

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 444**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2005** **E 05750392 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014** **EP 1755661**

54 Título: **Gelsolina para uso en el tratamiento de infecciones**

30 Prioridad:

12.05.2004 US 570233 P

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

02.06.2014

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)**

**75 FRANCIS STREET
BOSTON, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

**STOSSEL, THOMAS P. y
LEE, PO-SHUN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 464 444 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

Gelsolina para uso en el tratamiento de infecciones

5 La invención se refiere a gelsolina para uso en el tratamiento de infecciones y septicemia. También se describe el uso de gelsolina para monitorizar y evaluar tratamientos de infecciones y métodos para aumentar la expresión de interleucina, y métodos para reducir la expresión de citocinas proinflamatorias.

10 A pesar de los avances significativos en el diagnóstico y terapia, las infecciones y la septicemia sigue siendo una causa importante de morbimortalidad en todo el mundo. Incluso con el manejo agresivo, muchos pacientes con infecciones graves desarrollan complicaciones, y algunos mueren. La septicemia se lleva más de 200.000 vidas en los Estados Unidos de América anualmente (Angus, D. C. y Wax, R. S. (2001) Crit Care Med 29, S109-16). Una respuesta inflamatoria intensa acompaña la fase temprana de septicemia, con niveles plasmáticos notablemente incrementados de citocinas proinflamatorias (Riedemann, N. C., Guo, R. F. y Ward, P. A. (2003) Nat Med 29, 517-24), además de otras anomalías bioquímicas. Se ha realizado mucha investigación concertada en intentos de inhibir mediadores inflamatorios específicos con la esperanza de desarrollar tratamientos farmacológicos para la septicemia. No obstante, la proteína C activada (APC) es el único fármaco aprobado para reducir la mortalidad
15 debida a septicemia grave, con una reducción absoluta de muertes en un 6% (Bernard, G. R., Vincent, J. L., Laterre, P. F., LaRosa, S. P., Dhainaut, J. F., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J. S., Garber, G. E., Helterbrand, J. D., Ely, E. W. y Fisher, C. J., Jr. (2001) N Engl J Med 344, 699-709).

La Solicitud PCT nº WO 00/55350 describe un gran número de polipéptidos como polipéptidos asociados a cánceres humanos. Uno de estos polipéptidos, SEC ID NO: 1056, es la gelsolina.

20 La Solicitud PCT nº WO 04/035008 describe que un polipéptido con la capacidad para regular las polimerizaciones de actina se puede usar para tratar infecciones microbianas. Uno de los polipéptidos mencionados como implicado en la mediación de la acción de secuestro o unión es la gelsolina.

25 Weiner, D.J., Bucki, R., y Janmey, P.A. (2003) Am. J. of Respiratory Cell & Molecular Biology, Vol. 28, 738-745, describen que merecería la pena investigar la gelsolina adicionalmente como un agente que puede ser capaz de ayudar a técnicas convencionales a la hora de prevenir y tratar infecciones de las vías respiratorias en pacientes que sufren fibrosis quística.

Los efectos sanitarios negativos de las infecciones y septicemia proporcionan un fuerte incentivo para identificar nuevos tratamientos así como ensayos y enfoques mejorados para evaluar la terapia de infecciones y septicemia.

30 En un primer aspecto de la invención, se proporciona gelsolina para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección, en el que la gelsolina se va a administrar al sujeto en una cantidad eficaz para tratar la infección, y la infección está provocada por una bacteria grampositiva.

Las realizaciones preferidas de la invención en cualquiera de sus diversos aspectos son como se describen más abajo o como se definen en las reivindicaciones.

35 Esta invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que gelsolina trata infecciones y protege frente a manifestaciones tóxicas de las infecciones. Se ha encontrado que ratones inyectados con gelsolina tras la exposición a un agente infeccioso sobrevivieron inesperadamente mejor que los ratones a los que se les administró disolución salina. De este modo, la descripción implica la administración de gelsolina a un sujeto para tratar una infección. La descripción también se refiere a métodos para usar gelsolina para tratar los efectos biológicos de infecciones.

40 La gelsolina (GSN), específicamente gelsolina citoplásmica (cGSN), descubierta primeramente como una proteína de unión a actina intracelular implicada en la movilidad celular (Yin, H. L. y Stossel, T. P. (1979) Nature 281, 583-6) es también una proteína secretora abundante (Yin, H. L., Kwiatkowski, D. J., Mole, J. E. y Cole, F. S. (1984) J Biol Chem 259, 5271-6). La isoforma exportada de gelsolina, denominada gelsolina plasmática (pGSN), tiene 25 aminoácidos adicionales y se origina a partir del ajuste alternativo de un solo gen (Kwiatkowski, D. J., Stossel, T. P., Orkin, S. H., Mole, J. E., Colten, H. R. y Yin, H. L. (1986) Nature 323, 455-8).

Se prefiere el uso de pGSN.

45 Se proporcionan métodos para tratar una infección en un sujeto. Los métodos incluyen administrar gelsolina al sujeto que tiene o que está en riesgo de tener una infección, en una cantidad eficaz para tratar la infección. La infección puede estar provocada por una bacteria grampositiva, un bacilo resistente a ácidos, una espiroqueta, un actinomiceto, un virus, un hongo, un parásito, una especie de Ureaplasma, incluyendo Ureaplasma urealyticum, una especie de Mycoplasma incluyendo Mycoplasma pneumoniae, especie de Rickettsia, especie de Chlamydia, incluyendo Chlamydia psittaci, Chlamydia trachomatis y Chlamydia pneumoniae, y especie de Pneumocystis incluyendo Pneumocystis carinii.

El sujeto puede estar de otro modo libre de indicaciones que necesiten tratamiento con gelsolina. La gelsolina puede

ser administrada tras la exposición del sujeto a la infección. La gelsolina se puede administrar al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ó 24 horas tras la exposición del sujeto a la infección. La gelsolina se puede administrar al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días tras la exposición del sujeto a la infección.

- 5 Se proporcionan métodos para tratar una infección bacteriana gramnegativa en un sujeto. Los métodos incluyen administrar gelsolina al sujeto en una cantidad eficaz en un tiempo posterior a la exposición del sujeto a una infección bacteriana gramnegativa. El sujeto puede estar de otro modo libre de indicaciones que necesiten tratamiento con gelsolina.

10 La gelsolina se puede administrar al menos alrededor de una hora tras la exposición del sujeto a la infección bacteriana gramnegativa. La gelsolina se puede administrar al menos alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ó 24 horas tras la exposición del sujeto a la infección bacteriana gramnegativa. La gelsolina se puede administrar al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días tras la exposición del sujeto a la infección bacteriana gramnegativa. La gelsolina se puede administrar antes de la exposición del sujeto a la infección bacteriana gramnegativa.

- 15 Se proporcionan métodos para tratar o prevenir los efectos de endotoxina lipopolisacárido (LPS) en un sujeto. Los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad eficaz de gelsolina en un tiempo posterior a la exposición a LPS, para proteger al sujeto frente a los efectos de LPS.

20 El sujeto puede estar de otro modo libre de indicaciones que necesiten tratamiento con gelsolina. La gelsolina se puede administrar al menos alrededor de una hora tras la exposición del sujeto al LPS. La gelsolina se puede administrar al menos alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ó 24 o más horas tras la exposición del sujeto a LPS.

La gelsolina se puede administrar al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días tras la exposición del sujeto a LPS.

- 25 Se proporcionan métodos para tratar o prevenir choque séptico bacteriano gramnegativo en un sujeto expuesto a LPS. Los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad eficaz de gelsolina en un tiempo posterior a la exposición a LPS, para tratar el choque séptico bacteriano gramnegativo en el sujeto.

30 El sujeto puede estar libre de indicaciones que necesiten tratamiento con gelsolina. La gelsolina se puede administrar al menos alrededor de una hora tras la exposición del sujeto a LPS. La gelsolina se puede administrar al menos alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ó 24 horas tras la exposición del sujeto a LPS.

La gelsolina se puede administrar al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días tras la exposición del sujeto a LPS.

Se proporciona un método para aumentar la expresión de interleucina (IL) en un sujeto. El método implica administrar gelsolina al sujeto en una cantidad eficaz para aumentar la expresión de IL en el sujeto.

- 35 El sujeto puede estar libre de indicaciones que necesiten tratamiento con gelsolina. El aumento de la expresión de IL puede ser debido a una mayor expresión de la IL, o debido a una menor degradación de la IL, o una combinación de una mayor expresión de la IL y una menor degradación de la IL.

40 La expresión de IL se puede incrementar en al menos aproximadamente 25% con respecto al control. La expresión de IL se puede incrementar en al menos aproximadamente 50% o 75% con respecto al control. La expresión de IL se puede incrementar en al menos aproximadamente 2 veces con respecto al control.

45 La expresión de IL se puede incrementar al menos aproximadamente 3 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1000 veces con respecto al control. En general, el nivel de expresión de IL en un control es el nivel de expresión de IL en un sujeto al que no se le administró gelsolina pero de otro modo es idéntico al sujeto tratado. Los métodos para medir los niveles de IL son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

Se proporciona un método para aumentar la expresión de IL *in vitro*. El método implica poner en contacto una célula capaz de expresar IL con una cantidad suficiente de gelsolina para aumentar el nivel de expresión de IL en la célula. La expresión de IL se puede incrementar en al menos aproximadamente 25% con respecto al control. La expresión de IL se puede incrementar en al menos aproximadamente 50% o 75% con respecto al control.

- 50 La expresión de IL se puede incrementar en al menos aproximadamente 2 veces con respecto al control. En general, el nivel de expresión de IL en un control es aquel nivel de expresión en una célula que no está en contacto con gelsolina pero que de otro modo es idénticamente tratada a la célula puesta en contacto con gelsolina. La expresión de IL se puede incrementar al menos aproximadamente 3 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1000 veces con respecto al control. Los métodos para medir los niveles de IL son conocidos por

aquellos de pericia normal en la técnica.

5 El período de tiempo en el que se incrementa la expresión de IL es, al menos en parte, una función del tipo celular y de la vasija de cultivo específica usada. En general, este período de tiempo oscila de 2-3 horas (para incremento a corto plazo) a alrededor de 2-3 días (para incremento a medio plazo) hasta varias semanas (para incremento a largo plazo). Se pueden usar procedimientos habituales conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica para determinar el nivel de expresión de IL como una función de dosis crecientes de gelsolina o tiempo de incubación creciente o de las células con gelsolina. Una IL preferida es IL-10.

10 Se proporciona un método para disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias. El método implica administrar al sujeto gelsolina en una cantidad eficaz para disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias en el sujeto. El sujeto puede estar de otro modo libre de indicaciones que necesiten tratamiento con gelsolina. La disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias puede ser debida a una menor expresión de la citocina, o debida a una mayor degradación de la citocina, o una combinación de una menor expresión de la citocina y una mayor degradación de la citocina. En general, la expresión de citocina proinflamatoria se disminuye en al menos aproximadamente 10% con respecto al control. La expresión de citocina proinflamatoria se puede disminuir en al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 99% con respecto al control. La expresión de citocina proinflamatoria se puede disminuir en un 100% con respecto al control. En general, el nivel de expresión de citocina proinflamatoria en un control es el nivel de expresión de citocina proinflamatoria en un sujeto al que no se le administró gelsolina pero que es de otro modo idéntico al sujeto tratado. Los métodos para medir los niveles de citocina proinflamatoria son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. Una citocina proinflamatoria preferida es IL-1 β . Otra citocina proinflamatoria preferida es IFN- α .

20 Se proporciona un método para disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias *in vitro*. El método implica poner en contacto una célula capaz de expresar una citocina proinflamatoria con una cantidad suficiente de gelsolina para disminuir el nivel de expresión de citocinas proinflamatorias en la célula. En general, la expresión de una citocina proinflamatoria se disminuye en al menos aproximadamente 10% con respecto al control. En general, el nivel de una expresión de citocina proinflamatoria en un control es aquel nivel de expresión en una célula que no está en contacto con gelsolina pero que se ha tratado de otro modo idénticamente a la célula que se ha puesto en contacto con gelsolina.

25 La expresión de citocinas proinflamatorias se puede disminuir al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 99% con respecto al control. La expresión de citocina proinflamatoria se disminuye en 100% con respecto al control. Los métodos para medir los niveles de citocina proinflamatoria son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

30 El período de tiempo en el que se disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias es, al menos en parte, una función del tipo celular y de la vasija de cultivo específica usada. En general, este período de tiempo oscila de 2-3 horas (para disminución a corto plazo) a alrededor de 2-3 días (para disminución a medio plazo) hasta varias semanas (para disminución a largo plazo). Se pueden usar procedimientos habituales conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica para determinar el nivel de expresión de citocinas proinflamatorias como una función de dosis crecientes de gelsolina o tiempo de incubación creciente de las células con gelsolina.

35 Se proporciona un método para tratar un sujeto para reducir el riesgo de una infección. El método comprende seleccionar un sujeto en base a que se sabe que el sujeto tiene un nivel por debajo de lo normal de gelsolina, y administrar al sujeto un agente para reducir el riesgo de una infección en una cantidad eficaz para disminuir el riesgo del sujeto de desarrollar una infección. El agente puede ser gelsolina y/o un agente antiinfeccioso. El sujeto puede estar de otro modo libre de indicaciones que necesiten tratamiento con gelsolina.

40 Un "nivel por debajo del normal de gelsolina" es un nivel de gelsolina al menos 10% menor que el nivel medio medido para una población dada de sujetos. El nivel medio de gelsolina puede depender de la población particular de sujetos. Por ejemplo, una población aparentemente sana tendrá un intervalo "normal" diferente de gelsolina que la que tendrá una población de sujetos que ha tenido una infección previa u otra afección. El nivel de gelsolina puede ser al menos 10% menor que el nivel medio medido para una población dada de sujetos. El nivel de gelsolina puede ser al menos 20% menor que el nivel medio medido para una población dada de sujetos. El nivel de gelsolina puede ser al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% menor que el nivel medio medido para una población dada de sujetos.

45 El nivel de gelsolina puede estar por debajo de alrededor de 2,4 μ M/l (micromoles/litro) de plasma.

50 El sujeto puede estar de otro modo libre de indicaciones que necesiten tratamiento con el agente. Cuando el agente es un agente antiinfeccioso, un sujeto libre de indicaciones que necesite tratamiento con un agente antiinfeccioso es un sujeto que no tiene signos o síntomas de una infección. Los signos y síntomas de una infección son bien conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. La gelsolina está indicada para el tratamiento de trastornos relacionados con actina, tal como síndrome disneico del adulto (ARDS), necrosis hepática fulminante, insuficiencia renal aguda, lesión muscular, trastornos caracterizados por niveles elevados de BUN y/o creatinina. Los trastornos relacionados con actina son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

El sujeto puede estar aparentemente sano. Como se usa aquí, un “sujeto aparentemente sano” es un sujeto que no tiene signos y/o síntomas de una enfermedad.

La infección puede estar provocada por uno o más de un número de organismos, tales como una bacteria, un virus, un hongo, o un parásito.

- 5 El agente antiinfeccioso puede ser un agente antibacteriano, un agente antivírico, un agente antifúngico, o un agente antiparasitario.

Los ejemplos de agentes antibacterianos, agentes antivíricos, agentes antifúngicos, y agentes antiparasitarios se enumeran más abajo.

- 10 La gelsolina se puede administrar oralmente, sublingualmente, bucalmente, intranasalmente, intravenosamente, intramuscularmente, intratecalmente, intraperitonealmente, subcutáneamente, intradérmicamente, tópicamente, rectalmente, vaginalmente, intrasinovalmente, o intravítreamente.

- 15 Se proporciona un método para evaluar la eficacia de una terapia con un agente terapéutico distinto de una gelsolina para tratar o prevenir una infección. El método implica obtener un nivel de una gelsolina en un sujeto bajo la terapia para tratar o prevenir una infección. El nivel de la gelsolina se compara con un valor predeterminado que corresponde a un nivel de control de gelsolina (por ejemplo, en una población aparentemente sana). Una determinación de si el nivel de la gelsolina está por debajo del nivel predeterminado es indicativa de si la terapia es eficaz. En algunas realizaciones, la obtención de un nivel de la gelsolina se repite para monitorizar el nivel de la gelsolina del sujeto humano a lo largo del tiempo.

- 20 Se proporciona un método para decidir sobre el curso de una terapia en un sujeto. El método implica obtener un nivel de gelsolina en un sujeto bajo una terapia para tratar una infección. El nivel de gelsolina se compara con un valor predeterminado que corresponde a un nivel de control de gelsolina (por ejemplo, en una población aparentemente sana). Se determina si el nivel de gelsolina obtenido está por encima o por debajo del nivel predeterminado, y se decide el curso de la terapia basándose en tal determinación. La obtención de un nivel de gelsolina se puede repetir para monitorizar el nivel de gelsolina del sujeto a lo largo del tiempo.

