diarrea en un sujeto, en donde la composición se formula para administración enteral y tiene una osmolaridad total de 100 mosm a 250 mosm, en donde la composición comprende:

uno o más aminoácidos libres seleccionados de lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano y serina; electrolitos y agua;
y en donde un sustrato de un transportador de glucosa y/o un compuesto que puede ser hidrolizado en un sustrato de un transportador de glucosa, si está presente en dicha composición, está presente a una concentración de menos de 0,05 mM; y,
en donde dicho sustrato de un transportador de glucosa es glucosa, α-metil-D-glucopiranósido (AMG), 3-O-metilglucosa (3-OMG), desoxi-D-glucosa o α-metil-D-glucosa,
y en donde el sujeto es un humano de cinco años de edad o más joven.

2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la diarrea es diarrea inducida por rotavirus.

3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición no contiene ningún carbohidrato.

4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición tiene un pH de 2,9 a 7,3.

5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición se administra por vía oral.

6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medicamento no contiene glucosa, α-metil-D-glucopiranósido (AMG), 3-O-metilglucosa (3-OMG), desoxi-D-glucosa, o α-metil-D-glucosa.

7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende uno o más electrolitos seleccionados de Na^+, K^+, HCO_3^-, CO_3^{2-}, y Cl^-.

8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición consiste esencialmente en
uno o más aminoácidos libres seleccionados de ácido aspártico, glicina, isoleucina, lisina, serina, treonina, valina, triptófano y tirosina, preferentemente lisina, ácido aspártico, glicina, isoleucina, treonina, tirosina, valina y serina;
uno o más electrolitos seleccionados de Na^+, K^+, HCO_3^-, CO_3^{2-}, y Cl^-;
agua; y,
opcionalmente, uno o más vehículos, agentes tamponantes, conservantes y/o agentes saborizantes.

9. Un envase que contiene la composición de la reivindicación 1, o un polvo que, cuando se combina con una cantidad especificada de agua, forma una composición de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1.

10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende uno o más aminoácidos libres seleccionados de lisina, ácido aspártico, glicina, isoleucina, treonina, tirosina, valina y serina.

11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición consiste esencialmente en
ácido aspártico, glicina, isoleucina, lisina, serina, treonina, valina, triptófano y tirosina;
uno o más electrolitos seleccionados de Na^+, K^+, HCO_3^-, CO_3^{2-}, y Cl^-;
agua; y,
opcionalmente, uno o más vehículos, agentes tamponantes, conservantes y/o agentes saborizantes.

12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición consiste esencialmente en
lisina, ácido aspártico, glicina, isoleucina, treonina, tirosina, valina y serina;
uno o más electrolitos seleccionados de Na^+, K^+, HCO_3^-, CO_3^{2-}, y Cl^-;
agua; y,
opcionalmente, uno o más vehículos, agentes tamponantes, conservantes y/o agentes saborizantes.

13. Una composición terapéutica estéril para su uso en un método para el tratamiento de diarrea en un sujeto, en donde la composición se formula para administración enteral,
en donde la composición comprende:

uno o más aminoácidos libres seleccionados de lisina, glicina, treonina, valina, tirosina, ácido aspártico, isoleucina, triptófano y serina; y electrolitos;
y en donde un sustrato de un transportador de glucosa y/o un compuesto que puede ser hidrolizado en un sustrato de un transportador de glucosa, si está presente en dicha composición, está presente a una concentración de

menos de 0,05 mM; y,
en donde dicho sustrato de un transportador de glucosa es glucosa, α-metil-D-glucopiranósido (AMG), 3-O-metilglucosa (3-OMG), desoxi-D-glucosa o α-metil-D-glucosa,
y en donde el sujeto es un humano de cinco años de edad o más joven,

en donde, cuando la composición se reconstituye en agua para su uso en dicho método, la composición tiene una osmolaridad total de 100 mosm a 250 mosm.

