



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 895**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/55** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61K 31/135** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03792402 .4**  
96 Fecha de presentación : **21.08.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1531826**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54 Título: **Antidepresivos para la profilaxis y la terapia de la fibrosis quística.**

30 Prioridad: **23.08.2002 DE 102 39 531**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.10.2011**

73 Titular/es: **Erich Gulbins**  
**Institut fur Molekularbiologie Universitat Essen**  
**Hufelandstrasse 55**  
**45122 Essen, DE**  
**Claus Adams**

72 Inventor/es: **Gulbins, Erich**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 366 895 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

Antidepresivos para la profilaxis y la terapia de la fibrosis quística

- 5 [0001] La presente invención se refiere a la utilización de sustancias activas que son adecuadas para la profilaxis y/o la terapia de la fibrosis quística.
- [0002] Ya que las enfermedades infecciosas siguen siendo un problema médico muy grande en el mundo entero, los estudios para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades de este tipo han sido desde hace mucho tiempo objeto de una investigación intensiva. Por ejemplo se dedican constantemente enormes costos al desarrollo de nuevos antibióticos. Estos antibióticos son necesarios para poder combatir bacterias, hongos, protozoos o parásitos como agentes patógenos de las enfermedades infecciosas. En particular ha de tenerse en cuenta en este caso la evolución constante de nuevas resistencias de los patógenos, lo cual es cada vez más problemático.
- 10 [0003] Una dificultad particular representa el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por virus o priones. Debido a la ausencia de un metabolismo propio, estos agentes patógenos no se pueden combatir con antibióticos, de modo que generalmente solo es posible un tratamiento de los síntomas.
- [0004] Para mejorar la profilaxis y la terapia de enfermedades infecciosas y particularmente para soportar los problemas mencionados, la invención se enfrenta a la tarea de proveer sustancias activas que son adecuadas particularmente para la profilaxis y la terapia de la fibrosis quística.
- 20 [0005] La tarea se resuelve por utilización de inhibidores, como está descrito en las reivindicaciones 1 y 2.
- [0006] Según la invención se usan para la profilaxis y/o la terapia de la fibrosis quística inhibidores de la esfingomielinasa ácida y/o inhibidores de productos que surgen por la reacción catalizada de la esfingomielinasa ácida según las reivindicaciones. A estos productos pertenece particularmente la ceramida que se produce por la disociación de esfingolípidos. Ensayos que han dado lugar a esta nueva utilización de inhibidores de este tipo, mostraban que por ello se puede impedir efectivamente la infección de células eucarióticas con diferentes organismos patógenos, por ejemplo bacterias, virus, hongos y parásitos. Junto a la profilaxis y/o la terapia de enfermedades infecciosas, los inhibidores citados pueden ser utilizados también con ventaja para la profilaxis y/o la terapia de enfermedades, cuya evolución clínica contribuye al menos por las infecciones, es decir la fibrosis quística.
- 25 [0007] Estos resultados sorprendentes se basan en que se precisan unas plataformas de membrana ricas en ceramidas en la membrana celular de células eucarióticas para una infección de células eucarióticas con agentes patógenos. Estas plataformas mayores en la membrana celular de las células eucarióticas se forman por la fusión de distintos dominios muy pequeños en la membrana celular, los llamados rafts (balsas). Estas balsas consisten en colesterol y esfingolípidos, en particular la esfingomielina, que se asocian muy firmemente entre sí, por lo cual se separan de los fosfolípidos de la membrana celular y forman estos pequeños dominios distintos. El esfingolípidos existente más frecuentemente en balsas es la esfingomielina, que consiste en el residuo de ceramida muy hidrófobo y el grupo de cabeza hidrófilo de fosforilcolina. La ceramida es un éster amídico de la base esfingoide D-eritro-esfingosina y un ácido graso, normalmente con una longitud de cadena de C16 a C26. Los enlaces por puentes de hidrógeno y las interacciones hidrófobas de van der Waal entre el sistema anular de colesterol y esfingolípidos o entre los grupos de cabeza de los esfingolípidos dan lugar a una asociación lateral de los esfingolípidos y del colesterol en la membrana celular y una separación espontánea de los demás fosfolípidos (Brown D.A., Londres E. (1998). Funciones de balsas lipídicas en membranas biológicas. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 14: 111-367; Harder T., Simons K. (1997). Caveolae, DIGs, y las dinámicas de microdominios del colesterol de esfingolípidos. Curr. Opin. Cell. Biol. 9: 534-542). Por ello surgen los dominios de membranas muy pequeños, distintos y ricos en esfingolípidos y colesterol denominados balsas (rafts). Extrayendo de las balsas el colesterol que funciona probablemente como espaciador entre los esfingolípidos con sus grupos de cabeza relativamente grandes, se destruye la estructura y la función de las balsas.
- 35 [0008] Según la invención se identificó un mecanismo que media la formación de plataformas de membrana a partir de las balsas, el agrupamiento, la agregación de receptores en estas plataformas de membrana y la infección de células con bacterias patógenas y virus. Por ejemplo tras la estimulación por CD95 o el receptor CD40, la infección con *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseriae gonorrhoeae* o también la infección de células humanas con rinovirus, en balsas da lugar a una liberación de ceramida de la esfingomielina. La formación de ceramida en balsas, a causa de las propiedades biofísicas de la ceramida, da lugar a una fusión de balsas pequeñas de plataformas demasiado grandes y ricas en ceramidas en la membrana celular.
- 40 [0009] Los resultados que dieron lugar a la invención, mostraban que estas pequeñas balsas son fusionadas por la enzima esfingomielinasa ácida y por la ceramida, que es liberada por la reacción catalizada por esta enzima, obteniendo las
- 45
- 50
- 55
- 60

plataformas más grandes mencionadas.

