

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 750**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/167** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2005 E 05714565 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 1722771**

54 Título: **Composiciones y métodos para prevenir o tratar una respuesta inflamatoria**

30 Prioridad:

**02.03.2004 US 548908 P**

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

**12.05.2014**

73 Titular/es:

**MCGILL UNIVERSITY (100.0%)  
845 SHERBROOKE STREET WEST  
MONTREAL, QC H3A 2T5, CA**

72 Inventor/es:

**KUBOW, STAN;  
VILELA, R.M. y  
LANDS, LARRY**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 459 750 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

Composiciones y métodos para prevenir o tratar una respuesta inflamatoria

**Antecedentes de la invención**

5 La fibrosis quística es la enfermedad hereditaria mortal más común entre los caucásicos y se caracteriza por una anomalía bioquímica en el canal CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística). La manifestación clínica más común en la fibrosis quística es la infección pulmonar crónica que da lugar a una destrucción progresiva del tejido y a morbilidad pulmonar y mortalidad elevadas. El daño en el tejido pulmonar en la fibrosis quística se ha relacionado con una respuesta inmunitaria anormalmente exacerbada en las células de fibrosis quística. Esta exacerbación se ha relacionado con una activación exagerada del factor transcripcional proinflamatorio NF- $\kappa$ B.

10 Una molécula que se sabe que inhibe la activación del NF- $\kappa$ B es la ceramida (N-acilesfingosina; Signorelli, *et al.* (2001) *FASEB J.* 15:2401-2414), un esfingolípido reconocido como segundo mensajero en la modulación molecular de la apoptosis. El ciclo de la esfingomielina, con la conversión de la esfingomielina en ceramida por la esfingomielinasa (SMasa), es una ruta de señalización clave en muchos sistemas celulares (Hannun, *et al.* (1996) *Science* 274 (5294):1855-9). Se han definido dos rutas principales para la generación de ceramida que incluyen la hidrólisis de esfingomielina, una especie de esfingolípido abundante en las membranas celulares, por la acción de las SMasas; y por la biosíntesis *de novo* catalizada por la ceramida sintasa (Levade and Jaffrezou (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1438:1-17). Sin embargo, la ruta hidrolítica es la fuente principal de ceramida en las respuestas celulares a la señalización extracelular, es decir, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), lipopolisacáridos, gamma-interferón e interleucinas (Chan and Goldkorn (2000) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22:460-468).

15 El tratamiento de células en cultivo con TNF- $\alpha$  ha surgido como uno de los modelos mejor caracterizados de la inducción de citocinas y de la función de la ceramida. El TNF- $\alpha$  induce la activación de la SMasa en estas células y esta activación es una consecuencia del descenso de glutatión que sigue a la activación del receptor de muerte y caspasa 8 (Liu, *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273:11313-11320; Luberto, *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:14760-14766). A la inversa, la complementación extracelular de glutatión o N-acetilcisteína, un conocido precursor de glutatión, inhibe la generación de ceramida inducida mediante el estrés oxidativo provocado por agentes tales como TNF- $\alpha$ , interleucina-1- $\beta$ , hipoxia y daunorubicina (Beaver and Waring (1995) *Eur. J. Cell Biol.* 68:47-54; Liu, *et al.* (1998) *supra*; Singh, *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273:20354-20362; Lavrentiadou, *et al.* (2001) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25:676-684). El glutatión inhibe la activación de la SMasa neutra, dependiente de magnesio, e inhibe la generación de ceramida inducida por el TNF- $\alpha$  en células de carcinoma mamario humanas (Liu, *et al.* (1998) citado anteriormente). Además, se ha demostrado que para la producción de ceramida se requirieron bajos niveles de glutatión en células pulmonares, mientras que altos niveles de glutatión inhiben la generación de ceramida (Lavrentiadou, *et al.* (2001) citado anteriormente).

20 Se ha demostrado que la fenretinida, es decir, N-(4-hidroxifenil)retinamida (4-HPR), un derivado sintético del ácido retinoico, incrementa la ceramida endotelial por la síntesis *de novo*, no mediada por esfingomielinasas, (Erdreich-Epstein, *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:49531-49537) dando como resultado la apoptosis endotelial, dependiente de caspasa, de células endoteliales microvasculares del cerebro humano. En consecuencia, para el uso en la prevención del cáncer se sugiere la fenretinida.

25 La patente de Estados Unidos Nº. 6.368.831 divulga un procedimiento de tratamiento de un trastorno hiperproliferativo (incluyendo tumores, cánceres y tejido neoplásico, junto con trastornos hiperproliferativos premalignos y no neoplásicos o no malignos) en un sujeto que necesita dicho tratamiento usando un retinoide generador de ceramida, tal como un inhibidor de la degradación de ceramida y fenretinida. Esta patente explica que los trastornos hiperproliferativos premalignos y no neoplásicos o no malignos incluyen, a título enunciativo, trastornos mielodisplásicos; carcinoma de cuello uterino *in situ*; poliposis intestinal familiar tal como síndrome de Gardner; leucoplasias orales; histiocitosis; queloides; hemangiomas; estenosis arterial hiperproliferativa, artritis inflamatoria; hiperqueratosis y erupciones papuloescamosas incluyendo artritis.

30 La patente de Estados Unidos Nº. 6.610.835 explica que los esfingolípidos biológicamente importantes se pueden administrar como profármacos (por ejemplo, ceramida  $\beta$ -glucuronida) lo que incrementa el nivel de compuesto activo que se libera en el sitio activo de interés. El profármaco se escinde *in vivo* mediante una enzima apropiada para liberar un resto esfingolípido parental para el tratamiento deseado. Esta referencia explica que los profármacos divulgados son útiles en el tratamiento de trastornos del tracto intestinal inferior, incluyendo, a título enunciativo, cáncer de colon, pólipos intestinales, tumores intestinales, enfermedades inflamatorias intestinales, incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, enterocolitis necrosante, ileocectis, y otras inflamaciones del intestino inferior.

**Breve descripción de la invención**

35 La presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de fenretinida para su uso para la prevención de inflamación aguda de las vías respiratorias o para su uso para prevenir o reducir una infección de las vías respiratorias en un sujeto con fibrosis quística, y el uso de una cantidad eficaz de fenretinida en la fabricación de un medicamento para la prevención de inflamación aguda de las vías respiratorias o para la

prevención o reducción de una infección de las vías respiratorias en un sujeto con fibrosis quística.

### Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 muestra el efecto del pretratamiento con fenretinida (1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ ) sobre la liberación de IL-8 por células deficientes en CFTR (CFTE29o-) estimuladas con TNF- $\alpha$  recombinante humano. Los resultados son medias  $\pm$  E.E. de 4-7 experimentos independientes. \*Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) en comparación con el control de TNF- $\alpha$ .

La figura 2 muestra el efecto del pretratamiento con fenretinida (1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ ) sobre la liberación de IL-8 por células normales (9HTEo-) estimuladas con TNF- $\alpha$  recombinante humano. Los resultados son medias  $\pm$  E.E. de 4-6 experimentos independientes. \*Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) en comparación con el control de TNF- $\alpha$ .

10 La figura 3 muestra el efecto de la fenretinida (1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ ) sobre la liberación de IL-8 por células deficientes en CFTR (CFTE29o-) en condiciones no inflamatorias. Los controles incluyeron medio esencial mínimo (MEM) y controles con vehículo que contenían etanol (EtOH) en concentraciones equivalentes a las usadas con tratamientos con fenretinida. Los resultados son medias  $\pm$  E.E. de 3-7 experimentos independientes. \*Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) en comparación con el control de MEM.

15 La figura 4 muestra el efecto de la fenretinida (1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ ) sobre la liberación de IL-8 por células normales (9HTEo-) en condiciones no inflamatorias. Los controles incluyeron MEM y controles con vehículo que contenían EtOH en concentraciones equivalentes a las usadas con tratamientos con fenretinida. Los resultados son medias  $\pm$  E.E. de 4-6 experimentos independientes. \*Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) en comparación con el control de MEM.

20 La figura 5 muestra el efecto de la fenretinida sobre la cantidad de *Pseudomonas aeruginosa* hallada en los pulmones de ratones genéticamente intactos y deficientes en CFTR 3 días después de la infección.

La figura 6 muestra el número de células inflamatorias reclutadas en los pulmones de ratones genéticamente intactos y deficientes en CFTR pretratados con fenretinida y expuestos a *P. aeruginosa*.

25 La figura 7 muestra el efecto de la fenretinida sobre la proliferación de células epiteliales humanas deficientes en CFTR (CFTE29o-). Se incubaron células CFTE29o- (0,6 x 10<sup>6</sup>/pocillo en una placa de 24 pocillos) con 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  o 5  $\mu\text{M}$  de fenretinida durante 24 horas en un MEM que contenía FBS al 10%. Los pocillos de control con vehículo contenían etanol (EtOH) a concentraciones equivalentes a las usadas con tratamientos con fenretinida. Después de 24 horas, el medio se reemplazó por MEM con FBS al 2%, se incubaron las células durante otras 24 horas y se determinaron los recuentos de células viables. \*Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) en comparación con los controles de MEM y vehículo.

30 La figura 8 muestra el efecto de la fenretinida sobre la proliferación de células epiteliales humanas deficientes en CFTR estimuladas con TNF- $\alpha$  recombinante humano. Se incubaron células CFTE29o- con 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  o 5  $\mu\text{M}$  de fenretinida durante 24 horas en un MEM que contenía FBS al 10%. Después de 24 horas, el medio se reemplazó por MEM con FBS al 2% que contenía las mismas concentraciones de fenretinida y se estimuló con TNF- $\alpha$  durante otras 24 horas. Se determinaron los recuentos de células viables. Las medias que no comparten un superíndice común son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ),

35 La figura 9 muestra el efecto de la fenretinida sobre la proliferación de células epiteliales humanas normales (9HTEo-). Se incubaron células 9HTEo- (0,4 x 10<sup>6</sup>/pocillo en una placa de 24 pocillos) con 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  o 5  $\mu\text{M}$  de fenretinida durante 24 horas en un MEM que contenía FBS al 10%. Los pocillos de control con vehículo contenían etanol (EtOH) a concentraciones equivalentes a las usadas con tratamientos con fenretinida. Después de 24 horas, el medio se reemplazó por MEM con FBS al 2%, se incubaron las células durante otras 24 horas y se determinaron los recuentos de células viables. \*Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) en comparación con MEM. #Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) en comparación con controles con vehículo.

40 La figura 10 muestra el efecto de la fenretinida sobre la proliferación de células epiteliales humanas normales estimuladas con TNF- $\alpha$  recombinante humano. Se incubaron células 9HTEo- con 1,25  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  o 5  $\mu\text{M}$  de fenretinida durante 24 horas en un MEM que contenía FBS al 10%. Después de 24 horas, el medio se reemplazó por MEM con FBS al 2% que contenía las mismas concentraciones de fenretinida y se estimuló con TNF- $\alpha$  durante otras 24 horas. Se determinaron los recuentos de células viables. \*Significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) en comparación con el control de TNF- $\alpha$ .