- 25 Se proporciona un método para tratar un sujeto con un nivel reducido de gelsolina. El método implica tratar el sujeto con una primera terapia para tratar una infección. Se obtiene un nivel de gelsolina en el sujeto. El nivel de gelsolina se compara con un valor predeterminado que corresponde a un nivel de control de gelsolina (por ejemplo, en una población aparentemente sana). Si no se alcanza el nivel predeterminado de gelsolina, el sujeto se trata con una segunda terapia para tratar una infección, y se mide el nivel de gelsolina y se compara con el nivel predeterminado de la gelsolina hasta que se alcanza el nivel predeterminado de la gelsolina.

- 30 Se proporciona un método para caracterizar un perfil de riesgo del sujeto de desarrollar una infección futura. El método comprende obtener un nivel de gelsolina en el sujeto y comparar el nivel del marcador con un valor predeterminado. El perfil de riesgo del sujeto de desarrollar una infección se caracteriza basándose en el nivel de gelsolina en comparación con el valor predeterminado. Un nivel de gelsolina por debajo del nivel predeterminado es indicativo de que el sujeto está en un riesgo elevado de desarrollar una infección, y un nivel de gelsolina por encima del nivel predeterminado es indicativo de que el sujeto no está en un riesgo elevado de desarrollar una infección.

El valor predeterminado puede ser alrededor de 2,4 $\mu\text{M/l}$ de plasma o inferior.

El sujeto puede ser un sujeto aparentemente sano.

Las figuras son solamente ilustrativas y no son necesarias para permitir la invención descrita aquí.

- 40 La Figura 1 es una gráfica de los niveles plasmáticos de gelsolina en ratones sépticos. (A) Se inyectaron a ratones con dosis crecientes de LPS no letal de forma intraperitoneal (IP), y después se sangraron 24 horas más tarde. El nivel de pGSN se correlacionó de forma inversa con las dosis de LPS ($P < 0,05$, correlación de Spearman). Por el contrario, la albúmina no cambió. (B) Los ratones se sometieron a CLP (ligación y punción cecal), o no se les sometió a cirugía, y el plasma se recogió 24 horas más tarde. La gráfica de la izquierda muestra que los niveles de pGSN de ratones sometidos a CLP fueron significativamente menores que los ratones del control ($P < 0,001$), mientras que la gráfica de la derecha muestra que niveles plasmáticos de albúmina fueron realmente mayores en ratones con CLP ($P = 0,02$).

- 45 La Figura 2 es una gráfica de supervivencia en ratones sépticos. (A) En ratones expuestos a LPS letal, aquellos tratados con pGSN tuvieron una supervivencia significativamente mejor en comparación con ratones tratados con BSA ($P < 0,001$) o con disolución salina ($P < 0,001$). (B) Los ratones sometidos a CLP tuvieron una respuesta favorable similar a pGSN y tuvieron una supervivencia mucho mejor ($P = 0,001$).

- 50 La Figura 3 es una gráfica de los niveles de pGSN en ratones con endotoxemia letal tratados con o sin pGSN exógena. Las barras en blanco representan ratones que recibieron tratamiento con disolución salina, y las barras en negro representan ratones que recibieron tratamiento con pGSN exógena. Los niveles de pGSN

endógenos cayeron hasta cerca del 50% del normal en 6 horas de exposición a LPS letal, y persistieron durante al menos 24 horas (*P < 0,015, en comparación con ratones no expuestos). La administración de pGSN exógena en el momento de la exposición a LPS elevó con éxito los niveles de pGSN (**P < 0,021, en comparación con ratones tratados con pGSN y ratones no tratados dentro del mismo grupo).

5 La Figura 4 es una gráfica de los perfiles de citocina de ratones con endotoxemia tratados con o sin pGSN a 6 h y 24 h después de LPS (eje y en la escala logarítmica). (A) Los perfiles de citocina no difirieron entre ratones tratados con pGSN (barras negras) y ratones no tratados (barras blancas) 6 horas después de la exposición a LPS. (B) Sin embargo, 24 horas después de LPS, los ratones tratados con disolución salina tuvieron niveles significativamente mayores de GM-CSF, IFN- γ , e IL-1 β (P < 0,03 para todos), tanto como 10 veces en comparación con ratones tratados con pGSN. Por el contrario, el nivel de IL-10 fue significativamente mayor en ratones tratados con pGSN (P < 0,03).

15 La Figura 5 es una gráfica de los niveles plasmáticos de gelsolina en ratones C3H/HeJ expuestos a LPS de *E. coli* y no expuestos. LPS no tuvo ningún efectos sobre los niveles de pGSN de mutantes TLR4. Los ratones C3H/HeJ inyectados con LPS que fue letal para ratones C57BL/6 no mostraron signos de enfermedad, y tuvieron niveles de pGSN inalterados.

La Figura 6 es un análisis de transferencia Western, con tinción para pGSN, sobre extractos tisulares de ratones expuestos con o sin LPS. La transferencia muestra que el pulmón tuvo la concentración más elevada de pGSN en comparación con el músculo esquelético, corazón, riñón e hígado, tanto en ratones normales como endotoxémicos.

20 La Figura 7 es una gráfica que compara la unión a LPS de pGSN frente a BSA. El estudio de unión basado en fluorescencia de pGSN y LPS muestra una curva de unión clásica de LPS fluorescente que alcanza una meseta a 250 μ g/pocillo de pGSN. La proteína BSA, que sirve como control, mostró afinidad mínima por LPS.

25 La Figura 8 es una gráfica de los niveles de TNF- α de medios procedentes de células THP-1 tratadas sin LPS (no estimuladas), con LPS solamente, con pGSN solamente, con LPS y pGSN, con LPS y BSA, y con BSA solamente. Las células THP-1 estimuladas con LPS tratadas con pGSN o BSA tuvieron niveles de TNF- α similares (P > 0,05).

30 La presente descripción se basa, en parte, en el descubrimiento de que la administración de gelsolina protege a un sujeto de una infección. De este modo, la descripción incluye administrar gelsolina a un sujeto para el tratamiento de infección en el sujeto. Se ha descubierto que gelsolina antagoniza los efectos tóxicos de la endotoxina lipopolisacárido (LPS), el material de la pared celular de bacterias gramnegativas que se sabe que es el responsable de muchas de las manifestaciones de la infección de bacterias gramnegativas. También se descubrió que la administración de gelsolina a un sujeto tras la exposición del sujeto a una infección puede tratar una infección y puede reducir o prevenir los efectos tóxicos de la infección en el sujeto. Preferiblemente, el tratamiento de una infección implica el tratamiento de los signos y síntomas de la infección.

35 El término "tratamiento" o "tratar" pretende incluir la profilaxis, mejora, prevención o cura de infecciones.

Como se usa aquí, el término "sujeto" significa cualquier mamífero que puede necesitar tratamiento. Los sujetos incluyen, pero no se limitan a: seres humanos, primates no humanos, gatos, perros, ovejas, cerdos, caballos, vacas, roedores tales como ratones, hámsters, y ratas. Los sujetos preferidos son sujetos humanos.

40 Como se usa aquí, el término "gelsolina" engloba gelsolina de tipo salvaje (número de acceso GenBank: X04412), isoformas, análogos, variantes, fragmentos o derivados funcionales de gelsolina. Gelsolina engloba gelsolina nativa así como gelsolina sintética y recombinante, y análogos de gelsolina. La gelsolina, específicamente cGSN, es una proteína secretora abundante (Yin, H. L., Kwiatkowski, D. J., Mole, J. E. y Cole, F. S. (1984) J Biol Chem 259, 5271-6). La forma exportada de gelsolina, pGSN, tiene 25 aminoácidos adicionales, y se origina a partir del ajuste alternativo de un solo gen (Kwiatkowski, D. J., Stossel, T. P., Orkin, S. H., Mole, J. E., Colten, H. R. y Yin, H. L. (1986) Nature 323, 455-8). En los diferentes aspectos y realizaciones de la invención, se prefiere el uso de pGSN.

45 Un "análogo de gelsolina" se refiere a un compuesto sustancialmente similar en función a la gelsolina nativa o a un fragmento de la misma. Los análogos de gelsolina incluyen secuencias de aminoácidos biológicamente activas sustancialmente similares a las secuencias de gelsolina, y pueden tener secuencias sustituidas, suprimidas, alargadas, reemplazadas, o de otro modo modificadas, que poseen bioactividad sustancialmente similar a la de la gelsolina. Por ejemplo, un análogo de gelsolina es aquel que no tiene la misma secuencia de aminoácidos que la gelsolina pero que es suficientemente homólogo a gelsolina para retener la bioactividad de gelsolina. La bioactividad se puede determinar, por ejemplo, determinando las propiedades del análogo de gelsolina y/o determinando la capacidad del análogo de gelsolina para reducir o prevenir los efectos de una infección. Un ejemplo de ensayo de bioactividad de gelsolina es la capacidad de la gelsolina para estimular la nucleación de la actina. Los ensayos de bioactividad de la gelsolina se describen en el Ejemplo, y son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

55 Un "fragmento" incluye cualquier porción de una molécula de gelsolina que proporciona un segmento de gelsolina que mantiene la bioactividad de gelsolina; la expresión incluye fragmentos de gelsolina que proceden de cualquier

fuelle, tal como, por ejemplo, secuencias peptídicas de origen natural, secuencias peptídicas sintéticas o sintetizadas químicamente, y secuencias peptídicas manipuladas genéticamente mediante ingeniería.

Una "variante" de gelsolina se refiere a un compuesto sustancialmente similar en estructura y bioactividad a gelsolina nativa, o a un fragmento de la misma.

- 5 Un "derivado funcional" de gelsolina es un derivado que posee una bioactividad que es sustancialmente similar a la bioactividad de gelsolina. Por "sustancialmente similar" se quiere decir una actividad que es cuantitativamente diferente pero cualitativamente la misma. Por ejemplo, un derivado funcional de gelsolina podría contener la misma cadena principal de aminoácidos que la gelsolina, pero también contiene otras modificaciones tales como modificaciones post-traduccionales tales como, por ejemplo, fosfolípidos unidos, o hidrato de carbono enlazado
- 10 covalentemente, dependiendo de la necesidad de tales modificaciones para el comportamiento del ensayo de diagnóstico o tratamiento terapéutico. Como se usa aquí, el término también incluye un derivado químico de gelsolina. Tales derivados pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica, etc., de la gelsolina. Los derivados también pueden disminuir la toxicidad de la gelsolina, o eliminar o atenuar cualquier efecto secundario indeseable de la gelsolina, etc. Los derivados, y específicamente restos químicos, capaces de mediar tales efectos se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (1980). Los procedimientos para acoplar tales restos a una molécula tal como gelsolina son bien conocidos en la técnica. La expresión "derivado funcional" pretende incluir los "fragmentos", "variantes", "análogos", o "derivados químicos" de gelsolina.
- 15

Se describen métodos para tratar una infección en un sujeto.

- 20 Los métodos implican administrar gelsolina a un sujeto para tratar la infección. Se sabe que el sujeto tiene, se sospecha que ha estado expuesto, o que está en riesgo de estar expuesto, o que se ha expuesto a una infección. La gelsolina se administra en una cantidad eficaz para tratar la infección en el sujeto.

Una respuesta a un método de tratamiento se puede medir, por ejemplo, determinando los efectos fisiológicos del tratamiento, tal como la disminución o falta de síntomas tras la administración del tratamiento.

- 25 Una "infección" o "enfermedad infecciosa", como se usa aquí, se refiere a un trastorno que surge de la invasión de un hospedante, superficial, local o sistémicamente, por un organismo infeccioso. Los organismos infecciosos incluyen bacterias, virus, parásitos, hongos, y protozoos.
- 30

- Las bacterias incluyen bacterias gramnegativas y grampositivas. Los ejemplos de bacterias grampositivas incluyen especie de Pasteurella, especie de Staphylococcus, incluyendo Staphylococcus aureus, especie de Streptococcus, incluyendo Streptococcus pyogenes grupo A, Streptococcus viridans grupo, Streptococcus agalactiae grupo B, Streptococcus bovis, especie de Streptococcus anaerobia, Streptococcus pneumoniae, y Streptococcus faecalis, especie de Bacillus incluyendo Bacillus anthracis, especie de Corynebacterium incluyendo Corynebacterium diphtheriae, especie de Corynebacterium aerobia, y especie de Corynebacterium anaerobia, especie de Diphtheroids, especie de Listeria incluyendo Listeria monocytogenes, especie de Erysipelothrix incluyendo Erysipelothrix rhusiopathiae, especie de Clostridium incluyendo Clostridium perfringens, Clostridium tetani, y Clostridium difficile.
- 35

- Las bacterias gramnegativas incluye especie de Neisseria incluyendo Neisseria gonorrhoeae y Neisseria meningitidis, especie de Branhamella incluyendo Branhamella catarrhalis, especie de Escherichia incluyendo Escherichia coli, especie de Enterobacter, especie de Proteus incluyendo Proteus mirabilis, especie de Pseudomonas incluyendo Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas mallei, y Pseudomonas pseudomallei, especie de Klebsiella incluyendo Klebsiella pneumoniae, especie de Salmonella, especie de Shigella, especie de Serratia, especie de Acinetobacter; especie de Haemophilus incluyendo Haemophilus influenzae y Haemophilus ducreyi, especie de Brucella, especie de Yersinia, incluyendo Yersinia pestis y Yersinia enterocolitica, especie de Francisella, incluyendo Francisella tularensis, especie de Pasteurella, incluyendo Pasteurella multocida, Vibrio cholerae, especie de Flavobacterium, meningosepticum, especie de Campylobacter incluyendo Campylobacter jejuni, especie de Bacteroides (oral, faríngea), incluyendo Bacteroides fragilis, especie de Fusobacterium, incluyendo Fusobacterium nucleatum, Calymmatobacterium granulomatis, especie Streptobacillus, incluyendo Streptobacillus moniliformis, especie de Legionella, incluyendo Legionella pneumophila.
- 40
- 45

Otros tipos de bacterias incluyen bacilos resistentes a ácidos, espiroquetas, y actinomicetos.

- 50 Los ejemplos de bacilos resistentes a ácidos incluyen especie de Mycobacterium, incluyendo Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium leprae.

Los ejemplos de espiroquetas incluyen especie de Treponema, incluyendo Treponema pallidum, Treponema pertenue, especie de Borrelia incluyendo Borrelia burgdorferi (enfermedad de Lyme), y Borrelia recurrentis, y especie de Leptospira.

- 55 Los ejemplos de actinomicetos incluyen: especie de Actinomyces, incluyendo Actinomyces israelii, y especie de Nocardia, incluyendo Nocardia asteroides.

Los ejemplos de virus incluyen, pero no se limitan a: Retrovirus, virus de la inmunodeficiencia humana, incluyendo HIV-1, HDTV-III, LAVE, HTLV-III/LAV, HIV-III, HIV-LP, citomegalovirus (CMV), picornavirus, virus de la polio, virus de la hepatitis A, enterovirus, virus de Coxsackie humana, rinovirus, ecovirus, calcivirus, togavirus, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola, flavivirus, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla, coronavirus, rabdovirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, filovirus, virus del Ébola, Paramixovirus, virus de la parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio (RSV), Ortomixovirus, virus de la gripe, Bungavirus, virus de Hantaan, flevovirus o virus de Nairo, virus Arena, virus de la fiebre hemorrágica, reovirus, orbivirus, rotavirus, birnavirus, hepadnavirus, virus de la hepatitis B, parvovirus, Papovaviridae, virus del papiloma, virus del polioma, Adenovirus, virus del herpes, incluyendo virus 1 y 2 del herpes simple, virus de varicela zóster, poxvirus, virus de la viruela, virus de la vacuna, Iridovirus, virus de la fiebre porcina africana, virus de la hepatitis delta, virus de la hepatitis no A, no B, hepatitis C, virus de Norwalk, astrovirus, y virus sin clasificar.

Los ejemplos de hongos incluyen, pero no se limitan a: especie de *Cryptococcus*, incluyendo *Cryptococcus neoformans*, especie de *Histoplasma*, incluyendo *Histoplasma capsulatum*, especie de *Coccidioides*, incluyendo *Coccidioides immitis*, especie de *Paracoccidioides*, incluyendo *Paracoccidioides brasiliensis*, especie de *Blastomyces*, incluyendo *Blastomyces dermatitidis*, especie de *Chlamydia*, incluyendo *Chlamydia trachomatis*, especie de *Candida*, incluyendo *Candida albicans*, especie de *Sporothrix*, incluyendo *Sporothrix schenckii*, especie de *Aspergillus*, y hongos de mucormicosis.