5 [0010] Una importancia fisiológica de estas plataformas ha sido descrita ya recientemente por Grassmé et al. (J. Biol. Chem. 276, 20589-20596 (2001); J. Immunol. 168, 298-307 (2002)). Los autores podían demostrar que las plataformas ricas en ceramida servían de mediación de señales del espacio extracelular al interior celular. Al mismo tiempo es inducida una translocación de la enzima esfingomielinasa ácida hacia el lado exterior de la membrana por activación de diferentes receptores, p. ej. CD95 y CD40. Aquí la esfingomielinasa ácida libera la ceramida de la esfingomielina, que es agregada espontáneamente en las balsas. Por ello da lugar a la transformación de balsas en áreas muy hidrófobas de la membrana. Estos agregados de ceramida muestran además la tendencia a fusionarse espontáneamente en plataformas de membrana más grandes. En estas plataformas de membrana ricas en ceramida se agregan receptores activados como CD95 y CD40, lo cual es necesario para la mediación de una señal por estos receptores en la célula.

15 [0011] Lo interesante que ahora podía demostrarse dentro del marco de la invención es que estas plataformas permiten adicionalmente una penetración de organismos patógenos por medio de estas secciones de membrana correspondientes. En la formación de estas "puertas de entrada" para organismos patógenos en la célula eucariótica está implicado terminantemente la enzima esfingomielinasa ácida, ya que las ceramidas, como productos de la reacción catalizada por esta enzima, forman las plataformas de membrana. Este proceso se desencadena, dado que por los agentes patógenos, por medio de un mecanismo hasta ahora desconocido, se induce la esfingomielinasa ácida a ser transportada en vesículas intracelulares en la superficie celular o en el lado exterior de la membrana. Allí es causada por la enzima la degradación de la esfingomielina con respecto a la ceramida en la membrana. Esta relevancia de plataformas de membrana ricas en ceramidas para infecciones con bacterias patógenas y virus podía ser demostrada por los inventores particularmente en el ejemplo de la infección de células mamalias con *Pseudomonas aeruginosa*. La infección de células mamalias con *P. aeruginosa* activa la esfingomielinasa ácida y induce con ella la liberación de la ceramida.

25 [0012] Otra tarea de la enzima esfingomielinasa ácida ha sido descrita ya por Grassmé et al. (Cell, Vol. 91, 605-615, 1997) en relación con la invasión de gonococos en células eucarióticas. Los autores podían demostrar que la esfingomielinasa ácida está involucrada en una cadena de transducción de señales en la célula huésped que media la invasión de una determinada cepa de gonococos. Importantes son en este caso ciertas proteínas de superficie sobre la bacteria patógena, las llamadas proteínas OPA. Estas se unen a un receptor específico de la célula huésped eucariótica, de modo que se activa la fosfolipasa C y se forma el diacilglicerol. Este diacilglicerol a su vez activa la esfingomielinasa ácida, de modo que por la reacción catalizada por esta enzima se forma la ceramida. Esta señalización en cascada sin embargo sólo podía ser inducida por ciertas bacterias o cepas. Particularmente la inducibilidad de esta señalización en cascada dependía de las proteínas OPA en la bacteria. Aquí se trata por lo tanto de un mecanismo completamente distinto y muy especial en comparación con el mecanismo de invasión o de infección general descubierto en relación con la invención por medio de las plataformas de membrana arriba citadas.

40 [0013] Por el impedimento según la invención de la conformación de las plataformas de membrana y/o la destrucción de plataformas de membrana ya formadas se impide una penetración de los agentes patógenos en la célula huésped. Esto se logra dentro del marco de invención preferiblemente por la utilización de inhibidores según las reivindicaciones de la esfingomielinasa ácida y/o de inhibidores según las reivindicaciones de los productos de la reacción catalizada por esta enzima. Respecto a los métodos convencionales de tratamiento de las enfermedades infecciosas tiene esto la ventaja de que la meta para la sustancia activa se encuentra en la célula huésped, es decir la célula eucariota a infectar. Por la presente se da a conocer un inhibidor de la infección general que puede ser utilizado para una variedad de agentes patógenos muy diferentes (por ejemplo, bacterias, virus, parásitos, protozoos y hongos). Esto es una ventaja decisiva, por ejemplo, referente al uso de antibióticos, que deben ser dirigidos cada uno específicamente contra el agente patógeno a combatir. Por el uso divulgado es posible proceder contra las infecciones virales, lo cual generalmente no ha sido posible de esta manera. Además, por el uso divulgado se huye del problema de las resistencias desarrolladas de los agentes patógenos, ya que la sustancia activa no está dirigida contra el agente patógeno mismo, sino contra las reacciones provocadas por este agente patógeno en la célula huésped.

50 [0014] La invención abarca además de los inhibidores, que influyen directamente sobre la actividad de la esfingomielinasa ácida, también las sustancias activas, que influyen en las fases previas de la enzima y/o los mecanismos de activación de la enzima en el ámbito de las pretensiones. Además las sustancias activas pueden actuar también sobre la formación, la estabilización, la movilización y/o la translocación de las vesículas intracelulares, en las cuales la enzima se halla en la célula.

60 [0015] Además, la invención comprende la utilización de inhibidores según las reivindicaciones, que influyen en el efecto biológico de los productos, que surgen por la reacción enzimática de la esfingomielinasa ácida. En estos productos se trata particularmente de la ceramida que forma un componente esencial de las plataformas de membrana. La invención abarca consecuentemente inhibidores según las reivindicaciones, que modifican y particularmente desactivan, neutralizan o destruyen la ceramida. Por ejemplo pueden utilizarse según la invención sustancias que aumentan la tasa de degradación

de la ceramida y se ajustan a las reivindicaciones. Aquí particularmente es preferida la enzima glucosil-ceramida transferasa, la cual por ejemplo puede ser reforzada por métodos biológico-moleculares, en su expresión y con ello puede ser reforzada en su actividad y/o que puede ser activada por otros reguladores. Además, los inhibidores pueden impedir según las reivindicaciones el almacenaje en conjunto de las ceramidas, de modo que se perjudica la formación de una plataforma. Adicionalmente, la invención comprende la utilización de inhibidores según las reivindicaciones, que influyen en la funcionalidad de las plataformas de membrana ricas en ceramidas ya formadas y/o que impiden a priori la formación de las plataformas de membrana.

