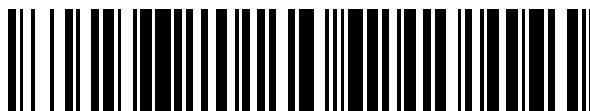


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 623**

51 Int. Cl.:

A61K 31/167 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2006 E 06840469 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 1959945**

54 Título: **Fenretinida para corregir un desequilibrio de lípidos en un sujeto**

30 Prioridad:

13.12.2005 US 750004 P

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

18.03.2015

73 Titular/es:

**MCGILL UNIVERSITY (100.0%)
845 Sherbrooke Street West
Montreal, QC H3A 0G4, CA**

72 Inventor/es:

**RADZIOCH, DANUTA;
GUILBAULT, CLAUDINE y
DE SANCTIS, JUAN BAUTISTA**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 531 623 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

Fenretinida para corregir un desequilibrio de lípidos en un sujeto

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos, usos y kits para corregir un desequilibrio de lípidos, y usos de los mismos tal como para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad o afección asociada al desequilibrio de lípidos. Más específicamente, la presente invención se refiere a corregir niveles de ácido docosahexaenoico (DHA) y/o ácido araquidónico (AA).

Antecedentes de la invención

El ácido graso esencial (EFA) y sus derivados se dividen en dos grupos; el ácido alfa-linolénico, que es el precursor de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-3, y el ácido linoleico, que es el precursor de PUFA n-6. El ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) son los metabolitos de PUFA n-3, que se ha mostrado que tienen potentes propiedades antiinflamatorias que actúan mediante factores de transcripción y expresión génica, flujos de calcio, alteran la fluidez de la membrana, la regulación y secreción de enzimas digestivas y hormonas y también desempeñan una función en disminuir la susceptibilidad a enfermedades inflamatorias, tales como artritis y asma (Das U.N. 2006. *Biotechnol J.*, 1(4):420-439). A diferencia, el ácido araquidónico (AA), un metabolito de PUFA n-6, estimula reacciones proinflamatorias mediante diversas rutas de prostaglandinas y leucotrienos. Gilljam y colaboradores estudiaron la función de AA sobre la inflamación e infección pulmonar y descubrieron un aumento considerable en moco (Gilljam y col., 1986. *Scand J Clin Lab Invest.* 46(6): 511-8). Este aumento en la inflamación no fue secundario a la infección pulmonar, sino un defecto primario atribuible a la(s) mutación (mutaciones) del gen Cfr. Estudios epidemiológicos, clínicos y bioquímicos sugieren que se considera generalmente que los efectos beneficiosos de consumir PUFA n-3 son debidos a la reducción de AA y sus metabolitos eicosanoides. DHA y AA son el "yin y el yang" del metabolismo de los ácidos grasos, y la alteración del equilibrio de EFA n-3: n-6 produce varias anomalías sistémicas (Das U.N., arriba).

La fibrosis quística (FQ) se caracteriza por excesiva inflamación del pulmón, seguida de infecciones bacterianas recurrentes. En la raíz de esta afección está un gen defectuoso que previene que las células produzcan proteínas reguladoras de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) funcionales. El gen CFTR codifica una proteína de 1.480 aminoácidos. La mutación más común encontrada en pacientes con FQ es deltaF508 ($\Delta F508$); es una delección de 3 nucleótidos que produce una pérdida del aminoácido fenilalanina (F) en la posición 508 de la proteína. Hay varias otras mutaciones que se han asociado a FQ (Nunes y col., 1991. *Hum. Genet.* 87(6): 737-8; Estivill X. y col., 1997. *Hum. Mutat.*, 10(2) 135-54). La ausencia de CFTR no funcional debilita el sistema inmunitario del cuerpo, produce hiperinflamación y hace que el cuerpo produzca moco pegajoso anormalmente grueso que obstruye las pequeñas vías respiratorias de los pulmones y conduce a infecciones pulmonares potencialmente mortales. Estas secreciones gruesas obstruyen otras glándulas exocrinas, que incluyen el páncreas, previniendo que las enzimas digestivas lleguen a los intestinos para ayudar a degradar y absorber alimentos. Por tanto, los pacientes con FQ sufren un desequilibrio de lípidos en los órganos afectados por FQ (Sahu & Lynn (1977) *Am. Rev. Respir. Dis.* 115:233-239)

Otro fenotipo recientemente descrito asociado a FQ es la reducida densidad mineral ósea, que produce osteopenia y osteoporosis (Gronowitz, E. y col., 2006. *Br. J. Nutr.* 95:1159-1165; Cawood, T.J. y col., 2005. *Ir. Med. J.* 98:270-273; Giron, R.M. y col., *Med. Clin. (Barc.)* 125:325-328; Conway, S. 2003. *J. Cyst. Fibros.* 2:161-162; Giron, R.M. y col., 2004. *Med. Clin. (Barc.)* 123:81-84; Flohr, F. y col., 2002. *Eur. J. Endocrinol.* 146:531-536; Robinson, R.F. y col., 2001. *J. Pediatr. Health Care* 15:308-315). Osteopenia se refiere a la reducción de la calcificación o densidad de huesos. Osteoporosis significa literalmente "huesos porosos" y se caracteriza por baja densidad ósea y el debilitamiento estructural de tejido de hueso, que conduce a un elevado riesgo de fracturas (Turner, C.H. 2006. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1068:429-46). Actualmente, la pauta de tratamiento de la osteoporosis para pacientes con FQ consiste en una mezcla de medicaciones que incluye: vitamina D, calcio, vitamina K, hormonas sexuales, agentes antirresortivos tales como bisfosfatos, agentes anabólicos tales como hormona paratiroidea (PTH) y hormonas de crecimiento recombinantes humanas (HrGH) (Hecker, T.M. y Aris, R.M. 2004. *Drugs.* 64:133-147; Robinson, R.F. y Nahata, M.C. 2001. *J. Pediatr. Health Care.* 15:308-315).

Existe la necesidad del desarrollo de estrategias novedosas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades y afecciones asociadas al desequilibrio de lípidos.

60 Sumario de la invención

La invención se refiere a métodos, usos y kits para corregir un desequilibrio de lípidos, y usos de los mismos tales como para el diagnóstico o tratamiento de enfermedad o afección asociada al desequilibrio de lípidos. Más específicamente, la presente invención se refiere a corregir niveles de ácido docosahexaenoico (DHA) y/o ácido araquidónico (AA).

La presente divulgación se refiere a un método de (a) disminuir los niveles de ácido araquidónico (AA), (b) aumentar los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA), c) aumentar la relación de DHA/AA, o (d) cualquier combinación de (a) - (c) en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto fenretinida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

5 En una realización, el aumento o disminución anteriormente mencionado es sistémico.

En una realización, el sujeto anteriormente mencionado sufre una enfermedad o afección asociada a un desequilibrio de lípidos.

10 En una realización, el sujeto anteriormente mencionado tiene (a) una relación de DHA/AA de 0,4 o menos, (b) niveles de DHA de 3,5 ng/μg de fosfato o menos, (c) niveles de AA de 40 ng/μg de fosfato o más o (d) cualquier combinación de (a) a (c), antes de dicha administración.

15 También se desvela, pero ya no se reivindica, un método de evaluación de enfermedad de los huesos en un sujeto, comprendiendo dicho método determinar si (a) el nivel de DHA disminuye, (b) el nivel de AA aumenta, (c) la relación de DHA/AA disminuye, o (d) cualquier combinación de (a) a (c), en una muestra biológica de dicho sujeto; con respecto a un nivel o relación de control correspondiente, en el que dicho aumento o disminución es indicativo de que dicho sujeto sufre enfermedad de los huesos.

20 También se desvela, pero ya no se reivindica, un método de determinación de si un sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar enfermedad de los huesos, comprendiendo dicho método determinar si (a) el nivel de DHA disminuye, (b) el nivel de AA aumenta, (c) la relación de DHA/AA disminuye, o (d) cualquier combinación de (a) a (c), en una muestra biológica de dicho sujeto; con respecto a un nivel o relación de control correspondiente, en el que dicho aumento o disminución es indicativo de que dicho sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar enfermedad de los huesos.

25 En una realización, el nivel o relación de control anteriormente mencionado está seleccionado de un nivel o relación correspondiente determinado en una muestra biológica de un sujeto que no padece enfermedad de los huesos y un nivel o relación estándar establecido.

30 En una realización, el método anteriormente mencionado es para pronosticar enfermedad de los huesos y el nivel o relación de control anteriormente mencionado se determina en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto en un momento anterior.

35 También se desvela, pero ya no se reivindica, un método de identificación de un compuesto para tratar o prevenir enfermedad de los huesos, que comprende determinar si (a) el nivel de DHA disminuye, (b) el nivel de AA aumenta, (c) la relación de DHA/AA disminuye, o (d) cualquier combinación de (a) a (c), en presencia frente a ausencia de un compuesto de prueba, en el que dicho aumento o disminución es indicativo de que dicho compuesto de prueba puede usarse para tratar o prevenir enfermedad de los huesos.

40 También se desvela, pero ya no se reivindica, un método de tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada de una enfermedad o afección asociada a un desequilibrio de lípidos, una enfermedad infecciosa y una enfermedad de los huesos, en un sujeto, comprendiendo dicho método:

45 (i) evaluar (a) el nivel de DHA, (b) nivel de AA, (c) relación de DHA/AA, o (d) cualquier combinación de (a) a (c), en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto; y

50 (ii) administrar fenretinida a dicho sujeto si dicho (a) nivel de DHA disminuye, (b) nivel de AA aumenta, (c) la relación de DHA/AA disminuye, o (d) cualquier combinación de (a) a (c), con respecto a un nivel o relación de control correspondiente.

55 En una realización, el nivel o relación de control anteriormente mencionado está seleccionado de un nivel o relación correspondiente determinado en una muestra biológica de un sujeto que no padece una enfermedad o afección seleccionada de una enfermedad o afección asociada a un desequilibrio de lípidos, una enfermedad infecciosa y una enfermedad de los huesos y un nivel o relación estándar establecido.

60 En una realización, el método anteriormente mencionado es para pronosticar una enfermedad o afección seleccionada de una enfermedad o afección asociada a un desequilibrio de lípidos, una enfermedad infecciosa y una enfermedad de los huesos y el nivel o relación de control anteriormente mencionado se determina en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto en un momento anterior.

65 En un aspecto, la presente invención proporciona fenretinida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana oportunista, osteopenia u osteoporosis en un sujeto (a) disminuyendo los niveles de ácido araquidónico (AA), (b) aumentando los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA), c) aumentando la relación de DHA/AA, o (d) cualquier combinación de (a) - (c), en un sujeto.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un uso de fenretinida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección bacteriana oportunista, osteopenia u osteoporosis en un sujeto (a) disminuyendo los niveles de ácido araquidónico (AA), (b) aumentando los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA), c) aumentando la relación de DHA/AA, o (d) cualquier combinación de (a) - (c), en un sujeto.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana oportunista, osteopenia u osteoporosis en un sujeto (a) disminuyendo los niveles de ácido araquidónico (AA), (b) aumentando los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA), c) aumentando la relación de DHA/AA, o (d) cualquier combinación de (a) - (c) en un sujeto, comprendiendo dicha composición:

(a) fenretinida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y

15 (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se desvela, pero ya no se reivindica, un envase o kit que comprende:

20 (a) la composición anteriormente mencionada; y

(b) instrucciones para su uso para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección seleccionada de una enfermedad o afección asociada a un desequilibrio de lípidos, una enfermedad infecciosa y una enfermedad de los huesos en dicho sujeto.

25 En una realización, el sujeto anteriormente mencionado sufre una enfermedad infecciosa. En otra realización, la enfermedad infecciosa anteriormente mencionada es una infección oportunista. En otra realización, la infección oportunista anteriormente mencionada es una infección bacteriana.

30 En otra realización, la infección bacteriana anteriormente mencionada es una infección de las vías respiratorias y el método o uso anteriormente mencionado produce al menos una disminución de 2 veces, en otras realizaciones al menos de 3, 4, 5 ó 10 veces, en la carga bacteriana en las vías respiratorias del sujeto.

35 En otra realización, el sujeto anteriormente mencionado sufre enfermedad de los huesos. En otra realización, la enfermedad de los huesos anteriormente mencionada es osteopenia u osteoporosis.

40 En una realización, el tratamiento anteriormente mencionado no produce aumento o no produce aumento sustancial en la actividad inflamatoria (por ejemplo, aumento en los niveles de mediadores inflamatorios (por ejemplo, citocinas/quimiocinas); aumento del reclutamiento de células inflamatorias en las vías respiratorias) en tejido respiratorio (por ejemplo, pulmonar, pulmón, vías respiratorias).

En una realización, los DHA y AA anteriormente mencionados son fracciones asociadas a fosfolípido de DHA y AA.

45 En una realización, el sujeto anteriormente mencionado es un mamífero. En otra realización, el mamífero anteriormente mencionado es un ser humano.

Otros objetivos, ventajas y características de la presente invención serán más evidentes tras la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de realizaciones específicas de la misma, dadas a modo de ejemplo solo con referencia a los dibujos adjuntos.