Otros organismos infecciosos incluyen parásitos. Los parásitos incluyen especie de *Plasmodio*, tal como especies de *Plasmodio* que incluyen *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, y *Plasmodium vivax* y *Toxoplasma gondii*. Los parásitos portados por la sangre y/o de los tejidos incluyen especie de *Plasmodio*, especie de *Babesia*, incluyendo *Babesia microti* y *Babesia divergens*, especie de *Leishmania*, incluyendo *Leishmania tropica*, especie de *Leishmania*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, especie de *Trypanosoma* incluyendo *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense* (enfermedad del sueño africano), y *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas).

Otros microorganismos médicamente relevantes se han descrito ampliamente en la bibliografía, por ejemplo véase C.G.A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Gran Bretaña 1983.

Se proporciona un método para aumentar la expresión de interleucina (IL) en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto gelsolina en una cantidad eficaz para aumentar la expresión de IL. El aumento de IL se puede medir determinando los efectos fisiológicos de la IL tras la administración de gelsolina. Los efectos fisiológicos de IL son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

Se proporciona un método para disminuir la expresión de una citocina proinflamatoria en un sujeto. El método comprende administrar gelsolina al sujeto en una cantidad eficaz para disminuir la expresión de citocina proinflamatoria. La disminución de citocinas proinflamatorias se puede medir determinando los efectos fisiológicos de citocinas proinflamatorias tras la administración de gelsolina. Los efectos fisiológicos de citocinas proinflamatorias son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

Otros ensayos son conocidos por un experto de pericia normal en la técnica, y se pueden emplear para medir el nivel de la respuesta.

Se proporciona un método para monitorizar un sujeto. El método implica obtener un nivel de gelsolina en un sujeto bajo terapia para tratar una infección. El nivel de gelsolina se compara con un nivel predeterminado que corresponde a un nivel de control de gelsolina (por ejemplo, en una población aparentemente sana). Una determinación de si el nivel de gelsolina está por debajo de un nivel predeterminado es indicativa de si el sujeto se beneficiaría de la terapia continuada con la misma terapia, o se beneficiaría de un cambio en la terapia. La obtención del nivel de gelsolina se puede repetir para monitorizar los niveles de gelsolina del sujeto a lo largo del tiempo. El sujeto puede haber estado bajo la terapia durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días.

El sujeto puede haber estado bajo la terapia durante al menos 1, 2, 3, 4 o más semanas.

Un cambio en la terapia con gelsolina se refiere a un incremento en la dosis de la gelsolina, un cambio de gelsolina a otro agente, la adición de otro agente al régimen terapéutico de gelsolina, o una combinación de los mismos.

Se proporciona un método para evaluar la eficacia de una terapia para tratar o reducir el riesgo de una infección. El método implica obtener un nivel de gelsolina en un sujeto bajo terapia para tratar o prevenir una infección. El nivel de gelsolina se compara con un valor predeterminado que corresponde a un nivel de control de gelsolina (por ejemplo, en una población aparentemente sana). Una determinación de si el nivel de gelsolina está por debajo de un nivel predeterminado es indicativa de si la terapia es eficaz. El sujeto puede haber estado bajo la terapia durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días. El sujeto humano puede haber estado bajo la terapia durante al menos 1, 2, 3, 4 o más semanas.

Se describe la medición de gelsolina para guiar tratamientos a fin de mejorar el resultado en los sujetos. Los niveles de gelsolina en terapia tienen valores predictivos para la respuesta a tratamientos de infecciones o septicemia. Los niveles de gelsolina en terapia son aditivos a agentes de predicción de la técnica anterior del resultado en las

infecciones.

5 Los sujetos que se beneficiarían de esto son sujetos que están bajo terapia para tratar o prevenir una infección (es decir, un sujeto “en terapia”). Un sujeto en terapia es un sujeto que ya se ha diagnosticado y está en el curso de tratamiento con una terapia para tratar una infección. La terapia puede ser cualquiera de los agentes terapéuticos citados aquí. La terapia también puede ser tratamientos no farmacéuticos.

La terapia puede ser aquella que aumenta los niveles de gelsolina.

La terapia puede ser una terapia con gelsolina. Los sujetos preferidos son sujetos humanos. El sujeto que más probablemente se beneficiará de esta invención es un sujeto humano en terapia y que tiene un nivel de gelsolina por debajo de alrededor de 2,4 $\mu\text{M/l}$ de plasma.

10 El sujeto puede haber tenido ya o ha tenido ya una infección. Un sujeto que tiene o ha tenido una infección bacteriana, vírica, fúngica, parasitaria o protozoica primaria (primera) puede estar en un riesgo elevado de una infección secundaria (segunda). El sujeto puede no haber tenido una infección primaria, pero está en riesgo elevado de tener una infección debido a que el sujeto tiene uno o más factores de riesgo para padecer una infección. Los factores de riesgo para una infección primaria incluyen: inmunosupresión, inmunodepresión, edad, trauma, quemaduras (por ejemplo, quemaduras térmicas), cirugía, cuerpos extraños, cáncer, neonatos, especialmente neonatos que nacieron prematuramente. El grado de riesgo de una infección depende de una multitud y de la gravedad o magnitud de los factores de riesgo que tiene el sujeto. Existen mapas de riesgo y algoritmos de predicción para evaluar el riesgo de una infección en un sujeto basándose en la presencia y gravedad de factores de riesgo.

20 Otros métodos para evaluar el riesgo de una infección en un sujeto son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

El sujeto puede haber tenido una infección primaria y tiene uno o más factores de riesgo adicionales.

25 El tratamiento preferido es gelsolina. La gelsolina se puede administrar sola, en una composición farmacéutica, o combinada con otros regímenes terapéuticos. La gelsolina y otro agente o agentes terapéuticos se pueden administrar simultánea o secuencialmente. Cuando los otros agentes terapéuticos se administran simultáneamente, se pueden administrar en la misma formulación o en formulaciones separadas, pero se administran al mismo tiempo. Los otros agentes terapéuticos se pueden administrar secuencialmente entre sí y con gelsolina cuando la administración de los otros agentes terapéuticos y de la gelsolina se espacia temporalmente. La separación en el tiempo entre la administración de estos compuestos puede ser cuestión de minutos, o puede ser mayor. Otros agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agente o agentes antiinfecciosos. Los ejemplos de agente o agentes antiinfecciosos incluyen: agente o agentes antibacterianos, agente o agentes virales, agente o agentes antifúngicos, o agente o agentes antiprotozoarios.

35 Las frases tales como “agente antiinfeccioso”, “agente antibacteriano”, “agente antiviral”, “agente antifúngico”, “agente antiparasitario” y “parasitocida” tienen significados bien consolidados para aquellos de pericia normal en la técnica, y se definen en textos médicos estándar. De forma breve, los agentes antibacterianos exterminan o inhiben el crecimiento o función de las bacterias. Los agentes antibacterianos incluyen antibióticos así como otros compuestos sintéticos o naturales que tienen funciones similares. Los antibióticos, típicamente, son moléculas de bajo peso molecular que se producen como metabolitos secundarios por las células, tales como microorganismos. En general, los antibióticos interfieren con una o más funciones o estructuras bacterianas que son específicas para el microorganismo y que no están presentes en células hospedantes.

40 Una gran clase de agentes antibacterianos son los antibióticos. Los antibióticos que son eficaces para exterminar o inhibir un amplio intervalo de bacterias se denominan como antibióticos de amplio espectro. Otros tipos de antibióticos son predominantemente eficaces frente a las bacterias de la clase grampositiva o gramnegativa. Estos tipos de antibióticos se denominan antibióticos de espectro estrecho. Otros antibióticos que son eficaces frente a un único organismo o enfermedad y no frente a otros tipos de bacterias se denominan antibióticos de espectro limitado. Los agentes antibacterianos se clasifican algunas veces basándose en su modo de acción principal. En general, los agentes antibacterianos son inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhibidores de la membrana celular, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la síntesis o función de ácidos nucleicos, e inhibidores competitivos.

50 Los agentes antibacterianos incluyen, pero no se limitan a, aminoglucósidos, agentes β -lactámicos, cefalosporinas, macrólidos, penicilinas, quinolonas, sulfonamidas, y tetraciclinas. Los ejemplos de agentes antibacterianos incluyen, pero no se limitan a: Acedapsona, Acetosulfona sódica, Alamecina, Alexidina, Amdinocilina Clavulanato potásico, Amdinocilina, Amdinocilina Pivoxilo, Amiciclina, Amifloxacina, Amifloxacina Mesilato, Amikacina, Sulfato de Amikacina, ácido aminosalicílico, aminosalicilato sódico, Amoxicilina, Amfomicina, Ampicilina, Ampicilina sódica, Apalcilina sódica, Apramicina, Aspartocina, Sulfato de Astromicina, Avilamicina, Avoparcina, Azitromicina, Azlocilina, Azlocilina sódica, Hidrocloruro de Bacampicilina, Bacitracina, Metileno Disalicilato de Bacitracina, Bacitracina de cinc, Bambermicinas, Benzoilpas cálcico, Beritromicina, Sulfato de Betamicina, Biapenem, Biniramicina, Hidrocloruro de Bifenamina, Bispiritona Magsulfex, Butikacina, Sulfato de Butirosina, Sulfato de Capreomicina, Carbadox,

Carbenicilina disódica, Carbenicilina Indanil Sodio, Carbenicilina Fenil Sodio, Carbenicilina potásica, Carumonam Sodio, Cefaclor, Cefadroxilo, Cefamandol, Cefamandol Nafato, Cefamandol sódico, Cefaparol, Cefatrizina, Cefazaflur Sodio, Cefazolina, Cefazolina sódica, Cefbuperazona, Cefdinir, Cefditoren Pivoxilo, Cefepima, Hidrocloruro de Cefepima, Cefetecol, Cefixima, Hidrocloruro de Cefmenoxima, Cefmetazol, Cefmetazol Sodio, Cefonicida Monosódica, Cefonicida sódica, Cefoperazona sódica, Ceforanida, Cefotaxima, Cefotaxima sódica, Cefotetan, Cefotetan disódico, Hidrocloruro de Cefotiam, Cefoxitina, Cefoxitina Sódica, Cefpimizol, Cefpimizol Sódico, Cefpiramida, Cefpiramida Sódica, Sulfato de Cefpiroma, Cefpodoxima Proxetilo, Cefprozilo, Cefroxadina, Cefsulodin Sódico, Ceftazidima, Ceftazidima sódica, Ceftibuten, Ceftizoxima sódica, Ceftriaxona sódica, Cefuroxima, Cefuroxima Axetilo, Cefuroxima Pivoxetilo, Cefuroxima sódica, Cefacetril sódico, Cefalexina, Hidrocloruro de Cefalexina, Cefaloglicina, Cefaloridina, Cefalotina sódica, Cefapirina sódica, Cefradina, Hidrocloruro de Cetociclina, Cetofenicol, Cloranfenicol, Palmitato de Cloranfenicol, Complejo de Pantotenato de Cloranfenicol, Succinato de Cloranfenicol sódico, Fosfanilato de Clorhexidina, Cloroxilenol, Bisulfato de Clortetraciclina, Hidrocloruro de Clortetraciclina, Clilastatina, Cinoxacina, Ciprofloxacina, Hidrocloruro de Ciprofloxacina, Cirolemicina, Claritromicina, Clavulanato potásico, Hidrocloruro de Clinafloxacin, Clindamicina, Clindamicina Dextrosa, Hidrocloruro de Clindamicina, Hidrocloruro de Palmitato de Clindamicina, Fosfato de Clindamicina, Clofazimina, Cloxacilina Benzatina, Cloxacilina sódica, Cloxiquina, Colistimetato, Colistimetato sódico, Sulfato de Colistina, Cumermicina, Comermicina sódica, Ciclacilina, Cicloserina, Dalfopristina, Dapsona, Daptomicina, Demeclociclina, Hidrocloruro de Demeclociclina, Demeciclina, Denofungina, Diaveridina, Dicloxacilina, Dicloxacilina sódica, Sulfato de Dihidroestreptomicina, Dipiritiona, Diritromicina, Doxiciclina, Doxiciclina cálcica, Doxiciclina Fosfatex, Doxiciclina Hiclato, Doxiciclina Monohidratada, Droxacina sódica, Enoxacina, Epicilina, Hidrocloruro de Epitetraciclina, Ertapenem, Eritromicina, Eritromicina Acistrato, Eritromicina Estolato, Eritromicina Etilsuccinato, Eritromicina Gluceptato, Eritromicina Lactobionato, Propionato de Eritromicina, Estearato de Eritromicina, Hidrocloruro de Etambutol, Etionamida, Fleroxacina, Floxacilina, Fludalanina, Flumequina, Fosfomicina, Fosfomicina Trometamina, Fumoxicilina, Cloruro de Furazolio, Tartrato de Furazolio, Fusidato sódico, Ácido Fusídico, Gatifloxacina, Genifloxacina, Sulfato de Gentamicina, Gloximonom, Gramicidina, Haloprogina, Hetacilina, Hetacilina potásica, Hexedina, Ibafloroxacina, Imipenem, Isoconazol, Isepamicina, Isoniazida, Josamicina, Sulfato de Kanamicina, Kitasamicina, Levofloxacina, Levofuraltadona, Levopropilicina potásica, Lexitromicina, Lincomicina, Hidrocloruro de Lincomicina, Linezolid, Lomefloxacina, Hidrocloruro de Lomefloxacina, Mesilato de Lomefloxacina, Loracarbef, Mafenida, Meclociclina, Sulfosalicilato de Meclociclina, Fosfato de Megalomicina potásica, Mequidox, Meropenem, Metaciclina, Hidrocloruro de Metaciclina, Metenamina, Hipurato de Metenamina, Mandelato de Metenamina, Meticilina sódica, Metioprím, Hidrocloruro de Metronidazol, Fosfato de Metronidazol, Mezlocilina, Mezlocilina sódica, Minociclina, Hidrocloruro de Minociclin, Hidrocloruro de Mirincamicina, Monensina, Monensina sódica, Hidrocloruro de Moxifloxacina, Nafcilina sódica, Nalidixato sódico, ácido nalidíxico, Natamicina, Nebramicina, Palmitato de Neomicina, Sulfato de Neomicina, Undecilenato de Neomicina, Sulfato de Netilmicina, Neutramicina, Nifuradeno, Nifuraldeazona, Nifuratel, Nifuratróna, Nifurazilo, Nifurimida, Nifurpirinol, Nifurquinazol, Nifurtiazol, Nitroxiclina, Nitrofurantoína, Nitromida, Norfloxacina, Novobiocina sódica, Ofloxacina, Ormetoprim, Oxacilina sódica, Oximonom, Oximonom sódico, ácido oxolínico, Oxitetraciclina, Oxitetraciclina cálcica, Hidrocloruro de Oxitetraciclina, Paldimicina, Paraclorofenol, Paulomicina, Pefloxacina, Mesilato de Pefloxacina, Penamecilina, Penicilina G Benzatina, Penicilina G Potásica, Penicilina G Procaína, Penicilina G sódica, Penicilina V, Penicilina V Benzatina, Penicilina V Hidrabamina, Penicilina V potásica, Pentizidona sódica, Aminosalicilato de fenilo, Piperacilina, Piperacilina sódica, Pirbenicilina sódica, Píridicilina sódica, Hidrocloruro de Pírlimicina, Hidrocloruro de Pivampicilina, Pamoato de Pivampicilina, Probenato de Pivampicilina, Sulfato de Polimixina B, Porfiromicina, Propikacina, Pirazinamida, Cinc Piritiona, acetato de Quindecamina, Quinupristina, Racefenicol, Ramoplanina, Ranimicina, Relomicina, Repromicina, Rifabutina, Rifametano, Rifamexilo, Rifamida, Rifampina, Rifapentina, Rifaximina, Rolitetraciclina, Nitrato de Rolitetraciclina, Rosaramicina, Butirato de Rosaramicina, Propionato de Rosaramicina, Fosfato de Rosaramicina sódica, Estearato de Rosaramicina, Rosoxacina, Roxarsona, Roxitromicina, Sanciclina, Sanfetrinem sódico, Sarmoxicilina, Sarpicilina, Escopafungina, Sisomicina, Sulfato de Sisomicina, Esparfloxacina, Hidrocloruro de Espectinomicina, Espiramicina, Hidrocloruro de Estalimicina, Estefimicina, Ticarcilina disódica estéril, Sulfato de estreptomicina, Estreptonicozida, Sulbactam sódico, Sulfabenz, Sulfabenzamida, Sulfacetamida, Sulfacetamida sódica, Sulfacitina, Sulfadiazina, Sulfadiazina sódica, Sulfadoxina, Sulfaleno, Sulfamerazina, Sulfameter, Sulfametazina, Sulfametizol, Sulfametoaxazol, Sulfamonometoxina, Sulfamoxol, Sulfanilato de Cinc, Sulfanitran, Sulfasalazina, Sulfasomizol, Sulfatiazol, Sulfazamet, Sulfisoxazol, Sulfisoxazol Acetilo, Sulfisoxazol Diolamina, Sulfomixina, Sulopenem, Sultamicilina, Suncilina sódica, Hidrocloruro de Talampicilina, Tazobactam, Teicoplanina, Hidrocloruro de Temafloxacina, Temocilina, Tetraciclina, Hidrocloruro de Tetraciclina, Complejo de Fosfato de Tetraciclina, Tetroxoprima, Tianfenicol, Tifencilina potásica, Ticarcilina Cresil Sodio, Ticarcilina disódica, Ticarcilina Monosódica, Tíclatona, Cloruro de Tídonio, Tobramicina, Sulfato de Tobramicina, Tosufloxacina, Trimetoprima, Sulfato de Trimetoprima, Trisulfapirimidinas, Troleandomicina, Sulfato de Trospectomicina, Trovafloxacina, Tíotricina, Vancomicina, Hidrocloruro de Vancomicina, Virginiamicina, Zorbamicina.