[0016] Ventajosamente, las sustancias activas farmacológicas se utilizan como inhibidores, de los cuales es sabido que inhiben la enzima esfingomielinasa ácida. Según la invención son usados en este caso los antidepresivos tricíclicos y/o tetracíclicos amitriptilina y imipramina. Los antidepresivos tricíclicos por ejemplo pueden provocar una degradación proteolítica de la enzima, de modo que la enzima ya no puede ser activa y se impide una formación de ceramidas. Por esta disminución de la liberación de ceramida se impide la formación de la plataforma dentro de la membrana celular, de modo que no da lugar a una infección de la célula.

[0017] Aquí se trata de sustancias activas farmacológicas conocidas (genéricas), que esencialmente no desarrollan efectos secundarios. Para la utilización según la invención pueden ser utilizadas estas sustancias activas en forma de administraciones habituales, en particular la administración oral, intravenosa, intramuscular, tópica o también por inhalación. Además son adecuadas las dosificaciones habituales para la utilización según la invención. Sin embargo el efecto según la invención puede ser logrado también con dosificaciones reducidas.

[0018] Además de los inhibidores citados puede ser usada también la desipramina.

[0019] En la profilaxis y/o la terapia de enfermedades, cuyo historial es influenciado por infecciones, es decir la fibrosis quística, eventualmente puede ser ventajoso combinar varias de las sustancias activas según la invención.

[0020] Una ventaja particular de la invención es que los puntos de ataque de las sustancias activas (inhibidores), es decir particularmente la esfingomielinasa ácida o la ceramida, se encuentran en la superficie celular. Estas metas por lo tanto pueden ser logradas bien para las sustancias activas, sin que fuese necesario. La invención comprende además una composición farmacéutica para la utilización en la profilaxis y/o en la terapia de la fibrosis quística que contiene al menos una sustancia activa conforme a la utilización según la invención, los antidepresivos tricíclicos y/o tetracíclicos, la amitriptilina y/o la imipramina.

[0021] Además, la invención comprende una composición farmacéutica para la aplicación en la profilaxis y/o la terapia de la fibrosis quística al menos contiene una cantidad eficaz de desipramina. Como formas de administración son adecuadas por ejemplo las pastillas, supositorios, soluciones para inyecciones o soluciones de infusión.

[0022] Finalmente, la invención comprende el tratamiento de enfermedades, cuyo historial es influenciado por infecciones, es decir la fibrosis quística, con lo cual los inhibidores son administrados según las reivindicaciones, los cuales influyen, preferiblemente inhiben, la enzima esfingomielinasa ácida y/o productos de la reacción catalizada por esta enzima, en particular la ceramida. Este tratamiento se realiza de manera profiláctica y/o durante o después de una infección ocurrida. Un tratamiento preventivo puede ser realizado en caso de riesgo de infección general o preferiblemente en caso de un riesgo de infección aguda. Relativo a otras características de este tratamiento según la invención se hace referencia a la descripción arriba citada.

[0023] Las características citadas y otras características de la invención resultan de la sucesiva descripción de ejemplos en relación con las reivindicaciones secundarias y las figuras. Al mismo tiempo, las características individuales pueden ser realizadas en cada caso por sí solas o varias en combinación entre sí. Los ejemplos y las figuras rigen como referencias. En las ilustraciones se muestran:

- Fig. 1: La esfingomielinasa ácida (ASM) se activa por la infección con rinovirus.  
 Fig. 2: Los rinovirus inducen la liberación de la ceramida.  
 Fig. 3: La amitriptilina y la imipramina inhiben la infección de células humanas con rinovirus en función de la dosis.  
 Fig. 4: El efecto citotóxico del rinovirus se inhibe por la amitriptilina o la imipramina.  
 Fig. 5: VIH gp120 induce la liberación de la ceramida en linfocitos T humanos.  
 Fig. 6: La estimulación celular con gp120 induce plataformas de membrana ricas en ceramidas.

#### Ejemplos

##### 1. Infección con rinovirus

[0024] Los resultados de los ensayos con rinovirus manifiestan que la infección de células epiteliales humanas con diferentes rinovirus (cepa HRV 14 y 16) da lugar a una activación de la esfingomielinasa ácida (Fig. 1) y a una liberación de la ceramida (Fig. 2).

5

a) Una infección de células epiteliales humanas (células epiteliales HeLa o humanas ex vivo) activa dentro de un tiempo de 10 a 15 minutos la esfingomielinasa ácida (ASM) al triple hasta el cuádruplo. Esto se mostró en el ejemplo de células HeLa. Los resultados están resumidos en la figura 1. Las células fueron infectadas con el rinovirus (cepa 14, MOI de 25) y se midió la actividad de la esfingomielinasa en lisatos celulares. Para ello fueron lavadas las células después de la infección, recogidas en 250 mM de acetato de sodio (pH 5,0), 1,3 mM de ácido etilendiaminotetraacético AEDT y 0,05 % de NP40, quebradas por tratamiento con ultrasonido con un sonicador de barra con energía baja y fueron incubadas con [<sup>14</sup>C] de esfingomielina (0,5 μCi/prueba, 54,5 mCi/mmol; NEN) durante 30 min. El ensayo enzimático in vitro fue interrumpido por adición de 800 μl de una mezcla de 2:1 de CHCl<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>OH (v/v) así como 200 μl de H<sub>2</sub>O y se midió por scintigrafía la liberación de [<sup>14</sup>C] fosforilcolina en el sobranante acuoso por extracción orgánica. Se mostraron los valores medios ± desviación estándar de tres experimentos. Una preincubación de las células con un inhibidor de la esfingomielinasa ácida, i.e. amitriptilina, bloquea la actividad de la esfingomielinasa ácida.

10

15

20

b) La estimulación de la esfingomielinasa ácida correlacionada con una liberación de ceramida de las células infectadas. Esto se representa en la figura 2. Una infección de células epiteliales humanas (HeLa) da lugar a una liberación de ceramida dentro de pocos minutos tras la infección. Para ello, las células HeLa a su vez fueron infectadas con rinovirus (cepa 14). La medición de ceramida se realizó mediante un ensayo de diacilglicerol (DAG)-quinasa (Grassmé et al., Cell 91, 605-615, 1997). La ceramida fue reconstruida por adición de DAG-quinasa y [<sup>32</sup>P]γATP para obtener ceramida [<sup>32</sup>P]. La ceramida fosforilada se deshizo por cromatografía de capa delgada y se determinó de manera scintigráfica. Se representan los valores medios ± la desviación típica de tres experimentos. Una preincubación de las células con amitriptilina suprime la liberación de la ceramida.