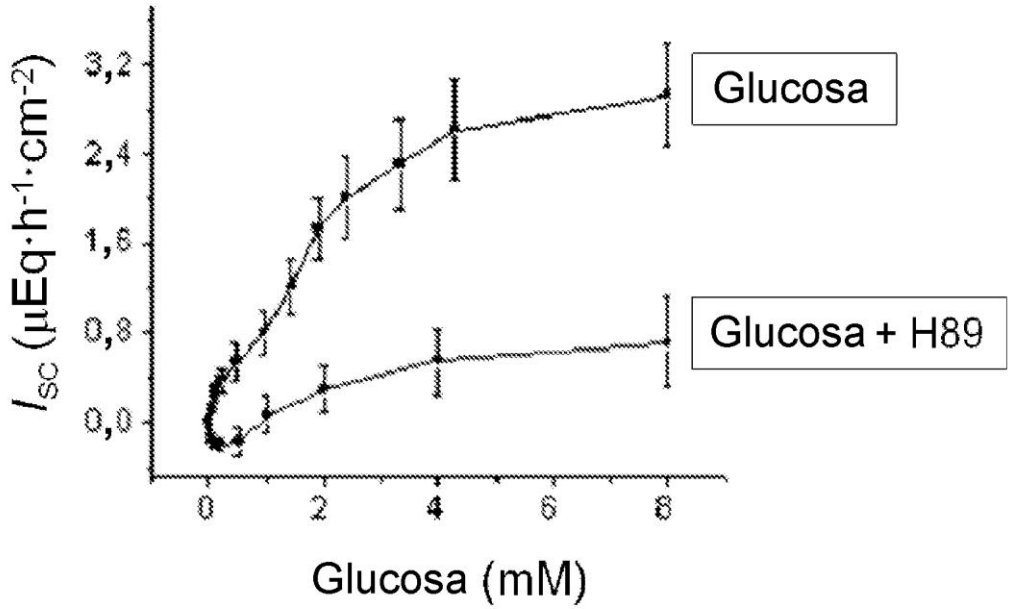
I_{SC} (µEq·h^{-1}·cm^{-2})
3,2
2,4
1,6
0,8
0,0
0
2
4
6
8
Glucosa (mM)
Glucosa
Glucosa + H89

FIG. 1A

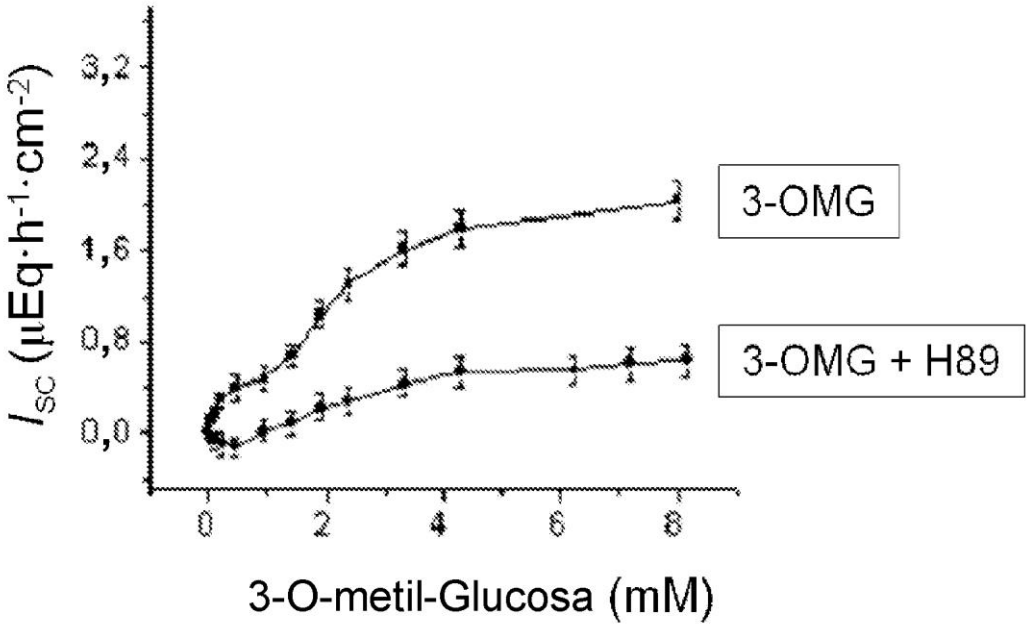
I_{SC} (µEq·h^{-1}·cm^{-2})
3,2
2,4
1,6
0,8
0,0
0
2
4
6
8
3-O-metil-Glucosa (mM)
3-OMG
3-OMG + H89