### 50 Descripción detallada de la invención

55 Se ha sugerido que las concentraciones de glutatión son relativamente altas en células epiteliales de pulmón con fibrosis quística (Linsdell y Hanrahan (1998) *Am. J. Physiol.* 275:C323-326; Jungas, *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:27912-8) y que las células deficientes en CFTR son menos sensibles al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las células normales (Jungas, *et al.* (2002) citado anteriormente), en parte debido a los niveles de glutatión constitutivos intrínsecamente altos en las células deficientes en CFTR. Para confirmar la presencia de niveles altos

de glutatión en células deficientes en CFTR, se determinaron las concentraciones intracelulares de glutatión total en líneas celulares del epitelio traqueal humano 9HTEo- y del epitelio traqueal CFTR  $\Delta$ F508 (CFTE29o-). Los resultados de este análisis indicaron que tanto la forma reducida de glutatión (es decir, GSH) como la forma oxidada de glutatión (es decir, GSSG) fueron 6,5 y 14 veces menores, respectivamente, en las células epiteliales sin fibrosis quística (tabla 1), lo que indica que las células sin fibrosis quística pierden GSH y GSSG intracelular debido al transporte dependiente de CFTR.

Tabla 1

Línea celular	GSSG ( $\mu$ M/mg proteína)	GSH ( $\mu$ M/mg proteína)
9HTEo-	*0,36 $\pm$ 0,09	*2,5 $\pm$ 0,58
CFTE29o-	5,24 $\pm$ 0,44	16,23 $\pm$ 1,62

Los datos representan las concentraciones medias  $\pm$  E.E.M. de tres experimentos distintos realizados en días diferentes.

\*Significativamente diferente,  $p < 0,05$ .

En consecuencia, teniendo en cuenta que en células deficientes en CFTR están presentes concentraciones altas de glutatión, los niveles altos de glutatión tienen un efecto negativo sobre la producción de ceramida (Liu, *et al.* (1998) citado anteriormente), y que la ceramida puede inhibir la activación de NF- $\kappa$ B que estimula la liberación de citocinas proinflamatorias tales como IL-8 (Signorelli, *et al.* (2001) citado anteriormente), se determinó si la complementación de células de fibrosis quística con un agente que potencia la producción de ceramida podía incrementar las concentraciones de ceramida celular para reducir la liberación de IL-8, dependiente de NF- $\kappa$ B, en respuesta a un estímulo proinflamatorio. Se trataron células del epitelio traqueal humano normales (9HTEo-) y deficientes en CFTR ( $\Sigma$ CFTE29o-  $\Delta$ F508 CFTR) con fenretinida (1,25, 2,5 o 5  $\mu$ M) para inducir la producción de ceramida. La exposición de las células a 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  dio como resultado un incremento de 100 veces en los niveles secretados de IL-8 en células de fibrosis quística, mientras que las células sin fibrosis quística presentaron un incremento mayor de 700 veces en concentraciones de IL-8 con relación a los controles no estimulados (comparación de niveles de IL-8 en las figuras 1-2 con niveles de IL-8 en las figuras 3-4, respectivamente). La fenretinida redujo la IL-8 de forma dependiente de la dosis en células deficientes en CFTR (figura 1) hasta un 70% del valor estimulado con TNF- $\alpha$ , con un nivel umbral para la significación a 2,5  $\mu$ M. Los niveles de IL-8 disminuyeron hasta un 86% del control en las células expuestas a la dosis de fenretinida 1,25  $\mu$ M, pero no fueron significativamente diferentes del valor de control del 100% que contenía sólo TNF- $\alpha$ . En cambio, la fenretinida potenció las concentraciones de IL-8 en células epiteliales de pulmón normales en el estado proinflamatorio (figura 2), hasta un nivel máximo del 139 % del secretado por células estimuladas con TNF- $\alpha$ , con un nivel umbral igualmente bajo de 2,5  $\mu$ M. Estos resultados demuestran que en células epiteliales de pulmón deficientes en CFTR, la fenretinida puede reducir la hipersensibilidad inmunitaria inflamatoria generada por la activación exagerada de NF- $\kappa$ B proinflamatorio.

Los cultivos control de fibrosis quística y sin fibrosis quística no estimulados produjeron cantidades similares de IL-8 con una tendencia a niveles mayores en asociación con células de fibrosis quística. El tratamiento simulado (etanol) no incrementó la secreción de IL-8 en ningún tipo de cultivo. De forma similar, los estudios clínicos han tendido a no encontrar diferencias en los niveles de citocinas entre sujetos control y con fibrosis quística no infectados (Armstrong, *et al.* (1995) *Br. Med. J.* 310:1571-1572). Además, se ha demostrado que la infección por *P. aeruginosa* se produce de forma intermitente en sujetos con fibrosis quística de tan sólo 3 años de edad; por tanto, se ha sugerido que la detección de niveles elevados de IL-8 en sujetos con fibrosis quística en algunos estudios puede deberse a respuestas a una infección recientemente finalizada (Burns, *et al.* (2001). *J. Infect. Dis.* 183:444-4521).

En ausencia de estimulación con TNF- $\alpha$ , el tratamiento con fenretinida incrementó los niveles de IL-8 casi de 2 a 8 veces en células de fibrosis quística de manera dependiente de la dosis (figura 3). De forma inesperada, las células de fibrosis quística fueron más resistentes al efecto estimulador de fenretinida sobre la liberación basal de IL-8, ya que el tratamiento con fenretinida de células sin fibrosis quística para todas las dosis de tratamiento mostró una mayor potenciación en la liberación de IL-8 (mayor de 14 veces; figura 4) de lo que se observó con células de fibrosis quística.

Posteriormente, se determinó si la fenretinida podría prevenir o disminuir la infección de ratones deficientes en CFTR por *Pseudomonas aeruginosa*. Durante un mes se pretrataron ratones genéticamente intactos y deficientes en CFTR con 5 mg/kg de fenretinida y posteriormente se expusieron a *P. aeruginosa*. La carga bacteriana tanto en los ratones genéticamente intactos como en los deficientes en CFTR tratados con fenretinida se redujo 3 días después de la infección en comparación con los ratones control con tratamiento simulado (figura 5). El tratamiento con fenretinida también provocó una disminución en el reclutamiento de células inflamatorias en los pulmones de ratones genéticamente intactos y deficientes en CFTR 3 días después de la infección en comparación con los ratones control con tratamiento simulado (figura 6). Estos resultados indican que el pretratamiento con fenretinida puede reducir la infección por organismos patógenos, disminuir la respuesta inflamatoria aguda en sujetos deficientes en CFTR, y además proporcionar beneficio a sujetos sanos con riesgo de infección en las vías respiratorias.

Se ha observado un incremento significativo en la regeneración de células del epitelio intestinal de fibrosis quística debido a un incremento en la tasa de proliferación en ratones con ausencia de CFTR y en el cultivo celular (Gallagher y Gottlieb (2001) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281:G681-G687). Además, se ha demostrado que la proliferación celular es mayor en epitelios de vías respiratorias y pólipos nasales en pacientes con fibrosis quística que en tejido de pacientes sin fibrosis quística (Hassid, *et al.* (1997) *J. Clin. Pathol.* 50:923-928; Leigh, *et al.* (1995) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12:605-612) y es atribuible a la expresión diferencial del CFTR (Gallagher y Gottlieb (2001) citado anteriormente). El elevado pH citosólico observado en células que expresan la mutación de CFTR asociada a la fibrosis quística puede potenciar la proliferación de estas células ya que el pH alcalino citosólico es una señal de mitogénesis (Elgavish (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180:342-348). A la inversa, una sobreexpresión de CFTR natural, pero no CFTR mutante, da como resultado la detención del crecimiento (Lesprit, *et al.* (2000) *Histol. Histopathol.* 15:395-402). En consecuencia, se determinó si las células usadas en el presente análisis, presentaron un incremento en las tasas de proliferación. Los resultados de este análisis indicaron que las células epiteliales de las vías respiratorias con fibrosis quística tenían un incremento en la tasa de proliferación con relación a la línea celular natural en condiciones tanto no inflamatorias (tabla 2) como proinflamatorias (tabla 3).

Tabla 2

Línea celular	Número de células ( $10^6$ /ml)
9HTEo-	*1,09 ± 0,83
CFTE29o-	1,64 ± 0,14

Proliferación celular en células del epitelio traqueal humano deficientes en CFTR (CFTE29o-) y normales (9HTEo-) 72 horas después de la siembra. Los datos representan las concentraciones medias ± E.E.M. de 4-7 experimentos distintos realizados en días diferentes. \*Significativamente diferente,  $p < 0,05$ .

Tabla 3

Línea celular	Número de células ( $10^6$ /ml)
9HTEo-	*0,82 ± 0,154
CFTE29o-	1,34 ± 0,74

Proliferación celular en células del epitelio traqueal humano deficientes en CFTR (CFTE29o-) y normales (9HTEo-) 72 horas después de la siembra. Los datos representan las concentraciones medias ± E.E.M. de 4-7 experimentos distintos realizados en días diferentes. \*Significativamente diferente,  $p < 0,05$ .

Se ha sugerido que el incremento en la proliferación de células epiteliales deficientes en CFTR de las vías respiratorias, originado por anomalías de CFTR, infección, lesión o restauración pulmonar, pudo deberse a un epitelio en general menos maduro y diferenciado. En este sentido, se ha demostrado que el CFTR desempeña un papel clave en la diferenciación del epitelio respiratorio durante el desarrollo pulmonar fetal (Burns, *et al.* (2001) *J. Infect. Dis.* 183:444-452; Larson, *et al.* (2000) *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L333-L341) y el desarrollo del epitelio secretor (Larson, *et al.* (2000) citado anteriormente). Estos eventos han estado implicados, a su vez, en la disminución de la biosíntesis y secreción de mucinas. Las enfermedades crónicas de las vías respiratorias, tales como asma, bronquitis crónica y fibrosis quística están asociadas a una hipresecréción mucosa en las vías respiratorias que da lugar a un incremento en la susceptibilidad a infección y a una disminución en la función pulmonar. Aunque los pacientes con fibrosis quística tienen un incremento de secreciones en las vías respiratorias y una mala eliminación de la mucosidad, el contenido en mucinas disminuye enormemente en estas secreciones lo que da lugar a un incremento en la susceptibilidad a infección en las vías respiratorias en fibrosis quística ya que la *P. aeruginosa* se une a la mucina en las vías respiratorias (Ramphal and Arora (2001) *Glycoconj. J.* 18:709-713). En consecuencia, la mucina puede actuar como una barrera contra la unión bacteriana al epitelio y, probablemente, es importante para la eliminación de las bacterias de las vías respiratorias (Henke, *et al.* (2004) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31:86-91). Se ha demostrado que la fenretinida suprime la proliferación celular en diversas líneas celulares de cáncer (Ulukaya y Wood (1999) *Cancer Treat. Rev.* 25:229-35) y, por lo tanto, se determinó si la fenretinida tenía algún efecto sobre la proliferación celular en células de fibrosis quística. Los resultados de este análisis indicaron que en el estado tanto proinflamatorio como no inflamatorio, las células epiteliales tanto deficientes en CFTR como las normales, presentaban una disminución significativa en la proliferación celular, en particular a dosis de 2,5  $\mu$ M y mayores (figuras 7-10).