25

30

c) La infección de células epiteliales humanas con rinovirus induce la formación de plataformas de membrana ricas en ceramidas. Tanto la esfingomielinasa ácida como también la ceramida pueden encontrarse sobre la superficie en plataformas de membrana, a las cuales se ligan también los rinovirus, tras una infección. Como verificación experimental para ello, las células epiteliales nasales humanas fueron infectadas con la cepa de rinovirus 14 durante 20 minutos, fijadas y teñidas con anticuerpos anticeramida monoclonales (Alexis) marcados con Cy3. En el microscopio confocal se manifestó poco tiempo después de la infección la formación de una plataforma de membrana rica en ceramidas. Las células no infectadas no presentaban ceramida alguna sobre la superficie celular.

35

40

d) Una inhibición farmacológica de la esfingomielinasa ácida bloquea la infección de células epiteliales humanas por los rinovirus en función de la dosis hasta una inhibición casi completa de la infección. Como fármacos se utilizaron los medicamentos (antidepresivos) imipramina y amitriptilina que bloquean hasta el 98 % de la actividad de la esfingomielinasa ácida dentro de 20 minutos en experimentos de control. La infección de células epiteliales humanas por los rinovirus fue medida en análisis citométricos de flujo del efecto citopático de los virus. Ya que los rinovirus inducen en estas células la muerte celular, la muerte celular puede ser usada como medida para una infección de las células. La curva del efecto de la dosis de la inhibición de la infección de células epiteliales humanas por imipramina y amitriptilina está representada en la figura 3. Para ello, las células epiteliales humanas HeLa fueron infectadas durante 24 h con la cepa del rinovirus 14 y se midió el efecto citotóxico de los virus por citometría de flujo después de la coloración con anexina FITC. La amitriptilina o imipramina que inhiben la esfingomielinasa ácida, fueron añadidas a las células durante 30 minutos antes de la infección de los rinovirus en un fluido exento de suero. Los datos demuestran que los fármacos inhiben la infección viral casi completamente. La amitriptilina y la imipramina mismas no tenían efecto citotóxico alguno sobre las células. Se muestran los valores medios ± la desviación típica de tres experimentos.

50

55

e) El efecto citotóxico de los rinovirus es inhibido por la amitriptilina o la imipramina. La Fig. 4 muestra el análisis representativo por citometría de flujo de la inhibición de la infección de células HeLa por los rinovirus tras el tratamiento con amitriptilina. Para ello, las células epiteliales HeLa humanas fueron infectadas con diferentes cepas de rinovirus (RV14, RV16) durante 24 h. La infección se mide con ayuda del efecto citotóxico de los virus y se determinaron por coloración de las células con anexina FITC en un citómetro de flujo. Un desplazamiento a la derecha de la curva significa un aumento del enlace de anexina FITC y es por ello una medida para la muerte celular. La amitriptilina o la imipramina como inhibidores de la esfingomielinasa ácida fueron añadidas a las células en un fluido exento de suero durante 30 minutos antes de la infección con los rinovirus. Los datos demuestran que los fármacos inhiben la infección viral casi completamente. Se muestra el efecto de la amitriptilina, se realzaron los datos analógicos para la imipramina. La representación a la izquierda en la figura 4 muestra el efecto sin adición de

60

sustancias activa,s la representación a la derecha muestra el efecto con la adición de sustancias activas.

- f) Mediante un tratamiento de células HeLa con anticuerpos anticeramidas, una infección de las células con rinovirus es inhibida casi completamente. Para realizar los ensayos correspondientes se añadieron anticuerpos anticeramidas (Fa. Alexis) en una concentración de 5 ng/ml con los virus (cepas de rinovirus 2, 14 y 16) a las células. La infección de las células con los rinovirus fue inhibida aproximadamente en 95%.

## 2. Infección con VIH

[0025] VIH infecta las células humanas esencialmente por el enlace de la molécula gp120 del virus con el receptor CD4. Sin el enlace de gp120 con CD4 solamente da lugar a una infección ineficiente de células con VIH . La molécula gp120 forma con la molécula gp41 un complejo oligomérico, en el cual gp120 está presente como un trímero. El enlace de gp120 con la molécula CD4 sobre linfocitos T modifica la conformación de gp120, particularmente da lugar a una variación de la conformación del bucle variable, por lo cual es descubierto el punto de enlace del llamado coreceptor. Por medio de este punto de enlace, gp120 se une a un coreceptor, en la mayoría de los casos los receptores de citoquina CCR5 o CXCR4. de 14 coreceptores diferentes, de una importancia grande in vivo sin embargo parecen ser solamente CCR5 o CXCR4. Por el enlace de VIH con CD4 y otros coreceptores se inicia la acogida del virus en la célula (Clapham P.R., McKnight A. (2001). Receptores de HIV-1 y el tropismo celular. British Medical Bulletin (Boletín Médico Británico) 58: 43-59).

[0026] La molécula CD4 se encuentra ya de manera constitutiva, es decir, también en células no infectadas, en balsas. Después de la infección con VIH da lugar a una redistribución de CD4 y a una concentración de CD4 en un área relativamente pequeña de la membrana celular (Popik W., Alce T.M., Au W.C. (2002). El virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 usa una balsa lipídica colocalizada CD4 y receptores quimioquinas para la entrada productiva en las células CD4+T. J. of Virology 76: 4709-4722). Este fenómeno de un enriquecimiento local, muy alto, de una molécula se denomina agrupamiento o agregación. CD4 es colocalizado después de la infección en estos grupos con GM1, un marcador típico para balsas, y también CCR5 y CXCR4, que se reclutan tras el estímulo en las plataformas de membrana formadas nuevas. Si se destruyen balsas por preincubación de las células con reactivos, que extraen el colesterol, se impidió en estos estudios tanto la agregación de CD4 después de la infección como también la infección de las células T mismas. El enlace del virus con CD4 por lo contrario no estaba modificado. Esto demuestra ya que las balsas de membrana hacen un papel sobresaliente en la infección de células humanas con VIH. Los mecanismos, que parecen mediar la fusión de muchas pequeñas balsas en grandes plataformas de membrana, que sirven de la agregación de CD4 así como del reclutamiento de coreceptores, y que parecen mediar finalmente la infección, eran sin embargo desconocidos hasta ahora.