FIG. 1B

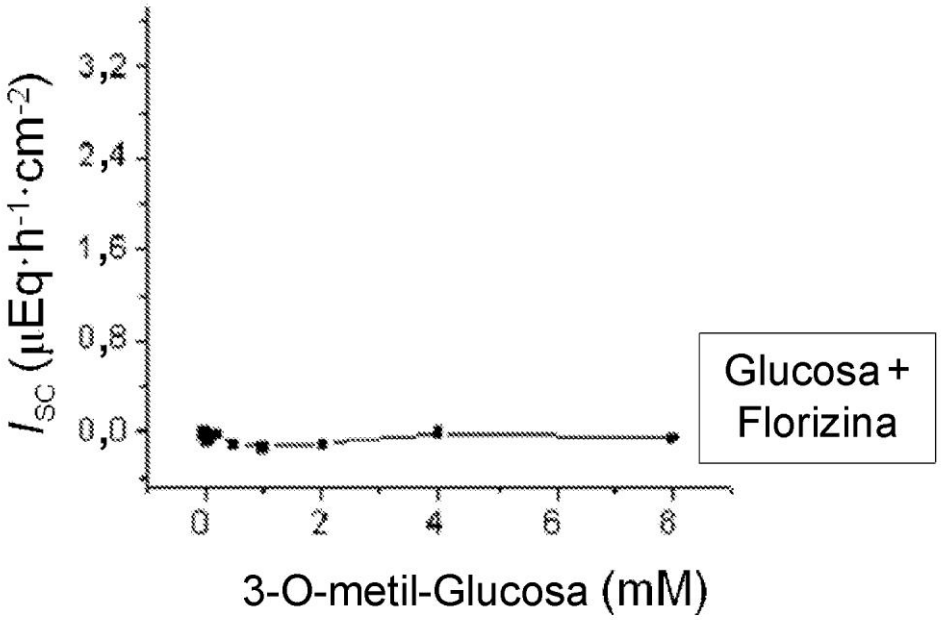
I_{SC} (µEq·h^{-1}·cm^{-2})
3,2
2,4
1,6
0,8
0,0
0
2
4
6
8
Glucosa + Florizina
3-O-metil-Glucosa (mM)

FIG. 1C

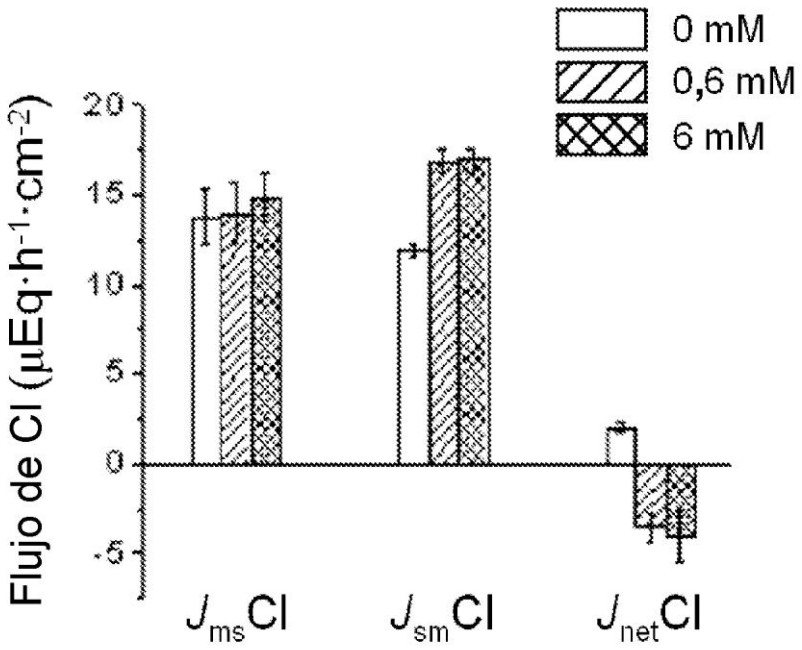
0 mM
0,6 mM
6 mM
Flujo de Cl (µEq·h^{-1}·cm^{-2})
20
15
10
5
0
-5
J_{ms}Cl
J_{sm}Cl
J_{net}Cl