De forma inesperada, los presentes resultados indicaron que las células epiteliales deficientes en CFTR, al contrario que las células epiteliales sin fibrosis, fueron resistentes a los efectos apoptóticos del cisplatino, que se usó como control positivo para la apoptosis. El cisplatino genera especies de oxígeno reactivas y desencadena respuestas celulares que implican múltiples rutas, incluyendo reparación de ADN, inhibición de la transcripción, detención del ciclo celular y apoptosis que implica la ruta enzimática c-Jun N terminal quinasa (JNK; proteína quinasa activada por estrés) (Siddik (2003) *Oncogene* 22:7265-7279). Se ha sugerido que la apoptosis está implicada en la remodelación del tejido pulmonar después de una lesión pulmonar aguda por la eliminación del exceso de células madre epiteliales después de la restauración (Bardales, *et al.* (1997) *Am. J. Pathol.* 149:845-852) y por la retirada normal de exceso de

células mesenquimales de lesiones dirimidas (Polunovsky, *et al.* (1993) *J. Clin. Invest.* 92:388-397). También hay indicios de que una rápida apoptosis de células epiteliales infectadas en fibrosis quística puede ser crítica para la eliminación de *P. aeruginosa* y los defectos asociados con CFTR en la apoptosis podrían colaborar de forma importante en la patogénesis de la enfermedad pulmonar en la fibrosis quística (Cannon, *et al.* (2003) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29:188-97).

En consecuencia, se determinó si la fenretinida tenía alguna influencia sobre la apoptosis en condiciones proinflamatorias. Se descubrió que el tratamiento con fenretinida, a una dosis eficaz de 2,5  $\mu\text{M}$ , estaba asociado con una disminución en el número de células epiteliales deficientes en CFTR en el estado no inflamatorio. Puesto que la dosis de fenretinida de 2,5  $\mu\text{M}$  estaba asociada con apoptosis en fase temprana, evaluada por tinción con fluoresceína, una disminución en la proliferación celular en lugar de en la muerte celular fue responsable del menor número de células (figura 7). Esto indica que el efecto antiproliferativo de la fenretinida estaba mediado por cambios en la ceramida intracelular puesto que la ceramida y la esfingosina, junto con sus derivados fosforilados, desempeñan una importante función como segundos mensajeros implicados en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Hannun and Bell (1989) *Science* 243:500-507). De forma inesperada, la menor dosis de fenretinida de 1,25  $\mu\text{M}$ , que no estaba asociada con una disminución estadísticamente significativa en la secreción de IL-8 en células de fibrosis quística, tampoco mostró una disminución en el número de células. Aunque las células no mostraron morfología de apoptosis, se observó una fluorescencia débil, lo que significa que las células pueden estar en fases muy tempranas de apoptosis. A diferencia de las células con fibrosis quística, parecía que el menor número de células observado en las células epiteliales sin fibrosis quística a la dosis de fenretinida de 2,5  $\mu\text{M}$  se debió a una muerte celular apoptótica ya que se observó una fuerte fluorescencia y una morfología apoptótica clásica. La menor dosis de fenretinida de 1,25  $\mu\text{M}$  mostró una fluorescencia más débil y una fase temprana de apoptosis. Sin embargo, en presencia de TNF- $\alpha$ , no se observó potenciación de la apoptosis en células epiteliales deficientes en CFTR en ninguna de las dosis de fenretinida. Por otra parte, se observó una apoptosis significativa con ambas dosis de tratamiento de fenretinida de células sin fibrosis quística tratadas con TNF- $\alpha$ .

Una vez demostrado que la fenretinida a dosis bajas puede actuar para atenuar la inflamación en el estado proinflamatorio, la presente invención es una composición para su uso en la inhibición o reducción de una respuesta proinflamatoria en una célula enferma de las vías respiratorias usando un agente que incrementa los niveles de ceramida en la célula. Este método implica las etapas de poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de un agente que incrementa los niveles de ceramida en la célula inhibiendo o reduciendo de este modo una respuesta proinflamatoria en la célula. En realizaciones particulares de la presente invención, la célula ha estado expuesta o está en riesgo de estar expuesta a un estímulo proinflamatorio que produce la respuesta proinflamatoria. Una respuesta proinflamatoria puede surgir como resultado de una infección por una bacteria, un virus o un hongo; sin embargo, para iniciar una respuesta proinflamatoria no se requiere una infección. Por ejemplo, se considera que el tabaquismo (Noguera, *et al.* (2001) *Thorax*. 56 (6):432-7), el TNF- $\alpha$ , la exposición a alérgenos, la exposición a una endotoxina en ausencia de infección bacteriana, y la flagelina bacteriana (Llaudet, *et al.* (2003) *Shock* 19:131-137) son estímulos proinflamatorios que facilitan una respuesta proinflamatoria en el contexto de la presente invención.

Esta composición de la presente invención es particularmente adecuada para inhibir o reducir una respuesta proinflamatoria en una célula enferma de las vías respiratorias (es decir, una célula de las vías nasal y oral, nasofaringe, bucofaringe, tráquea o pulmón) que es hipersensible a estímulos proinflamatorios. En general, se considera una célula enferma de las vías respiratorias una célula que tiene una afección preexistente que puede surgir de una serie de causas, incluyendo la inhalación de agentes tóxicos, accidentes, hábitos de vida perjudiciales tales como tabaquismo, infecciones, factores genéticos, y cualquier otra causa que afecte al desarrollo, directa o bien indirectamente, predisponiendo de este modo a las células de las vías respiratorias a responder a estímulos proinflamatorios de una manera hipersensible. Las células enfermas de interés particular son células que tienen una enfermedad de las vías respiratorias incluyendo, a título enunciativo, asma, enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias, bronquitis, enfisema, neumonía, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria, gripe, epiglotitis, tuberculosis, en un sujeto con fibrosis quística. En realizaciones particulares, la célula de las vías respiratorias es una célula pulmonar. En otras realizaciones, la enfermedad de las vías respiratorias es fibrosis quística.

La respuesta proinflamatoria en la célula enferma se inhibe o se reduce poniendo en contacto la célula con un agente que incrementa los niveles de ceramida en la célula. Los agentes adecuados que se pueden usar incluyen agentes que incrementan la síntesis *de novo* de ceramida, disminuyen la hidrólisis de ceramida, incrementan la hidrólisis de conjugados de ceramida, o disminuyen el uso de ceramida como sustrato, o combinaciones de estos.

Agentes que incrementan la síntesis *de novo* de ceramida son bien conocidos en la técnica e incluyen, a título enunciativo, ácido palmítico, serina, análogos de THC, gemcitabina, vitamina C, vasopodar, camptotecina, etopósido, paclitaxel, fludarabina, derivados del ácido todo-trans-retinoico (ATRA) y ácido retinoico (véase, por ejemplo, Radin (2003) *Biochem. J.* 371:243-256). La patente de Estados Unidos No. 6.774.114 también explica un éster monosacárido del ácido ascórbico y/o al menos una sal metálica de ácido ascórbico fosforilado para incrementar la síntesis de ceramida.

El agente usado para incrementar los niveles de ceramida en la célula es todo-trans-N-(4-hidroxifenil)retinamida, es