[0027] Los siguientes resultados muestran por medio de un estímulo de linfocitos T humanos con gp120 recombinante, que VIH usa plataformas de membrana ricas en ceramidas, para infectar células humanas.

- a) Dentro de pocos minutos, gp 120 induce la liberación de la ceramida en linfocitos T humanos. La Fig. 5 muestra el tratamiento de linfocitos humanos CD4-positivos con 10 µg/ml de gp120 recombinante. Dentro de un tiempo de 1 minuto se libera la ceramida. La ceramida fue determinada con un ensayo de DAG-quinasa.
- b) La liberación de la ceramida de linfocitos T humanos tras el estímulo con gp120 correlaciona con la formación de plataformas de membrana ricas en ceramidas en la membrana celular de células estimuladas, en los cuales la molécula CD4 se colocaliza y forma una agrupación. La Fig. 6 muestra que el estímulo celular con gp 120 induce plataformas de membrana ricas en ceramidas. El estímulo de células T humanas CD4-positivas con gp120 (10 µg/ml) dentro de un tiempo de 2 minutos da lugar a la formación de plataformas de membrana ricas en ceramidas. La formación de dominios de membranas ricas en ceramidas se determinó tras el marcado de las células con un anticuerpo anti-ceramida marcado con Cy3 mediante una microscopia fluorescente. En estas plataformas de membrana ricas en ceramidas se agrega CD4 que se representó con un anticuerpo marcado con FITC. Los análisis cuantitativos de la formación de plataformas de membrana ricas en ceramidas demuestran que 50 ± 7% de todos los linfocitos T CD4-positivos presentan una plataforma de membrana rica en ceramidas 5 minutos después del estímulo con gp120.

## 3. Infección con Pseudomonas aeruginosa

[0028] La importancia de plataformas de membrana ricas en ceramidas para infecciones con bacterias patógenas y virus se manifestó en el ejemplo de la infección de células mamalias con Pseudomonas aeruginosa. La activación de la esfingomielinasa ácida y la liberación de la ceramida fueron observadas tanto in vitro tras la infección de células epiteliales Chang, WI-38 fibroblastos, de fibroblastos de pulmón ex-vivo, de células epiteliales traqueales cultivadas ex-vivo como también in vivo en células epiteliales de la traquea tras la infección con P. aeruginosa. La liberación de la ceramida tras la infección se efectúa en balsas que se reorganizan por la ceramida liberada en plataformas de membrana grandes. La ceramida liberada y la esfingomielinasa ácida están localizadas en las plataformas de membrana nuevas formadas tras la

infección con *P. aeruginosa*.

5 [0029] La importancia de la esfingomielinasa ácida para la formación de plataformas de membrana tras la infección con *P. aeruginosa* se manifiesta en la ausencia completa de plataformas de membrana ricas en ceramidas tras la infección de células deficientes en esfingomielinasa ácida. El papel que hacen las plataformas de membrana ricas en ceramidas para la infección con *P. aeruginosa* fue examinado en células deficientes en esfingomielinasa ácida o por destrucción de balsas con fármacos que interfieren con el metabolismo de colesterol. En estos fármacos se trata de  $\beta$ -ciclodextrina, nistatina y filipina. La extracción de colesterol de las balsas de membrana conduce a un colapso de las balsas. In vivo las balsas fueron destruidas en el pulmón por lavado pulmonar con  $\beta$ -ciclodextrina, nistatina y filipina o se usaron ratones normales y deficientes en esfingomielinasa ácida. Los resultados muestran que las plataformas de membrana ricas en ceramidas regulan la internalización de las bacterias en células epiteliales, la muerte de células infectadas y la liberación de citoquinas proinflamatorias.

10  
15 [0030] La importancia in vivo de estos diagnósticos se mostró en ensayos de infección con ratones normales y deficientes en esfingomielinasa ácida. Mientras que los ratones normales curan una infección pulmonar con *P. aeruginosa* dentro de pocos días, los ratones deficientes en esfingomielinasa ácida eran muy sensibles con respecto a una infección pulmonar con *P. aeruginosa* y fallecían a los pocos días de una sepsis tras el comienzo de la infección.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

**REIVINDICACIONES**

1. Utilización de inhibidores de la esfingomielinasa ácida y/o de inhibidores de productos de la reacción catalizada por esta enzima, particularmente de ceramida, para la preparación de una composición farmacéutica para la profilaxis y/o la terapia de fibrosis quística, caracterizada por el hecho de que los inhibidores son antidepresivos, siendo los antidepresivos amitriptilina, imipramina y/o desipramina.
2. Amitriptilina, imipramina y/o desipramina para la utilización en la profilaxis y/o la terapia de fibrosis quística.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60