FIG. 2A

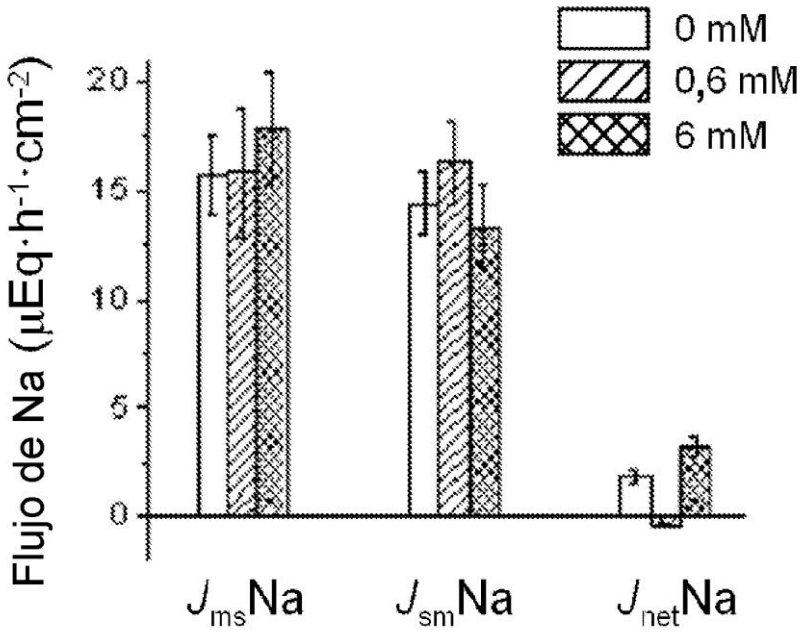
0 mM
0,6 mM
6 mM
Flujo de Na (µEq·h-1·cm-2)
20
15
10
5
0
JmsNa
JsmNa
JnetNa

FIG. 2B

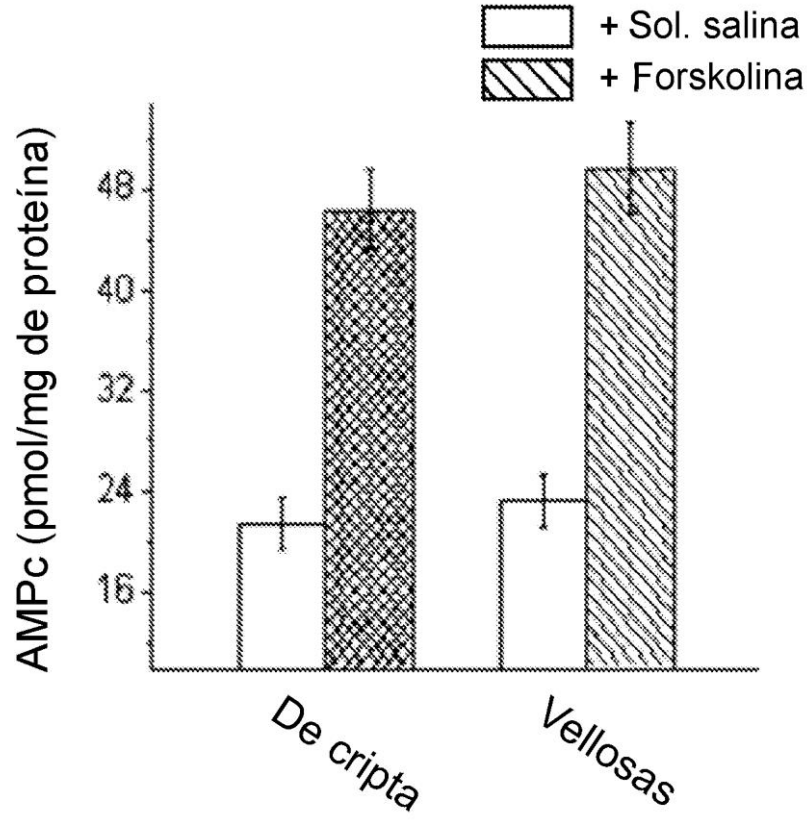
+ Sol. salina
+ Forskolina
AMPc (pmol/mg de proteína)
48
40
32
24
16
De cripta
Vellosas