- decir, fenretinida, que tiene el número de registro CAS 65646-68-6. La fenretinida es particularmente adecuada para su uso en la presente invención ya que se describió que tenía menos efectos secundarios en comparación con los retinoides naturales incluyendo la vitamina A (Ulukaya y Wood (1999) *Cancer Treat Rev.* 25:229-35). El perfil de seguridad para la fenretinida es excelente ya que se han notificado efectos secundarios mínimos en una diversidad de ensayos clínicos usando fenretinida en una base profiláctica (Ulukaya y Wood (1999) *supra*). Los ensayos clínicos han demostrado que la fenretinida no induce daño vascular generalizado en seres humanos (Reynolds y Lemons (2001) *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 15:867-910). La fenretinida también se ha usado para tratar sujetos (de 2 a 21 años) con neuroblastoma para definir la farmacocinética de la fenretinida y la dosis máxima tolerada en niños, y para evaluar la toxicidad a corto y a largo plazo en este intervalo de edad (Garaventa, *et al.* (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:2032-2039). La fenretinida se administró por vía oral una vez al día en ciclos de 28 días. Se determinaron semanalmente las funciones hepática y renal y la evaluación clínica. Los efectos secundarios que se produjeron en 15 de los 45 sujetos sometidos al ensayo fueron los mismos que los observados en sujetos adultos. Se observó que los efectos secundarios eran tolerables y fácilmente reversibles en un período de 7 días después de la suspensión del tratamiento.
- Los agentes que disminuyen la hidrólisis de ceramida incluyen inhibidores de ceramidasa que convierten la ceramida en esfingosina y ácidos grasos. Los inhibidores de ceramidasa particularmente adecuados incluyen N-oleoiletanolamina, D-MAPP y derivados de estos, por ejemplo, *p*-nitro-D-MAPP (véase, por ejemplo, Radin (2003) citado anteriormente).
- Los agentes que disminuyen el uso de ceramida como un sustrato incluyen, a título enunciativo, inhibidores de glucosilceramida sintasa, inhibidores de 1-acilceramida sintasa (también denominados inhibidores de 1-O-acilceramida sintasa), e inhibidores de la síntesis de esfingosina-1-fosfato. Los inhibidores de glucosilceramida sintasa y/o los inhibidores de 1-acilceramida sintasa son conocidos y se divulgan, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.302.609, 5.041.441 y 5.707.649. Los ejemplos específicos de inhibidores de glucosilceramida sintasa incluyen, a título enunciativo, 1-fenil-2-acilamino-3-morfolino-1-propanol; 1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol (PDMP); D-*treo*-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol (PPPP); 1-fenil-2-palmitoilamino-3-morfolino-1-propanol (PPMP); etilendioxi-P4; mifepristona; N-butil-desoxinijiramicina; antiandrógenos; y tamoxifeno, incluyendo citrato de tamoxifeno. Los inhibidores de la síntesis de esfingosina-1-fosfato, incluyendo inhibidores de esfingosina quinasa, tales como, D-*eritro*-N,N-dimetilesfingosina son conocidos. Por ejemplo, en la solicitud de patente japonesa 9176083 se desvela el inhibidor de la esfingosina quinasa F12509A.
- Los agentes que incrementan la hidrólisis de conjugados de ceramida, tales como glucosilceramida, incluyen fosfolípidos ácidos tales como bis(monoacilglicero)-fosfato y PtdSer, vitamina A, análogos de saposina C, y clorpromazina (CPZ) (véase, por ejemplo, Radin (2003) citado anteriormente).
- Para incrementar los niveles de ceramida en la célula pueden generarse otros compuestos activos mediante técnicas conocidas, incluyendo técnicas de diseño racional de fármacos (o técnicas de química combinatoria) que dirigen enzimas particulares que hidrolizan o sintetizan ceramida o usan compuestos activos existentes como compuestos guía. Se conocen métodos para determinar la estructura tridimensional de los compuestos activos y producir análogos activos de estos y reciben el nombre de técnicas de diseño racional de fármacos. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.593.853; 5.612.895; 5.331.573; 4.833.092; 4.859.765; 4.853.871; y 4.863.857. En técnicas de química combinatoria (o diseño aleatorio de fármacos), se exploran grandes bibliotecas combinatorias de compuestos candidatos para determinar los compuestos activos. Los métodos de síntesis de división en los que se une una etiqueta liberable a la partícula junto con los compuestos orgánicos de interés también se conocen como métodos de síntesis conjunta. Se diversos métodos de este tipo. Véanse, por ejemplo, Furka, *et al.* (1991) *J. Pept. Protein Res.* 37:487; Lam, *et al.* (1991) *Nature* 354:82; Zuckermann, *et al.* (1992) *Int. J. Pept. Protein Res.* 40:498; Sebestyen, *et al.* (1993) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3:413; y Lam, *et al.* (1993) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3:419.
- Una cantidad eficaz de los agentes divulgados en el presente documento es una cantidad que inhibe o reduce la respuesta proinflamatoria mediada por un incremento en los niveles de ceramida celular; un efecto que se puede determinar monitorizando la expresión o secreción de citocinas proinflamatorias tales como IL-8, IL-6, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y similares. De forma deseable, el agente disminuye la expresión o secreción de una citocina proinflamatoria en la célula aproximadamente en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o un 100% en comparación con la misma célula en ausencia del agente. El agente disminuye la expresión de al menos una citocina proinflamatoria al menos en un 10% en comparación con la misma célula en ausencia del agente. El agente también puede disminuir la expresión de al menos una citocina proinflamatoria al menos en un 30% en comparación con la misma célula en ausencia del agente.
- Al inhibir o reducir una respuesta proinflamatoria en una célula enferma, este método será útil para el estudio de las rutas de señalización implicadas en la respuesta proinflamatoria y para la prevención de una inflamación respiratoria aguda en un sujeto en riesgo.
- Normalmente, la inflamación aguda se produce durante un corto periodo de tiempo. Si una infección no desaparece durante este periodo de tiempo, la inflamación cambia de aguda a crónica e implica linfocitos y macrófagos. En general, el cambio a inflamación crónica es deseable ya que una inflamación crónica es menos dañina para el tejido.

Sin embargo, en pacientes con fibrosis quística, la respuesta inflamatoria aguda no realiza la transición a una respuesta crónica. De forma ventajosa, los datos presentados en el presente documento indican que el pretratamiento con un fármaco que aumenta los niveles de ceramida, concretamente fenretinida, puede mejorar la inflamación pulmonar aguda en enfermedades de las vías respiratorias tal como fibrosis quística. En consecuencia, la presente invención es una composición para su uso en la prevención o la reducción de una inflamación respiratoria aguda administrando a un sujeto en riesgo de tener inflamación respiratoria aguda, una cantidad eficaz de fenretinida que incrementa los niveles de ceramida en células de las vías respiratorias.

Como se usa en el presente documento, una respuesta inflamatoria aguda se caracteriza, en general, como una inflamación dominada por un reclutamiento de neutrófilos, así como de eosinófilos. En el estado inflamatorio agudo, se incrementa la producción de IL-8 y de leucotrieno B4, los neutrófilos se infiltran en el pulmón donde liberan mediadores, tales como elastasa, que además inhiben las defensas del huésped, paralizan la opsonofagocitosis, afectan a la depuración mucociliar y dañan la arquitectura de las paredes de las vías (Chmiel y Davis (2003) *Respir Res.* 4(1):8). La combinación de estos eventos favorece la persistencia de microorganismos en las vías respiratorias. En consecuencia, la atenuación de la respuesta inflamatoria aguda limitará el daño a los tejidos del huésped y acelerará la recuperación.

Los sujetos que particularmente pueden beneficiarse de recibir un agente que incremente los niveles de ceramida en las células son los que padecen una enfermedad preexistente de las vías respiratorias (por ejemplo, las descritas en el presente documento) y están en riesgo de estar expuestos a un estímulo proinflamatorio que dé como resultado una respuesta inflamatoria aguda. Dicha exposición puede incluir estar cerca de un individuo que se sabe que tiene una infección en las vías respiratorias, tal como, por ejemplo, una infección con *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus*, *Tuberculosis*, *Candida albicans* o *Aspergillus fumigatus*. Para prevenir o reducir una respuesta inflamatoria aguda, al sujeto en riesgo se le administra una cantidad eficaz de un agente divulgado en el presente documento, de forma deseable en una formulación farmacéuticamente aceptable, para prevenir o reducir la respuesta inflamatoria aguda. Una cantidad eficaz para producir la prevención o la reducción, es una cantidad como la descrita anteriormente, o en el contexto de terapia, es una cantidad que disminuye o atenúa los signos o síntomas de una inflamación aguda o acorta la respuesta inflamatoria aguda en el sujeto que se está tratando en comparación con un sujeto que no ha recibido tratamiento preventivo. Los signos o síntomas de inflamación aguda que se pueden monitorizar para evaluar la eficacia del tratamiento incluyen, a título enunciativo, hinchazón, enrojecimiento, fiebre, dolor, sibilancia, depuración mucociliar y similares.

Se pretende que un sujeto, como se usa en el contexto de la presente invención, incluya seres humanos; animales de compañía, tal como, perros, gatos, y aves; ganado tal como vacas, cerdos, y pollos; y cualquier otro mamífero (por ejemplo, caballos) que puedan recibir el beneficio de los métodos terapéuticos de la presente invención.

Los agentes que incrementan los niveles de ceramida en la célula se pueden preparar de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento formulando los agentes con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En la fabricación de una formulación farmacéutica, el agente activo, incluyendo su sal fisiológicamente aceptable, se mezcla típicamente, entre otros compuestos, con un vehículo aceptable. Por supuesto, el vehículo debe ser aceptable en el sentido de que debe ser compatible con cualquier otro ingrediente en la formulación y no debe ser perjudicial para el sujeto. El vehículo puede ser un sólido o un líquido, o ambas cosas, y preferentemente se formula con el compuesto como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, un comprimido, que puede contener del 0,5 % al 95 % en peso del agente activo. En las formulaciones de la invención pueden incorporarse uno o más agentes activos, que pueden prepararse por cualquiera de las técnicas farmacéuticas bien conocidas que consisten esencialmente en mezclar los componentes, incluyendo opcionalmente uno o más ingredientes auxiliares. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro, editor, 20ª ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000.

Las formulaciones de la invención incluyen las que son adecuadas para administración oral, bucal (por ejemplo, sublingual), parenteral (por ejemplo, subcutánea intramuscular, intradérmica o intravenosa), y tópica (es decir, superficies mucosas y superficies de las vías respiratorias), aunque la vía más adecuada en cualquier caso determinado dependerá de la naturaleza y de la gravedad de la afección que se esté tratando y de la naturaleza del agente activo particular que se esté usando. Son de interés particular las formulaciones para administración oral, bucal o tópica. Se contempla que las formulaciones de la presente invención puedan usarse solas o en combinación con otros agentes terapéuticos usados actualmente para tratar enfermedades de las vías respiratorias descritas en el presente documento.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden presentarse en unidades individuales, tales como cápsulas, obleas, pastillas para chupar o comprimidos, conteniendo cada una de ellas una cantidad predeterminada del compuesto activo; como un polvo o gránulos; como solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite. Dichas formulaciones pueden prepararse por cualquier método farmacéutico adecuado que incluye la etapa de mezclar el compuesto activo y un vehículo adecuado (que, como se indicó anteriormente, puede contener uno o más ingredientes auxiliares). En general, las formulaciones de la invención se preparan mezclando de forma uniforme e íntima el compuesto activo con un vehículo líquido o sólido finamente dividido, o ambos, y a continuación, en caso necesario, dando forma a la mezcla resultante. Por ejemplo, se puede preparar un comprimido comprimiendo o moldeando un polvo o gránulo que contiene el agente activo,

- opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Pueden prepararse comprimidos prensados comprimiendo el compuesto, en una máquina adecuada, en una forma fluida, tal como un polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte y/o uno o más agentes tensioactivos/dispersantes. Pueden prepararse comprimidos moldeados moldeando el compuesto en polvo, en una máquina adecuada, humedecido con un aglutinante líquido inerte.
- Las formulaciones adecuadas para administración bucal (sublingual) incluyen pastillas para chupar que tienen el agente activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; y pastillas que contienen el agente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica.
- Las formulaciones para administración parenteral son preparaciones acuosas convenientemente estériles del agente activo, preparaciones que, preferentemente, son isotónicas con la sangre del destinatario deseado. Estas preparaciones pueden administrarse por inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intradérmica. Dichas preparaciones pueden prepararse convenientemente mezclando el compuesto con agua o con un tampón de glicina y haciendo la solución resultante estéril e isotónica con la sangre.
- Las formulaciones adecuadas para aplicación tópica (por ejemplo, en la vía oral, nasofaringe o bucofaringe) están en forma de ungüento, crema, loción, pasta, gel, pulverización, aerosol o aceite. Los vehículos que pueden usarse incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos y combinaciones de dos o más de estos.
- Las formulaciones adecuadas para la administración a la tráquea o a los pulmones pueden estar en forma de formulaciones líquidas o sólidas. Las formulaciones se administran de forma deseable como partículas de tamaño respirable, por ejemplo, partículas de un tamaño suficientemente pequeño para pasar a través de la nariz, boca y laringe tras inhalación y a través de los bronquios y alveolos pulmonares. En general, las partículas respirables varían de aproximadamente 0,5 a 10 micrómetros de tamaño. Las partículas de tamaño no respirable que se incluyen en el aerosol tienden a depositarse en la garganta y a tragarse, y por tanto, se minimiza la cantidad de partículas no respirables en el aerosol. Para administración nasal, es deseable un tamaño de partículas en el intervalo de 10 a 500 micrómetros para garantizar la retención en la cavidad nasal.
- Las composiciones en forma de partículas sólidas que contienen partículas secas respirables de agente activo micronizado se pueden preparar moliendo el compuesto seco con mortero y mano de mortero, y a continuación haciendo pasar la composición micronizada a través de un tamiz de malla 400 para romper o separar aglomerados grandes. Una composición en forma de partículas sólidas que contiene el agente activo puede contener opcionalmente un dispersante que sirve para facilitar la formación de un aerosol. Un dispersante adecuado es lactosa, que se puede combinar con el agente activo en cualquier proporción adecuada, por ejemplo, en una proporción de 1 a 1 en peso.
- Los aerosoles de partículas sólidas que contienen el agente activo y el tensioactivo se pueden producir con cualquier generador de aerosol de medicamento en forma de partículas sólidas. Los generadores de aerosol para la administración de medicamentos en forma de partículas sólidas a un sujeto producen partículas que son respirables, y generan un volumen de aerosol que contiene una dosis medida predeterminada de un medicamento en una tasa adecuada para la administración a un ser humano. Un tipo ilustrativo de generador de aerosol en forma de partículas sólidas es un insuflador. Las formulaciones adecuadas para administración por insuflación incluyen polvos finamente triturados que se pueden administrar por medio de un insuflador o introducirse en la cavidad nasal del mismo modo en que se toma el tabaco rapé. En el insuflador, el polvo, por ejemplo, una dosis medida de este, eficaz para llevar a cabo los tratamientos descritos en el presente documento, está incluido en cápsulas o cartuchos, de forma típica fabricados en gelatina o plástico, que se perforan o bien se abren *in situ* y se administra el polvo por el aire aspirado a través del dispositivo durante la inhalación o por medio de una bomba manual. El polvo empleado en el insuflador consiste solamente en el ingrediente activo o bien en una mezcla en polvo que contiene el ingrediente activo, un diluyente de polvo adecuado, tal como lactosa, y un tensioactivo opcional. De forma típica, el ingrediente activo varía de un 0,1 a un 100 peso/peso (p/p) de la formulación. Un segundo tipo de generador de aerosol ilustrativo es un inhalador de dosis medida. Los inhaladores de dosis medida son dispensadores de aerosol presurizados que, de forma típica, contienen una formulación en suspensión o solución del ingrediente activo en un propulsor licuado. Durante su uso, estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para administrar un volumen medido, de forma típica de 10 a 150 µl, para producir una pulverización de partículas finas que contiene el ingrediente activo. Propulsores adecuados incluyen determinados compuestos de clorofluorocarbono, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano y mezclas de estos. La formulación puede contener además uno o más codisolventes, por ejemplo, etanol, emulsionantes y otros tensioactivos de formulación, tales como ácido oleico o trioleato de sorbitano, antioxidantes y agentes aromatizantes adecuados.
- Los aerosoles de partículas líquidas que contienen un agente activo de la presente invención se pueden producir por cualquier medio adecuado, tal como con un nebulizador. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.501.729. Los nebulizadores son dispositivos disponibles en el comercio que transforman las soluciones o suspensiones del ingrediente activo en una vaporización de aerosol terapéutico por medio de la aceleración de un gas comprimido, de forma típica aire u oxígeno, a través de un orificio de Venturi estrecho o bien por medio de agitación ultrasónica. Las formulaciones adecuadas para su uso en los nebulizadores contienen el ingrediente activo

en un vehículo líquido en una cantidad de hasta un 40% p/p preferentemente menos de un 20% p/p de la formulación. De forma típica, el vehículo es agua o solución acuosa diluida de alcohol, que preferentemente se vuelve isotónica con los fluidos corporales mediante la adición de, por ejemplo, cloruro de sodio. Los aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se prepara de forma estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, saborizantes, aceites volátiles, agentes tamponadores y emulsionantes y otros tensioactivos de formulación.

Un aerosol, ya esté formado de partículas sólidas o bien líquidas, se puede producir por un generador de aerosol a una tasa de aproximadamente 10 a 150 litros por minuto, más generalmente de aproximadamente 30 a 150 litros por minuto y, de la forma más deseable, aproximadamente 60 litros por minuto. Los aerosoles que contienen cantidades mayores de medicamento se pueden administrar más rápidamente.

Una cantidad o dosis eficaz del agente activo variará algo de un sujeto a otro, y dependerá de factores tales como la condición del sujeto y la vía de administración. Dichas dosificaciones se pueden determinar de acuerdo con procedimientos farmacológicos de rutina conocidos por los expertos en la técnica, en particular a la luz de la descripción proporcionada en el presente documento y de las actuales prácticas de dosificación del agente activo conocido.

La fenretinida se ha usado por vía sistémica alcanzando un nivel plasmático de aproximadamente 0,1, 2, 3, 5  $\mu\text{M}$  a 10 o 20  $\mu\text{M}$ . De forma típica, se usan (para dosificación oral) de 50 o 100 a 500 o 1000, 2000 o 3000  $\text{mg}/\text{m}^2$  de área de superficie corporal al día. En realizaciones particulares, se alcanzan concentraciones plasmáticas de 0,1 a 10  $\mu\text{M}$ .

La inhibición de la liberación basal de IL-8 da como resultado un influjo reducido de neutrófilos y linfocitos al sitio del daño tisular con una susceptibilidad incrementada a infecciones respiratorias (Greenberger, *et al.* (1996) *J. Infect. Dis.* 173:159). Los neutrófilos también pueden ayudar a restablecer la integridad epitelial después de una lesión y las citocinas tales como IL-8, IL-6 y IL-10 pueden potenciar el cierre de la herida en células epiteliales (Zahm, *et al.* (2000) *J. Cell Physiol.* 185:447-453). Además, la reducción de neutrófilos en ratas ha dado como resultado una disminución de la proliferación epitelial y la restauración después de lesión epitelial inducida por ozono (Vesely, *et al.* (1999) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20:699-709). Los resultados proporcionados en el presente documento indican que, en ausencia de un estímulo proinflamatorio, la fenretinida, que incrementa los niveles de ceramida en la célula, puede incrementar los niveles basales de IL-8 tanto en células normales como enfermas. En consecuencia, la presente invención es una composición para su uso en la inducción de una respuesta inflamatoria en una célula poniendo en contacto la célula con una cantidad eficaz de fenretinida.

En realizaciones particulares, la respuesta inflamatoria es una respuesta proinflamatoria o una respuesta inflamatoria aguda mediada por la producción de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-8, IL-6 y similares) que quimioatraen neutrófilos. Se contempla que la célula que se va a tratar es una célula sana, normal, o una célula enferma (por ejemplo, las descritas en el presente documento) de las vías respiratorias. La cantidad de agente usado para lograr el efecto deseado de inducción de una respuesta inflamatoria puede variar con el tipo de célula usado y se puede determinar midiendo la producción de citocinas proinflamatorias. Por ejemplo, como se ilustra en el presente documento, los niveles basales de IL-8 se pudieron incrementar poniendo en contacto células normales con niveles muy bajos de fenretinida (por ejemplo, 1,25  $\mu\text{M}$ ; figura 4), mientras que las células deficientes en CFTR requirieron niveles mayores de fenretinida (por ejemplo, 5  $\mu\text{M}$ ; figura 3) para lograr niveles similares de liberación de IL-8. En general, una cantidad eficaz en el contexto de la presente invención, es una cantidad que induce o potencia una respuesta inflamatoria; un efecto que se puede determinar monitorizando la expresión o la secreción de citocinas proinflamatorias tales como IL-8, IL-6, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y similares. De forma deseable, el agente provoca al menos un incremento de 2 veces en la expresión o secreción de citocinas proinflamatorias. De forma más deseable, el agente provoca un incremento de 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o mayor en la expresión o la secreción de una citocina proinflamatoria en la célula en comparación con la misma célula en ausencia del agente.

Al inducir una respuesta inflamatoria en una célula, este procedimiento será útil para el estudio de las vías de señalización implicadas en la respuesta inflamatoria y para la protección de sujetos en riesgo frente a infecciones respiratorias.

También se ha demostrado que la fenretinida supera la acción antiapoptótica y la proliferación potenciada observadas en las células de fibrosis quística. En consecuencia, la presente invención proporciona además una composición para su uso en la reducción o disminución de proliferación de una célula enferma de las vías respiratorias con una cantidad eficaz de un agente que incrementa los niveles de ceramida en la célula, concretamente fenretinida. Una cantidad eficaz de un agente que incrementa los niveles de ceramida en la célula es una cantidad que disminuye la proliferación de la célula de las vías respiratorias con enfermedad en comparación con una célula que no está en contacto con el agente. Las tasas de proliferación celular se pueden determinar de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica. Debido a que los agentes inductores de ceramida, tales como fenretinida, evitan el bloqueo de los mecanismos apoptóticos en células enfermas, tales como células de fibrosis quística, este procedimiento es útil para el estudio de la fisiopatología de enfermedades de las vías respiratorias así como para facilitar la maduración y la diferenciación de células epiteliales de las vías respiratorias protegiendo de este modo a los individuos con enfermedades de las vías respiratorias de

adquirir infecciones de las vías respiratorias.

Al demostrar que ratones con fibrosis quística pretratados con fenretinida y expuestos a *P. aeruginosa* presentaron una reducción de aproximadamente un 40% en el número de células con *P. aeruginosa* en comparación con los controles (figura 5), la presente invención también es un procedimiento para prevenir o reducir una infección respiratoria en un sujeto administrando a un sujeto en riesgo de adquirir una infección respiratoria una cantidad eficaz de un agente que incrementa los niveles de ceramida en células de las vías respiratorias. Los sujetos que se pueden beneficiar particularmente de este procedimiento de la presente invención son sujetos con fibrosis quística, en los que el sujeto está en riesgo de haber estado expuesto a una infección respiratoria de modo que el incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias y el reclutamiento de neutrófilos pueden disminuir la susceptibilidad a la infección respiratoria. En el contexto de las presentes enseñanzas, se contempla que la potenciación de la liberación basal de IL-8 y la disminución de la tasa a la que proliferan y se diferencian las células epiteliales, pudo dar lugar, en general, a un epitelio más maduro y diferenciado, potenciando de este modo la biosíntesis y secreción de mucinas para mejorar la capacidad de los pacientes con fibrosis quística a combatir infecciones pulmonares recurrentes y mejorar la capacidad de restauración del tejido pulmonar después de la infección.