50 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el análisis de 17 metabolitos de esfingolípidos de muestras humanas. Se analizaron los niveles de ceramida en plasma por EM en tándem con HPLC (Bielawski J. y col., 2006. Methods, 39: 82-91) a partir de plasma de controles sanos (n=9, barras negras) y pacientes con FQ (n=10, barras grises). A. Concentraciones de 17 ceramidas individuales en muestras de plasma. Las muestras de plasma de pacientes con FQ mostraron significativamente (*) menores concentraciones de esfingolípido que sus controles sanos correspondientes: C14:0 C14-ceramida (N-miristoil-D-*eritro*-esfingosina) (P = 0,048), C20:1 (ceramida 20:1) (P = 0,017), C22:0 ceramida (C22:0) (P = 0,005), C22:1 ceramida (C22:1) (P = 0,003), C24:0 N-lignoceroil-D-*eritro*-esfingosina (C24:0) (P = 0,033) y dihidroceramida C16:0 (DHC16:0) (P = 0,043). B. Suma total de concentraciones de ceramida en muestras de plasma. Se analizaron diecisiete metabolitos de esfingolípidos de muestras humanas de plasma (14 ceramidas diferentes y 3 esfingolípidos). Las concentraciones en plasma de ceramida se analizaron por EM en tándem con HPLC usando plasmas de controles sanos (n = 9, *negro*) y pacientes con fibrosis quística (n = 10, *gris*), como se describe en el ejemplo 1 (Material y métodos). B. La suma total de ceramidas en muestras de plasma se calculó para voluntarios sanos (n = 10) y pacientes con FQ (n = 10). Las muestras de pacientes con FQ muestran significativamente (*) menores niveles de ceramida en comparación con sus controles sanos (P = 0,0003).

La figura 2 muestra un análisis de niveles de ceramidas en ratones naturales y *Cftr*-KO no infectados. Se determinaron los niveles de ceramidas en los pulmones (figura 2A, panel izquierdo) y plasma (figura 2B, panel derecho) de ratones naturales (WT, n=33), heterocigóticos (HZ, n=6) y *Cftr*-KO (n=17) por ELISA (véase el ejemplo 1).

5 La figura 3 muestra un análisis de niveles de ceramida en ratones naturales (barras grises) y *Cftr*-KO (barras blancas) infectados con *P. aeruginosa*. Se determinaron los niveles de ceramida en los pulmones (figura 3A, panel izquierdo) y plasma (figura 3B, panel derecho) por ELISA (véase el ejemplo 1). CTRL = tratados con control; FEN = tratados con fenretinida.

10 La figura 4 muestra la carga bacteriana en los pulmones de ratones naturales y *Cftr*-KO infectados con *P. aeruginosa*. Las unidades formadoras de colonias (UFC) de los pulmones de ratones naturales (WT, círculos negros) y *Cftr*-KO (círculos blancos) infectados con *P. aeruginosa* que fueron no tratados/tratados con control (CTRL) o tratados con fenretinida (FEN) se determinaron 3 días después de la infección.

15 La figura 5 muestra la relación del índice de DHA/AA observada en los pulmones y plasma. La relación del índice de DHA/AA en los pulmones (figura 5A) y en el plasma (figura 5B) se evaluaron en ratones naturales (triángulos) y *Cftr*-KO (círculos) que no se infectaron (blancos) o se infectaron con *P. aeruginosa* 3 días después de la infección (negros) y que o bien no se trataron o se trataron con control (CTRL) o bien se trataron con fenretinida (FEN).

20 La figura 6 muestra DHA incorporado en fosfolípido expresado como el porcentaje de ácidos grasos totales en los pulmones y plasma. Los niveles de DHA en los pulmones (figura 6A) y en el plasma (figura 6B) se evaluaron en ratones naturales (triángulos) y *Cftr*-KO (círculos) que no se infectaron (blancos) o se infectaron con *P. aeruginosa* (negros) 3 días después de la infección y que o bien no se trataron o se trataron con control (CTRL) o bien se trataron con fenretinida (FEN).

25 La figura 7 muestra la concentración de DHA incorporado en fosfolípido en los pulmones y plasma. Los niveles de DHA en los pulmones (figura 7A) y en el plasma (figura 7B) se evaluaron en ratones naturales (triángulos) y *Cftr*-KO (círculos) que no se infectaron (blancos) o se infectaron con *P. aeruginosa* 3 días después de la infección (negros) y que o bien no se trataron o se trataron con control (CTRL) o bien se trataron con fenretinida (FEN).

30 La figura 8 muestra DHA libre expresado como porcentaje de ácidos grasos totales en los pulmones y plasma. Los niveles de DHA en los pulmones (figura 8A) y en el plasma (figura 8B) se evaluaron en ratones naturales (triángulos) y *Cftr*-KO (círculos) que no se infectaron (blancos) o se infectaron con *P. aeruginosa* 3 días después de la infección (negros) y que o bien no se trataron o se trataron con control (CTRL) o bien se trataron con fenretinida (FEN). Los ratones naturales infectados tratados con fenretinida mostraron una diferencia significativa (#) en la mediana de niveles de DHA en los pulmones y plasma en comparación con los ratones de control no infectados no tratados naturales.

35 La figura 9 muestra la concentración de DHA libre en los pulmones y plasma. Los niveles de DHA en los pulmones (figura 9A) y en el plasma (figura 9B) se evaluaron en ratones naturales (triángulos) y *Cftr*-KO (círculos) que no se infectaron (blancos) o se infectaron con *P. aeruginosa* 3 días después de la infección (negros) y que o bien no se trataron o se trataron con control (CTRL) o bien se trataron con fenretinida (FEN).

40 La figura 10 muestra la concentración de AA incorporada en fosfolípidos. Los niveles de AA en los pulmones (figura 10A) y en el plasma (figura 10B) se evaluaron en ratones naturales (triángulos) y *Cftr*-KO (círculos) que no se infectaron (blancos) o infectados con *P. aeruginosa* 3 días después de la infección (negros) y que o bien no se trataron o se trataron con control (CTRL) o bien se trataron con fenretinida (FEN).

45 La figura 11 muestra la densidad ósea de ratones naturales y *Cftr*-KO. A. Imagen de μ CT de fémur. Los huesos se diseccionaron libres de tejido blando, se fijaron durante la noche antes de escanearse en un instrumento estático Skyscan 1072 equipado con el software analítico 3D Creator. Reconstrucciones 3D representativas y barridos en sección transversal 2D demuestran una clara diferencia entre ratones WT de control y *Cftr*-KO. Los ratones *Cftr*-KO tienen mucho menos volumen de hueso que sus controles WT. Lo recuadrado por recuadros negros indica el área del hueso en la que se usó μ CT para el barrido y muestra el efecto positivo de la fenretinida en el aumento del volumen de hueso de *Cftr*-KO. B. Tinciones de von Kassa de fémur. Se incorporaron huesos en MMA y se tiñeron con von Kassa. Los portaobjetos teñidos con von Kassa se usaron para confirmar la cantidad de hueso mineralizado (tinción negra) a las imágenes de μ CT. Lo recuadrado por recuadros negros indica el área del hueso en la que se usó μ CT para el barrido y muestra el efecto positivo de la fenretinida en aumentar el volumen de hueso de *Cftr*-KO. Se muestra un portaobjetos representativo.

50 La figura 12 muestra μ CT cuantitativa de la composición y arquitectura del hueso trabecular. Los siguientes parámetros se calcularon en el fémur izquierdo de 5 a 6 ratones por grupo usando el software 3D Creator suministrado con el instrumento Skyscan. Las líneas representaron la media. La significancia se fija a $p < 0,05$. (*) indica significancia entre WT no tratados y *Cftr*-KO no tratados y (#) indica una diferencia significativa encontrada

65

entre los grupos de control de *Cftr*-KO y tratados. A. Volumen de hueso/volumen de tejido. B. Volumen de hueso. C. Número de huesos trabeculares. D. Índice del modelo estructural. E. Separación trabecular; se observa una clara diferencia entre los grupos de control WT y de *Cftr*-KO, como se muestra mediante los paneles A a E, se muestra a continuación que la fenretinida aumenta BV/TV, BV, BN, SMI y Trb. Sp al nivel de los grupos de control.

5 La figura 13 muestra la cuantificación de osteoblastos y osteoclastos en el fémur. A. Se descalcificaron huesos, se incorporaron en parafina y se tiñeron con H&E. Se usaron múltiples portaobjetos para contar el número de osteoblastos y osteoclastos (se muestra un portaobjetos representativo). Los portaobjetos se contaron a 400X aumentos. Los osteoblastos se identificaron como células en forma de bacilo mononucleadas unidas al hueso trabecular como se muestra por la flecha negra. Los osteoclastos se definieron como grandes células redondas multinucleares (tipo macrófago) unidas al hueso trabecular como se muestra por las flechas. B. Cuantificación de los portaobjetos contados. Se muestran datos como media +/- el EEM, (*) indica significancia entre ratones WT y *Cftr*-KO no tratados y (#) indica una diferencia significativa entre los grupos no tratados y tratados de *Cftr*-KO. Los datos mostrados son representativos de un promedio de 3 portaobjetos contados por animal. C. Tinción con TRAP. Los huesos se incorporaron en MMA y se tiñeron con TRAP. Se analizaron múltiples portaobjetos para identificar y cuantificar los osteoclastos presentes en cada portaobjetos (se muestra un portaobjeto representativo a 200X aumentos).

20 La figura 14 muestra el perfil de lípidos de ratones *Cftr*-KO y WT no tratados y tratados con fenretinida. A. Ácido araquidónico unido a fosfolípido. Los niveles de ácido araquidónico unido a fosfolípido se cuantificaron en el plasma de ratones WT y *Cftr*-KO. Los datos mostrados como media +/- el EEM (*) indican significancia entre WT no tratados y *Cftr*-KO no tratados y (#) indica una diferencia significativa encontrada entre los grupos no tratados y tratados de *Cftr*-KO. Después de 4 semanas de tratamiento bisemanal con fenretinida (total de 8 tratamientos), el ácido araquidónico unido a fosfolípido en los ratones *Cftr*-KO disminuyó significativamente ($p < 0,05$) al nivel observado en los WT. Ya no fue detectable una diferencia significativa entre animales *Cftr*-KO y animales WT tratados ($p > 0,05$). B. DHA unido a fosfolípido. La concentración de DHA unido en fosfolípidos se evaluó en ratones WT y *Cftr*-KO. (*) indica significancia entre WT no tratados y *Cftr*-KO no tratados y (#) indica una diferencia significativa encontrada entre los grupos no tratados y tratados de *Cftr*-KO. Después de 4 semanas de tratamientos bisemanales con fenretinida, DHA unido en fosfolípidos en ratones WT y *Cftr*-KO aumentó 2 veces, que ilustra una tendencia positiva. C. DHA unido a fosfolípido: AA. Se evaluó la relación de DHA:AA en ratones WT y *Cftr*-KO. (*) indica significancia entre WT no tratados y *Cftr*-KO no tratados y (#) indica una diferencia significativa encontrada entre los grupos no tratados y tratados de *Cftr*-KO. La relación de DHA:AA es estadísticamente diferente entre ratones WT y *Cftr*-KO ($p < 0,05$). Después de 4 semanas de tratamientos bisemanales con fenretinida, la relación de DHA unido a fosfolípido y AA unido a fosfolípido aumenta significativamente ($p < 0,05$).

35 La figura 15 muestra niveles de esfingolípidos de ceramida en ratones *Cftr*-KO y WT no tratados y tratados con fenretinida. Se evaluaron los niveles de ceramida en plasma aislado de ratones WT y *Cftr*-KO. Los niveles de ceramida en las muestras de plasma fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$ (*)) entre ratones WT y *Cftr*-KO. Tras 4 semanas de tratamiento bisemanal con fenretinida, los niveles de ceramida en los ratones *Cftr*-KO aumentaron significativamente [$p < 0,05$ (#)].

45 La figura 16 muestra el perfil de lípidos en diferentes órganos de ratones *Cftr*-KO (KO), heterocigóticos para *Cftr* (HZ) y naturales (WT) tras la administración bisemanal de fenretinida durante 4 semanas. A. Niveles de DHA. B. Niveles de ceramida. C. Relación de DHA/AA. D. Niveles de AA. Los niveles de ácido araquidónico unido a fosfolípido se cuantificaron en el plasma, hígado, páncreas, íleon, bazo, riñón y corazón de ratones WT y *Cftr*-KO. Después de 4 semanas de tratamiento bisemanal con fenretinida (total de 8 tratamientos), el ácido araquidónico unido a fosfolípido en los ratones *Cftr*-KO disminuyó significativamente.

50 La figura 17 muestra parámetros de lípidos en sujetos sanos y en pacientes con diferentes genotipos de FQ. Se recogieron muestras de sangre de 75 voluntarios sanos y 62 pacientes con FQ. Los pacientes con FQ se subdividieron en tres grupo basados en su genotipo de FQ. El primer grupo representa pacientes con FQ homocigótica para la mutación deltaF508 en el sitio CFTR (deltaF508/deltaF508), que produce la forma más grave de la enfermedad. El segundo grupo comprende pacientes con FQ heterocigóticos para la mutación deltaF508 y que llevan otra mutación en el sitio CFTR (deltaF508/otra). Los tipos de mutaciones se enumeran en la tabla 1. "Desconocido" significa que no se identificó una mutación específica debido a que no ha sido una de las 40 mutaciones que pueden identificarse usando el kit de genotipado utilizado en el Hospital infantil de Montreal; la prueba de sudor del paciente identificó el paciente como paciente con FQ. El tercer grupo no lleva una mutación deltaF508 en el sitio del gen CFTR, pero lleva otras dos mutaciones, una combinación que se cree que produce la enfermedad de fibrosis quística algo menos grave (otra/otra), ya que puede detectarse algún nivel de proteína CFTR residual para algunas de las mutaciones, aunque no se cuantifica perfectamente. Todos los pacientes con deltaF508/deltaF508 comparten la insuficiencia pancreática, en el grupo en el que se analizan otras combinaciones de mutaciones algunos pacientes también muestran insuficiencia pancreática (por ejemplo, deltaF508/otra u otra/otra (véase la tabla 6). A. Niveles de DHA. B. Niveles de AA. C. Relación de DHA/AA. D. Niveles de ceramida.