Los agentes antivirales se pueden aislar de fuentes naturales, o se pueden sintetizar, y son útiles para exterminar o inhibir el crecimiento o función de virus. Los agentes antivirales son compuestos que previenen la infección de células por virus o por replicación del virus en la célula. Hay varias etapas en el proceso de la infección viral que se pueden bloquear o inhibir mediante agentes antivirales. Estas etapas incluyen la adhesión del virus a la célula hospedante (inmunoglobulina o péptidos de unión), la pérdida de revestimiento del virus (por ejemplo adamantina), la síntesis o traducción del ARNm vírico (por ejemplo interferón), la replicación del ARN o ADN vírico (por ejemplo, análogos nucleotídicos), la maduración de nuevas proteínas del virus (por ejemplo inhibidores de proteasas), y el

brote y liberación del virus.

Los agentes antivirales útiles incluyen, pero no se limitan a: inmunoglobulinas, adamantina, interferones, análogos nucleotídicos, e inhibidores de proteasas. Los ejemplos específicos de antivirales incluyen, pero no se limitan a, Acemanano; Aciclovir; Aciclovir Sódico; Adefovir; Alovudina; Alvircept Sudotox; Hidrocloruro de Amantadina; Aranotina; Arildona; Mesilato de Ateviridina; Avridina; Cidofovir; Cipamfilina; Hidrocloruro de Citarabina; Mesilato de Delavirdina; Desciclovir; Didanosina; Disoxarilo; Edoxudina; Enviradeno; Enviroxima; Famciclovir; Hidrocloruro de Famotina; Fiacitabina; Fialuridina; Fosarilato; Foscarnet Sódico; Fosfonet Sódico; Ganciclovir; Ganciclovir Sódico; Idoxuridina; Ketoxal; Lamivudina; Lobucavir; Hidrocloruro de Memotina; Metisazona; Nevirapina; Penciclovir; Pirodávir; Ribavirina; Hidrocloruro de Rimantadina; Mesilato de Saquinavir; Hidrocloruro de Somantadina; Sorivudina; Statolon; Estavudina; Hidrocloruro de Tilorona; Trifluridina; Hidrocloruro de Valaciclovir; Vidarabina; Fosfato de Vidarabina; Fosfato de Vidarabina sódica; Viroxima; Zalcitabina; Zidovudina; y Zinviroxima.

Los análogos nucleotídicos son compuestos sintéticos que son similares a los nucleótidos, pero que tienen un grupo desoxirribosa o ribosa incompleto o anormal. Una vez que los análogos nucleotídicos están en la célula, se fosforilan, produciendo el trifosfato formado que compite con nucleótidos normales por la incorporación en el ADN o ARN vírico. Una vez que la forma de trifosfato del análogo nucleotídico se incorpora en la cadena de ácido nucleico en crecimiento, provoca una asociación irreversible con la polimerasa vírica, y de este modo la terminación de la cadena. Los análogos nucleotídicos incluyen, pero no se limitan a, aciclovir (usado para el tratamiento del virus del herpes simple y el virus de la varicela zóster), ganciclovir (útil para el tratamiento de citomegalovirus), idoxuridina, ribavirina (útil para el tratamiento del virus sincitial respiratorio), didesoxiinosina, didesoxicitidina, zidovudina (azidotimidina), imiquimod, y resiquimod.

Los interferones son citocinas que son segregadas por células infectadas por virus así como por células inmunes. Los interferones funcionan mediante la unión a receptores específicos en células adyacentes a las células infectadas, provocando el cambio en la célula que la protege de la infección del virus. El α - y β -interferón también inducen la expresión de moléculas del MHC de Clase I y Clase II sobre la superficie de células infectadas, dando como resultado una mayor presentación de antígenos para el reconocimiento de células inmunes del hospedante. Los interferones α y β están disponibles como formas recombinantes, y se han usado para el tratamiento de infección por hepatitis B y C crónica. A las dosis que son eficaces para la terapia antiviral, los interferones tienen graves efectos secundarios, tales como fiebre, malestar general y pérdida de peso.

Los agentes antifúngicos se usan para tratar infecciones fúngicas superficiales, así como infecciones fúngicas oportunistas y sistémicas primarias. Los agentes antifúngicos son útiles para el tratamiento y prevención de hongos infecciosos. Los agentes antifúngicos se clasifican algunas veces por su mecanismo de acción. Algunos agentes antifúngicos funcionan, por ejemplo, como inhibidores de la pared celular al inhibir la glucosa sintasa. Estos incluyen, pero no se limitan a, basiungina/ECB. Otros agentes antifúngicos funcionan desestabilizando la integridad de la membrana. Estos incluyen, pero no se limitan a, imidazoles, tales como clotrimazol, sertaconazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol, y voriconazol, así como FK 463, anfotericina B, BAY 38-9502, MK 991, pradimicina, UK 292, butenafina, y terbinafina. Otros agentes antifúngicos funcionan rompiendo la quitina (por ejemplo quitinasa) o inmunosupresión (crema 501).

Los agentes antiparasitarios exterminan o inhiben parásitos. Los ejemplos de agentes antiparasitarios, también denominados parasiticidas, útiles para la administración humana, incluyen, pero no se limitan a, albendazol, anfotericina B, benznidazol, bitionol, cloroquina HCl, fosfato de cloroquina, clindamicina, dehidroemetina, dietilcarbamazina, furoato de diloxanida, eflornitina, furazolidona, glucocorticoides, halofantrina, yodoquinol, ivennectina, mebendazol, mefloquina, antimonio de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol, niclosamida, nifurtimox, oxamniquina, paromomicina, isetionato de pentamidina, piperazina, praziquantel, fosfato de primaquina, proguanilo, pamoato de pirantel, pirimetanmina-sulfonamidas, pirimetanmina-sulfadoxina, quinacrina HCl, sulfato de quinina, gluconato de quinidina, espiramicina, estibogluconato sódico (gluconato de sodio antimonio), suramina, tetraciclina, doxiciclina, tiabendazol, tinidazol, trimetoprim-sulfametoxazol, y tripartamida, algunos de los cuales se usan solos o en combinación con otros.

Puede ser necesario para obtener un nivel de gelsolina en un sujeto. Este nivel se compara entonces con un valor predeterminado, en el que el nivel de gelsolina en comparación con el valor predeterminado es indicativo de la probabilidad de que el sujeto se beneficiará de la terapia continuada. El sujeto se puede caracterizar entonces en términos del beneficio neto probable a obtener a partir de un cambio en la terapia.

El nivel de gelsolina para el sujeto se puede obtener mediante cualquier método reconocido en la técnica. Típicamente, el nivel se determina midiendo el nivel del marcador en un fluido corporal, por ejemplo sangre, linfa, saliva, orina y similar. El nivel se puede determinar mediante ELISA, o inmunoensayos u otras técnicas convencionales para determinar la presencia del marcador. Los métodos convencionales incluyen enviar una muestra o muestras de un fluido corporal del sujeto a un laboratorio comercial para la medición. Los métodos para medir gelsolina se describen en el Ejemplo.

La presente descripción también implica comparar el nivel de gelsolina para el sujeto con un valor predeterminado. El valor predeterminado puede tomar una variedad de formas. Puede ser un único valor de corte, tal como una

mediana o media. Se puede establecer basándose en grupos comparativos, tales como, por ejemplo, en el caso en el que el riesgo en un grupo definido es doble del riesgo en otro grupo definido. Puede ser un intervalo, por ejemplo en el caso en el que la población ensayada se divide por igual (o desigualmente) en grupos, tales como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio y un grupo de riesgo elevado, o en cuartiles, siendo el cuartil más bajo los sujetos con el riesgo más elevado, y siendo el cuartil más alto los sujetos con el riesgo más bajo, o en terciles, siendo el tercil más bajo los sujetos con el riesgo más elevado, y siendo el tercil más elevado los sujetos con el riesgo más bajo.

El valor predeterminado puede depender de la población particular de sujetos seleccionada. Por ejemplo, una población aparentemente sana tendrá un intervalo "normal" diferente de gelsolina que la que tendrá una población cuyos sujetos han tenido una infección previa u otra afección. En consecuencia, los valores predeterminados seleccionados pueden tener en cuenta la categoría en la que caen los sujetos. Los intervalos y categorías apropiados se pueden seleccionar con una experimentación no más allá de la rutinaria por aquellos de pericia normal en la técnica.

El fluido corporal preferido es sangre. Un valor predeterminado preferido de gelsolina es alrededor de 2,4 $\mu\text{M/l}$ de plasma.

Un valor predeterminado importante de gelsolina es un valor que es el promedio de una población de sujetos sanos (es decir, sujetos que no tienen signos ni síntomas de enfermedad). Por supuesto, el valor predeterminado dependerá de las características de la población de sujetos en la que se encuentra el sujeto. A la hora de caracterizar el riesgo, se pueden establecer numerosos valores predeterminados.

Actualmente, existen fuentes comerciales que producen reactivos para ensayos para gelsolina. Éstas incluyen, por ejemplo, Cytoskeleton (Denver, CO), Sigma (St. Louis, MO) y Calbiochem (San Diego, CA).

La descripción comprende además medir el nivel de gelsolina junto con un nivel de otro marcador de infección, tal como, por ejemplo, un nivel de glóbulos blancos (WBCs), para caracterizar un riesgo del sujeto de desarrollar una infección. Se obtiene un nivel de gelsolina en el sujeto. El nivel de gelsolina se compara con un valor predeterminado, para establecer un primer valor de riesgo. También se obtiene un nivel de WBCs en el sujeto. El nivel de los WBCs en el sujeto se compara con un segundo valor predeterminado, para establecer un segundo valor de riesgo. Entonces se caracteriza el perfil de riesgo del sujeto de desarrollar una infección basándose en la combinación del primer valor de riesgo y del segundo valor de riesgo, en el que la combinación del primer valor de riesgo y del segundo valor de riesgo establece un tercer valor de riesgo, diferente de los valores de riesgo primero y segundo.

El tercer valor de riesgo puede ser mayor que cualquiera de los valores de riesgo primero y segundo. Los sujetos preferidos para ensayar y predeterminar valores son como se describen anteriormente. La infección puede ser cualquier infección, tal como se describe anteriormente.

Se proporcionan métodos para determinar si un sujeto se beneficiará de la terapia continuada, o se beneficiará de un cambio en la terapia. El beneficio es típicamente una reducción en la tasa de aparición de una infección, o una recuperación más rápida a partir de una infección. La determinación de si un sujeto se beneficiará de la terapia continuada, o se beneficiará de un cambio en la terapia, es clínicamente útil. Un ejemplo de utilidad clínica de los métodos de esta descripción incluye identificar sujetos que tienen menos probabilidad o más probabilidad de responder a una terapia. Los métodos son también útiles para predecir o determinar que un sujeto se beneficiará de la terapia continuada o se beneficiará de un cambio en la terapia. Otro ejemplo de utilidad clínica, por ejemplo en el caso de sujetos humanos, incluye ayudar a los investigadores clínicos en la selección de ensayos clínicos de sujetos con una gran probabilidad de obtener un beneficio neto. Se espera que los investigadores clínicos usarán ahora la presente invención para determinar criterios de entrada para los ensayos clínicos.

Un sujeto que se beneficiará de la terapia continuada es un sujeto cuyo nivel de gelsolina en terapia alcanza un cierto valor predeterminado, o cuyo nivel de gelsolina está aumentando. Los valores predeterminados de gelsolina se describen anteriormente. Un sujeto que se beneficiará de un cambio en la terapia es un sujeto cuyo nivel de la gelsolina en terapia no alcanzó un cierto valor predeterminado, o cuyo nivel de gelsolina en terapia no está aumentando.

Como se usa aquí, un "cambio en la terapia" se refiere a un incremento o disminución en la dosis de la terapia existente, un cambio de una terapia a otra terapia, una adición de otra terapia a la terapia existente, o una combinación de los mismos. Un cambio de una terapia a otra puede implicar un cambio a una terapia con un perfil de riesgo elevado pero en la que la probabilidad del beneficio esperado aumenta. Las terapias preferidas pueden ser terapias que incrementan los niveles de gelsolina. Un sujeto que se beneficiará de un cambio en la terapia al aumentar la dosis de la terapia existente es un sujeto que, por ejemplo, estaba en la terapia pero no estaba recibiendo la dosis máxima tolerada o la dosis máxima permitida de la terapia, y cuyo nivel de gelsolina no alcanzó un cierto valor predeterminado. En tales casos, la dosis de la terapia existente se incrementa hasta que el nivel de gelsolina alcanza un cierto valor predeterminado. En algunos casos, la dosis de la terapia existente se incrementa desde la dosis existente hasta una dosis mayor, que no es la dosis máxima tolerada ni la dosis máxima permitida de

la terapia. En otros casos, la dosis se incrementa hasta la dosis máxima tolerada o hasta la dosis máxima permitida de la terapia. Un sujeto que se beneficiaría de un cambio en la terapia al disminuir la dosis de la terapia existente es, por ejemplo, un sujeto cuyo nivel de gelsolina en terapia alcanza o puede alcanzar un cierto valor predeterminado con una dosis más baja de la terapia.

5 Un sujeto que se beneficiaría de un cambio de una terapia a otra terapia es, por ejemplo, un sujeto que estaba en la dosis máxima tolerada o en la dosis máxima permitida de la terapia y cuyo nivel de gelsolina no alcanzó un cierto valor predeterminado. Otro ejemplo es un sujeto que no estaba en la dosis máxima tolerada o en la dosis máxima permitida de la terapia, pero que se determinó por el médico que muy probablemente se beneficiaría de otra terapia. Tales determinaciones se basan, por ejemplo, en el desarrollo en el sujeto de efectos secundarios indeseados en la
10 terapia inicial, o una falta de respuesta a la terapia inicial.

Un sujeto que se beneficiaría de un cambio en la terapia por la adición de otra terapia a la terapia existente es, por ejemplo, un sujeto que estaba en una terapia pero cuyo nivel de gelsolina no alcanzó un cierto valor predeterminado. En tales casos, se añade otra terapia a la terapia existente. La terapia que se añade a la terapia existente puede tener un mecanismo de acción diferente incrementando el nivel de gelsolina que la terapia existente. En algunos
15 casos, se puede usar una combinación de los cambios en terapia mencionados anteriormente.

La invención también proporciona métodos para determinar la eficacia de una terapia. La eficacia es típicamente la eficacia de la terapia a la hora de incrementar el nivel de gelsolina. Esto también se denomina algunas veces como respuesta positiva o respuesta favorable. La eficacia se puede determinar mediante un ensayo o ensayos en sangre de gelsolina para determinar si los niveles de gelsolina han aumentado como resultado de la terapia. En algunas
20 realizaciones, la determinación de la eficacia se basa en la eficacia de una terapia a la hora de incrementar tanto la gelsolina como los recuentos de WBCs normalizantes.

La medida de gelsolina se da en $\mu\text{M/l}$ (micromoles/litro), mg/dl (miligramos/decilitro), o mg/l (miligramos/litro).

Se proporcionan métodos para decidir sobre el curso de una terapia en un sujeto que está bajo terapia para tratar una infección. Tal curso de terapia se decide en base al nivel de gelsolina. Las terapias para tratar o reducir el riesgo
25 de una infección se describen anteriormente. El sujeto puede haber tenido ya una infección, o está en riesgo de tener una infección. Un sujeto que ha tenido una infección primaria (primera) está en un riesgo elevado de una infección secundaria (segunda) debido a la infección primaria. El sujeto puede estar en un riesgo elevado de una infección debido a que el sujeto tiene uno o más factores de riesgo para tener una infección. Los ejemplos de factores de riesgo para tener una infección se describen anteriormente. El sujeto que está en un riesgo elevado de
30 una infección puede ser un sujeto aparentemente sano. Un sujeto aparentemente sano es un sujeto que no tiene signos o síntomas de enfermedad.