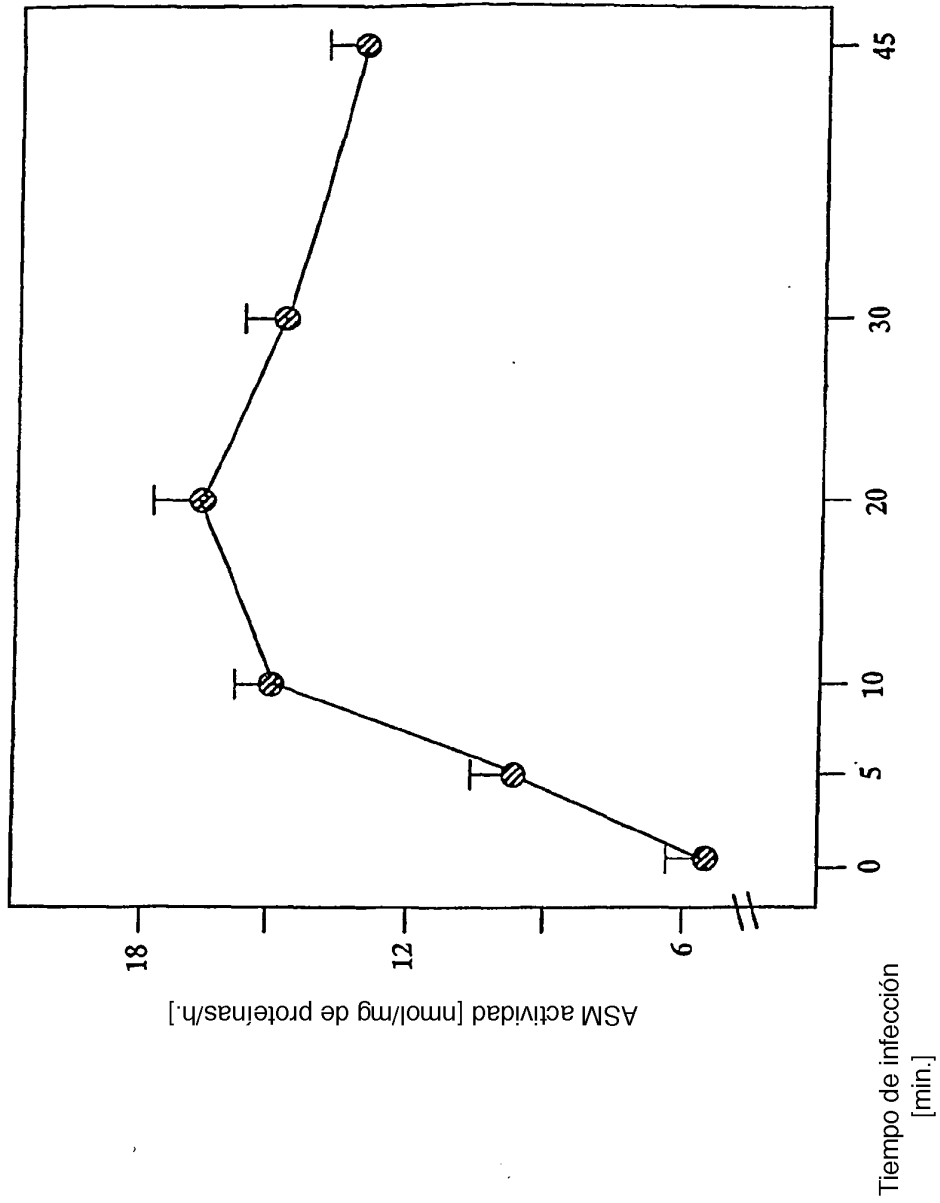


Fig. 1

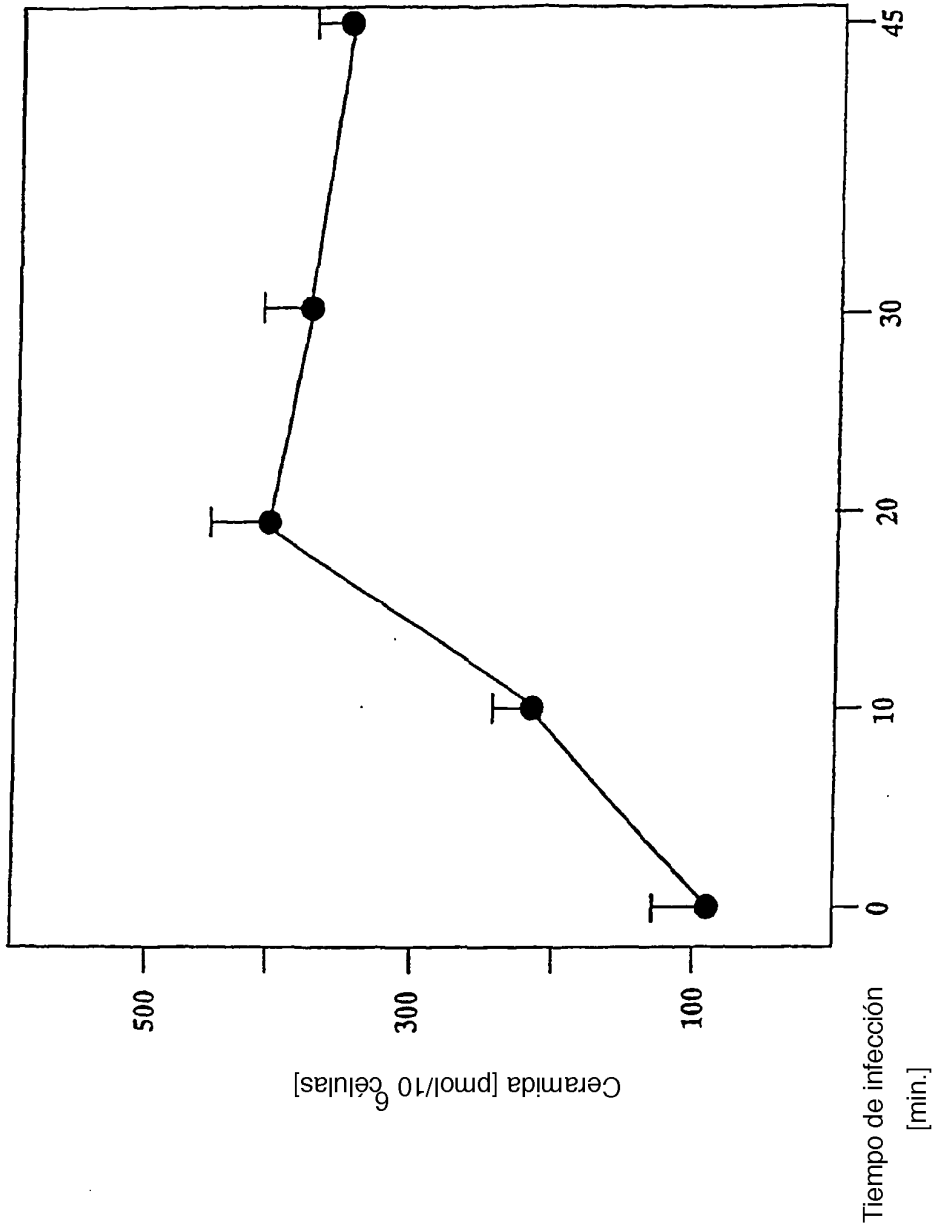


Fig. 2