65 **Descripción de realizaciones ilustrativas**

Los resultados presentados en el presente documento indican que la fenretinida reduce los niveles de AA, aumenta los niveles de DHA y mejora la relación de DHA/AA en varios órganos de ratones *Cftr*-KO. Estos cambios globales en los niveles de ácidos grasos conducen a mejoras importantes en la eliminación bacteriana (*P. aeruginosa*) en los pulmones de ratones deficientes en *Cftr*. Los resultados presentados en el presente documento también demuestran que la administración de fenretinida está asociada a una mejora de la estructura y protección del hueso contra osteopenia/osteoporosis en ratones *Cftr*-KO.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método de (a) disminuir los niveles de ácido araquidónico (AA), (b) aumentar los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA), (c) aumentar la relación de DHA/AA, o (d) cualquier combinación de (a) - (c) en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto fenretinida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

La fenretinida (all-trans-N-(4-hidroxifenil)retinamida), que tiene el número de registro CAS 65646-68-6, es un retinoide sintético. También pueden usarse derivados, análogos o metabolitos funcionales de fenretinida, tales como 4-oxo-N-(4-hidroxifenil)retinamida (4-oxo-4-HPR) y N-(4-metoxifenil)retinamida (4-MPR) (descritas en la solicitud de patente de EE.UU. nº 20060264514). La fenretinida es particularmente adecuada para su uso en los presentes métodos ya que se informa que tiene menos efectos secundarios en comparación con retinoides que se producen naturalmente que incluyen vitamina A (Ulukaya y Wood (1999) *Cancer Treat Rev.* 25:229-35). El perfil de seguridad para la fenretinida es excelente, y se han observado efectos secundarios mínimos en una variedad de ensayos clínicos usando fenretinida en una base profiláctica (Ulukaya y Wood (1999) *Cancer Treat. Rev.* 25:229-35). Los ensayos clínicos han mostrado que la fenretinida no induce daño vascular generalizado en seres humanos (Reynolds y Lemons (2001) *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 15:867-910). También se ha usado fenretinida para tratar sujetos (2-21 años de edad) con neuroblastoma para definir la farmacocinética de la fenretinida y la máxima dosis tolerada en niños, y para evaluar la toxicidad a corto y medio plazo en este intervalo de edad (Garaventa, y col. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:2032-2039). Se administró fenretinida por vía oral una vez al día en ciclos de 28 días. Se evaluaron semanalmente las funciones hepática y renal y la evaluación clínica. Los efectos secundarios que se produjeron en 15 de los 45 sujetos probados fueron los mismos que aquellos observados en sujetos adultos. Se observó que los efectos secundarios eran tolerables y fácilmente reversibles en el plazo de 7 días tras la interrupción del tratamiento.

La fenretinida se ha estudiado ampliamente debido a sus actividades quimio-protectoras y antitumorales descritas cuando se usa sobre una variedad de células malignas, que incluyen cáncer de pulmón de células no pequeñas, neuroblastoma, sarcoma de Kaposi, cáncer de mama y glioma (Charles, y col. (2001) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47:444-450; Garaventa, y col. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:2032-2039; Lippman, y col. (2001) *J. Natl. Cancer Inst.* 93:605-618; Ponthan, y col. (2003) *Oncol. Rep.* 10:1587-1592; Puduvalli y col. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5:2230-2235; Rao, y col. (1998) *Breast Cancer Res. Treat.* 48:265-271), y se ha autorizado para ensayos clínicos de pacientes con cáncer y está siendo evaluada en ensayos de quimioprevención clínica en cáncer de pulmón, mama y de vejiga (Costa y col. (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 768:148-62).

Una cantidad eficaz de un agente (por ejemplo, fenretinida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma) o composición desvelada en el presente documento es una cantidad que (a) disminuye/reduce los niveles de AA, (b) aumenta los niveles de DHA, (c) aumenta o normaliza la relación de DHA/AA o (d) cualquier combinación de (a) - (d); un efecto que puede determinarse monitorizando, en una muestra, los niveles de AA o DHA libres o de AA y DHA incorporados en fosfolípidos. Deseablemente, el agente disminuye los niveles de AA en un paciente aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 % en comparación con un paciente que no ha recibido el agente, o aumenta los niveles de DHA al menos aproximadamente 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o 10 veces. Disminuyendo los niveles de AA y/o aumentando los niveles de DHA en el paciente se logra un aumento de la relación de DHA/AA. Deseablemente, el agente aumenta DHA/AA al menos aproximadamente 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o 10 veces. En una realización, la relación de DHA/AA se normaliza, es decir, la relación de DHA/AA en el paciente después del tratamiento es comparable a la relación de DHA/AA en un sujeto sano.

Los sujetos que pueden beneficiarse particularmente de recibir un agente que aumenta los niveles de DHA y/o disminuye los niveles de AA (y, por consiguiente, aumenta/normaliza la relación de DHA/AA) son pacientes que padecen una enfermedad o afección asociada a un desequilibrio de lípidos o que pueden estar en riesgo de una enfermedad o afección tal, en los que el tratamiento proporciona un retraso o prevención de la enfermedad o afección. Un paciente con una enfermedad o afección asociada a un desequilibrio de lípidos pretende incluir pacientes con una excesiva acumulación de ácido araquidónico unido a fosfolípido y/o alteración en el nivel de DHA incorporado en fosfolípidos. En una realización, la enfermedad o afección es una enfermedad infecciosa, tal como una infección oportunista (por ejemplo, una infección bacteriana) de las vías respiratorias que incluye, por ejemplo, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* o *Aspergillus fumigatus*, y similares. En una realización, el método de la presente invención produce al menos una disminución de 2 veces, al menos una de 3 veces, al menos una de 4 veces, al menos una de 5 veces, o al menos una 10 de veces, en la carga bacteriana en las vías respiratorias del sujeto. En otra realización, la enfermedad o afección es una enfermedad de los huesos, tal como osteopenia u

osteoporosis.

Como se usa en el presente documento, los términos “sujeto” o “paciente” se usan indistintamente, se usan para indicar cualquier animal, preferentemente un mamífero, que incluye seres humanos y primates no humanos. En una realización, el sujeto sufre desequilibrio(s) de ácidos grasos o lípidos, y más particularmente una excesiva acumulación de ácido araquidónico unido a fosfolípido y/o alteración en el nivel de DHA incorporado en fosfolípidos. En una realización, los niveles de DHA plasmático o la relación de DHA/AA plasmática del paciente son aproximadamente el 10 % inferiores a los niveles de DHA plasmático o la relación de DHA/AA plasmática medidos en un sujeto sano (es decir, un sujeto que no padece un desequilibrio de lípidos). Deseablemente, los niveles de DHA plasmático o la relación de DHA/AA plasmática en el paciente que padece un desequilibrio de lípidos son aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 % inferiores a los niveles de DHA plasmático o la relación de DHA/AA plasmática medidos en un sujeto sano. En una realización, los niveles de AA son al menos aproximadamente 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o 10 veces mayores en el paciente en comparación con los niveles medidos en un sujeto sano.

En una realización, el sujeto que puede beneficiarse particularmente de recibir un agente es un sujeto que tiene (a) una relación de DHA/AA de 0,4 o menos, (b) niveles de DHA de 3,5 ng/μg de fosfato o menos, (c) niveles de AA de 40 ng/μg de fosfato o más o (d) cualquier combinación de (a) a (c), antes de dicha administración. En una realización, el nivel o relación anteriormente mencionado se mide en una muestra de fluido biológico, tal como sangre, suero o plasma. En otra realización, el nivel o relación anteriormente mencionado se mide en una muestra de plasma.

“Enfermedad o afección asociada al desequilibrio de lípidos”, como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad o afección en la que los niveles de uno o más lípidos o en un sujeto son anómalos o anormales (es decir, son tanto mayores como menores en comparación con los niveles del (de los) lípidos(s) correspondiente(s) en un individuo sano que no padece la enfermedad o afección). En una realización, el desequilibrio de lípidos es un desequilibrio en uno o más lípidos asociados a (o unidos a) un ácido graso esencial. En otra realización, el lípido asociado a un ácido graso esencial es un fosfolípido. En otra realización, el ácido graso esencial es ácido araquidónico (AA) o ácido docosahexaenoico (DHA).

“Infección oportunista”, como se usa en el presente documento, significa la invasión por un patógeno de un huésped eucariota en el que las condiciones son favorables para el crecimiento, proliferación y posible producción de toxinas y posterior lesión al huésped. Por ejemplo, tal huésped puede ser un sujeto que tiene un sistema inmunitario que funciona mal o suprimido producido por una infección (por ejemplo, infección por el VIH, virus respiratorio sincitial (VRS), etc.) o ciertas enfermedades tales como cáncer, diabetes, fibrosis quística, anemia de células falciformes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, quemaduras graves y cirrosis del hígado. Ejemplos de infecciones oportunistas incluyen, pero no se limitan a, infecciones con: *Pneumocystis jirovecii pneumonia*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana oportunista, osteopenia u osteoporosis en un sujeto (a) disminuyendo los niveles de ácido araquidónico (AA), (b) aumentando los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA), c) aumentando la relación de DHA/AA, o (d) cualquier combinación de (a) - (c) en un sujeto, comprendiendo dicha composición:

(a) fenretinida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y

(b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los agentes (por ejemplo, fenretinida) que disminuyen/reducen los niveles de ácido araquidónico y/o aumentan/normalizan los niveles de DHA y la relación de DHA/AA pueden prepararse para uso terapéutico según los métodos desvelados en el presente documento formulando los agentes con un vehículo farmacéuticamente aceptable para obtener una composición (composición farmacéutica o medicamento). En la fabricación de una formulación farmacéutica, el agente activo, que incluye la sal fisiológicamente aceptable del mismo, se mezcla normalmente con, entre otros, un vehículo aceptable. El vehículo es aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro componente en la formulación y no ser perjudicial para el sujeto. El vehículo puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y se formula preferentemente con el compuesto como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, un comprimido, que puede contener del 0,5 % al 95 % en peso del agente activo. Uno o más agentes activos pueden incorporarse en las formulaciones de la invención, que pueden prepararse por cualquiera de las técnicas muy conocidas de la farmacia que consisten esencialmente en mezclar los componentes, que opcionalmente incluyen uno o más componentes secundarios. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro, editor, 20^a ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000

Las formulaciones de la invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, bucal (por ejemplo, sub-

lingual), parenteral (por ejemplo, intramuscular, intradérmica o intravenosa subcutánea) y tópica (es decir, superficies de las mucosas y superficies de las vías respiratorias), aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que está tratándose y de la naturaleza del agente activo particular que se usa. Son de particular interés las formulaciones para administración oral, bucal o tópica. Se contempla que las formulaciones de la presente invención pueden usarse solas o en combinación con otros terapéuticos actualmente usados para tratar enfermedades de las vías respiratorias o fibrosis quística.

Las formulaciones adecuadas para administración por vía oral pueden presentarse en unidades discretas, tales como cápsulas, sellos, pastillas para chupar o comprimidos, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del compuesto activo; como un polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión de aceite en agua o agua en aceite. Tales formulaciones pueden prepararse por cualquier método adecuado de la farmacia, que incluye la etapa de poner en asociación el compuesto activo y un vehículo adecuado (que puede contener uno o más componentes secundarios como se observa anteriormente). En general, las formulaciones de la invención se preparan mezclando uniformemente e íntimamente el compuesto activo con un vehículo líquido o sólido finamente dividido, o ambos, y a continuación, si fuera necesario, moldeando la mezcla resultante. Por ejemplo, un comprimido puede prepararse comprimiendo o moldeando un polvo o gránulo que contiene el agente activo, opcionalmente con uno o más componentes secundarios. Los comprimidos pueden prepararse comprimiendo, en una máquina adecuada, el compuesto en una forma fluida, tal como un polvo o gránulos opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte y/o agente(s) tensioactivo(s)/dispersante(s). Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando, en una máquina adecuada, el compuesto en polvo humedecido con un aglutinante líquido inerte.

Formulaciones adecuadas para administración bucal (sublingual) incluyen pastillas para chupar que tienen el agente activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; y pastillas que contienen el agente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga.

Las formulaciones para administración parenteral son preparaciones acuosas convenientemente estériles del agente activo, preparaciones que son preferentemente isotónicas con la sangre del receptor previsto. Estas preparaciones pueden administrarse por medio de inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intradérmica. Tales preparaciones pueden prepararse convenientemente mezclando el compuesto con agua o un tampón de glicina y convirtiendo la disolución resultante en estéril e isotónica con la sangre. Las formulaciones para administración parenteral también pueden mezclarse, por ejemplo, con vitamina E y/u otros antioxidantes alimentarios y suplementos alimenticios adecuados (tales como Peptamen® (Nestlé) o Oxepa® (Abbott Laboratories)).

Formulaciones adecuadas para administración tópica (por ejemplo, en el tubo oral, nasofaringe u orofaringe) toman la forma de una pomada, crema, loción, pasta, gel, espray, aerosol o aceite. Vehículos que puede usarse incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos y combinaciones de dos o más de los mismos.

Las formulaciones adecuadas para administración a la tráquea o pulmones pueden estar en forma de formulaciones líquidas o sólidas. Las formulaciones se administran deseablemente como partículas de tamaño respirable, por ejemplo, partículas de un tamaño suficientemente pequeño para pasar a través de la nariz, boca y laringe tras la inhalación y a través de los bronquios y alvéolos de los pulmones. En general, las partículas respirables oscilan de aproximadamente 0,5 a 10 micrómetros de tamaño. Las partículas de tamaño no respirables que están incluidas en el aerosol tienden a depositarse en la garganta y a tragarse, y así se minimiza la cantidad de partículas no respirables en el aerosol. Para administración nasal, se desea un tamaño de partícula en el intervalo de 10-500 micrómetros para garantizar la retención en la fosa nasal.