Estos métodos tienen implicaciones importantes para el tratamiento de pacientes, y también para el desarrollo clínico de nuevas terapias. También se espera que los investigadores clínicos usarán ahora los presentes métodos para determinar criterios de entrada para sujetos humanos en ensayos clínicos. Los médicos y sanitarios seleccionan regímenes terapéuticos para el tratamiento basándose en el beneficio neto esperado para el sujeto. El beneficio neto deriva de la relación riesgo a beneficio. Esto permite la determinación de si un sujeto se beneficiará de la terapia continuada o si se beneficiará de un cambio en la terapia, ayudando de este modo al médico a
35 seleccionar una terapia.

La cantidad de un tratamiento se puede variar, por ejemplo, incrementando o disminuyendo la cantidad de gelsolina o agente farmacológico o una composición terapéutica, cambiando la composición terapéutica administrada, cambiando la vía de administración, cambiando el tiempo de dosificación, etc. La cantidad eficaz variará con la infección o afección particular que se esté tratando, con la edad y estado físico del sujeto que se esté tratando, con la gravedad de la infección o afección, con la duración del tratamiento, con la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay), con la vía específica de administración, y los factores similares están dentro del conocimiento y experiencia
40 del personal sanitario. Por ejemplo, una cantidad eficaz dependerá del grado al que se ha expuesto un individuo o al que se ha visto afectado por exposición a la infección.

Una cantidad eficaz es una dosis del agente terapéutico suficiente para proporcionar un resultado médicamente deseable. Una cantidad eficaz también depende, por ejemplo, del grado al que un individuo tiene niveles anormalmente disminuidos de gelsolina. Se debería entender que los agentes terapéuticos se usan para tratar o
50 prevenir infecciones, esto es, se pueden usar profilácticamente en sujetos con riesgo de desarrollar una infección. De este modo, una cantidad eficaz es aquella cantidad que puede reducir el riesgo de, ralentizar, o quizás prevenir totalmente el desarrollo de una infección. Se reconocerá que cuando el agente terapéutico se usa en circunstancias agudas, se usa para prevenir uno o más resultados médicamente indeseables que surgen típicamente de tales efectos adversos.

55 Los factores implicados a la hora de determinar una cantidad eficaz son bien conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica, y se pueden abordar con una experimentación no más allá de la normal. Generalmente se prefiere que se use una dosis máxima de los agentes farmacológicos (solos o en combinación con otros agentes terapéuticos), esto es, la dosis segura más elevada según el juicio médico. Se entenderá por aquellos de pericia

normal en la técnica, sin embargo, que un paciente puede insistir en una menor dosis o dosis tolerable por razones médicas, razones fisiológicas, o por virtualmente cualesquiera otras razones.

La cantidad terapéuticamente eficaz de un agente farmacológico de la invención es aquella cantidad eficaz para tratar el trastorno, tal como una infección. En el caso de infecciones, la respuesta deseada es inhibir la progresión de la infección. Esto puede implicar solamente ralentizar la progresión de la infección temporalmente, aunque más preferiblemente, implica detener la progresión de la infección permanentemente. Esto se puede monitorizar mediante métodos de diagnóstico normales conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. La respuesta deseada al tratamiento de la infección también puede ser retrasar el comienzo o incluso prevenir el comienzo de la infección.

Los agentes farmacológicos usados son preferiblemente estériles, y contienen una cantidad eficaz de gelsolina para producir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un sujeto. Las dosis de los agentes farmacológicos administrados a un sujeto se pueden escoger según diferentes parámetros, en particular según el modo de administración usado y el estado del sujeto. Otros factores incluyen el período de tratamiento deseado. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear mayores dosis (o dosis eficazmente mayores mediante una vía de suministro diferente, más localizada) hasta el grado en que lo permita la tolerancia del paciente. La dosis de un agente farmacológico se puede ajustar por el médico o veterinario individual, particularmente en el caso de cualquier complicación. Una cantidad terapéuticamente eficaz varía típicamente de 0,01 mg/kg a alrededor de 1000 mg/kg, preferiblemente de alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 200 mg/kg, y muy preferiblemente de alrededor de 0,2 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o más días.

Aquellos de pericia normal en la técnica conocen diversos modos de administración que suministran eficazmente los agentes farmacológicos a un tejido, célula o fluido corporal deseado. Los métodos de administración se explican en otra parte en la solicitud.

Referencias estándar en la técnica (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore MD, 2001) proporcionan modos de administración y formulaciones para el suministro de diversas preparaciones y formulaciones farmacéuticas en vehículos farmacéuticos. Otros protocolos que son útiles para la administración de agentes farmacológicos serán conocidos por el experto de pericia normal en la técnica, en los que la cantidad de dosis, el calendario de administración, los sitios de administración, el modo de administración, y similar, varían con respecto a aquellos presentados aquí.

La administración de agentes farmacológicos a mamíferos distintos de seres humanos, por ejemplo con fines de ensayo o con fines terapéuticos veterinarios, se lleva a cabo en sustancialmente las mismas condiciones como se describen anteriormente. Se entenderá por el experto de pericia normal en la técnica que esta descripción es aplicable tanto a enfermedades humanas como animales. De este modo, esta descripción está destinada a ser usada en medicina de ganadería y veterinaria, así como en terapéutica humana.

Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos. Tales preparaciones pueden contener habitualmente sales, agentes tamponantes, conservantes, vehículos compatibles, y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden usar convenientemente sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sus sales farmacéuticamente aceptables, y no se excluyen del alcance de la invención. Tales sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. También, las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, de potasio o de calcio.

Un agente o composición farmacológica se puede combinar, si se desea con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa aquí, significa una o más cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes que son adecuadas para la administración a un ser humano. El término "vehículo" representa un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de ser mezclados con los agentes farmacológicos y entre sí, de una manera tal que no haya interacción que alteraría sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

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

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, y se

pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el agente activo con un vehículo, que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el compuesto activo con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

- 5 Las composiciones adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, comprimidos, pastillas, tabletas, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del compuesto activo (por ejemplo, gelsolina). Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos, tales como un jarabe, elixir, una emulsión, o un gel.

10 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener como excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir
15 agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico, o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Opcionalmente, las formulaciones orales también se pueden formular en disolución salina o tampones, es decir, EDTA, para neutralizar condiciones ácidas internas, o se pueden administrar sin ningún vehículo.

20 También se contemplan específicamente formas de dosificación oral del componente o componentes anteriores. El componente o componentes se pueden modificar químicamente de manera que el suministro oral del derivado sea eficaz. Generalmente, la modificación química contemplada es la unión de al menos un resto a la propia molécula del componente, en el que dicho resto permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) la captación en el torrente sanguíneo desde el estómago o intestino. También se desea el incremento en la estabilidad global del componente o componentes, y el incremento en el tiempo de circulación en el cuerpo. Los ejemplos de tales restos incluyen:
25 polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polialcohol vinílico, polivinilpirrolidona y poliprolina. Abuchowski y Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" en: Enzymes as Drugs, Hochenberg y Roberts, eds., Wiley-Interscience, Nueva York, NY, p. 367-383; Newmark, et al., 1982, J. Appl. Biochem. 4: 185-189. Otros polímeros que se podrían usar son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-trioxocano. Los preferidos para uso farmacéutico, como se indica anteriormente, son restos de polietilenglicol.

30 Para el componente (o derivado), la localización de la liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno, o el íleo), o el intestino grueso. Un experto en la técnica tiene formulaciones disponibles que no se disuelven en el estómago, aunque liberarán el material en el duodeno o en cualquier otra parte en el intestino. Preferiblemente, la liberación evitará los efectos perniciosos del entorno estomacal, ya sea mediante protección de gelsolina o mediante liberación del material biológicamente activo más allá del entorno estomacal, tal como en el
35 intestino.

Para asegurar una resistencia gástrica completa, es esencial un revestimiento impermeable a al menos pH 5,0. Los ejemplos de ingredientes inertes más habituales que se usan como revestimientos entéricos son acetato-trimelitato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, acetato-ftalato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, acetato-ftalato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S, y goma laca. Estos revestimientos se pueden usar como películas mixtas.
40

Un revestimiento o mezcla de revestimientos también se puede usar sobre comprimidos, que no están destinados para la protección frente al estómago. Esto puede incluir revestimientos de azúcar, o revestimientos que hacen al comprimido más fácil de tragar. Las cápsulas pueden consistir en una cubierta dura (tal como gelatina) para el suministro de la sustancia terapéutica seca, es decir, polvo; para formas líquidas, se puede usar una cubierta de
45 gelatina blanda. El material de cubierta de los saquitos podría ser almidón espeso u otro papel comestible. Para pastillas, tabletas, comprimidos moldeados o triturados de comprimidos, se pueden usar técnicas de masificación en húmedo.

La sustancia terapéutica puede incluirse en la formulación como múltiples partículas finas en forma de gránulos o peletes de tamaño de partículas de alrededor de 1 mm. La formulación del material para la administración de
50 cápsulas podría ser también como un polvo, tarugos ligeramente comprimidos, o incluso como comprimidos. La sustancia terapéutica se podría preparar mediante compresión.

Los colorantes y los agentes saborizantes se pueden incluir todos ellos. Por ejemplo, la gelsolina se puede formular (tal como mediante encapsulamiento de liposomas o microsferas) y después se puede encerrar adicionalmente en un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes saborizantes.

55 Se puede diluir o incrementar el volumen de la sustancia terapéutica con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir hidratos de carbono, especialmente manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. También se podrían usar ciertas sales inorgánicas como cargas, incluyendo trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro de sodio. Algunos diluyentes comercialmente disponibles son Fast-Flo,

Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

5 Los disgregantes se pueden incluir en las formulaciones de la sustancia terapéutica en una forma de dosificación sólida. Los materiales usados como disgregantes incluyen, pero no se limitan a, almidón, incluyendo el disgregante comercial basado en almidón, Explotab. Se pueden usar glicolato de almidón sódico, Amberlite, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato de sodio, gelatina, piel de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de los disgregantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Las gomas en polvo se pueden usar como disgregantes y como aglutinantes, y estos pueden incluir gomas en polvo tales como agar, Karaya o tragacanto. El ácido algínico y su sal de sodio también son útiles como disgregantes.

10 Los aglutinantes se pueden usar para mantener el agente terapéutico junto para formar un comprimido duro, e incluyen materiales de productos naturales tales como goma arábiga, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). La polivinilpirrolidona (PVP) y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) se podrían usar ambas en disoluciones alcohólicas para granular la sustancia terapéutica.

15 En la formulación de la sustancia terapéutica se puede incluir un agente contra la fricción, para evitar la pegajosidad durante el proceso de formulación. Se pueden usar lubricantes como una capa entre la sustancia terapéutica y la pared de la matriz, y estos pueden incluir, pero no se limitan a: ácido esteárico, incluyendo sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. También se pueden usar lubricantes solubles, tales como laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.

20 Se pueden añadir agentes de deslizamiento que pueden mejorar las propiedades de flujo del fármaco durante la formulación, y para ayudar al reordenamiento durante la compresión. Los agentes deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirógena y silicoaluminato hidratado.

25 Para ayudar a la disolución de la sustancia terapéutica en el entorno acuoso, se puede añadir un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y dioctilsulfonato de sodio. Se pueden usar detergentes catiónicos, y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que se podría incluir en la formulación como tensioactivos son lauromacrogol 400, polioxil 40 estearato, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso con sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación de gelsolina ya sea solos o como una mezcla en diferentes relaciones.

30 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar oralmente incluyen cápsulas de cierre a presión hechas de gelatina, así como cápsulas cerradas herméticamente blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de cierre a presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes.

35 También se pueden usar microesferas formuladas para la administración oral. Tales microesferas se han definido muy bien en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en dosis adecuadas para tal administración.

40 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o tabletas formuladas de manera convencional.

45 Para la administración mediante inhalación, los compuestos para uso según la presente invención se pueden suministrar convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol a partir de paquetes a presión o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de por ejemplo gelatina para uso en un inhalador o insuflador, que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

50 También se contempla aquí el suministro pulmonar de gelsolina. La gelsolina se suministra a los pulmones de un mamífero mientras inhala y atraviesa a lo largo del forro epitelial pulmonar hasta el torrente sanguíneo. Otros informes de moléculas inhaladas incluyen Adjei et al., 1990, *Pharmaceutical Research*, 7:565-569; Adjei et al., 1990, *International Journal of Pharmaceutics*, 63:135-144 (acetato de leuprolida); Braquet et al., 1989, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13 (supl. 5):143-146 (endotelina-1); Hubbard et al., 1989, *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, p. 206-212 (a1-antitripsina); Smith et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (a-1-proteinasa); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, March, (hormona del crecimiento humana recombinante); Debs et al., 1988, *J. Immunol.* 140:3482-3488 (interferón-γ y factor alfa necrosis tumoral) y Platz et al., patente U.S. nº 5.284.656 (factor estimulante de colonias de

granulocitos). En la patente U.S. nº 5.451.569, expedida el 19 de septiembre de 1995 a Wong et al, se describe un método y composición para el suministro pulmonar de fármacos para efecto sistémico.

Se contempla para uso en la práctica de esta descripción un amplio intervalo de dispositivos mecánicos diseñados para el suministro pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo, pero sin limitarse a, nebulizadores, inhaladores de dosis medida, e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para aquellos expertos en la técnica.

Algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles son: el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador de dosis medida Ventolín, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina; y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Todos los citados dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para dispensar gelsolina. Típicamente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado, y puede implicar el uso de un material propelente apropiado. Además de los diluyentes habituales, adyuvantes y/o vehículos útiles en terapia. También, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión, u otros tipos de vehículos. La gelsolina químicamente modificada también se puede preparar en diferentes formulaciones, dependiendo del tipo de modificación química o del tipo de dispositivo empleado.

Las formulaciones adecuadas para uso con un nebulizador, ya sea de chorro o ultrasónico, comprenderán típicamente gelsolina disuelta en agua a una concentración de alrededor de 0,1 a 25 mg de gelsolina biológicamente activa por ml de disolución. La formulación también puede incluir un tampón y un azúcar simple (*por ejemplo*, para estabilización de la gelsolina y regulación de la presión osmótica). La formulación del nebulizador también puede contener un tensioactivo, para reducir o prevenir la agregación de la gelsolina inducida por la superficie causada por atomización de la disolución a la hora de formar el aerosol.

Las formulaciones para uso con un dispositivo inhalador de dosis medida comprenderán generalmente un polvo finamente dividido que contiene la gelsolina suspendida en un propelente con la ayuda de un tensioactivo. El propelente puede ser cualquier material convencional empleado para este fin, tal como un clorofluorocarbono, un hidroc fluorocarbono, un hidrofluorocarbono, o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetano, y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o sus combinaciones. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico también puede ser útil como tensioactivo.

Las formulaciones para dispensación a partir de un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene gelsolina, y también puede incluir un agente para dar volumen, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa, o manitol, en cantidades que faciliten la dispersión del polvo desde el dispositivo, *por ejemplo* 50 a 90% en peso de la formulación. La gelsolina debería prepararse muy ventajosamente en forma de partículas, con un tamaño promedio de partículas menor que 10 mm (o micrómetros), muy preferiblemente 0,5 a 5 mm, para el suministro más eficaz al pulmón distante.

También se contempla el suministro nasal (o intranasal) de una composición farmacéutica. El suministro nasal permite el paso de una composición farmacéutica directamente al torrente sanguíneo tras administrar el producto terapéutico en la nariz, sin la necesidad de la deposición del producto en el pulmón. Las formulaciones para el suministro nasal incluyen aquellas con dextrano o ciclodextrano.

Para la administración nasal, un dispositivo útil es una botella dura pequeña a la que se une un pulverizador de dosis medida. La dosis medida se puede suministrar extrayendo la disolución de la composición farmacéutica a una cámara de volumen definido, cámara la cual tiene una abertura dimensionada para aerosolizar una formulación de aerosol al formar una pulverización cuando se comprime un líquido en la cámara. La cámara se comprime para administrar la composición farmacéutica de la presente invención. En una realización específica, la cámara es un montaje de pistón. Tales dispositivos están comercialmente disponibles.

Como alternativa, se usa una botella de plástico oprimible, con una abertura dimensionada para aerosolizar una formulación de aerosol mediante la formación de una pulverización cuando se oprime. La abertura se encuentra habitualmente en la parte superior de la botella, y la parte superior generalmente se estrecha para ajustarse parcialmente en los conductos nasales para la administración eficiente de la formulación de aerosol. Preferiblemente, el inhalador nasal proporcionará una cantidad medida de la formulación de aerosol, para la administración de una dosis medida del fármaco.