FIG. 3A

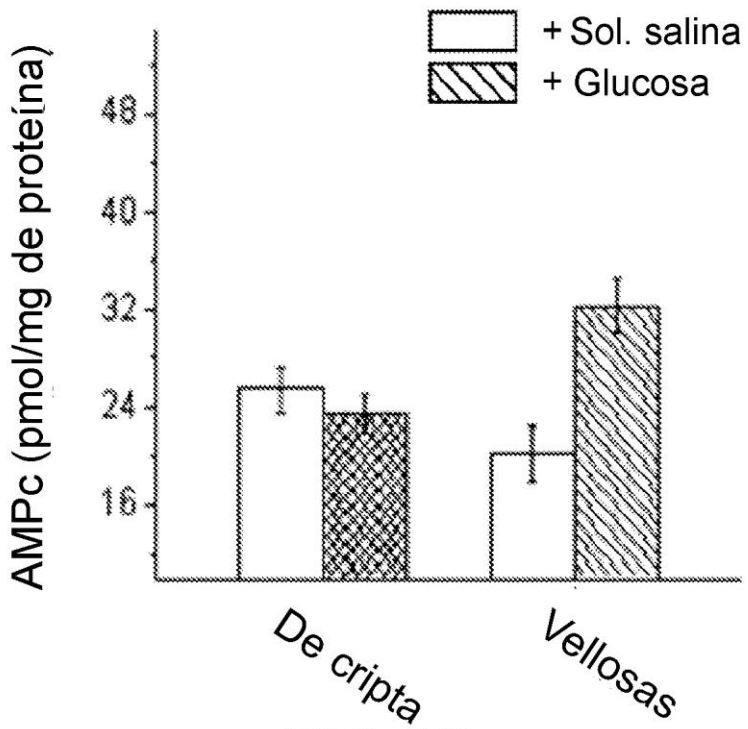
+ Sol. salina
+ Glucosa
AMPc (pmol/mg de proteína)
48
40
32
24
16
De cripta
Vellosas

FIG. 3B

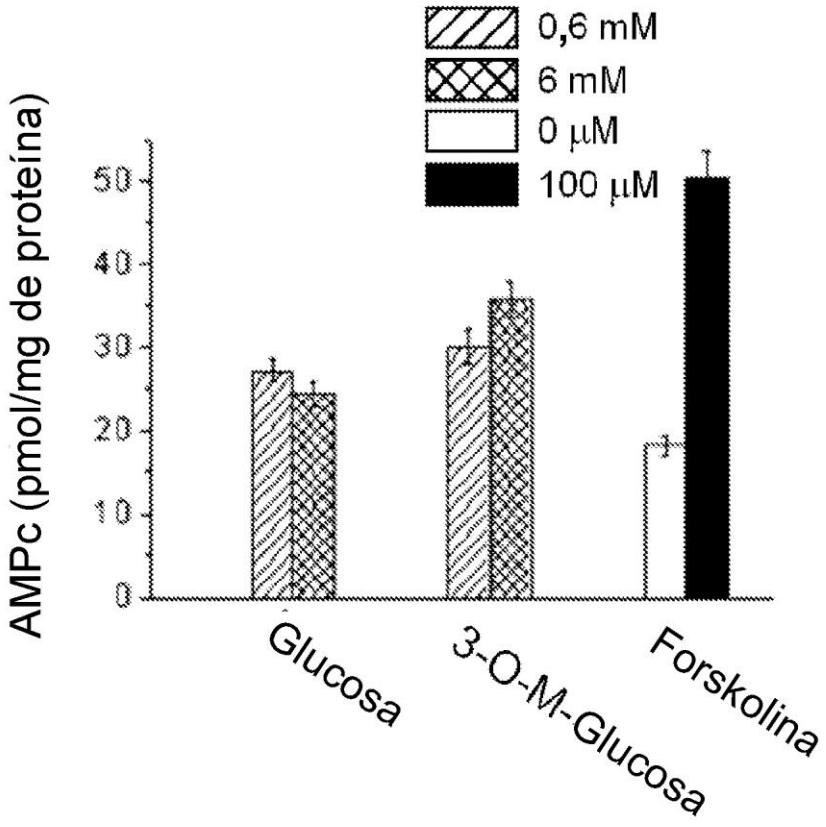
0,6 mM
6 mM
0 μM
100 μM
AMPc (pmol/mg de proteína)
50
40
30
20
10
0
Glucosa
3-O-M-Glucosa
Forskolina