Las composiciones en partículas sólidas que contienen partículas secas respirables de agente activo micronizado pueden prepararse moliendo compuesto seco con un mortero y pistilo, y a continuación pasando la composición micronizada a través de un tamiz de malla 400 para desintegrar o separar grandes aglomerados. Una composición en partículas sólidas que contiene el agente activo puede contener opcionalmente un dispersante que sirve para facilitar la formación de un aerosol. Un dispersante adecuado es lactosa, que puede mezclarse con el agente activo en cualquier relación adecuada, por ejemplo, una relación 1 a 1 en peso.

Pueden producirse aerosoles de partículas sólidas que contienen el agente activo y el tensioactivo con cualquier generador de aerosol de medicamento en partículas sólidas. Los generadores de aerosoles para administrar medicamentos en partículas sólidas a un sujeto producen partículas que son respirables, y generan un volumen de aerosol que contiene una dosis medida predeterminada de un medicamento a una tasa adecuada para administración humana. Un tipo ilustrativo de generador de aerosol de partículas sólidas es un insuflador. Formulaciones adecuadas para administración por insuflación incluyen polvos finamente triturados que pueden administrarse por medio de un insuflador o tomarse en la fosa nasal en el modo en el que se toma el rapé. En el insuflador, el polvo, por ejemplo, una dosis medida del mismo eficaz para llevar a cabo los tratamientos descritos en el presente documento, está contenido en cápsulas o cartuchos, normalmente hechas de gelatina o plástico, que son tanto perforadas como abiertas *in situ* y el polvo administrado por el aire se extrae mediante el dispositivo tras la inhalación o por medio de una bomba manualmente operada. El polvo empleado en el insuflador consiste tanto

únicamente en el principio activo como en una mezcla en polvo que contiene el principio activo, un diluyente en polvo adecuado, tal como lactosa, y un tensioactivo opcional. El principio activo normalmente es del 0,1 al 100 peso/peso (peso/peso) de la formulación. Un segundo tipo de generador de aerosol ilustrativo es un inhalador de dosis medida. Los inhaladores de dosis medidas son dispensadores de aerosol presurizados, que normalmente
 5 contienen una formulación en suspensión o disolución del principio activo en un propulsor licuado. Durante el uso, estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para administrar un volumen dosificado, normalmente de 10 a 150 μ l, para producir un spray de partículas finas que contiene el principio activo. Propulsores apropiados incluyen ciertos compuestos de clorofluorocarburo, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano y mezclas de los mismos. La formulación puede contener
 10 adicionalmente uno o más co-disolventes, por ejemplo, etanol, emulsionantes y otros tensioactivos de formulación, tales como ácido oleico o trioleato de sorbitano, antioxidantes y aromatizantes adecuados.

Los aerosoles de partículas líquidas que contienen un agente activo de la presente invención pueden producirse por cualquier medio adecuado, tales como con un nebulizador. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.501.729.
 15 Los nebulizadores son dispositivos comercialmente disponibles que transforman las disoluciones o suspensiones del principio activo en una niebla de aerosol terapéutico tanto por medio de aceleración de un gas comprimido, normalmente aire u oxígeno, a través de un estrecho orificio de venturi o por medio de agitación ultrasónica. Formulaciones adecuadas para su uso en nebulizadores contienen el principio activo en un vehículo líquido en una cantidad de hasta el 40 % peso/peso, preferentemente inferior al 20 % peso/peso de formulación. El vehículo
 20 normalmente es agua o una disolución alcohólica acuosa diluida, preferentemente hecha isotónica con líquidos corporales mediante la adición de, por ejemplo, cloruro sódico. Aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se prepara estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, aromatizantes, aceites volátiles, agentes de tamponamiento y emulsionantes, y otros tensioactivos de formulación.

Un aerosol, si se forma a partir de partículas sólidas o líquidas, puede producirse por un generador de aerosol a una tasa de aproximadamente 10 a 150 litros por minuto, más generalmente de aproximadamente 30 a 150 litros por minuto, y lo más deseablemente aproximadamente 60 litros por minuto. Los aerosoles que contienen mayores cantidades de medicamento pueden administrarse más rápidamente.

Una cantidad eficaz o dosis de un agente activo cualquiera variará algo de compuesto a compuesto, sujeto a sujeto, y dependerá de factores tales como la afección del sujeto y la vía de administración. Tales dosificaciones pueden determinarse según procedimientos farmacológicos rutinarios conocidos para aquellos expertos en la materia, particularmente en vista de la divulgación proporcionada en el presente documento y las actuales prácticas de dosificación de agentes activos conocidos.

Por ejemplo, la fenretinida se ha usado sistémicamente alcanzando un nivel en plasma de aproximadamente 0,1, 2, 3, 5 μ M a 10 ó 20 μ M. Para la dosificación oral, la fenretinida normalmente se usa a 50 ó 100 a 500 ó 1000, 2000 ó 3000 mg/m² de área superficial del cuerpo por día. En realizaciones particulares, se alcanzan concentraciones de 0,1 a 10 μ M en plasma. En una realización, el agente (por ejemplo, fenretinida) se administra bisemanalmente.

También se desvelan, pero ya no se reivindican, kits o envases (por ejemplo, envases comerciales) que comprenden las composiciones o agentes anteriormente mencionados junto con instrucciones para su uso para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección seleccionada de una enfermedad o afección asociada a un desequilibrio de lípidos, una enfermedad infecciosa y una enfermedad de los huesos en un sujeto.

También se desvela, pero ya no se reivindica, un método de identificación de un compuesto (por ejemplo, método de cribado) para tratar o prevenir enfermedad de los huesos, que comprende determinar si (a) el nivel de DHA disminuye, (b) el nivel de AA aumenta, (c) la relación de DHA/AA disminuye, o (d) cualquier combinación de (a) a (c), en presencia frente a la ausencia de un compuesto de prueba, en el que dicho aumento o disminución es indicativo de que dicho compuesto de prueba puede usarse para tratar o prevenir enfermedad de los huesos.

Los métodos de cribado mencionados en el presente documento pueden emplearse tanto con un único compuesto de prueba como con una pluralidad o biblioteca (por ejemplo, una biblioteca combinatoria) de compuestos de prueba. En el último caso, los efectos sinérgicos proporcionados por las combinaciones de compuestos también pueden identificarse y caracterizarse. Los compuestos anteriormente mencionados pueden usarse para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección asociada al desequilibrio de lípidos, o pueden usarse como compuestos principales para el desarrollo y prueba de compuestos adicionales que tienen especificidad, eficacia y/o propiedades farmacológicas (por ejemplo, farmacocinéticas) mejoradas. En una realización, el compuesto puede ser un profármaco que se altera en su forma activa en el sitio de acción apropiado, por ejemplo, en tejido de pulmón. En ciertas realizaciones, puede automatizarse una o una pluralidad de las etapas del método de cribado/prueba de la invención.

Según la presente invención, los niveles de AA o DHA (tanto libre como unido a lípido) pueden medirse en una muestra biológica obtenida de un sujeto. En general, muestras biológicas típicas incluyen, pero no se limitan a, esputo, suero, líquido linfático, sangre, plasma, glóbulos sanguíneos (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica), tejido o muestras de biopsia con aguja fina, orina, líquido peritoneal, calostros, leche de mama, líquido

fetal, lágrimas y líquido pleural, o células de los mismos. Los métodos para determinar los niveles AA y DHA en una muestra biológica son muy conocidos en la técnica.

5 También se desvela, pero ya no se reivindica, un método de tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada de una enfermedad o afección asociada a un desequilibrio de lípidos, una enfermedad infecciosa y una enfermedad de los huesos, en un sujeto, comprendiendo dicho método:

10 (i) evaluar (a) el nivel de DHA, (b) nivel de AA, (c) relación de DHA/AA, o (d) cualquier combinación de (a) a (c), en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto; y

(ii) administrar fenretinida a dicho sujeto si dicho (a) nivel de DHA disminuye, (b) nivel de AA aumenta, (c) la relación de DHA/AA disminuye, o (d) cualquier combinación de (a) a (c), con respecto a un nivel o relación de control correspondiente.

15 El nivel o relación de control puede ser, por ejemplo, un nivel o relación correspondiente determinado en una muestra biológica de un sujeto que no padece una enfermedad o afección seleccionada de una enfermedad o afección asociada a un desequilibrio de lípidos, una enfermedad infecciosa y una enfermedad de los huesos. El nivel o relación de control también puede ser el nivel o relación determinado en una muestra biológica obtenida del mismo sujeto, pero en un momento anterior (por ejemplo, cuando el sujeto no estaba afectado por la enfermedad o afección). El nivel o relación de control también puede corresponderse con un nivel o relación estándar establecido.

20 La presente invención se ilustra en más detalle por los siguientes ejemplos no limitantes.

25 Ejemplos

EJEMPLO 1: MATERIALES Y MÉTODOS

30 *Animales.* Se usaron pares reproductores de ratones C57BL/6-Cftr consanguíneos, heterocigóticos (HZ) en el sitio CFTR. Todos los bebés se genotiparon entre los días 12 y 14 de su vida. Los animales se mantuvieron en jaulas con lecho de maíz estéril (Anderson, Bestmonro, LA) y se mantuvieron en estanterías ventiladas (Lab Products). Los ratones se alimentaron con tanto la dieta de ratón irradiada modificada con NIH-31 (Harlan Teklad, Indianapolis, IN) como con una dieta líquida a partir de 14 días de edad (dieta líquida Peptamen; Nestle Canada, Brampton, ON). La dieta líquida se preparó fresca cada mañana y se proporcionó en tubos de centrifuga de 50 ml (Fisher Scientific Ltd, Nepean, ON). Ratones C57BL/6-Cftr+/+ (naturales) de la misma edad y sexo (hembra; n = 10, macho; n = 31) y ratones C57BL/6-Cftr-/- (Cftr-KO) (hembra; n = 8, macho; n = 18) estuvieron libres de patógenos murinos, *Helicobacter* y de parásitos. Se alojaron (1 - 4 animales/jaula), se alimentaron y se mantuvieron en una unidad de instalación de barrera bajo condiciones libres de patógenos específicas. Se realizaron procedimientos experimentales con los ratones según las pautas del Canadian Council on Animal Care y con la autorización del comité de cuidado animal del Centro de Salud de la Universidad McGill, Montreal, Quebec, Canadá.

40 *Suplementación de dieta con fenretinida.* Ejemplos 2 a 6: Se resuspendió polvo de fenretinida (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) en 95 % de etanol y posteriormente se incorporó en la dieta líquida Peptamen. Se protegió de la luz y se mantuvo a 4 °C antes de administrarse a los ratones (5 mg/kg por día por ratón). Se prepararon similarmente dietas tratadas con control añadiendo etanol a la dieta Peptamen, pero omitiendo la suplementación de fenretinida. La dieta se administró cada mañana durante 28 días consecutivos con monitorización específica de la cantidad consumida por los ratones en cada jaula. Ejemplos 7 a 12: El polvo de fenretinida fue amablemente proporcionado por el Dr. Robert Smith (NIH; Bethesda, MD, EE.UU.). La fenretinida se resuspendió en 95 % de etanol para preparar una concentración de 2 µg/µl. Se incorporaron aproximadamente 40 µl de esta preparación en la dieta líquida Peptamen (5 mg/kg por día por ratón). A continuación, el alimento preparado que contiene fenretinida se almacenó en la oscuridad a 4 °C durante no más de 3 horas antes de administrarse a los ratones. Para garantizar que se consumió la dosis de fármaco entera, los ratones se administraron con 10 ml de Peptamen tratado con fenretinida, que representa 2/3 del consumo de alimentos de ratón diario, a última hora de la tarde. Los 5 ml restantes de Peptamen (sin fenretinida) se administraron a la mañana siguiente. Los ratones se trataron dos veces a la semana durante 4 semanas. Durante el periodo de tratamiento, cada ratón se mantuvo en una jaula separada (incluyendo ratones WT) y se monitorizaron para garantizar que se consumió toda la cantidad de Peptamen que contiene la fenretinida o sin ella. Se preparó la dieta para el grupo de control tratado con control y se administró similarmente a la descrita anteriormente, añadiendo el mismo volumen de etanol a la dieta Peptamen, pero omitiendo la suplementación de fenretinida.

60 *Preparación de inóculo de P. aeruginosa.* Con el fin de establecer un modelo de infección pulmonar prolongada, perlas de agar impregnadas en bacterias se prepararon frescas el día antes de cada experimento según métodos establecidos (Guilbault, y col. (2005) Laboratory Animals 39:336-352), y se guardaron a 4 °C durante la noche. Brevemente, las bacterias (cepa 508 de *P. aeruginosa*) de un cultivo durante la noche se cultivaron durante aproximadamente 3 horas en una estufa de incubación con agitación a 37 °C, hasta que alcanzó una fase semilogarítmica. Las bacterias en fase logarítmica se concentraron y se resuspendieron en 5 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS; INVITROGEN™, Mississauga, ON). Se añadió una alícuota de 5 ml del

caldo bacteriano concentrado a 52 °C, 1,5 % de agar tripticasa de soja (DIFCO®, Detroit, MI) (se prepararon perlas de agarosa libres de bacterias usando PBS en lugar de una suspensión bacteriana). Esta mezcla se añadió rápidamente a aceite mineral pesado a 52 °C y se agitó rápidamente, primero a temperatura ambiente durante 6 minutos, seguido de enfriamiento en hielo con agitación continua durante 10 minutos. La mezcla de aceite-agar se

5 centrifugó para sedimentar las perlas. Las perlas se lavaron con PBS y su tamaño se verificó microscópicamente y solo se usaron aquellas preparaciones que contenían perlas predominantemente de 100-250 micrómetros de diámetro como inóculo. El inóculo se preparó diluyendo la suspensión de perlas a 1×10^6 UFC por 50 μ l (volumen de inyección).