Los compuestos, cuando es deseable suministrarlos sistémicamente, se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección, *por ejemplo* mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, *por ejemplo* en ampollas, o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar

- como suspensiones oleosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones muy concentradas.
- 5 Como alternativa, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, *por ejemplo* agua libre de pirógenos estéril, antes del uso.
- 10 Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios o enemas de retención, *por ejemplo*, que contienen bases para supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.
- 15 Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de actuación prolongada se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados apenas solubles, por ejemplo como una sal apenas soluble.
- Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase de gel. Los ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles.
- 20 Las formas de preparación farmacéutica líquidas o sólidas adecuadas son, por ejemplo, disoluciones acuosas o salinas para inhalación, microencapsuladas, encocleadas, revestidas sobre partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, peletes para implantación en la piel, o secas sobre un objeto afilado para ser raspado en la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación se usan habitualmente como se describe anteriormente excipientes y aditivos y/o auxiliares tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes de hinchamiento, lubricantes, saborizantes, edulcorantes o solubilizantes. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para uso en una variedad de sistemas de suministro de fármacos. Para un breve repaso de métodos para el suministro de fármacos, véase Langer, Science 249:1527-1533, 1990.
- 25 30 La gelsolina y opcionalmente otras sustancias terapéuticas se pueden administrar *per se* o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.
- El agente o agentes terapéuticos, incluyendo específicamente pero sin limitarse a gelsolina, se pueden proporcionar en partículas. Partículas, como se usa aquí, significa nano o micropartículas (o en algunos casos más grandes) que pueden consistir en todo o en parte de gelsolina u otro agente o agentes terapéuticos como se describe aquí. Las partículas pueden contener el agente o agentes terapéuticos en un núcleo rodeado por un revestimiento, incluyendo, pero sin limitarse a, un revestimiento entérico. El agente o agentes terapéuticos también se pueden dispersar a lo largo de las partículas. El agente o agentes terapéuticos también se pueden adsorber en las partículas. Las partículas pueden ser de una cinética de liberación de cualquier orden, incluyendo liberación de orden cero, liberación de primer orden, liberación de segundo orden, liberación retrasada, liberación sostenida, liberación inmediata, y cualquier combinación de las mismas, etc. La partícula puede incluir, además del agente o agentes terapéuticos, cualquiera de aquellos materiales usados habitualmente en la técnica de farmacia y medicina, incluyendo, pero sin limitarse a, material erosionable, no erosionable, biodegradable, o no biodegradable, o sus combinaciones. Las partículas pueden ser microcápsulas que contienen la gelsolina en una disolución o en un estado semisólido. Las partículas pueden ser virtualmente de cualquier forma.
- 40 45 En la fabricación de partículas para suministrar el agente o agentes terapéuticos, se pueden usar materiales poliméricos tanto no biodegradables como biodegradables. Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona basándose en el período de tiempo a lo largo del cual se desea la liberación. Los polímeros bioadhesivos de particular interés incluyen hidrogeles bioerosionables descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak y J.A. Hubell en *Macromolecules*, (1993) 26:581-587.
- 50 Estos incluyen ácidos polihalurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, poliácido acrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo).
- 55 El agente o agentes terapéuticos pueden estar contenidos en sistemas de liberación controlada. La expresión "liberación controlada" pretende referirse a cualquier formulación que contiene un fármaco en la cual se controla la manera y perfil de liberación del fármaco a partir de la formulación. Esto se refiere a formulaciones de liberación inmediata así como no inmediata, incluyendo la formulación de liberación no inmediata, pero sin limitarse a, formulaciones de liberación sostenida y de liberación retrasada. La expresión "liberación sostenida" (también

denominada "liberación extendida") se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona liberación gradual de un fármaco durante un período de tiempo prolongado, y que preferiblemente, aunque no necesariamente, da como resultado niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco durante un período de tiempo prolongado. La expresión "liberación retrasada" se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco en la que hay un retraso de tiempo entre la administración de la formulación y la liberación del fármaco a partir de ella. "Liberación retrasada" puede implicar o no la liberación gradual del fármaco durante un período de tiempo prolongado, y de este modo puede ser o no una "liberación sostenida".

El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento de afecciones crónicas. La liberación "a largo plazo", como se usa aquí, significa que el implante se construye y dispone para suministrar niveles terapéuticos del ingrediente activo durante al menos 7 días, y preferiblemente 30-60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica, e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

También se contempla el uso de kits. El kit puede incluir un vial de preparación farmacéutica, un vial de diluyente de la preparación farmacéutica, y gelsolina. El vial que contiene el diluyente para la preparación farmacéutica es opcional. El vial del diluyente contiene un diluyente, tal como disolución salina fisiológica, para diluir lo que podría ser una disolución concentrada o polvo liofilizado de gelsolina. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para mezclar una cantidad particular del diluyente con una cantidad particular de la preparación farmacéutica concentrada, con lo que se prepara una formulación final para inyección o infusión. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para tratar un sujeto con una cantidad eficaz de gelsolina. También se entenderá que los recipientes que contienen las preparaciones, ya sea que el recipiente sea una botella, un vial con un tapón, una ampolla con un tapón, una bolsa de infusión, y similar, pueden contener etiquetas con texto, tales como marcas convencionales que cambian de color cuando la preparación se ha sometido a autoclave o se ha esterilizado de otro modo.

EJEMPLO

La septicemia está asociada con diversas anomalías bioquímicas, incluyendo agotamiento de gelsolina plasmática. Aunque la función real de la gelsolina plasmática no es conocida, los estudios clínicos y con animales han mostrado que el agotamiento de la gelsolina plasmática mediante lesión e inflamación se asocia con resultados adversos. Se examinó la gelsolina plasmática en ratones sépticos y se encontró que el agotamiento de la gelsolina plasmática se produce tras exposiciones sépticas, y que el agotamiento significativo va acompañado de septicemia mortal. La reposición de la gelsolina plasmática conduce a un perfil de citocina más favorable, y mejora la mortalidad. La gelsolina plasmática tiene un papel fisiológico en la inflamación sistémica, y la sustitución de gelsolina puede representar una nueva terapia para infecciones y septicemia.

La gelsolina, específicamente gelsolina citoplásmica (cGSN), descubierta por primera vez como una proteína de unión a actina intracelular implicada en la movilidad celular (Yin, H. L. y Stossel, T. P. (1979) *Nature* 281, 583-6), es también una proteína secretora abundante (Yin, H. L., Kwiatkowski, D. J., Mole, J. E. y Cole, F. S. (1984) *J Biol Chem* 259, 5271-6). La isoforma exportada de gelsolina, denominada gelsolina plasmática (pGSN), tiene 25 aminoácidos adicionales, y se origina a partir del ajuste alternativo de un único gen (Kwiatkowski, D. J., Stossel, T. P., Orkin, S. H., Mole, J. E., Colten, H. R. y Yin, H. L. (1986) *Nature* 323, 455-8). Aunque postulada como un "depurador de actina" (Lee, W. M. y Galbraith, R. M. (1992) *N Engl J Med* 326, 1335-41), la función biológica de pGSN es un misterio. La prevalencia de pGSN en organismos complejos, incluyendo *Drosophila* (Stella, M. C., Schauerte, H., Straub, K. L. y Leptin, M. (1994) *J Cell Biol* 125, 607-16), es consistente con su papel fisiológico importante. En seres humanos, el trauma, la hemólisis masiva, el síndrome disneico agudo (ARDS), el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), la insuficiencia hepática aguda, la mionecrosis, la pancreatitis y la septicemia pueden conducir al agotamiento de pGSN (Dahl, B., Schiodt, F. V., Ott, P., Gvozdenovic, R., Yin, H. L. y Lee, W. M. (1999) *Shock* 12, 102-4; Suhler, E., Lin, W., Yin, H. L. y Lee, W. M. (1997) *Crit Care Med* 25, 594-8; DiNubile, M. J., Stossel, T. P., Ljunghusen, O. C., Ferrara, J. L. y Antin, J. H. (2002) *Blood* 100,4367-71; y Lind, S. E., Smith, D. B., Janmey, P. A. y Stossel, T. P. (1988) *Am Rev Respir Dis* 138, 429-34). Además, en pacientes con trauma y en receptores de HSCT, niveles más bajos de pGSN predicen una mayor morbimortalidad (DiNubile, M. J., Stossel, T. P., Ljunghusen, O. C., Ferrara, J. L. y Antin, J. H. (2002) *Blood* 100, 4367-71; Mounzer, K. C., Moncure, M., Smith, Y. R. y Dinubile, M. J. (1999) *Am J Respir Crit Care Med* 160,1673-81).

En animales, las quemaduras y la lesión pulmonar aguda inducida por estrés oxidativo, la radiación y la hipoxia también producen agotamiento de pGSN (Rothenbach, P. A., Dahl, B., Schwartz, J. J., O'Keefe, G. E., Yamamoto, M., Lee, W. M., Horton, J. W., Yin, H. L. y Turnage, R. H. (2004) *J Appl Physiol* 96, 25-31; Christofidou-Solomidou, M., Scherpereel, A., Solomides, C. C., Christie, J. D., Stossel, T. P., Goelz, S. y DiNubile, M. J. (2002) *J Investig Med* 50, 54-60; y Christofidou-Solomidou, M., Scherpereel, A., Solomides, C. C., Muzykantov, V. R., Machtay, M., Albelda, S. M. y DiNubile, M. J. (2002) *Lung* 180, 91-104). La administración de pGSN a algunos de estos animales disminuye las lesiones (Rothenbach, P. A., Dahl, B., Schwartz, J. J., O'Keefe, G. E., Yamamoto, M., Lee, W. M., Horton, J. W., Yin, H. L. y Turnage, R. H. (2004) *J Appl Physiol* 96, 25-31; y Christofidou-Solomidou, M., Scherpereel, A., Solomides, C. C., Christie, J. D., Stossel, T. P., Goelz, S. y DiNubile, M. J. (2002) *J Investig Med* 50, 54-60).

Se teoriza que si la inflamación sistémica asociada con septicemia disminuye pGSN, la restauración de pGSN podría ser beneficiosa. Aquí, se muestra que los niveles de pGSN caen en ratones sometidos a endotoxemia o a peritonitis, y la repleción de pGSN conduce a una mejor supervivencia y al desplazamiento del perfil de citocinas en ratones sépticos.

5 Materiales y métodos

Animales

Se adquirieron ratones macho C57BL/6 de tipo salvaje de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Los ratones macho C3H/HeJ mutantes para el receptor 4 semejante a Toll (TLR4) se adquirieron del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). A los ratones se les dio acceso libre a pienso estándar y a agua, y todos los procedimientos y estudios descritos aquí han sido aprobados por el Harvard Medical Area Standing Committee on Animals según estándar como se expone en The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Respuesta a la dosis de LPS

A ratones C57BL/6 macho de 6-8 semanas, que pesan 18-20 g, se les inyectó intraperitonealmente (i.p.) con LPS (*Pseudomonas aeruginosa* Serotipo 10, de Sigma (St. Louis, MO) a dosis de 0, 10, 20, y 40 mg/kg en 100 μ l de disolución salina tamponada con fosfato (PBS), y se usaron 3-4 en cada grupo. 24 horas tras la administración de LPS, los animales se anestesiaron con 0,015-0,017 mg/g de avertina i.p. (Fluka Chemie, Buchs, Suiza). Entonces se recogió sangre mediante sangrado retroorbital en un volumen de 0,1 de disolución anticoagulante Aster-Jand1 (Gamulescu, M. A., Seifert, K., Tingart, M., Falet, H. y Hoffmeister, K. M. (2003) Platelets 14, 211-7) y se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos para generar plasma. El plasma se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

20 Septicemia murina por CLP (ligación y punción cecal)

En primer lugar, ratones C57BL/6 macho de 8-10 semanas se anestesiaron con 0,015-0,017 mg/g i.p. de avertina. El ciego de cada animal anestesiado se expuso a través de una pequeña incisión en el abdomen anterior inferior, y se pinchó mediante una aguja de calibre 19. Se extruyó una pequeña cantidad del contenido intestinal, y el ciego se ligó sin obstruir el conducto intestinal con sutura de seda 6-0. Después de volver a colocar los contenidos intestinales, el abdomen se cerró con una sutura de seda 4-0. Para el estudio del nivel de pGSN, los 5 animales recibieron 1 ml de PBS subcutáneamente inmediatamente después de la cirugía. Cinco animales que no sufrieron CLP sirvieron como controles. A los animales se les dejó recuperar con acceso libre a comida y agua. 24 horas después de la CLP, los animales se anestesiaron entonces y se recogió plasma como se describe anteriormente. Además, se recogieron el corazón, pulmones, hígado, riñones y músculos esqueléticos, y se congelaron a -80°C, de cada animal. Los pulmones se recogieron tras perfusión perforando en primer lugar el ventrículo derecho del corazón e inyectando 1 ml de PBS en el ventrículo izquierdo. Para el estudio de mortalidad, 20 animales se sometieron a CLP, y 10 animales recibieron inyecciones subcutáneas (s.c.) de 1 ml de 1) 150 mM de NaCl (disolución salina) o 2) 8 mg/ml de pGSN humana recombinante (Biogen, Boston, MA) con 0,4 mM de Ca en disolución salina inmediatamente y 24 horas después de CLP.

35 Mortalidad por LPS y citocinas plasmáticas

A ratones C57BL/6 macho de 6-8 semanas, que pesan 18-20 g, se les inyectó i.p. con 25 mg/kg de LPS (*Escherichia coli* O55:B5, St. Louis, Sigma), y se dividieron para recibir 400 μ l de inyección subcutánea dorsal de 1) pGSN: 20 mg/ml de pGSN humana recombinante con 1 mM de Ca en disolución salina (8 animales), 2) BSA: 20 mg/ml de seroalbúmina bovina (Serologicals, Norcross, GA) con 1 mM de Ca en disolución salina (9 animales), o 3) disolución salina: disolución salina estéril sola (9 animales), inmediatamente, y a 24, 48 y 72 horas tras las inyecciones de LPS. Los animales se monitorizaron frecuentemente, y la mortalidad se registró durante 7 días. Los ratones que sobrevivieron se eutanasiaron. En un experimento distinto, los ratones recibieron la misma exposición a LPS y se dividieron para recibir pGSN o tratamiento salino como se describió, y se sacrificaron para la recogida del plasma y de los órganos a 6 horas (5 ratones por grupo de tratamiento) y 24 horas (4 ratones por grupo de tratamiento) tras la exposición a LPS. Además, a los ratones del control sin exposición a LPS se les dio solamente s.c. disolución salina (5 ratones) o pGSN (3 ratones) 24 horas antes de ser sacrificados para la recogida de sangre y de órganos. El plasma y los órganos se recogieron de cada ratón como se describió.

pGSN en ratones resistentes a LPS

A ratones C3H/HeJ macho de 6-8 semanas, que pesan 19-20 g, se les inyectó i.p. con 25 mg/kg de LPS de *E. coli* (4 ratones), y los ratones no expuestos sirvieron como controles (4 ratones). 24 horas después de la exposición a LPS, se recogieron muestras de plasma a partir de ratones anestesiados como se describe anteriormente. El nivel de gelsolina se midió en cada muestra de plasma.

Medida de citocinas del ratón

Las citocinas GM-CSF, INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, y TNF- α plasmáticas se midieron usando ensayos ELISA (LINCO Research, St. Charles, MO). El intervalo más bajo del ensayo es \leq 3,2 pg/ml para cada citocina, y a los niveles \leq 3,2

pg/ml se les asignó un valor de cero.

Medidas de gelsolina y albúmina

La gelsolina plasmática se midió en muestras duplicadas mediante su capacidad para estimular la nucleación de actina (Janmey, P. A., Chaponnier, C., Lind, S. E., Zaner, K. S., Stossel, T. P. y Yin, H. L. (1985) *Biochemistry* 24, 3714-23). El plasma de ratón se diluyó 1:5 veces en 0,1 M de KCl, 0,2 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA, 0,5 mM de ATP, 0,5 mM de β-mercaptoetanol, 10 mM de tampón Tris-HCl, pH 7,4 (Tampón B). De la muestra plasmática diluida, se añadieron 5 μl a 280 μl de Tampón B suplementado con 1,5 mM de CaCl₂ y 0,4 μM de falacina en tubos de cultivo de borosilicato de 6 x 50 mm. La reacción de polimerización de actina se inició añadiendo 15 μl de 20 μM de actina pirénica en 0,5 mM de ATP, 5 mM de β-mercaptoetanol, 0,2 mM de CaCl₂, 0,2 mM de tampón Tris-HCl, pH 7,4 (Tampón A). La polimerización se monitorizó durante 200 segundos en un espectrofluorímetro a longitudes de onda de excitación y de emisión de 366 y 386 nm respectivamente. Las concentraciones de gelsolina se estimaron a partir de una curva patrón usando pGSN humana recombinante. La actina pirénica madre para estos ensayos, preparada mediante el método de Kouyama y Mihashi (Kouyama, T. y Mihashi, K. (1981) *Eur J Biochem* 114, 33-8), se almacenó a -80°C en lotes, se descongeló y se diluyó 10x con Tampón A, se centrifugó a 250.000 x g durante 30 minutos después de dejar reposar toda la noche.