FIG. 3C

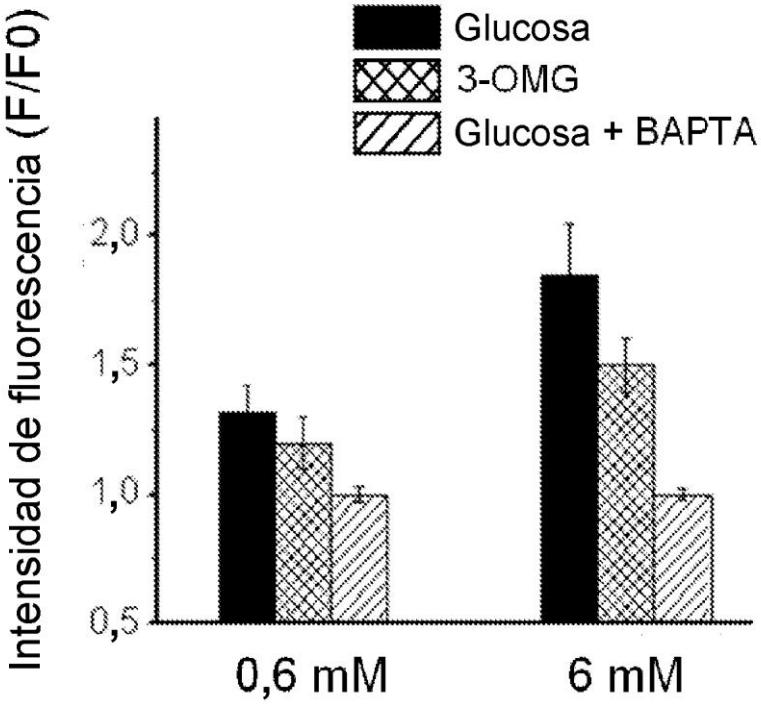
Glucosa
3-OMG
Glucosa + BAPTA
Intensidad de fluorescencia (F/F0)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,6 mM
6 mM

FIG. 4A

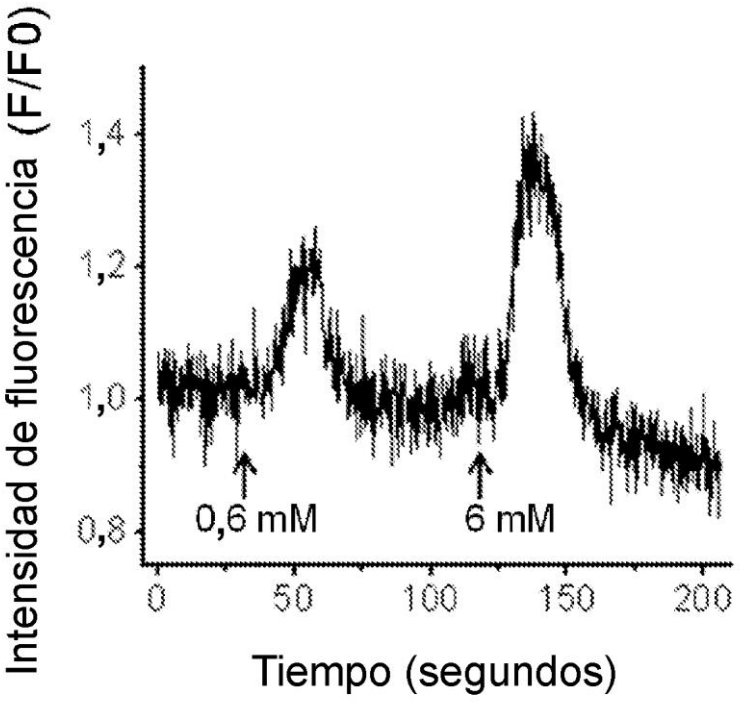
Intensidad de fluorescencia (F/F0)
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6 mM
6 mM
0
50
100
150
200
Tiempo (segundos)