10 *Infección pulmonar de ratón.* Los ratones se anestesiaron con una combinación de ketamina (7,5 mg/ml) y xilazina (0,5 mg/ml) administrada intraperitonealmente a una dosis de 20 ml/kg de peso corporal. Una vez el ratón se anestesió satisfactoriamente, el animal se instaló bajo binoculares (microscopio M650, Wild Leitz, Willowdale, ON) en la posición vertical y se mantuvo en una mesa limitadora manteniendo el animal por sus dientes incisivos superiores (Guilbault, y col. (2005), arriba). A continuación, la lengua se colocó suavemente al lado de la boca y se

15 insertó una aguja de sonda nasogástrica 26-G en la boca y se guió a través de la faringe suavemente tocando las cuerdas vocales para ver la luz de la tráquea; a continuación, la aguja se introdujo en la tráquea para alcanzar el pulmón para la inyección bilateral del inóculo de 50 microlitros. Después de la inoculación, el animal recuperó el reflejo de enderezamiento en el plazo de una hora. Se usó una dosis final de 1×10^6 *P. aeruginosa* para la infección usando ratones naturales y *Cftr*-KO. Los ratones se monitorizaron 3 veces al día; la máxima pérdida de peso

20 permitida fue del 15 %. Los ratones se sacrificaron por sobredosis de CO₂.

Lavado broncoalveolar. Se lavó la circulación por infusión intracardiaca lenta de solución salina equilibrada de Hank libre de cationes divalentes (HBSS; INVITROGEN™, Mississauga, ON). La tráquea se canuló con una unidad de colocación de catéter intravenoso de calibre 22 (CRITIKON®, GE Medical Systems, Tampa, FL) conectada a dos

25 jeringas de 5 ml mediante una llave de paso de 3 vías con un cuello giratorio (Namic U.S.A., Glens Falls, NY). Los alvéolos de ratones infectados se lavaron 3 veces con 1,4 ml de HBSS libre de cationes divalentes. El volumen de líquido de lavado broncoalveolar recuperado fue aproximadamente 1,2 ml. Se centrifugaron las células alveolares y el sobrenadante se usó para la determinación del recuento de UFC antes de guardarse a -20 °C, hasta que se ensayó para las concentraciones de citocinas. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de medio Eagle modificado

30 por Dulbecco (DMEM; INVITROGEN™) complementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF; Hyclone, Logan, UT), se diluyeron en disolución de Turk y se contaron usando un hematocitómetro. La proporciones de macrófagos, linfocitos y PMN se calcularon después de contar aproximadamente 300 células alveolares sobre preparaciones Cytospin teñidas con la tinción DIF-QUICK® (American Scientific Products, McGaw Park, IL).

35 *Homogeneizados de pulmón.* Se recogieron pulmones de ratones infectados y se homogeneizaron durante 60 segundos a alta velocidad (homogeneizador PT10135; Brinkmann Instruments Co., Mississauga, ON) en 4 ml de PBS estéril (INVITROGEN™). Se sembraron diluciones de 10 veces en serie de homogeneizados de pulmón sobre placas de Petri que contenían TSA. Se contó el número de UFC por pulmón después de la incubación durante la

40 noche a 37 °C. Para las mediciones de citocinas, los homogeneizados de pulmón se centrifugaron a 1500 x g a 4 °C durante 10 minutos; a continuación, los sobrenadantes se extrajeron, se separaron en alícuotas en tubos nuevos y se guardaron a -20 °C hasta que se ensayaron para las concentraciones de citocina.

Análisis de ácidos grasos. Se sumergieron tejidos picados aislados de ratones en BHA 1 mM en cloroformo y metanol (2:1 vol). Para muestras de plasma (ratón y humanas), se añadieron 100 μ l de plasma a 1 ml de BHA. A

45 continuación se extrajeron los lípidos de todas las muestras según métodos convencionales (Folch y col. (1957) J. Biol. Chem. 226:497-509). La identificación de fosfolípidos se llevó a cabo por extracción por cromatografía en capa fina (Van Handel & Zilversmit (1957) J. Lab. Clin. Med. 50:152-157). Por tanto, se secaron los lípidos fraccionados y se resuspendieron en heptano: metanol: ácido sulfúrico (5:1:1) para la extracción de ácidos grasos libres. Se usó diazometano para esterificar los ácidos grasos liberados y los ésteres se identificaron por CG/EM (Hewlett Packard

50 5880A, columna capilar WCOT (Supelco-10, 35 m x 0,5 mm, 1 μ m de espesor)) usando patrones comerciales (Sigma-Aldrich).

Análisis de ceramidas/esfingolípidos. Se determinó la concentración de ceramida en los homogeneizados (de pulmón, hígado, íleon, páncreas) y plasma de ratones y seres humanos por ELISA 39;40 sobre muestras de lípidos

55 separadas por cromatografía en capa fina, como se ha descrito anteriormente. Los fosfolípidos de la sílice seca se resuspendieron en etanol y se usaron para recubrir placas Nunc específicas para la unión a lípidos. A continuación se lavaron las placas, se incubaron con tampón de bloqueo durante 1 h a 37 °C (PBS, 0,1 % de Tween 20 y 1 % de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, Oakville, ON)), y posteriormente se incubaron con anticuerpo (Ab) murino anti-IgM de ceramida (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37 °C. Las placas se lavaron de nuevo y a continuación se

60 incubaron con Ab anti-IgM de ratón conjugada con peroxidasa durante 1 h a 37 °C. Finalmente, las placas se incubaron con el sustrato de peroxidasa (TMB; Roche, Laval, QC). La intensidad de la reacción colorimétrica se determinó mediante espectrofotometría a 405 nm. Los niveles de ceramida se calcularon con referencia a una curva patrón usando ceramida (Sigma-Aldrich). Se evaluaron los niveles de fosfato, como se describe previamente, por el ensayo de fosfato PiBlue™ (Boehringer Ingelheim, Chuao, Caracas), según las instrucciones del fabricante.

65 μ -CT. Se sacrificaron ratones por CO₂ y se desangraron por punción cardíaca. Se extrajeron fémures, tibias y

vertebras, se quitó el tejido blando y se fijaron en 4 % de paraformaldehído durante la noche. Se realizó tomografía microcomputarizada (μ CT) en el fémur izquierdo después de la fijación durante la noche. La metáfisis distal se barrió con un instrumento de μ CT Skyscan 1072 (Skyscan, Amberes, Bélgica). La adquisición de imágenes se realizó a 100 kV y 98 μ A, con una rotación de 0,9° entre marcos. Se usaron imágenes bidimensionales para generar reconstrucciones tridimensionales para obtener datos cuantitativos usando el software 3D Creator suministrado con el instrumento (ANT 3D Creator software, Skyscan, Amberes, Bélgica).

Análisis histológico. Los ratones se administraron con una inyección intra-peritoneal de 30 mg/kg de calceína 7 días y 2 días antes del sacrificio para marcar superficies activamente mineralizantes. Después de la fijación durante la noche en 4 % de paraformaldehído y aclarado en solución salina tamponada con fosfato (PBS), los fémures y tibias derechos se incorporaron en poli(metacrilato de metilo) (MMA) o una mezcla de 50 % de MMA y 50 % de metacrilato de glicol (GMA). Se cortaron secciones de 4 a 6 μ m en serie sobre un micrótopo giratorio Leica RM 2155 modificado (Leica Microsystems, Richmond Hill, Ontario, Canadá). Los tejidos incorporados en MMA se tiñeron con von Kossa y azul de toluidina, mientras que las secciones de MMA-GMA de 4 μ m se tiñeron con actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y fosfato alcalino (ALP). Se capturaron imágenes usando un microscopio Leica DMR (Leica Microsystems) equipado con una cámara Retiga 1300 (Qimaging, Burnaby, British Columbia, Canadá). El fémur y tibia izquierdos y las vértebras lumbares se descalcificaron con 4 % de EDTA para incorporarlos en parafina después de 14 días. Se cortaron secciones de 5 μ m en serie y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Los osteoblastos se definieron como células en forma de bacilo mononucleadas y se identificaron a lo largo de la superficie de las láminas trabeculares. Los osteoclastos se definieron como células multinucleadas que son mucho mayores que los osteoblastos y muestran morfología de macrófagos típica.

Mediciones de citocinas/quimiocinas. Se evaluaron los niveles de 10 citocinas/quimiocinas (IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-15, IL-17, G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), MIP-1a (proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos) y N51/KC (quimioatrayente de neutrófilos inducido por citocinas) en homogeneizados de pulmón preparados a partir de animales infectados con el kit LINCOpex de citocinas/quimiocinas de ratón (Linco Research, Inc, St-Charles, MO) usando tecnología Luminex™ y se ensayaron con el sistema Luminex100LS™ por Linco Research, Inc. El límite de detección de citocinas para este ensayo fue 3,2 pg/ml.

Análisis estadísticos. Ejemplos 2 a 6: Se analizaron los datos usando el software Sigma Stat V3.1 (SPSS Inc, Chicago, IL). Se evaluaron diferencias estadísticamente significativas entre medias y medianas de los grupos estudiados usando la prueba de la t de Student y la prueba de la U de Mann-Whitney no paramétrica, respectivamente. Se usaron ANOVA unilateral y ANOVA de Kruskal-Wallis de rangos, combinados con los procedimientos apropiados de comparaciones múltiples por pares para evaluar las diferencias entre múltiples grupos. La significancia se fijó a un valor de p bilateral de $\leq 0,05$. Ejemplo 7 a 13: Se analizaron los datos usando el software GraphPad Prism Versión 4.03 (GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos). Se analizaron todos los datos por análisis unilateral paramétrico de la varianza (ANOVA), seguido de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. La significancia se fijó a un valor de p bilateral de $\leq 0,05$.

Pacientes con FQ. Para el análisis preliminar de niveles de ceramida, se recogieron muestras de plasma de pacientes con fibrosis quística, enrolados en una clínica de FQ (Montreal Chest Institute Research Center, Centro de salud de la Universidad McGill). Se reclutaron pacientes que tenían un amplio intervalo de genotipos de CFTR y tenían entre 18 y 62 años de edad. Ningún paciente se excluyó debido a raza, sexo o antecedentes étnicos.

Voluntarios sanos. Se reclutaron sujetos en los hospitales asociados al Centro de salud de la Universidad McGill. Los criterios de inclusión para el estudio incluyeron sujetos con FQ masculinos y femeninos de la misma edad y que no habían tenido episodios potencialmente mortales de ninguna enfermedad en el plazo de los 6 meses previos. Los criterios de exclusión incluyeron pruebas del abuso del alcohol o de drogas, cualquier enfermedad clínicamente significativa, tratamientos de inmunoterapia en el plazo de los 6 meses previos y el uso de cualquier fármaco que regule el metabolismo de los lípidos en los últimos 6 meses. El estudio fue autorizado por el comité de ética de investigación y la oficina de contratos clínicos del Instituto torácico de Montreal.

Recogida de datos. A cada participante se le asignó un número arbitrario que se guardó de aquellos que procesaron y analizaron las muestras para prevenir el sesgo en la interpretación de los resultados. A los pacientes con FQ y voluntarios sanos se les preguntó su altura y peso para calcular su índice de masa corporal. Los pacientes con FQ también desvelaron su información de la historia clínica con respecto al estado pulmonar y de infección.

Preparación de sangre. Se tomaron tres (3) ml de sangre de cada paciente en tubos K2EDTA recubiertos por pulverización BD Vacutainer® (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) para las extracciones de plasma y de ADN. Se tomaron otros dos mililitros en tubos BD Vacutainer® SST™ (BD) para la recogida de suero. Los tubos se centrifugaron a 1100 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Para el análisis de ácidos grasos, se añadieron 100 μ l de plasma a 1 ml de disolución de hidroxil-anisol butilado (BHA 100 mM en 2:1 de cloroformo/metanol) y se guardaron a -80 °C. Se tomaron en alícuotas suero y plasma y se guardaron a -80 °C para el posterior análisis.

EJEMPLO 2: NIVELES DE CERAMIDA EN PLASMA DE PACIENTES CON FQ Y VOLUNTARIOS SANOS

(ANÁLISIS DE ESPECTROSCOPÍA DE MASAS)

5 El solicitante buscó primero determinar si las personas afectadas con FQ mostraron diferentes niveles de ceramidas en su sangre en comparación con un grupo de control. Las características de los sujetos humanos (sanos y FQ) se proporcionan en la tabla 1.

TABLA 1. Características de sujetos humanos; análisis de espectroscopía de masas

	Voluntarios sanos	Pacientes con fibrosis quística
N	10	10
Edad	34,7 ± 3,7	37,2 ± 4,2
Peso (kg)	70,1 ± 4,3	58,5 ± 3,0
Altura (cm)	166,2 ± 3,4	166,7 ± 3,4
BMI	25,4 ± 1,3	21,0 ± 1,0
Genotipos		ΔF508/ΔF508
		ΔF508/ΔF508
		ΔF508/ΔF508
		ΔF508/R334w
		ΔF508/desconocida
		ΔF508/desconocida
		ΔF508/desconocida
	621+1G > T /L206W	
	desconocida/desconocida	

10 Se probó el plasma de pacientes con FQ y voluntarios sanos para niveles de ceramida y los resultados obtenidos demostraron que existen discrepancias en las especies de ceramida específicas entre estos dos grupos. Como se muestra en la figura 1A, C14:0 (P=0,048), C20:1 (P=0,017), C22:0 (P=0,005), C22:1 (P=0,003), C24:0 (P=0,033) y DH-C16:0 (P=0,043) mostraron una reducción estadísticamente significativa en pacientes con FQ en comparación con sus controles sanos del mismo sexo y edad. Todas las otras variantes de ceramida analizadas no fueron estadísticamente diferentes entre los dos grupos (oscilando los valores de P de 0,133 a 0,732). La diferencia global en los niveles acumulados de ceramida entre pacientes con FQ y controles sanos fue altamente significativa (P = 0,0003), como se demuestra por la suma de las especies analizadas en la figura 1B.