La cuantificación de la gelsolina mediante el ensayo de nucleación de la actina se correlaciona bien con los niveles obtenidos a partir de medidas de transferencia Western (Mounzer, K. C., Moncure, M., Smith, Y. R. y Dinubile, M. J. (1999) *Am J Respir Crit Care Med* 160,1673-81). El ensayo es muy específico, como se evidencia por la actividad virtualmente cero en plasma de ratones sin gelsolina tratados con LPS (datos no mostrados); sin embargo, el ensayo no discrimina entre cGSN y pGSN. Tampoco es específico de la especie, y de este modo es capaz de aproximar los niveles de gelsolina total en ratones tratados con pGSN humana recombinante. Los lípidos que se complejan a pGSN no afectan a la actividad de nucleación de actina de pGSN (Janmey, P. A., Lida, K., Yin, H. L. y Stossel, T. P. (1987) *J Biol Chem* 262, 12228-36).

Los niveles de albúmina se midieron colorimétricamente usando un kit comercial (Stanbio, Boerne, TX) según las instrucciones del fabricante.

Extracción de proteínas a partir de órganos

Se analizaron los órganos recogidos 6 h después de haber sido expuestos a 25 mg/kg i.p. de LPS de *E. coli*, o a CLP. Los órganos procedentes de ratones no expuestos sirvieron como controles. Cada órgano se homogeneizó en tampón RIPA (Boston Bioproducts, Ashland, MA), suplementado con cóctel de inhibidor de proteínas (Calbiochem, La Jolla, CA) a una concentración 1:100, y ortovanadato de sodio, y se incubó en hielo durante 30 minutos antes de centrifugar a 2.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y se centrifugó nuevamente a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y se mantuvo a -80°C hasta el análisis.

Análisis de transferencia Western

La concentración de proteínas se determinó para cada muestra usando DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se calentaron 10 μg de cada muestra a 85°C durante 3 minutos en un tampón de muestra con SDS (Boston Bioproducts), y después se analizó mediante SDS-PAGE usando gel de Tris-glicina al 12% (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se transfirió a una membrana PVDF (Millipore, Bedford, MA). Después de bloquear la membrana toda la noche en leche seca desnatada al 5% en disolución salina tamponada con Tris (TBS) con 0,05% de Tween 20, se añadieron antisueros pGSN de ratón a 1:1000 y después se sondó con IgG anticonejo ligada a HRP (Cell Signaling, Beverly, MA) a 1:2000. La quimioluminiscencia se desarrolló con LumiGLO (Cell Signaling, Beverly, MA), y la fotopelícula se expuso y se desarrolló. El suero anti-pGSN de ratón se produjo inmunizando conejos frente a un péptido derivado de la extensión plasmática de pGSN de ratón usando un servicio comercial (Invitrogen, Carlsbad, CA). La especificidad y sensibilidad de los antisueros se ha ensayado usando ELISA y transferencia Western que se muestra que son específicos frente a pGSN de ratón solamente y no gelsolina citoplásmica (cGSN) (datos no mostrados).

Unión de gelsolina-LPS

Todos los estudios se realizaron por duplicado. Cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos blanca Microlite 2 (Dynex Technologies, Chantilly, VA) se revistió con diversas cantidades de pGSN humana recombinante o BSA, y se incubó a 4°C toda la noche. Después de 4 lavados con tampón PB (145 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 3,5 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de glucosa, 10 mM de Hepes, 3 mg/ml de BSA, 1 mM de CaCl₂, pH 7,4), se añadieron 2 μg de LPS marcado con Alexa488 (*Escherichia coli* Serotipo 055:B5, Molecular Probes, Eugene, OR) a cada pocillo con 100 μl de tampón PB, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de 4 lavados con tampón PB, la fluorescencia de cada pocillo se analizó en un espectrofluorímetro a longitudes de onda de excitación y de emisión de 488 y 520 nm respectivamente. La cantidad de Alexa488-LPS unida se estimó extrapolando a partir de una curva patrón generada sembrando diversas cantidades de Alexa488-LPS en tampón PB.

Estimulación de células monocíticas por LPS

La estirpe celular monocítica humana THP-1 se adquirió de la American Type Culture Collection, Manassas, VA. Las células se mantuvieron en RPMI (GIBCO, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 2% de penicilina-estreptomina (GIBCO) a 37°C. Se sembraron 50.000 células en cada pocillo en una placa de 24 pocillos, y se estimularon con o sin 100 ng de LPS de *E. coli* y se trataron con 200 µg/ml de pGSN recombinante humana o BSA. 2 horas después de LPS, se recogieron 200 µl de medio, y las células se eliminaron mediante centrifugación a 1000 x g durante 10 minutos. Los niveles de TNF-α de los medios libres de células se determinaron mediante ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Estadística

Los valores se presentan como media ± SD. Se usó un ensayo no paramétrico, la correlación de rangos de Spearman, para analizar correlaciones en el estudio de respuesta frente a la dosis. La mortalidad de los animales se presenta como curvas de Kaplan-Meier, y se usó la prueba de rangos logarítmicos para analizar el impacto del tratamiento sobre la mortalidad de los animales. Se usó la prueba de la U de Mann-Whitney para evaluar diferencias entre los niveles de citocinas y pGSN. Un valor P menor que 0,05 se consideró significativo.

15 Resultados

Los niveles de pGSN disminuyen en ratones sometidos a LPS o CLP

La Figura 1A muestra que la inyección de dosis crecientes no letales de LPS de *Pseudomonas* conduce a una disminución progresiva, máxima a una dosis de 20 mg/kg, de los niveles de pGSN en ratones (P < 0,05). Los niveles de albúmina plasmática no se alteraron con el tratamiento de LPS. De forma similar, los niveles de pGSN cayeron (P < 0,001), mientras que los niveles de albúmina aumentaron (P = 0,02) en ratones después de CLP. Estos datos sugieren que la inflamación sistémica debida a septicemia tiene un efecto específico sobre pGSN.

La repleción de pGSN mejoró la supervivencia en ratones sépticos

LPS de *E. coli*, a una dosis de 25 mg/kg i.p., induce una mortalidad de >90% en ratones en los 7 días de inyección, y los ratones que sobreviven parecen recuperarse completamente y no muestran signos de peligro. Como se muestra en la Figura 2A, la administración de pGSN exógena en el momento de la exposición a LPS potenció significativamente la supervivencia en ratones endotoxémicos en comparación con aquellos tratados con disolución salina (P < 0,001), o con BSA (P < 0,001). La Figura 2B muestra que los ratones que recibieron pGSN también tuvieron una supervivencia significativamente mejor que aquellos que recibieron disolución salina tras CLP (P = 0,001).

La administración de pGSN exógena elevó eficazmente los niveles de pGSN en ratones endotoxémicos.

La Figura 3 muestra el nivel de pGSN en ratones expuestos a una dosis letal de LPS de *E. coli*. En contraste con LPS de *Pseudomonas* no letal, que sólo provocó que pGSN cayese en 14%, una dosis letal de LPS de *E. coli* indujo una caída del 50% en el nivel de pGSN en las 6 horas de exposición a LPS. La inyección subcutánea de 8 mg de pGSN recombinante mantuvo con éxito pGSN a o por encima del nivel normal en ratones endotoxémicos.

Efectos de la repleción de pGSN en los perfiles de citocinas de ratones endotoxémicos

Se examinó si la administración de pGSN altera el perfil de citocinas de ratones endotoxémicos. La Figura 4A no muestra diferencias en el perfil de citocinas plasmáticas entre ratones endotoxémicos tratados con pGSN y tratados con disolución salina a las 6 horas después de LPS (P > 0,05 para todas las citocinas mostradas). Los niveles de TNF-α estaban casi cerca del valor inicial, consistente con los informes publicados que muestran picos de TNF-α, y comienzan a caer en 2-3 horas de la exposición a LPS en ratones (Villa, P., Sartor, G., Angelini, M., Sironi, M., Conni, M., Gnocchi, P., Isetta, A. M., Grau, G., Buurman, W., van Tits, L. J. y et al. (1995) Clin Diagn Lab Immunol 2, 549-53).

Sin embargo, 24 horas después de la exposición a LPS, los ratones tratados con pGSN tuvieron niveles significativamente menores de varias citocinas proinflamatorias (GM-CSF, IFN-γ, IL-1β), aunque los niveles de IL-6 y TNF-α no fueron detectablemente diferentes (Figura 4B). Además, el tratamiento con pGSN dio como resultado un nivel de IL-10 significativamente mayor. pGSN parece no estimular directamente la secreción de IL-10 puesto que los ratones no expuestos con o sin administración de pGSN no tuvieron perfiles de citocinas significativamente diferentes; específicamente, IL-10 no aumentó en ratones no expuestos tratados con pGSN (datos no mostrados).

Distribución tisular de pGSN

En la Figura 6 se muestra un análisis de transferencia Western representativo de músculos esqueléticos, corazones, riñones, hígados y pulmones cosechados de ratones 6 horas después de ser tratados con o sin 25 mg/kg de LPS de *E. coli*, usando antisueros de pGSN de ratón. Se encontró que el pulmón tuvo la concentración más elevada de pGSN, tanto en los estados normal como endotoxémico. Puesto que los pulmones se perfusionaron con PBS para

eliminar sangre intravascular antes de la cosecha, es improbable que la contaminación por sangre explique el resultado. Se encontró una distribución tisular similar de pGSN en ratones sometidos a CLP (datos no mostrados).

pGSN se une a LPS pero no inhibe LPS activante de monocitos

5 Puesto que pGSN se puede unir a lípidos bioactivos tales como ácido lisofosfatídico (Goetzl, E. J., Lee, H., Azuma, T., Stossel, T. P., Turck, C. W. y Karliner, J. S. (2000) *J Biol Chem* 275, 14573-8), se exploró la posibilidad de que pGSN también se puede unir a LPS. La Figura 7 muestra que pGSN se une específicamente a LPS fluorescente, mientras que la proteína de control, BSA, mostró poca afinidad por LPS. Sin embargo, parece que pGSN no interfiere con la capacidad de LPS de provocar la secreción de TNF- α a partir de monocitos humanos, puesto que
10 células THP-1 estimuladas con LPS, tratadas con pGSN o BSA, segregaron una cantidad similar de TNF- α en los medios de cultivo (Figura 8).

pGSN no se ve afectada en ratones mutantes TLR4 expuestos a LPS

15 Para examinar si LPS provoca directamente el agotamiento de pGSN, se estudiaron los niveles de pGSN en ratones C3H/HeJ, una raza que expresa TLR4 mutado que hace a los ratones resistentes a la inflamación inducida por LPS (Beutler, B. y Poltorak, A. (2001) *Crit Care Med* 29, S2-6; discusión S6-7). La Figura 5 muestra que los niveles de pGSN no difirieron significativamente entre ratones C3H/HeJ expuestos a LPS de *E. coli* y los no expuestos. Consistente con su resistencia conocida a LPS, los ratones C3H/HeJ también parecieron completamente normales tras la exposición a LPS.

Discusión

20 Se ha demostrado que se produce un agotamiento significativo de pGSN tras el ataque séptico por endotoxina o peritonitis, y que pGSN exógena mejora drásticamente la supervivencia de ratones sépticos. Estos datos indican que pGSN sirve como función importante a favor de la supervivencia en septicemia.

25 La hipótesis de que pGSN sea un "depurador de actina" parte de estudios sobre gelsolina citoplásmica (cGSN), y sobre un informe que demuestra la infusión de moléculas de actina en ratas, provocando la muerte. Sin embargo, pGSN puede no actuar como un depurador para actina circulante en septicemia, debido a que no se sabe que la septicemia temprana conduzca a liberación de actina, y no hemos sido capaces de demostrar complejos de gelsolina-actina en el plasma de ratones endotoxémicos (datos sin publicar).

30 Se exploró la posibilidad de que pGSN funcione interactuando directamente con LPS. Aunque pGSN se puede unir a LPS, no se encontraron pruebas de que pGSN interfiera con la capacidad de LPS para iniciar la inflamación en células de cultivo. Aunque se inyectó pGSN en ratones inmediatamente después de la exposición a LPS, no hubo ningún retraso en que pGSN se suministrase a la circulación debido a la vía de administración subcutánea. Por lo tanto, es improbable que pGSN funcione mediante interferencia directa de LPS, y los perfiles de citocinas tempranas de ratones endotoxémicos tratados y no tratados apoyan esta conclusión. Es posible que la capacidad de pGSN para unirse a LPS altere un suceso posterior en la respuesta inflamatoria inducida por LPS. Los perfiles de citocinas de fase temprana similares de nuestros ratones de control y ratones tratados con pGSN también sugieren que es
35 improbable que pGSN funcione interfiriendo con la señalización de citocinas tempranas, específicamente TNF- α , puesto que la inhibición de TNF- α en el modelo murino de endotoxemia reduce los niveles plasmáticos de IL-1 β e IL-6 en 3-4 horas de la exposición a LPS (Fong, Y., Tracey, K. J., Moldawer, L. L., Hesse, D. G., Manogue, K. B., Kenney, J. S., Lee, A. T., Kuo, G. C., Allison, A. C., Lowry, S. F. y et al. (1989) *J Exp Med* 170, 1627-33). Por otro lado, los perfiles de citocinas de ratones tratados y no tratados 24 horas después de LPS muestra que pGSN es
40 capaz de disminuir varias citocinas proinflamatorias tanto como 90% mientras aumenta IL-10, una citocina que se cree que tiene un papel antiinflamatorio en la septicemia e inflamación (Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. y O'Garra, A. (2001) *Annu Rev Immunol* 19, 683-765). Puesto que la dosis letal de LPS está asociada con citocinas proinflamatorias persistentemente elevadas, tales como IL-1 β e IFN- γ (Joshi, V. D., Kalvakolanu, D. V., Hebel, J. R., Hasday, J. D. y Cross, A. S. (2002) *Infect Immun* 70, 6896-903), se cree que el desplazamiento del
45 perfil de citocinas es consistente con que pGSN promueve la resolución de la inflamación.

50 Parece que el pulmón tiene la concentración más elevada de pGSN en comparación con otros órganos mediante análisis de transferencia Western, y puede ser la fuente principal de pGSN. Esto contrasta con un estudio previo que concluye que el músculo esquelético es la fuente principal de pGSN usando análisis de transferencia Northern (Kwiatkowski, D. J., Mehl, R., Izumo, S., Nadal-Ginard, B. y Yin, H. L. (1988) *J Biol Chem* 263, 8239-43). La contradicción puede ser debida a la capacidad cuantificadora limitada del análisis de transferencia Northern, o a que la expresión de ARNm no sea representativa de la producción de proteína.

La falta de cambios de pGSN en ratones resistentes a LPS sugiere que el agotamiento de pGSN está aguas abajo de la activación de TLR4 por LPS, y requiere el inicio de la cascada inflamatoria. Sin embargo, el actual estudio no elucida el mecanismo del agotamiento de pGSN en septicemia.

55 Desde el descubrimiento de gelsolina hace más de 20 años, la mayoría de la investigación se ha centrado en cGSN y su interacción con actina (Kwiatkowski, D. J. (1999) *Curr Opin Cell Biol* 11, 103-8), y pGSN ha recibido poca atención. Nuestro estudio muestra que pGSN desempeña un papel crítico en la inflamación sistémica, y la

administración de pGSN mejora la supervivencia en septicemia murina y promueve un desplazamiento de citocinas hacia la resolución de la inflamación.

REIVINDICACIONES

1. Gelsolina para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección, en el que la gelsolina se va a administrar al sujeto en una cantidad eficaz para tratar la infección, y la infección está provocada por una bacteria grampositiva.
- 5 2. Gelsolina para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección según la reivindicación 1, en el que la bacteria grampositiva se selecciona del grupo que consiste en: especie de Pasteurella, especie de Staphylococcus, especie de Streptococcus, Bacillus anthracis, especie de Corynebacterium, especie de Difteroides, especie de Listeria, especie de Erysipelothrix, y especie de Clostridium.
- 10 3. Gelsolina para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección según la reivindicación 1, en el que la gelsolina se va a administrar subsiguientemente a la exposición del sujeto a la infección.
4. Gelsolina para uso en el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar una infección según la reivindicación 1, en el que la gelsolina se va a administrar antes de la exposición del sujeto a la infección.
- 15 5. Gelsolina para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o que está en riesgo de desarrollar una infección según la reivindicación 1, en el que la gelsolina se va a administrar oralmente, sublingualmente, bucalmente, intranasalmente, intravenosamente, intramuscularmente, intratecalmente, intraperitonealmente, subcutáneamente, intradérmicamente, tópicamente, rectalmente, vaginalmente, intrasinovalmente, o intravítreamente.
6. Gelsolina para uso en el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar una infección según la reivindicación 1, en el que el sujeto está de otro modo libre de indicaciones que necesiten tratamiento con gelsolina.
- 20 7. Gelsolina para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o que está en riesgo de desarrollar una infección según la reivindicación 1, en el que la gelsolina es gelsolina plasmática (pGSN).