FIG. 4B

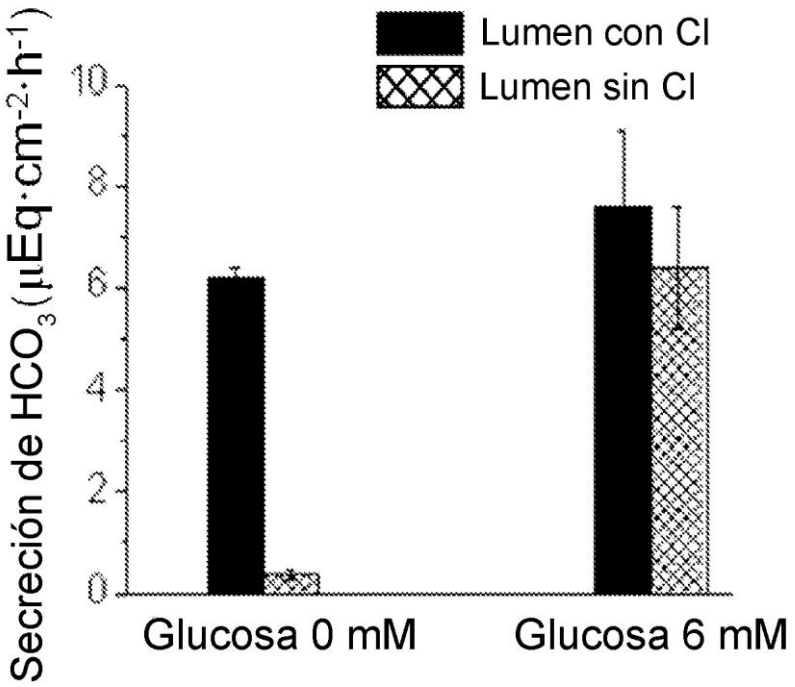
Lumen con Cl
Lumen sin Cl
Secreción de HCO_3 ($\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)
0
2
4
6
8
10
Glucosa 0 mM
Glucosa 6 mM

FIG. 5A

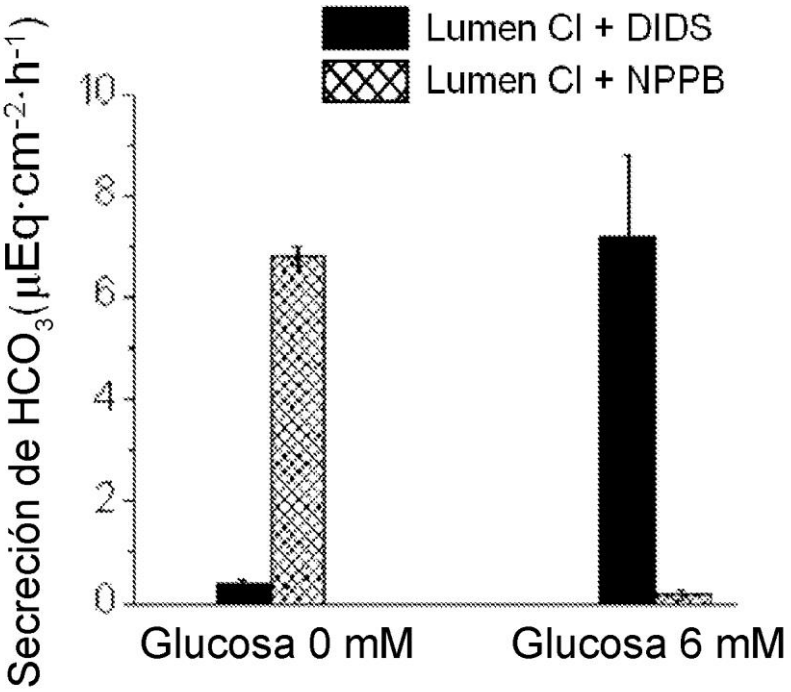
Lumen Cl + DIDS
Lumen Cl + NPPB
Secreción de HCO_3 ($\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)
0
2
4
6
8
10
Glucosa 0 mM
Glucosa 6 mM

FIG. 5B