Las infecciones de las vías respiratorias que se pueden prevenir o reducir (determinadas por recuentos celulares o víricos) incluyen, a título enunciativo, virus del resfriado común (por ejemplo, rinovirus, coronavirus, adenovirus, mixovirus, ecovirus, Coxsackie A y B); caries dental provocada por *Streptococcus mutans*; aftas provocadas por *C. albicans*; gingivitis ulceronecrosante aguda provocada por *Treponema vincentii* o *Fusobacterium fusiforme*, estomatitis provocada por el virus del herpes simple; faringitis provocada por adenovirus, virus del herpes simple, virus de Coxsackie, *S. pyrogenes*, o *Corynebacterium diphtheriae*; difteria provocada por virus paragripales o virus respiratorio sincitial; epiglotitis provocada por *H. influenzae*; bronquitis provocada por virus paragripales, virus respiratorio sincitial, virus gripales, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*; bronquiolitis provocada por virus respiratorio sincitial; u otras infecciones conocidas por provocar enfermedad de las vías respiratorias (por ejemplo, *P. aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, o *Aspergillus fumigatus*). En realizaciones particulares, la infección respiratoria prevenida o reducida es una infección de los pulmones.

Para prevenir o reducir una infección respiratoria, al sujeto en riesgo se le administra una cantidad eficaz de un agente descrito en el presente documento, de forma deseable en una formulación farmacéuticamente aceptable, para prevenir o reducir la infección respiratoria. Una cantidad eficaz para producir la prevención o reducción es una cantidad que provoca un incremento específico en la expresión o secreción de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, como se analiza anteriormente), o en el contexto de la eficacia del tratamiento es una cantidad que disminuye o atenúa los signos o síntomas de la infección respiratoria o acorta la infección respiratoria en el sujeto que se está tratando en comparación con un sujeto que no ha recibido tratamiento preventivo. Las cantidades eficaces adecuadas se describen en el presente documento y pueden variar con la infección y el paciente que se está tratando. Los signos o síntomas de la infección respiratoria que se pueden monitorizar para determinar la eficacia del tratamiento incluyen, a título enunciativo, recuentos celulares o víricos, fiebre, aclaramiento mucociliar y similares. Dichos signos o síntomas se pueden valorar por el médico experto antes y después del tratamiento con el agente activo para determinar la eficacia de la pauta de tratamiento y las dosificaciones se pueden ajustar en consecuencia.

La invención se describe con mayor detalle por los siguientes ejemplos.

#### 40 Ejemplo 1: Materiales

Las células del epitelio traqueal humano normales (9HTEo-) y deficientes en CFTR  $\Sigma$ CFTE29o- (homocigoto  $\Delta$ F508) son cultivos de células establecidos en la técnica para analizar la fisiopatología de la fibrosis quística y la respuesta inflamatoria en estas células del epitelio respiratorio (Gruenert, *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5951-5955; Clemens, *et al.* (2000) *Infect. Immun.* 68(8):4430-40; Cromwell, *et al.* (1992) *Immunology* 77(3):330-7; Schwiebert, *et al.* (1999) *Am. J. Physiol.* 276(3 Pt 1):C700-10; Scheid, *et al.* (2001) *Eur. Respir. J.* 17:27-35). Los estudios que usan los cultivos con células epiteliales de pacientes con fibrosis quística ( $\Delta$ 508-CFTR) se han correlacionado bien con la fisiopatología de la fibrosis quística. Por ejemplo, Rubenstein, *et al.* ((1997) *J. Clin. Invest.* 100:2457-2465) explican que el tratamiento con 4-fenilbutirato (4PBA) a concentraciones de 0,1-2 mM dio como resultado el restablecimiento de la secreción de cloruro activado con forskolina en cultivos de células  $\Delta$ 508-CFTR. Asimismo, una dosis de 19 gramos, dos veces al día, administrada a 18 pacientes homocigóticos  $\Delta$ 508-CFTR con fibrosis quística fue suficiente para mejorar estadísticamente el patrón de respuesta de diferencia de potencial nasal en estos pacientes para la perfusión de una solución libre cloruro/isoproterenol/amilorida, una medida que refleja la función epitelial de CFTR.

Los suministros para el cultivo celular, tales como medio esencial mínimo, suero bovino fetal (FBS), penicilina-estreptomocina, L-glutamina y solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS), se obtuvieron en GIBCO-BRL™ (Grand Island, NY). La solución de tripsina-EDTA (0,25%) se obtuvo en Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO). La solución usada para cubrir los matraces T-75 y las placas de 24 pocillos se preparó con colágeno bovino de tipo I y fibronectina humana obtenidos en BD Biosciences (San Jose, CA). El medio basal EGTA, BSA y LHC se obtuvo en Biofluids Biosource (Camarillo, CA). El TNF- $\alpha$  recombinante humano se obtuvo en BD PHARMINGEN™ (San Diego, CA) y se preparó con BSA al 0,1%. Para determinar la liberación de IL-8, se obtuvieron kits de ensayo ELISA

(conjunto de IL-8 humana OPTEIA™) en BD Bioscience (San Diego, CA). La viabilidad celular se determinó usando MTT obtenido en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). N-(4-hidroxifenil)-retinamida (es decir, fenretinida) se obtuvo en Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO).

### Ejemplo 2: Cultivos celulares

5 *Procedimientos generales.* Se usaron células del epitelio traqueal humano normales (9HTEo-) y deficientes en CFTR (CFTE29o- ΔF508 CFTR) en el análisis descrito en el presente documento y se hicieron crecer en matraces T-75 precubiertos en un medio que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS). Se realimentaron las células cada 2-3 días hasta que alcanzaron la confluencia. Se liberaron monocapas adherentes de la superficie de plástico después del tratamiento con tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) y se dividieron en placas de 24 pocillos durante 10 aproximadamente 24 horas antes de recibir los tratamientos.

*Tratamiento con fenretinida y TNF-α.* Se trataron células normales y deficientes en CFTR con fenretinida (Wang, *et al.* (2001) *Cancer Res.* 61:5102-5105; Erdreich-Epstein, *et al.* (2002) citado anteriormente) en dosis conocidas para incrementar, de forma eficaz, el contenido en ceramida celular en el cultivo celular. Se incubaron células del epitelio humano normales (9HTEo-;  $0,4 \times 10^6$  células/pocillo) y deficientes en CFTR (CFTE29o- ΔF508 CFTR;  $0,6 \times 10^6$  células/pocillo) durante 24 horas a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5% con fenretinida 1,25 μM, 2,5 μM o 5 μM en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS). Posteriormente, se reemplazó el medio con MEM con FBS al 2% que contenía las mismas concentraciones iniciales de fenretinida y se hicieron crecer las células durante 24 horas más para caracterizar el impacto de fenretinida sobre la liberación de IL-8 en una afección no inflamatoria. Para caracterizar la afección inflamatoria, se trataron las células con MEM con FBS al 2% que contenía fenretinida 1,25 μM, 2,5 μM o 5 μM y se estimuló simultáneamente con TNF-α recombinante humano (10 ng/ml) durante otras 24 horas. Todos los experimentos incluyeron pocillos de control negativo no estimulados.

*Liberación de IL-8 y ensayos de viabilidad celular.* Se recogieron los sobrenadantes de las células tratadas y se determinó la cantidad de IL-8 liberada en el medio usando un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (conjunto de IL-8 humana OPTEIA™; BD PHARMINGEN™, San Diego, CA). En resumen, se recubrieron placas de 96 pocillos durante la noche con anticuerpo de captura, se lavaron con PBS, TWEEN®-20 al 0,05% y se recubrieron con PBS, FBS inactivado con calor al 10%. Se añadieron concentraciones conocidas de IL-8 (patrón) y sobrenadantes que contenían IL-8 liberada como alícuotas en pocillos apropiados, se incubaron durante 2 horas y posteriormente se decantaron de los pocillos. Se añadió anticuerpo anti-IL-8 conjugado con enzima y se incubó durante 1 hora. Después de lavar la placa, se añadió un sustrato para la enzima y se incubó la placa durante 30 minutos. Se detuvo la reacción usando una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se leyó la absorbancia a 450 nm.

La viabilidad celular se evaluó usando un ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) de acuerdo con procedimientos convencionales (Mosmann, T. (1983) *J. Immunol. Methods.* 65:55-63). En resumen, después de recoger el sobrenadante para determinar la liberación de IL-8, se lavaron cuidadosamente las células con PBS y se añadió solución de MTT (0,5 mg/ml de MTT en medio de cultivo exento de rojo fenol). Se incubaron las células durante 4 horas a 37 °C, se aspiró el sobrenadante, se añadió solución de HCl-isopropanol (HCl 0,04 N en isopropanol), y después de 5 minutos se midieron las densidades ópticas a 540 nm. La prueba se basa en la formación de un producto de formazano azul producido por la reducción de la sal de tetrazolio MTT amarilla por reductasas mitocondriales. La intensidad de color se correlaciona con el número de células y la actividad metabólica de las células. En células con la misma actividad, se puede usar la prueba para determinar el porcentaje de células viables.

### Ejemplo 3: Medidas de glutatión intracelular

Se realizó la determinación cuantitativa del GSH y disulfuro de glutatión (GSSG) intracelular total de acuerdo con procedimientos convencionales (Yang, *et al.* (2002) *Biomed. Chromat.* 16:224-228) con las siguientes modificaciones. Se lavaron células del epitelio traqueal confluentes normales y deficientes en CFTR dos veces en placas de seis pocillos con 5,0 ml de PBS que contenía BSA al 25 mg%. Se trataron las células con 1,5 ml de volumen de BSA al 25 mg % en solución de PBS y a continuación se sometieron a una centrifugación de 500 x g durante 10 minutos seguido de otra centrifugación a 400 x g durante 6 minutos. Se desechó el sobrenadante y se lavaron las células una vez con 0,45 ml de PBS y se resuspendieron con 0,45 ml de PBS. Se diluyeron las muestras con 0,1 ml de HCl 10 mM y se sometió a ultrasonidos durante 3 ciclos de 20 segundos. Se filtró la suspensión celular usando un filtro de centrifuga MILLIPORE™ (nº 42407; MILLIPORE™, Billerica, MA) a 14.000 x g durante 60 minutos a 4 °C. Se determinó la concentración de proteína de la porción no filtrada de las muestras por el ensayo de Bradford (BIO-RAD®, Waltham, MA). Se transfirieron los filtrados a una microplaca de 96 pocillos para la medida de las concentraciones de GSH y GSSG usando un procedimiento de reciclado de GSH reductasa (Anderson (1985) *Meth. Enzymol.* 113:548-551) después del tratamiento de las muestras con ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). Se colocó la microplaca sobre el lector de placa de microvaloración usando un filtro de 420 nm y se leyó la absorbancia durante 5 minutos. Se compararon las muestras con la curva de calibración para determinar las concentraciones de GSH y GSSG en cada pocillo.