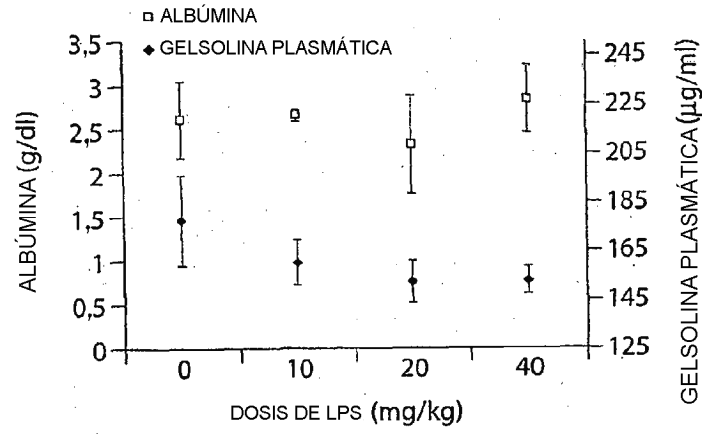


Fig. 1A

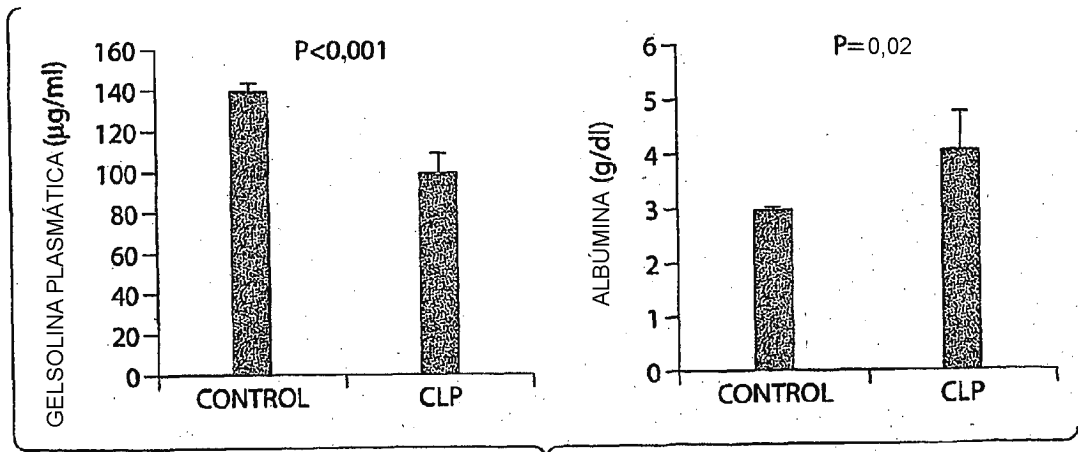


Fig. 1B

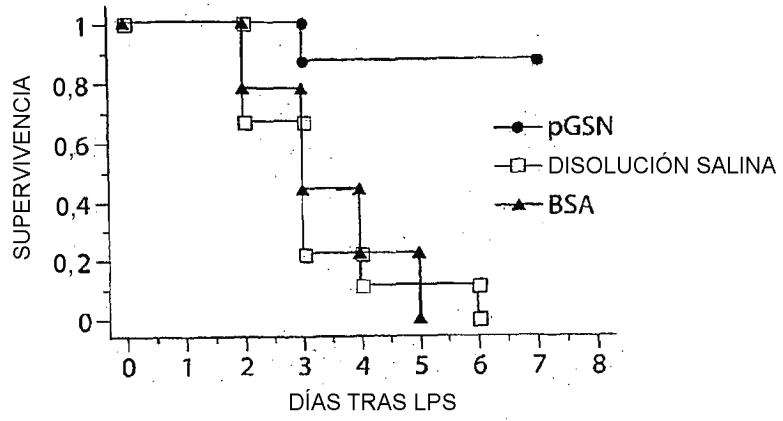


Fig. 2A

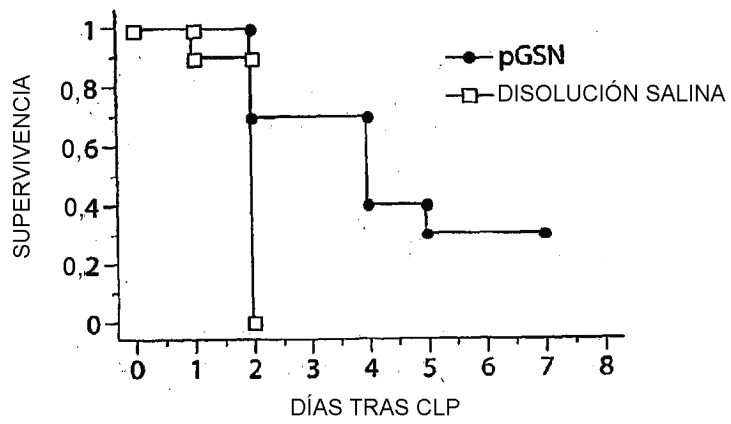


Fig. 2B

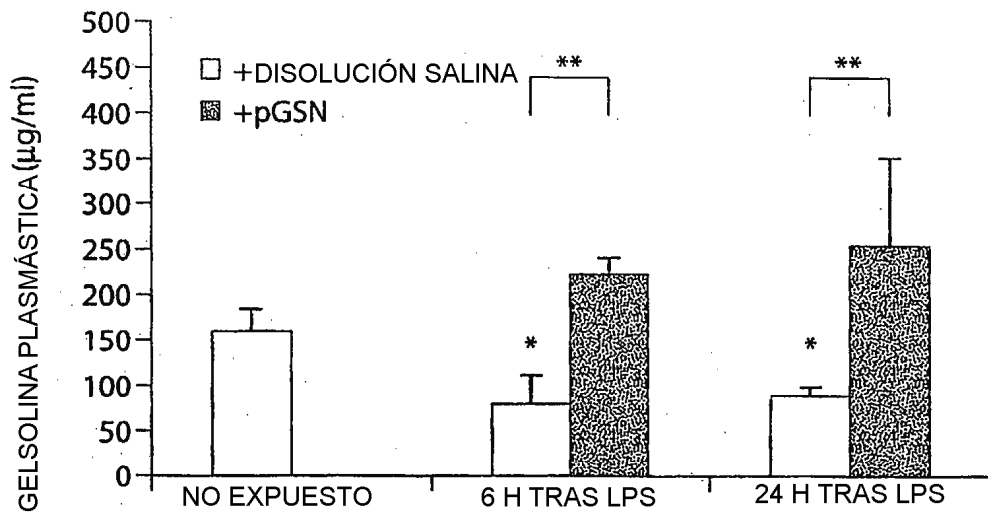


Fig. 3

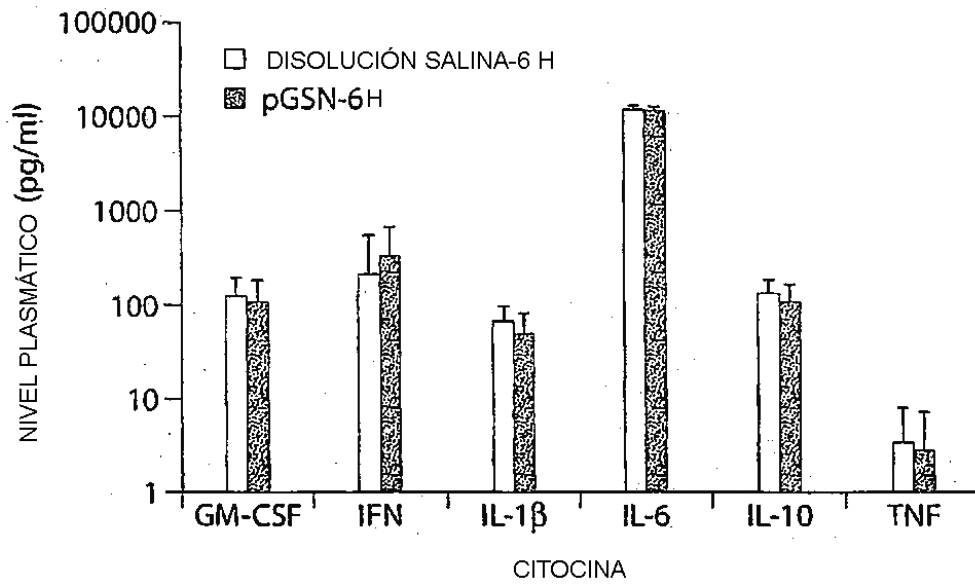


Fig. 4A

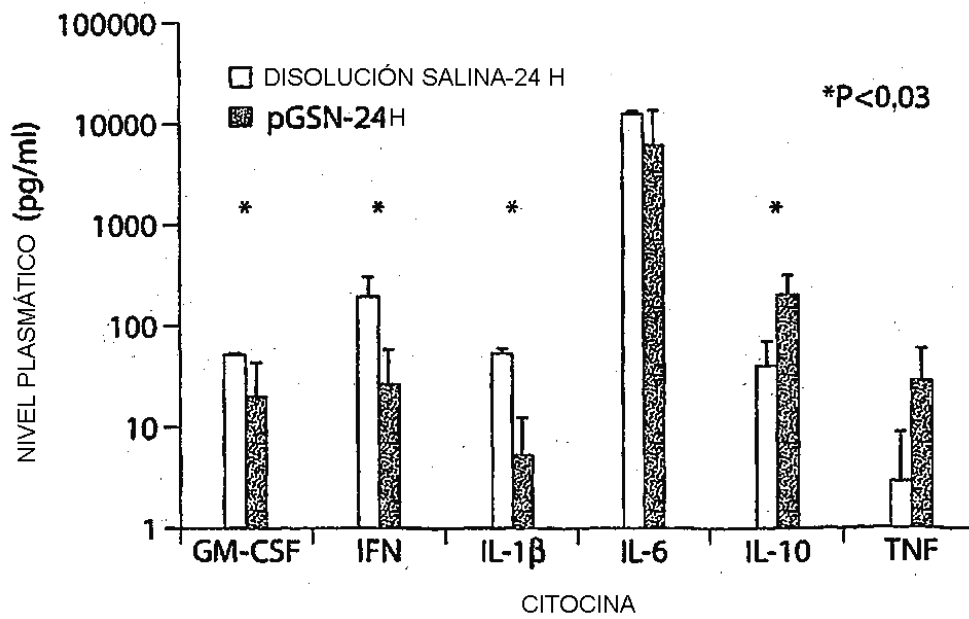


Fig. 4B

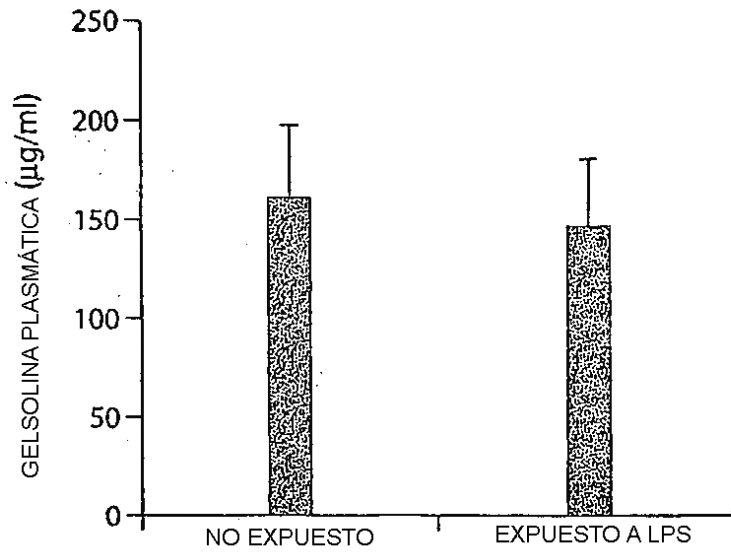


Fig. 5

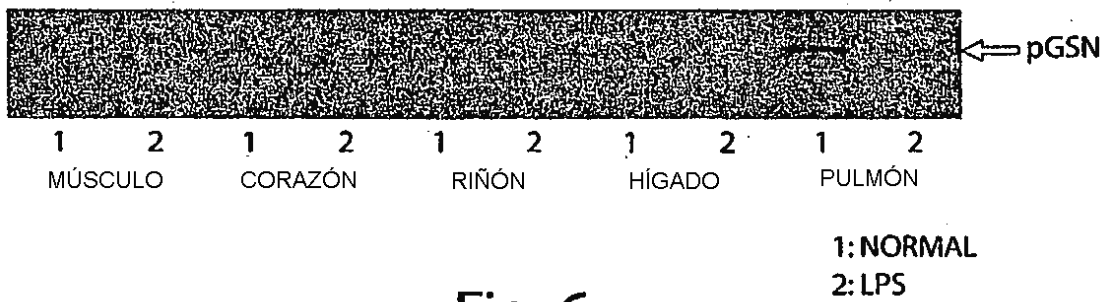


Fig. 6

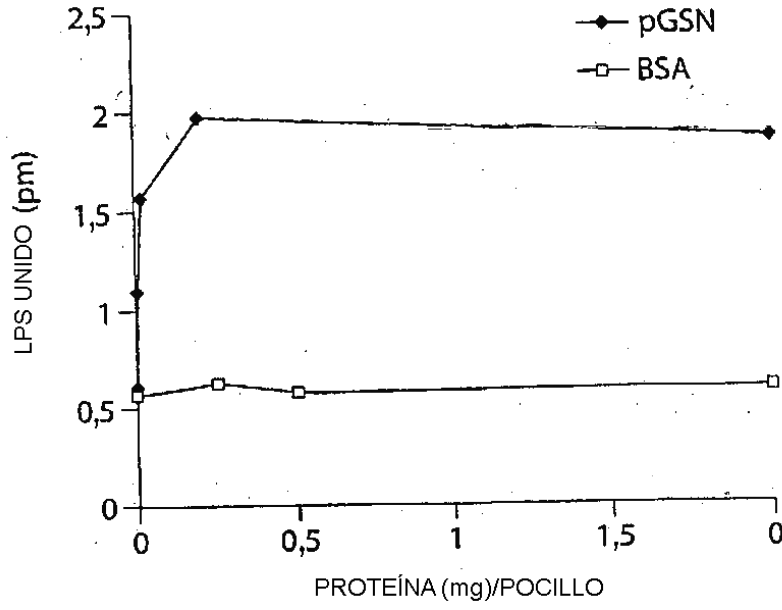


Fig. 7

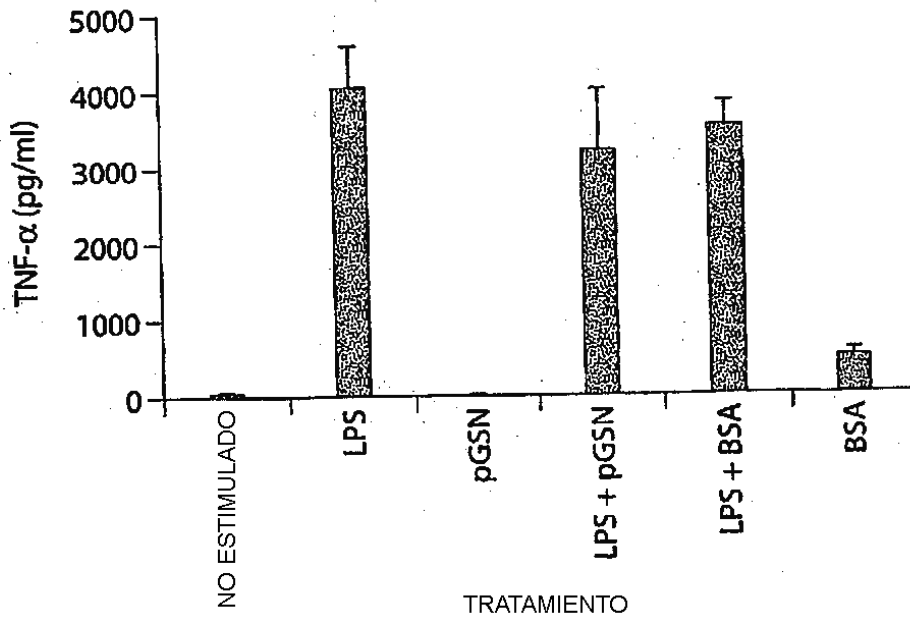


Fig. 8