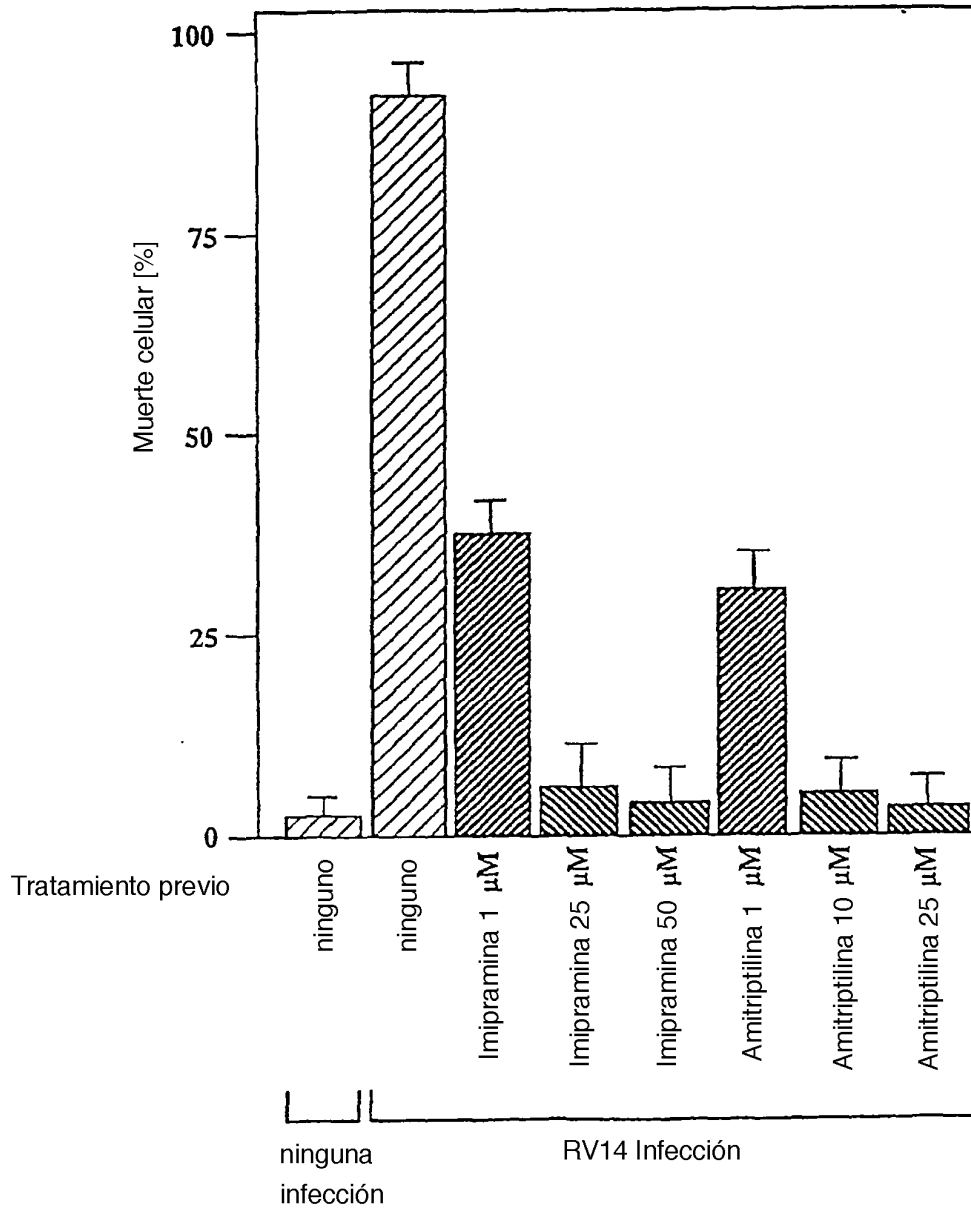


Fig. 3

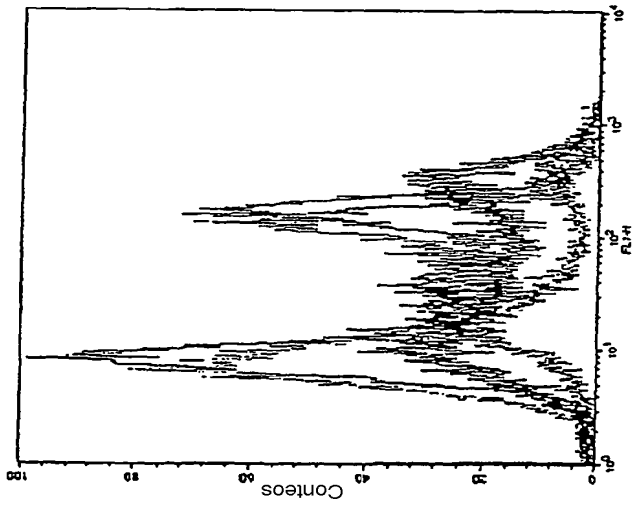
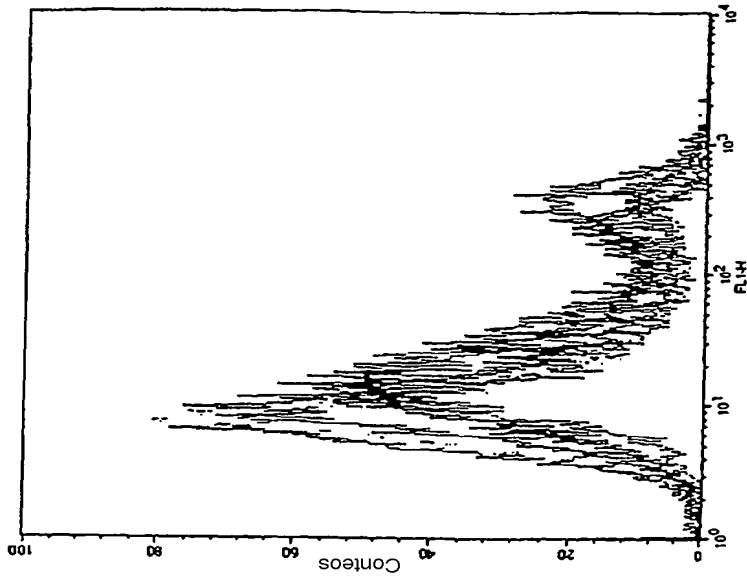