**Ejemplo 4: Marcado terminal in situ de roturas de hebras de ADN**

Se trataron líneas celulares epiteliales adherentes, CFTE29o- y 9HTEo-, que se hicieron crecer en cubreobjetos recubiertos durante 24 horas, con fenretinida en las mismas concentraciones usadas para determinar la liberación de IL-8 como se indica anteriormente. Después de una incubación de 24 horas con fenretinida, se estimularon las células con TNF- $\alpha$  (grupo experimental) o con cisplatino a 25 mg/ml o 12,5 mg/ml (como control positivo) durante 24 horas más. Se fijaron las células en paraformaldehído al 4% en PBS a pH 7,4 durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las células y se permeabilizaron usando TRITON™ X-100 al 0,1 % en tampón citrato al 0,1 % durante 2 minutos en hielo. Antes de lavarlos, los cubreobjetos se retiraron de forma individual de las placas de 24 pocillos y se incubaron las células durante una hora a 37 °C con enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt) conjugada con fluoresceína (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) para su visualización. Se produjo un portaobjetos negativo incubando un portaobjetos de ambas líneas celulares con tampón menos la enzima Tdt. La enzima Tdt se une al extremo hidroxilo libre de la rotura de la hebra de ADN. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y se colocaron en cubreobjetos en presencia del medio antidecoloración VECTASHIELD® para facilitar la preservación de la fluorescencia. Los portaobjetos se marcaron individualmente con números para mantener los resultados ocultos al investigador hasta después de revisar los portaobjetos. Se visualizaron cuatro campos seleccionados al azar a 400X (aumento total) usando microscopía de fluorescencia y se contaron las células que aparecieron intensamente fluorescentes. Se tomaron fotos para estimar el número de células positivas con respecto a negativas por campo.

**Ejemplo 5: Análisis estadístico**

El número mínimo de copias para todas las mediciones fue al menos de tres. Se expresaron todos los datos de las citocinas como media  $\pm$  EEM para todos los estudios realizados. Se realizaron comparaciones entre los valores de las citocinas usando análisis de varianza (ANOVA). Se realizaron ensayos de t de Student sobre los datos de GSH y GSSG. Se consideró que los datos fueron significativos cuando  $P < 0,05$ .

**Ejemplo 6: Infección de ratones inactivados para CFTR con *P. aeruginosa***

Los ratones C57BL/6 con inactivación génica para *Cftr*<sup>unc</sup> homogéneo generados por inserción de un codón de terminación en el exón 10 del gen *Cftr* son bien conocidos en la técnica (Snouwaert, *et al.* (1992) *Science* 257:1083-8; Gosselin, *et al.* (1998) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:1253-62). Los ratones usados en estos estudios representan crías de ratones B6-*Cftr*<sup>unc</sup> (+/-) retrocruzados con ratones C57BL/6 durante de 10 a 12 generaciones.

*Condiciones de alojamiento.* Se alojaron ratones B6-Cftr (-/-) y B6-Cftr (+/+) en lechos de mazorcas de maíz (Anderson, Maumee, OH) y se alimentaron con PEPTAMEN® estéril (Clintec Nutrition, Deerfield, IL), una dieta líquida baja en residuos que previamente se mostró que prevenía la obstrucción intestinal ratones con inactivación génica para *Cftr*<sup>unc</sup> (Eckman, *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 269: L625-L630). Se usó una dieta convencional (Gosselin, *et al.* (1998) citado anteriormente), en la que el contenido calórico de la dieta fue de 420 kJ/100 ml y un ratón adulto consume aproximadamente 15 ml/día. Para mantener la esterilidad de la dieta, se cambió diariamente. Durante un mes antes de la infección pulmonar con *P. aeruginosa*, se les proporcionó a los ratones fenretinida (preparada en PEPTAMEN®) en el agua de bebida a 5 mg/kg de peso corporal. Se ajustó la dosis para cada ratón individual en base a su peso y se ajustó cada semana (por ejemplo, 147  $\mu$ g/ratón/día para un ratón de 30 gramos).

*Infección de los ratones.* Se seleccionó *P. aeruginosa* (cepa 508) aislada inicialmente de un paciente con fibrosis quística por el carácter mucóide. La infección pulmonar con esta cepa de bacterias, atrapada en perlas de agar, está establecida en la técnica (Gosselin, *et al.* (1995) *Infect. Immun.* 63:3272-3278; Morissette, *et al.* (1995) *Infect. Immun.* 63:1718-1724; Stevenson, *et al.* (1995) *Clin. Exp. Immunol.* 99:98-105). En resumen, se diluyó una suspensión de bacterias de fase logarítmica en agar de tripticasa de soja (TSA) caliente (52 °C). A continuación, se atrapan las bacterias en perlas de agar mezclando con aceite mineral pesado (52 °C) (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ) y agitando vigorosamente seguido de enfriamiento de la mezcla a 4 °C. Se lavaron exhaustivamente las perlas que contenían las bacterias y se resuspendieron en PBS (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA). Se confirmaron el tamaño ( $\leq 150 \mu$ M) y la uniformidad de las perlas por examen al microscopio. Se determinó el número de *P. aeruginosa* viables atrapadas en perlas de agar sembrando en placas diluciones en serie de la suspensión de perlas homogeneizada en placas de TSA.

Los ratones se anestesiaron con una mezcla de clorhidrato de ketamina (75 mg/kg de peso corporal; MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canadá) y xilacina (30 mg/kg de peso corporal; Bayvet Division, Chemagro Limited, Etobicoke, Ontario, Canadá) inyectada por vía intramuscular. Se inyectaron 50  $\mu$ l de inóculo, que contenía  $10^5$  *P. aeruginosa* viables atrapadas en perlas de agar, en los pulmones a través de la tráquea con un catéter intravenoso de calibre 22 (Critikon, Tampa, FL).

*Lavados broncoalveolares (BAL).* Se lavaron 7 veces los alveolos de ratones infectados con un ml de PBS a través de la tráquea canulada. Se centrifugaron las células alveolares, se resuspendieron en 1 ml de PBS, se tiñeron con solución de Turk y se contaron. Se calcularon las proporciones de macrófagos, linfocitos y leucocitos polimorfonucleares (PMN) después del recuento de 200 células alveolares en preparaciones de citospina teñidas con DIFF-QUICK® (American Scientific Products, McGaw Park, ID).

5 *Medida de la carga bacteriana.* Se recogieron los pulmones, los bazo, los riñones y los hígados de forma independiente de ratones infectados y se homogeneizaron durante 60 segundos a alta velocidad (homogeneizador PT10135; Brinkmann Instruments Co., Mississauga, Ontario, Canadá) en 10 ml de PBS. Se sembraron diluciones en serie con factor de dilución 10 de homogeneizados en placas de Petri que contenían TSA y se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por órganos después de una incubación durante la noche a 37 °C. En cada experimento, se confirmó la identidad de las bacterias recuperadas de animales infectados usando un sistema de identificación de bacterias gram-negativas VITEK® (BioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO).

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende una cantidad eficaz de fenretinida para su uso para la prevención de inflamación aguda de las vías respiratorias o para su uso para prevenir o reducir una infección de las vías respiratorias en un sujeto con fibrosis quística.
- 5 2. El uso de una cantidad eficaz de fenretinida en la fabricación de un medicamento para la prevención de inflamación aguda de las vías respiratorias o para prevenir o reducir una infección de las vías respiratorias en un sujeto con fibrosis quística.