EJEMPLO 3: ANÁLISIS DE NIVELES DE CERAMIDA EN RATONES *Cftr*-KO

20 Se analizaron niveles de ceramida en ratones *Cftr*-KO (modelo de fibrosis quística murina). Ratones *Cftr*-KO* tienen una delección completa del gen CFTR y desarrollan espontáneamente enfermedad pulmonar durante un cierto periodo de tiempo. Se desarrolló y se usó un método alternativo más asequible a la técnica de espectroscopía de masas (EM) para analizar los niveles de ceramida. La eficacia de un ensayo de ELISA usando un anticuerpo monoclonal que reconoce muchas especies de ceramida se evaluó comparando los resultados obtenidos con aquellos obtenidos por espectroscopía de masas. Para reducir la posibilidad de que el anticuerpo monoclonal (mAb) reconociera otros lípidos distintos de los derivados de ceramida, las muestras de plasma se prepararon separando los fosfolípidos por cromatografía en capa fina (CCF) y a continuación se procesó la muestra separada por ELISA (véase el ejemplo 1).

30 Se seleccionaron arbitrariamente treinta (30) muestras para someterse al análisis por ambos métodos. El análisis de regresión lineal mostró que el ELISA detectó los niveles totales de ceramida similarmente al método de EM (tabla 2, P=0,002). A continuación, el análisis se realizó en muestras de pulmón y de plasma de ratones usando el ensayo de ELISA para medir los niveles de ceramida en ratones naturales y *Cftr*-KO.

35 TABLA 2. Análisis de regresión lineal; niveles de detección de ceramida de EM frente a ELISA

N	R ²	F	Valor de p
30	0,293	11,6	0,002

Se midieron los niveles basales de ceramida encontrada en las muestras de pulmón y de plasma de ratones *Cftr*-

KO, ratones heterocigóticos para el gen *Cftr* (HZ) y sus controles WT. Como se observa en la figura 2, los ratones sin infectar con diversas combinaciones del gen CFTR funcional o anómalo tienen niveles significativamente diferentes de ceramida endógena en su tejido de pulmón (panel A, $P \leq 0,001$) y plasma (panel B, $P = 0,002$). Hubo diferencias sorprendentes (± 10 veces) en la mediana de los niveles de ceramida entre los ratones *Cftr*-KO y WT, para tanto las muestras de pulmón como de plasma. Apenas fueron detectables los niveles de ceramida en ratones *Cftr*-KO. De forma interesante, ratones HZ, que poseen un alelo normal y uno extirpado del gen *Cftr*, tienen niveles de ceramida 2,3 veces menores en los pulmones y niveles de ceramida 2,6 veces menores en el plasma en comparación con sus homólogos WT. Estos interesantes hallazgos soportan adicionalmente la existencia de una relación entre el genotipo *Cftr* y los niveles de ceramida detectados en los pulmones de estos ratones. No se encontró correlación entre los niveles de ceramida en los pulmones y el peso de los ratones (WT; $P = 0,061$, *Cftr*-KO; $P = 0,687$), ni entre los niveles de ceramida en los pulmones y la edad de los ratones (WT; $P = 0,251$, *Cftr*-KO; $P = 0,187$).

A continuación se estudió el efecto de la administración de fenretinida sobre los niveles de ceramida en estos ratones. El tratamiento con fenretinida causó un aumento en los niveles de ceramida, como se muestra claramente en la tabla 3. Los ratones WT que se trataron con fenretinida mostraron el aumento más pequeño, con un aumento de 1,4 veces (pulmón) y 1,6 veces (plasma) en sus niveles de ceramida en comparación con sus homólogos WT no tratados. Los ratones HZ mostraron un efecto intermedio con un aumento de 2,1 veces (pulmón) y 2,7 veces (plasma) en comparación con sus homólogos HZ no tratados. Los ratones *Cftr*-KO tuvieron el impacto más impresionante, que demostró un aumento de 7,0 veces (pulmón) y 6,9 veces (plasma) en los niveles de ceramida promedio en comparación con sus homólogos *Cftr*-KO no tratados. Estos aumentos en los niveles de ceramida producidos por fenretinida en *Cftr*-KO conducen a la desaparición de la diferencia que existió (como se representa en la figura 2) entre los ratones *Cftr*-KO y los ratones WT a los niveles basales, en tanto las muestras de pulmón como las muestras de plasma (datos no mostrados), conduciendo los niveles de ceramida de ambos grupos de ratones a niveles similares.

TABLA 3. Inducción de niveles de ceramida por fenretinida en ratones no infectados

Genotipo <i>Cftr</i>	Aumento en veces (tratados con FEN con respecto a CTRL*)	
	Pulmón	Plasma
WT	1,4 (n=10)	1,6 (n=12)
HZ	2,1 (n=3)	2,7 (n=3)
<i>Cftr</i> -KO	7,0 (n=3)	6,9 (n=3)

* Los grupos CTRL incluyen muestras no tratadas y tratadas con control

La infección con *P. aeruginosa* no afectó por sí misma los niveles de ceramida detectados en los pulmones cuando se compararon con los niveles encontrados en ratones no infectados para tanto animales WT ($p = 0,715$) como *Cftr*-KO ($p = 0,630$) (datos no mostrados). Los presentes inventores evaluaron a continuación los niveles de ceramida en ratones infectados que fueron tanto no tratados/tratados con control (EtOH) como tratados con fenretinida. En ratones infectados con *P. aeruginosa* (figura 3), los presentes inventores observaron significativamente ($p \leq 0,001$) menores niveles de ceramida en los pulmones (figura 3A) y muestras de plasma (figura 3B) de ratones *Cftr*-KO (barras blancas) en comparación con controles infectados WT (barras grises) en tanto ratones tratados con control (CTRL) como tratados con fenretinida (FEN). Además, cuando los ratones se trataron con fenretinida, se observó un aumento en los niveles de ceramida en tanto ratones WT como *Cftr*-KO, cuando se comparó con sus grupos de control tratados con control respectivos. Se midió un aumento de aproximadamente 7 veces en los niveles de ceramida en los ratones *Cftr*-KO tratados con fenretinida en comparación con su controles *Cftr*-KO tratados con control. En cuanto a los ratones WT, el tratamiento con fenretinida también indujo un aumento en los niveles de ceramida en comparación con sus homólogos WT no tratados, pero a una magnitud más pequeña (aprox. 2 veces) en comparación con *Cftr*-KO. De forma interesante, los niveles de ceramida observados en los *Cftr*-KO tratados con fenretinida alcanzaron niveles similares a aquellos observados en los ratones WT tratados con control. En general, estos resultados indican que los ratones *Cftr*-KO tienen menores niveles de ceramida basales en los pulmones en comparación con sus controles naturales antes y durante la infección por *P. aeruginosa*. Inesperadamente, el tratamiento con fenretinida fue capaz de aumentar considerablemente los niveles de ceramida en los pulmones y tejidos plasmáticos en los ratones *Cftr*-KO.

También se observó una diferencia de peso estadísticamente significativa entre los ratones *Cftr*-KO ($n = 14$) y naturales ($n = 17$) como se ha determinado por el porcentaje de pérdida de peso media en el día 2 y día 3 después de la infección (tabla 4).

TABLA 4

Días después de la infección	Pérdida de peso media (% de peso inicial)				
	Natural	± EEM	<i>Cftr</i> -KO	± EEM	Valor de p
1	-4,5	0,4	-4,7	0,9	0,799
2	-10,1	0,6	-13,5	1,5	0,030*
3	-11,2	0,9	-16,2	1,9	0,016*

EEM, error estándar de la media.

*Diferencias estadísticamente significativas entre los ratones naturales y *Cftr*-KO ($P \leq 0,05$).

- 5 Se realizó la monitorización cuidadosa para determinar si la suplementación de la dieta con fenretinida podría afectar la pérdida de peso media y no se observó diferencia significativa en el porcentaje entre los grupos de control tratados con fenretinida y tratados con control en ninguno de los días después de la infección ($P \leq 0,05$ para el día 1 a día 3 después de la infección; tabla 5).

10 TABLA 5

Días después de la infección (valor de p)	Pérdida de peso media (% de peso inicial)			
	Natural		<i>Cftr</i> -KO	
	CTRL n = 6	FEN n = 11	CTRL n = 6	FEN n = 8
1 (0,598)	-3,9 ± 0,8	-4,8 ± 0,4	-5,7 ± 1,7	-4,0 ± 1,1
2 (0,179)	-10,6 ± 1,3	-9,9 ± 0,5	-14,2 ± 3,2	-12,9 ± 0,9
3 (0,114)	-11,2 ± 1,3	-11,1 ± 1,2	-17,2 ± 3,7	-15,3 ± 1,8

Los datos se presentan como pérdida de peso media ± EEM.

CTRL: no tratados o tratados con control; FEN: tratados con fenretinida.

15 EJEMPLO 4: CÉLULAS INFLAMATORIAS EN LOS PULMONES DE RATONES NATURALES Y *CFTR*-KO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE FENRETINIDA

- Se evaluó el número de células alveolares del fluido de lavado broncoalveolar en tanto ratones *Cftr*-KO ($n = 20$) como naturales ($n = 25$) 3 días después de infección con 1×10^6 *P. aeruginosa* incorporadas en perlas de agar. El tratamiento con fenretinida no tuvo efecto sobre las células reclutadas en los pulmones de ratones infectados en comparación con los ratones tratados con control en el día 3 después de la infección. Específicamente, no se encontró diferencia significativa en el número total medio de células alveolares en los pulmones entre los ratones *Cftr*-KO tratados con control ($1,2 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$) y los ratones *Cftr*-KO tratados con fenretinida ($1,1 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$) ($p = 0,530$). Similarmente, no se observó diferencia significativa en el número total medio de células alveolares en los pulmones entre los ratones naturales tratados con control ($1,0 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$) y los ratones naturales tratados con fenretinida ($1,2 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^6$) ($p = 0,280$). Cuando se cuantificaron y se compararon la cantidad de diferentes tipos de células inflamatorias encontradas en los pulmones de ratones infectados tratados con fenretinida y tratados con control, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Esto se aplicó a los diferentes tipos de células inflamatorias estudiadas y para tanto ratones naturales como *Cftr*-KO (neutrófilos, $p = 0,143$; monocitos, $p = 0,223$; linfocitos, $p = 0,400$). En resumen, el tratamiento con fenretinida no influye en las cantidades de diferentes tipos de células inflamatorias en el modelo de ratón de infección pulmonar por *P. aeruginosa* empleado en el día 3 después de la infección.

- También se probaron homogeneizados de pulmón de ratones WT y *Cftr*-KO para determinar el nivel de 10 citocinas para evaluar los posibles efectos inflamatorios de la suplementación de la dieta con fenretinida. Se detectaron niveles de IL-17 estadísticamente menores (disminución de 2,9 veces; $p = 0,049$) en ratones *Cftr*-KO cuando se trataron con fenretinida en comparación con los controles de *Cftr*-KO. También se observó una tendencia hacia la disminución de los niveles de IL-1 β , IL-9, KC y MIP-1a en los ratones *Cftr*-KO tratados con fenretinida en comparación con su grupo de control tratado con control, aunque estas diferencias no obtuvieron significancia estadística (datos no mostrados), también se analizaron niveles de IL-6, G-CSF, IL-15, IL-10 y IL-7 y no estuvieron afectados por el tratamiento con fenretinida, al menos no en el momento probado (datos no mostrados). En los ratones WT, no se observó diferencia entre ratones tratados con fenretinida y no tratados, para todas las citocinas probadas.

45 EJEMPLO 5: EFECTO DE FENRETINIDA SOBRE LA CARGA BACTERIANA EN LOS PULMONES DE RATONES NATURALES Y *CFTR*-KO

También se evaluó si el tratamiento con fenretinida afectaba la carga bacteriana en los pulmones de los ratones *Cftr*-KO y naturales en el día 3 después de la infección con *P. aeruginosa* (figura 4). Los ratones *Cftr*-KO no tratados

tuvieron cifras de la mediana de las unidades formadoras de colonias (UFC) significativamente mayores en los pulmones en comparación con sus homólogos naturales ($p = 0,004$). Hubo aproximadamente una diferencia de 30 veces en la carga bacteriana en los pulmones entre ratones *Cftr*-KO y naturales. Inesperadamente, la pauta de tratamiento con fenretinida disminuyó espectacularmente (aproximadamente 10 veces) la mediana del número de bacterias que se encontró en los ratones *Cftr*-KO tratados en comparación con los ratones *Cftr*-KO no tratados (*Cftr*-KO no tratados = $4,0 \times 10^5$ UFC/pulmón en comparación con *Cftr*-KO tratados con fenretinida = $3,8 \times 10^4$ UFC/pulmón, $p = 0,004$). No solo fue una disminución en la carga bacteriana de los *Cftr*-KO observados, sino que las cifras de UFC disminuyeron a los niveles de los naturales (no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre grupos de ratones *Cftr*-KO tratados con fenretinida y naturales, $p = 0,086$). La fenretinida no tuvo efecto significativo sobre la mediana del número de bacterias encontradas en los pulmones de los ratones naturales en comparación con sus controles naturales infectados con *P. aeruginosa* no tratados ($p = 0,240$).