Fig. 4

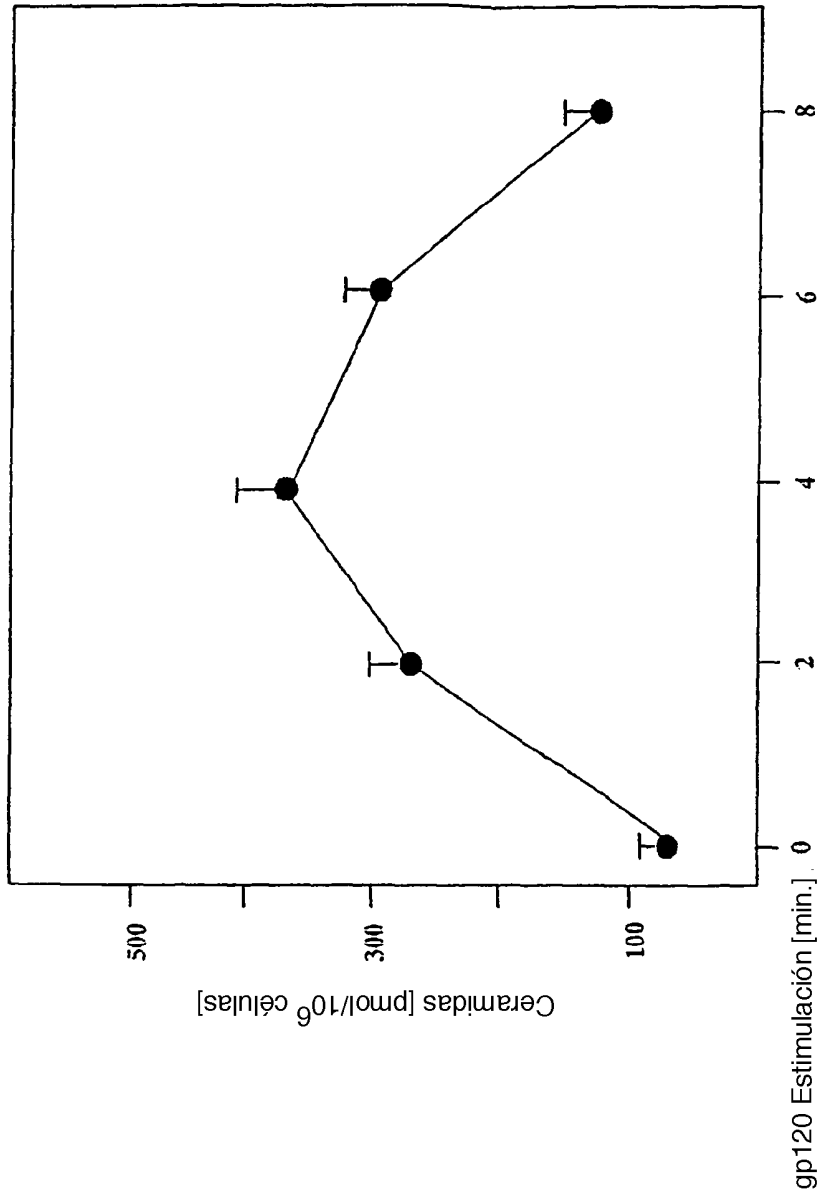


Fig. 5

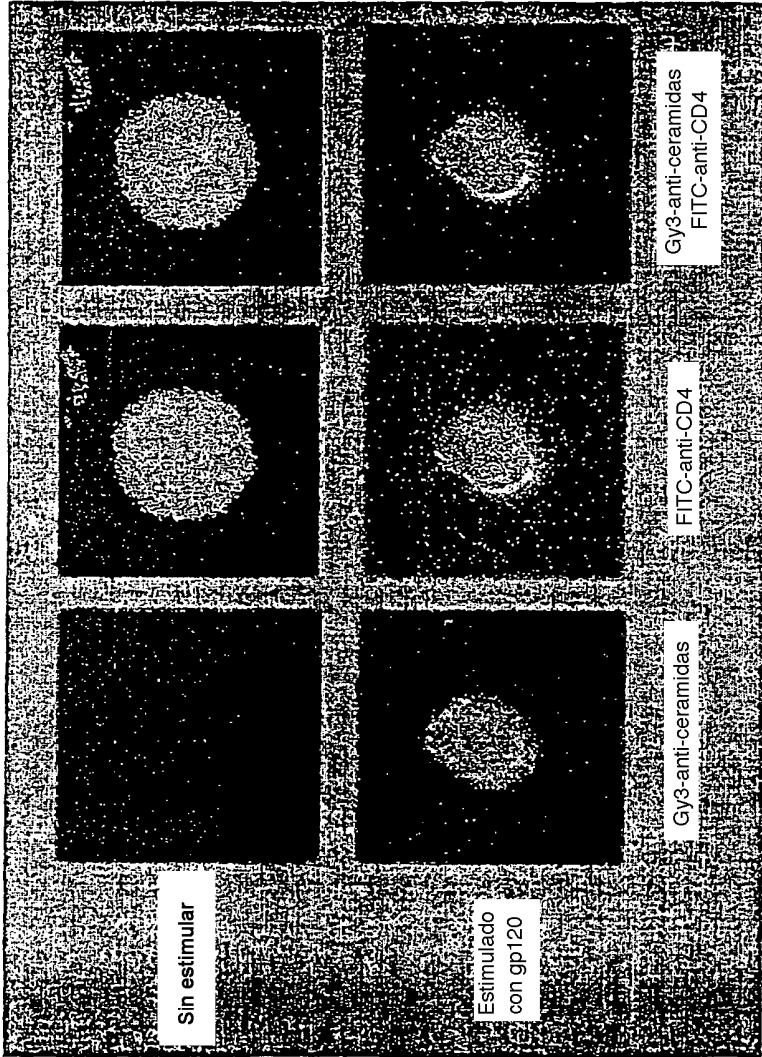


Fig. 6