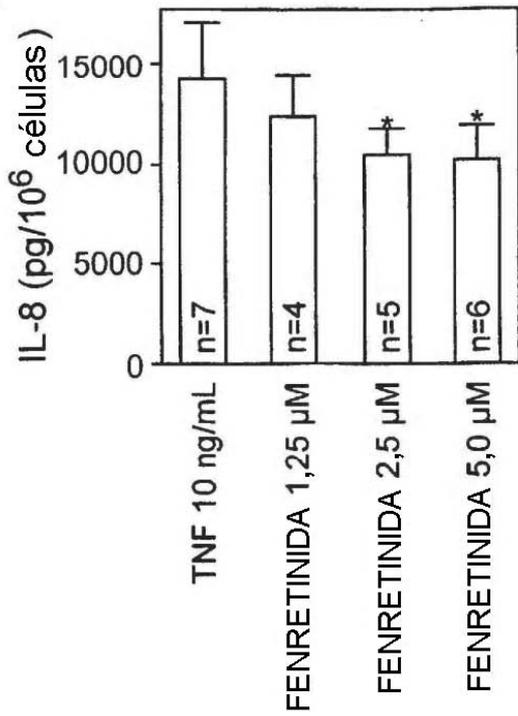


FIG. 1

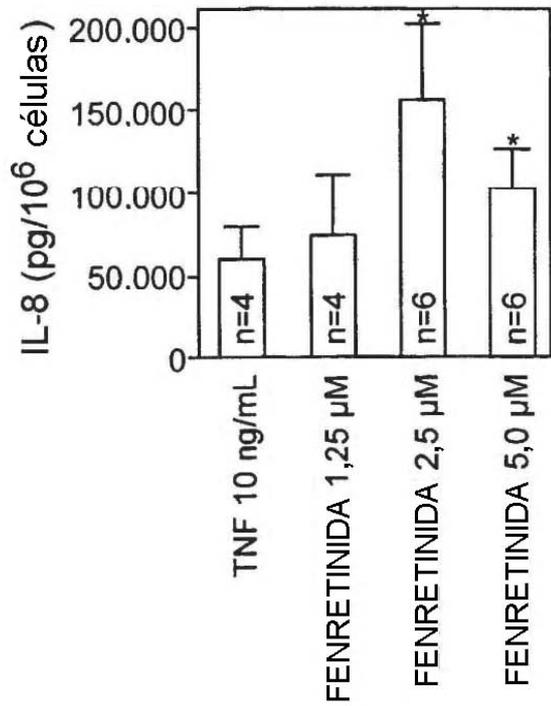


FIG. 2

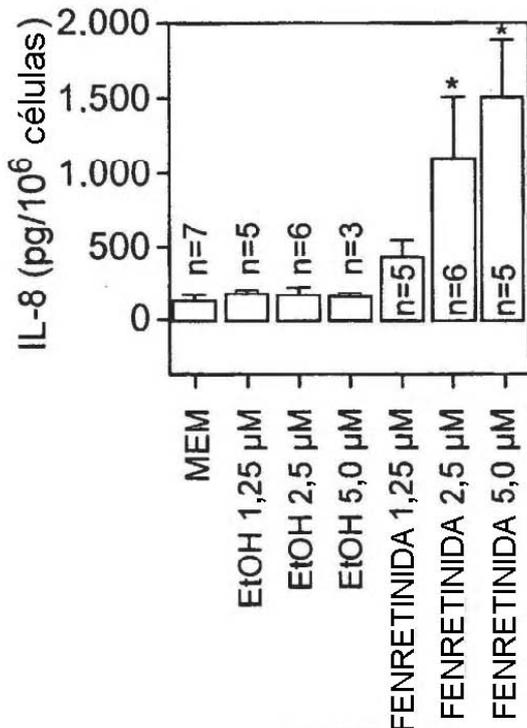


FIG. 3

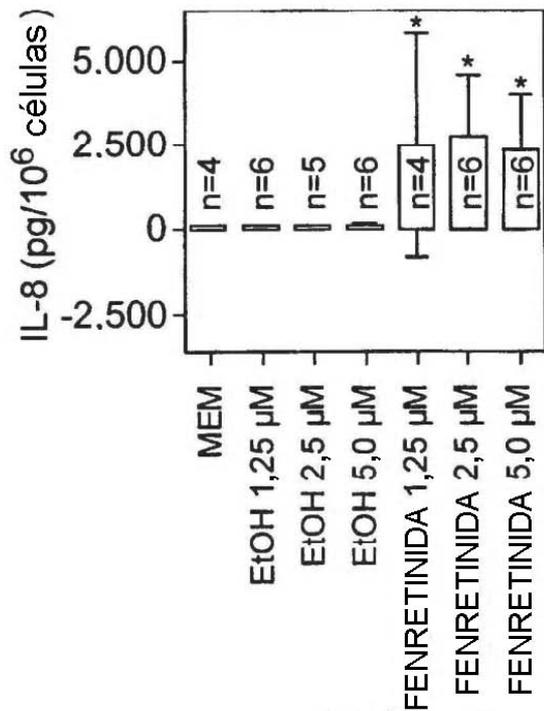


FIG. 4

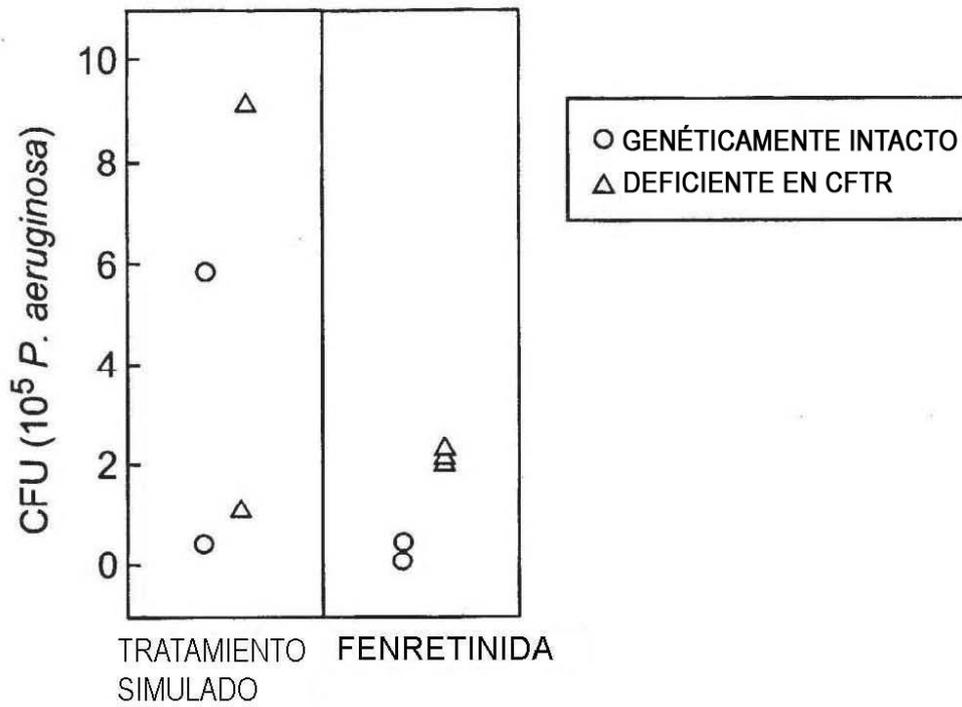


FIG. 5

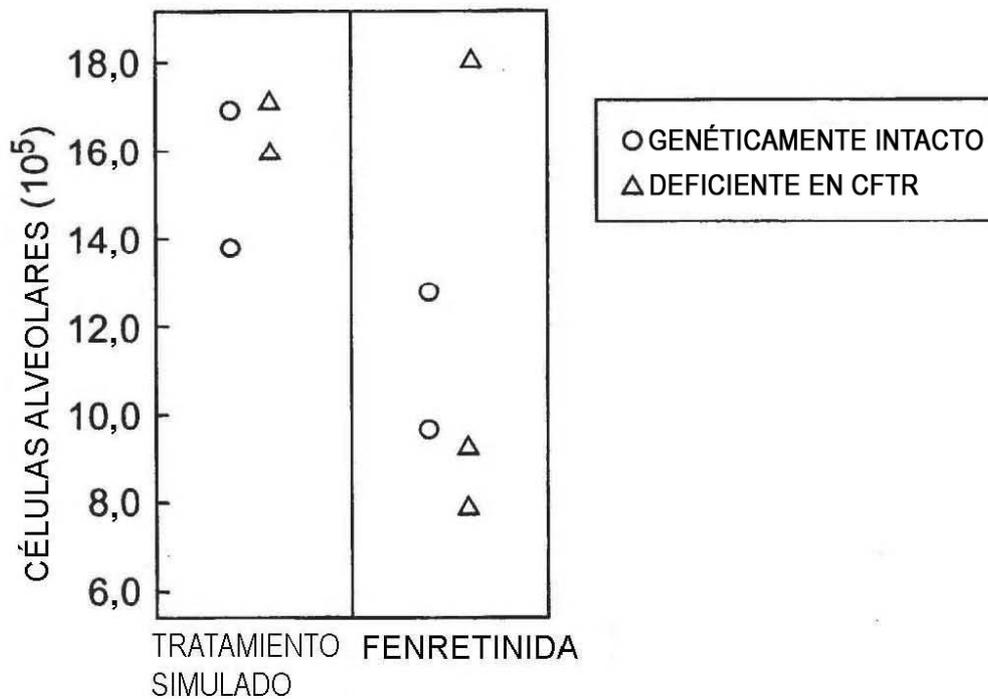


FIG. 6

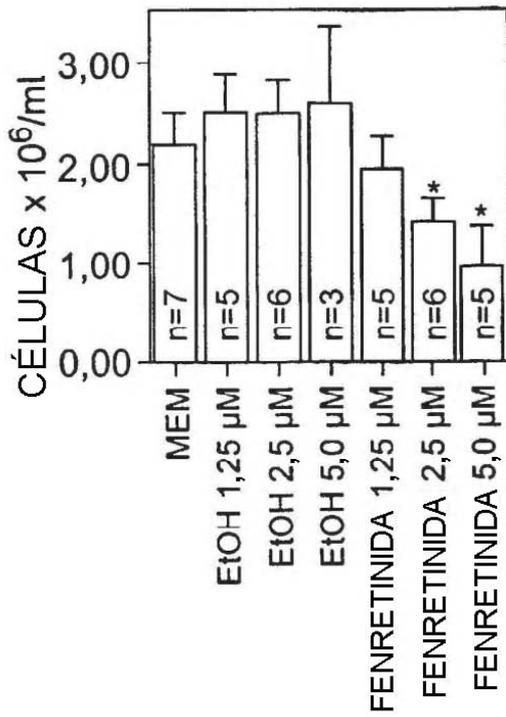


FIG. 7

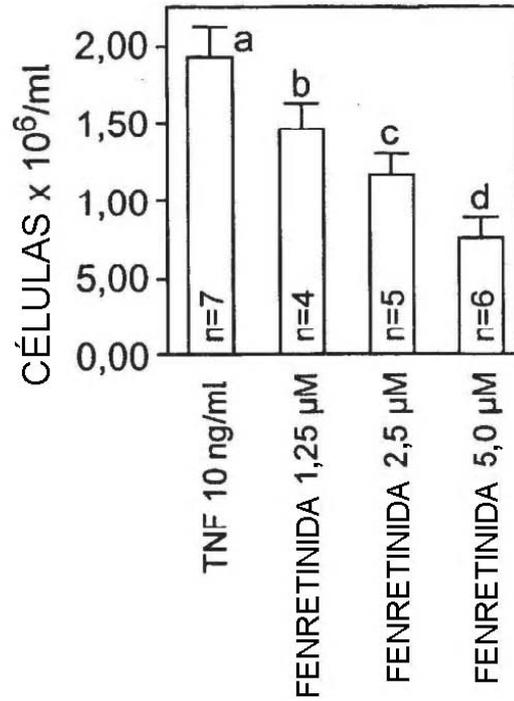


FIG. 8

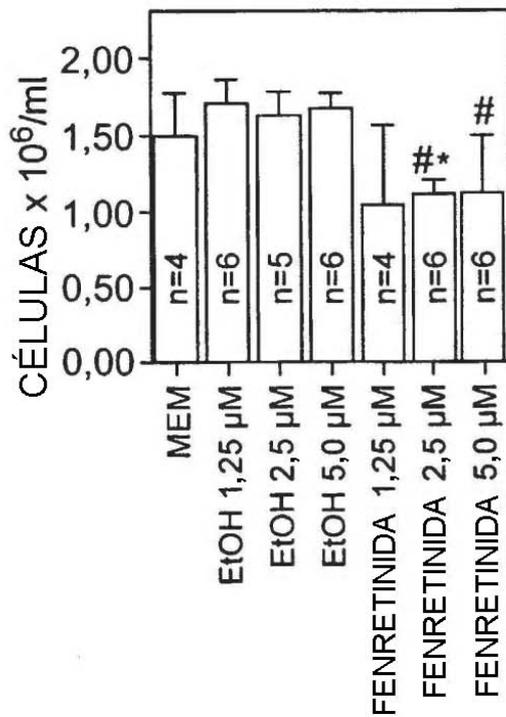


FIG. 9

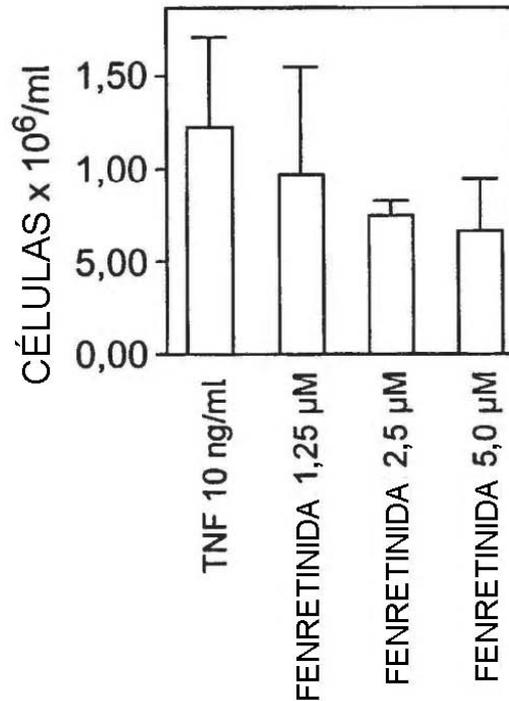


FIG. 10