EJEMPLO 6: EFECTO DE FENRETINIDA SOBRE LA RELACIÓN DE DHA/AA

Se evaluaron los niveles de DHA y de AA en diferentes órganos de ratones no tratados, tratados con control o tratados con fenretinida no infectados o infectados en el pulmón con *P. aeruginosa*.

Inesperadamente, en los pulmones y en el plasma de ratones no tratados, se observó una menor mediana ($p \leq 0,001$) de la relación índice de DHA/AA en los ratones *Cftr*-KO en comparación con sus controles naturales (figuras 5A y 5B, paneles CTRL, símbolos blancos). Por tanto, cuando los ratones se infectaron con *P. aeruginosa* en los pulmones (figura 5A y 5B, paneles CTRL, símbolos negros), se observó una mediana significativamente menor (*) de la relación índice de DHA/AA en los pulmones de ratones *Cftr*-KO en comparación con controles infectados naturales en tanto los pulmones (figura 5A, $p \leq 0,001$) como el plasma (figura 5B, $p \leq 0,001$). Cuando los ratones se trataron con fenretinida, se observó un aumento en la mediana de la relación índice de DHA/AA en los pulmones y plasma de ratones *Cftr*-KO infectados en comparación con los ratones de control no tratados *Cftr*-KO (figura 5). Sin embargo, esta diferencia alcanzó significancia estadística solo en los pulmones (†) debido a que las muestras de plasma mostraron mayor variabilidad intragrupal. En cuanto a los ratones naturales, el tratamiento con fenretinida no tuvo efecto sobre la mediana de la relación índice de DHA/AA en tanto pulmones como plasma en comparación con sus ratones de control naturales no tratados. Como el tratamiento con fenretinida tuvo un efecto sobre la relación de DHA/AA en los ratones *Cftr*-KO, pero no en los ratones naturales, el aumento observado en los ratones *Cftr*-KO tratados alcanzó el nivel al que ya no pudo observarse una diferencia entre los ratones naturales infectados y *Cftr*-KO tratados con fenretinida (figura 5A, panel FEN) en comparación con los ratones naturales no tratados y *Cftr*-KO (figura 5A, panel CTRL). El tratamiento con fenretinida redujo la diferencia en la mediana de la relación índice entre los naturales y *Cftr*-KO aproximadamente 10 veces (naturales no tratados/*Cftr*-KO = 67 veces frente a naturales tratados con FEN/*Cftr*-KO = 7 veces). Estos resultados demostraron claramente que el tratamiento con fenretinida tuvo un impacto muy profundo sobre la relación de DHA/AA. Este protocolo de tratamiento pudo normalizar la relación de DHA/AA anormal observada en tanto ratones *Cftr*-KO no infectados como infectados a relaciones similares a aquellas observadas en ratones naturales no infectados e infectados.

Los niveles de DHA en los pulmones y en el plasma se evaluaron en ratones naturales y *Cftr*-KO que no se infectaron o infectados con *P. aeruginosa* 3 días después de la infección. Los ratones fueron o bien no tratados o tratados con control (CTRL) o bien tratados con fenretinida (FEN). Se evaluaron los niveles de DHA incorporado en fosfolípidos y los datos se expresaron como percentil de ácidos grasos totales (figura 6). Las muestras de pulmón ($p \leq 0,001$) y plasma ($p \leq 0,001$) fueron estadísticamente diferentes entre los grupos de ratones probados. Los ratones *Cftr*-KO infectados con *P. aeruginosa* mostraron menor mediana (*) de los niveles de DHA en comparación con sus controles infectados naturales en tanto los pulmones como el plasma (figura 6, paneles CTRL). Los ratones tratados con fenretinida no mostraron diferencia en la mediana de niveles de DHA en los pulmones y plasma de ratones *Cftr*-KO infectados en comparación con los ratones no tratados de control *Cftr*-KO. Similarmente, los tratados con fenretinida naturales no mostraron diferencia en la mediana del nivel de DHA en tanto pulmones como plasma en comparación con sus ratones de control naturales no tratados.

También se evaluó la concentración específica de DHA incorporado en fosfolípidos y expresó en nmol/mg de proteína (figura 7). Los ratones no infectados *Cftr*-KO mostraron menor mediana (*) de los niveles de concentración de DHA en comparación con sus controles no infectados naturales en tanto los pulmones como el plasma (figura 7, paneles CTRL). Similarmente, los ratones infectados con *P. aeruginosa* *Cftr*-KO mostraron menor mediana (*) de los niveles de DHA en comparación con sus controles infectados naturales en tanto los pulmones como el plasma (figura 7, paneles CTRL). Los ratones infectados *Cftr*-KO tratados con fenretinida mostraron menor mediana (*) de los niveles de DHA en comparación con sus controles infectados naturales en tanto los pulmones como el plasma (figura 7, paneles CTRL). Estos resultados indican que el aumento mediado por fenretinida observado en la relación de DHA/AA no fue debido a los niveles de DHA incorporado en fosfolípidos.

También se analizaron niveles de DHA libre. La mediana de los niveles de percentil de DHA en los pulmones ($p \leq 0,001$) y en las muestras de plasma ($p \leq 0,001$) fue estadísticamente diferente entre los grupos de ratones probados (figura 8). Los ratones infectados con *P. aeruginosa* *Cftr*-KO mostraron menor mediana (*) de los niveles de DHA en comparación con sus controles infectados naturales en tanto los pulmones como el plasma (figura 8, paneles CTRL). Los ratones naturales infectados tratados con fenretinida mostraron una diferencia significativa (#) en la mediana de

niveles de DHA en los pulmones y plasma en comparación con los ratones de control no infectados no tratados naturales.

5 Por tanto, la mediana de los niveles de concentración de DHA en las muestras de plasma fue estadísticamente diferente entre los grupos de ratones probados (figura 9, $p \leq 0,001$). Los ratones infectados *Cftr*-KO mostraron menor mediana (*) de los niveles de DHA en comparación con sus controles infectados naturales en el plasma (figura 9, paneles CTRL). Los ratones infectados *Cftr*-KO tratados con fenretinida mostraron mayor mediana (*) de los niveles de DHA en el plasma en comparación con sus controles infectados naturales.

10 La mediana de los niveles de AA en los pulmones ($p \leq 0,001$) y en las muestras de plasma ($p \leq 0,001$) fue estadísticamente diferente entre los grupos de ratones probados. Los ratones no infectados *Cftr*-KO mostraron mayor mediana (*) de los niveles de AA en comparación con sus controles no infectados naturales en las muestras de plasma solo (figura 10). Los ratones infectados *Cftr*-KO mostraron mayor mediana (*) de los niveles de AA en comparación con sus controles infectados naturales en tanto los pulmones como el plasma (figura 10, paneles CTRL). Los ratones infectados *Cftr*-KO tratados con fenretinida mostraron menor mediana (*) de los niveles de AA en comparación con sus controles no tratados *Cftr*-KO infectados tanto en los pulmones como el plasma. Además de una disminución en los niveles de AA del pulmón y plasma, los ratones *Cftr*-KO también mostraron una disminución en los niveles de AA en el íleon, hígado y páncreas.

20 EJEMPLO 7: EFECTO DE FENRETINIDA SOBRE LA DENSIDAD DE HUESO TRABECULAR

La osteoporosis se caracteriza por una disminución en la cantidad (cantidad de hueso) y calidad (integridad estructural) de hueso trabecular. La figura 11 representa los análisis de μ CT de los huesos trabeculares aislados de ratones con FQ y sus controles de compañeros de camada y muestra que los ratones *Cftr*-KO muestran claros signos de osteoporosis. Estos resultados también demuestran claramente que el tratamiento bisemanal con fenretinida durante el transcurso de cuatro semanas (8 dosis totales) puede eliminar completamente cualquier signo de osteoporosis en el hueso trabecular de ratones *Cftr*-KO. Reconstrucciones 3D representativas y barridos de la sección transversal 2D demuestran que, antes del tratamiento con fenretinida, los ratones *Cftr*-KO tienen de pocos a ningún hueso trabecular recuadrado en recuadros rojos evidentes en la imagen en sección transversal en comparación con controles de compañeros de camada. Después del tratamiento con fenretinida hay un espectacular aumento en el hueso trabecular en los ratones *Cftr*-KO en comparación con sus controles WT.

EJEMPLO 8: EFECTO DE FENRETINIDA SOBRE LA COMPOSICIÓN Y ARQUITECTURA DEL HUESO

35 Para tratar los cambios osteoporóticos de la composición y arquitectura, se cuantificó el hueso trabecular. Los siguientes parámetros: volumen de hueso/volumen de tejido (BV/TV), índice de modelo estructural (SMI) y separación trabecular se calcularon a partir del fémur izquierdo. Los datos presentados en la figura 12A muestran una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la fracción de volumen de hueso (BV/TV) en los ratones *Cftr*-KO en comparación con controles WT. Esta es la primera demostración usando tecnología de μ CT de que ratones *Cftr*-KO adultos muestran un defecto significativo en BV/TV en comparación con sus controles de compañeros de camada. De forma interesante, esta diferencia desaparece cuando los ratones *Cftr*-KO se tratan con fenretinida (aumento de 2,7 veces), que aumenta su BV/TV a un nivel comparable a los niveles observados en los ratones WT. Este aumento en BV/TV se asoció a un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en el volumen de hueso (BV) y el número de huesos (BN), como muestran las figuras 12B y 12C. El tratamiento con fenretinida aumentó BV 3,1 veces y BN 2,4 veces en comparación con ratones *Cftr*-KO no tratados. El SMI es un algoritmo que tiene en cuenta el cambio en el área superficial para el cambio en la expansión radial de estructuras similares a placa trabecular y similares a varilla, que se conoce como el "factor patrón de hueso trabecular" (Wehrli, F.W. y col., 2001. Adv. Exp. Med. Biol. 496:153-64; Wehrli, F.W. y col. 2001. J. Bone Miner. Res. 16:1520-1531). Se da una puntuación entre 1 y 3, a medida que el valor se aproxima a 3 disminuye la calidad del hueso. La figura 12D ilustra que las puntuaciones de SMI son una diferencia significativa ($p = 0,026$) entre ratones no tratados WT y *Cftr*-KO. Sin embargo, cuando estos ratones se tratan con fenretinida, no hay diferencia significativa ($p = 0,320$) entre WT y *Cftr*-KO. Adicionalmente, se midió la separación entre los huesos trabeculares como se muestra en la figura 12E, también se midió. Los ratones *Cftr*-KO tienen un grado de separación significativamente mayor ($p = 0,026$) en comparación con controles WT. Cuando los ratones se tratan con fenretinida ya no hay diferencia significativa entre la separación trabecular ($p = 0,548$). Estos resultados sugieren que la fenretinida no solo corrige la cantidad de hueso, sino también la calidad de la estructura del hueso.

Los resultados anteriores se confirmaron analizando las vértebras lumbares (V3-V5), que son ricas en hueso trabecular (datos no mostrados). Los resultados de μ CT se confirmaron de nuevo por histomorfometría por tinción de los fémures con tinción de von Kossa, que tiñe hueso mineralizado en negro de como se muestra en la figura 11B.

EJEMPLO 9: EFECTO DE FENRETINIDA SOBRE LA FORMACIÓN DE OSTEÓBLASTOS

Los osteoblastos se depositan sobre nuevas láminas de hueso y son activos en el desarrollo de hueso y también en la remodelación de hueso. Por el contrario, se ha mostrado que los osteoclastos participan en la resorción ósea, digiriendo la matriz ósea adyacente. Para establecer si el aumento en el volumen de hueso observado en los ratones

Cftr-KO tratados con fenretinida es el resultado de la formación de hueso más eficaz o de resorción ósea menos eficaz, el solicitante contó el número de osteoblastos (células formadoras de hueso) y osteoclastos (células de resorción ósea) en el fémur. La figura 13A muestra un portaobjetos teñido con H&E representativo usado para cuantificar el número de osteoblastos y osteoclastos. La figura 13B muestra la cuantificación del promedio de 3 portaobjetos contados por animal en cada grupo. El análisis del solicitante demuestra claramente una notable diferencia en el número de osteoblastos entre los ratones *Cftr*-KO y WT ($p < 0,05$). De forma interesante, los datos de los presentes inventores también demuestran que el tratamiento con fenretinida conduce a un aumento en la cantidad de osteoblastos para los ratones *Cftr*-KO tratados en comparación con ratones *Cftr*-KO que no se trataron con fenretinida ($p < 0,05$). No se encontró diferencia significativa en el número de osteoclastos entre los *Cftr*-KO y WT tratados con fenretinida y no tratados (figura 13C). Este hallazgo se corroboró usando tinción con TRAP, como se muestra como la figura 13C, indicando manchas grises más oscuras tinción positiva para fosfatasa ácida resistente a tartrato, una enzima que es específica para las células de osteoclastos.

EJEMPLO 10: EFECTO DE FENRITINIDA SOBRE PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES

Sorprendentemente, después de 8 tratamientos (es decir, administración bisemanal durante 4 semanas) con fenretinida, la concentración de AA en el plasma de ratones *Cftr*-KO se hundió significativamente ($p < 0,05$) en comparación con los controles WT (figura 14A). El solicitante ha demostrado anteriormente (ejemplo 6) que 28 tratamientos diarios con fenretinida normalizan completamente el desequilibrio de lípidos observado en ratones *Cftr*-KO. Los datos presentados en la figura 14A complementan estos hallazgos mostrando que solo 8 (a diferencia de 28) tratamientos con fenretinida reducen eficazmente la excesiva cantidad de AA unido a fosfolípido coherentemente encontrada en el plasma de ratones *Cftr*-KO. Cuando se analiza la concentración de DHA unido a fosfolípido (figura 14B), el solicitante encontró un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) después del tratamiento con fenretinida en tanto ratones WT como *Cftr*-KO. Se observó una tendencia positiva con el tratamiento con fenretinida en el que un aumento de 2 veces en DHA unido a fosfolípido en ratones *Cftr*-KO, en comparación con los ratones *Cftr*-KO de control. Por tanto, comparando animales *Cftr*-KO no tratados con los ratones tratados *Cftr*-KO de control, hubo un aumento significativo ($p < 0,05$) en la relación de DHA:AA, como se muestra en la figura 14C, en la que es evidente un aumento de 2 veces.

EJEMPLO 11: EFECTO DE FENRITINIDA SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE CERAMIDA

El solicitante ha mostrado anteriormente (ejemplo 2) que los niveles de ceramida disminuyen espectacularmente en ratones *Cftr*-KO, y que esta alteración puede corregirse con 28 días de tratamiento con fenretinida. El solicitante evaluó si solo 8 tratamientos con fenretinida también corregirían esta alteración. Los niveles de ceramida en los ratones *Cftr*-KO no tratados, en comparación con sus controles WT de compañeros de camada, fueron estadísticamente significativamente menores ($p < 0,05$) (figura 15, panel izquierdo). Después de 4 semanas de tratamiento bisemanal con fenretinida, los niveles de ceramida en los ratones *Cftr*-KO tratados aumentan 5,9 veces en comparación con ratones *Cftr*-KO no tratados ($p < 0,05$) (figura 15, panel derecho).

EJEMPLO 12: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON FENRITINIDA DE BAJA DOSIS SOBRE PARÁMETROS DE LÍPIDOS SISTÉMICOS EN RATONES *CFTR*-KO

Los datos presentados en las figuras 16 demuestran que el desequilibrio de lípidos en ratones con FQ es sistémico; en comparación con sus homólogos WT, los ratones *Cftr*-KO mostraron menores niveles de DHA (figura 16A), relación de DHA/AA (figura 16B) y niveles de ceramida (figura 16C) en varios órganos, que incluyen en órganos de "control" (es decir, órganos no clínicamente afectados en FQ), concretamente el corazón, riñón y bazo. Los ratones heterocigóticos para la delección del gen *CFTR* (HZ) normalmente mostraron niveles de DHA y de ceramida intermedios y una relación de DHA/AA intermedia, en comparación con ratones WT y *Cftr*-KO. Además, un tratamiento bisemanal de cuatro semanas con fenretinida fue eficaz en la corrección, al menos parcialmente, del defecto/desequilibrio en niveles de DHA, relación de DHA/AA y niveles de ceramida en todos los órganos de ratones *Cftr*-KO (KO ETOH frente a KO FEN) y HZ (HZ ETOH frente a HZ FEN). La figura 16D muestra que los ratones *Cftr*-KO tienen mayor niveles de AA (en comparación con ratones WT) en todos los órganos de control probados (corazón, riñón y bazo), y que un tratamiento bisemanal de cuatro semanas con fenretinida disminuye los niveles de AA a normales (comparables a los niveles de AA medidos en ratones tratados con control WT (WT ETOH)). Estos resultados demuestran que el desequilibrio de lípidos en ratones con FQ es sistémico y que un tratamiento bisemanal de cuatro semanas con fenretinida puede corregir el defecto en todos los órganos.

EJEMPLO 13: DESEQUILIBRIO DE LÍPIDOS Y MUTACIONES *CFTR* EN SERES HUMANOS

El solicitante analizó los parámetros de lípidos en pacientes con FQ que llevan diferentes mutaciones en el sitio del gen *CFTR*. Los pacientes con FQ se subdividieron en tres grupos basándose en su genotipo de FQ. El primer grupo representa pacientes con FQ homocigótica para la mutación deltaF508 ($\Delta F508$) en el sitio *CFTR* (deltaF508/deltaF508), que produce la forma más grave de la enfermedad. El segundo grupo comprende pacientes con FQ heterocigótica para la mutación deltaF508 y que llevan otra mutación algo menos grave, pero bien caracterizada, en el sitio *CFTR* (deltaF508/otra). El tercer grupo no lleva una mutación delta F508 en el sitio del gen *CFTR*, pero lleva otras dos mutaciones, una combinación que se cree que produce la enfermedad fibrosis quística

algo menos grave (otra/otra) ya que algún nivel de proteína CFTR residual puede detectarse para algunas de las mutaciones, aunque no está perfectamente cuantificado. Todos los pacientes con deltaF508/deltaF508 comparten la insuficiencia pancreática, en el grupo en el que se analizan otras combinaciones de mutaciones algunos pacientes también muestran insuficiencia pancreática (por ejemplo, deltaF508/otra u otra/otra (véase la tabla 6).

5

TABLA 6: Genotipo de FQ e insuficiencia pancreática

Insuficiencia pancreática				Suficiencia pancreática	
Cantidad total de pacientes: 47				Total: 10 pacientes	
alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2
ΔF508	ΔF508	ΔF508	621+1G=T	ΔF508	R334w
ΔF508	ΔF508	ΔF508	3849+10kb C->T	ΔF508	711+1G-T
ΔF508	ΔF508	ΔF508	Y 1092X	ΔF508	L206W
ΔF508	ΔF508	ΔF508	A455E	ΔF508	desconocido
ΔF508	ΔF508	ΔF508	desconocido	ΔF508	desconocido
ΔF508	ΔF508	ΔF508	W1282X	G85e	G85e
ΔF508	ΔF508	ΔF508	G85e	621+1G>T	L206W
ΔF508	ΔF508	ΔF508	R334W	621+1G=T	L206W
ΔF508	ΔF508	ΔF508	desconocido	desconocido	desconocido
ΔF508	ΔF508	ΔF508	desconocido	no probado	no probado
ΔF508	ΔF508	ΔF508	desconocido		
ΔF508	ΔF508	ΔF508	desconocido		
ΔF508	ΔF508	ΔF508	desconocido		
ΔF508	ΔF508	ΔF508	desconocido		
ΔF508	ΔF508	Δ508	desconocido		
ΔF508	ΔF508	R334w	desconocido		
ΔF508	ΔF508	W1282X	W1282X		
ΔF508	ΔF508	desconocido	desconocido		
ΔF508	ΔF508	desconocido	desconocido		
ΔF508	ΔF508	desconocido	desconocido		
ΔF508	ΔF508	desconocido	desconocido		
ΔF508	ΔF508	no probado	no probado		
ΔF508	ΔF508				
ΔF508	ΔF508				
ΔF508	ΔF508				

Como se muestra en las figuras 17A y 17B, se midieron menores niveles de DHA unido a fosfolípidos y relación de DHA/AA en todos los grupos de pacientes con FQ en comparación con sujetos sanos. Pacientes de control sanos y con FQ con la mutación ΔF508/ΔF508 tienen una relación de DHA/AA significativamente diferente ($p < 0,001$) (figura 17B); sin embargo, no hay diferencia significativa entre los tres grupos de pacientes con FQ. También los controles sanos son significativamente diferentes de la mutación ΔF508/otra ($p < 0,001$), y de pacientes con FQ con la mutación del gen otra/otra ($p < 0,05$). Además, solo pacientes con FQ homocigótica para la mutación ΔF508 mostraron menores niveles de ceramida significativos en comparación con sujetos sanos ($p < 0,05$, figura 17C). Por tanto, los datos presentados en la figura 17 demuestran que no todos los pacientes con FQ tienen un desequilibrio de lípidos (es decir, hay importantes variaciones entre pacientes con FQ); incluso en el grupo con la forma más grave de la enfermedad (ΔF508/ΔF508), algunos pacientes tienen niveles de AA, DHA y de ceramida comparables a los niveles medidos en sujetos sanos.

10

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Fenretinida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana oportunista, osteopenia u osteoporosis en un sujeto (a) disminuyendo los niveles de ácido araquidónico (AA), (b) aumentando los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA), (c) aumentando la relación de DHA/AA, o (d) cualquier combinación de (a)-(c) en el sujeto.
- 2.- Fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho sujeto tiene, antes del tratamiento, (a) una relación de DHA/AA de 0,4 o menos, (b) niveles de DHA de 3,5 ng/μg de fosfato o menos, (c) niveles de AA de 40 ng/μg de fosfato o más o (d) cualquier combinación de (a) a (c).
- 3.- Fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana oportunista.
- 4.- Fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en el tratamiento de osteopenia u osteoporosis.
- 5.- Fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho DHA y AA son fracciones asociadas a fosfolípido de DHA y AA.
- 6.- Fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según una cualquiera de la reivindicación 1-5, en la que dicho sujeto es un ser humano.
- 7.- Una composición que comprende (i) fenretinida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana oportunista, osteopenia u osteoporosis en un sujeto (a) disminuyendo los niveles de ácido araquidónico (AA), (b) aumentando los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA), (c) aumentando la relación de DHA/AA, o (d) cualquier combinación de (a)-(c) en el sujeto.
- 8.- Composición para su uso según la reivindicación 7, en la que dicho sujeto has, antes del tratamiento, (a) una relación de DHA/AA de 0,4 o menos, (b) niveles de DHA de 3,5 ng/μg de fosfato o menos, (c) niveles de AA de 40 ng/μg de fosfato o más o (d) cualquier combinación de (a) a (c).
- 9.- Composición para su uso según la reivindicación 7 u 8, para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana oportunista.
- 10.- Composición para su uso según la reivindicación 7 u 8, para su uso en el tratamiento de osteopenia u osteoporosis.
- 11.- Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en la que dicho DHA y AA son fracciones asociadas a fosfolípido de DHA y AA.
- 12.- Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en la que dicho sujeto es un ser humano.
- 13.- Uso de fenretinida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección bacteriana oportunista, osteopenia u osteoporosis en un sujeto (a) disminuyendo los niveles de ácido araquidónico (AA), (b) aumentando los niveles de ácido docosahexaenoico (DHA), c) aumentando la relación de DHA/AA, o (d) cualquier combinación de (a) - (c), en el sujeto.
- 14.- El uso de la reivindicación 13, en el que dicho sujeto tiene, antes del tratamiento, (a) una relación de DHA/AA de 0,4 o menos, (b) niveles de DHA de 3,5 ng/μg de fosfato o menos, (c) niveles de AA de 40 ng/μg de fosfato o más o (d) cualquier combinación de (a) a (c).
- 15.- El uso de la reivindicación 13 ó 14, para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana oportunista.
- 16.- El uso de la reivindicación 13 ó 14, para su uso en el tratamiento de osteopenia u osteoporosis.
- 17.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en el que dicho DHA y AA son fracciones asociadas a fosfolípido de DHA y AA.
- 18.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13-17, en el que dicho sujeto es un ser humano.

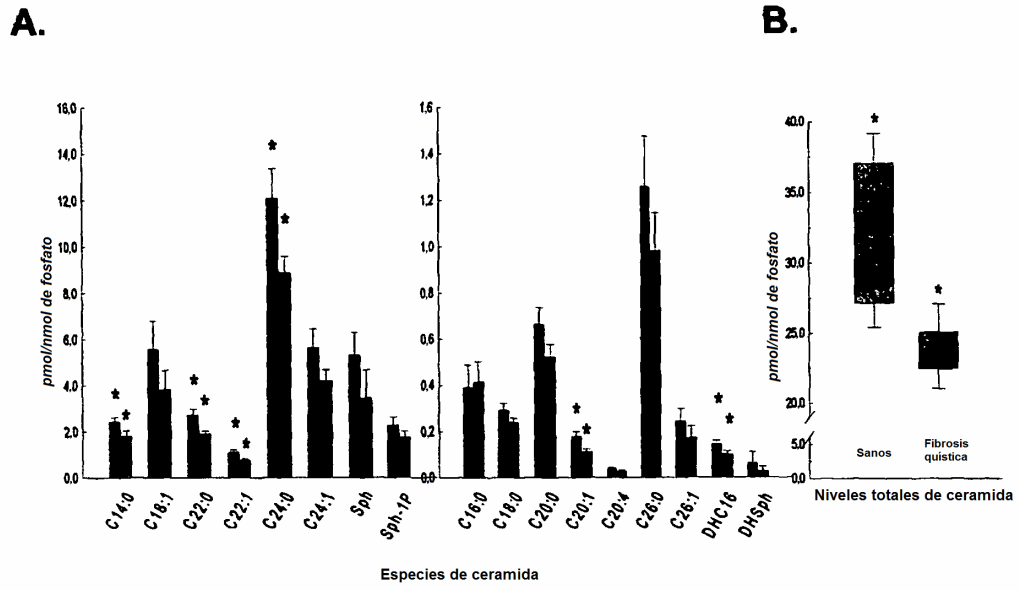


FIGURA 1

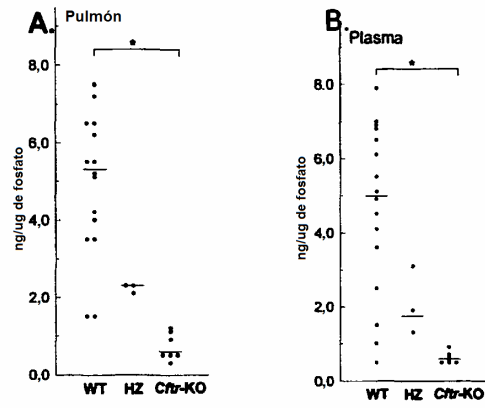


FIGURA 2

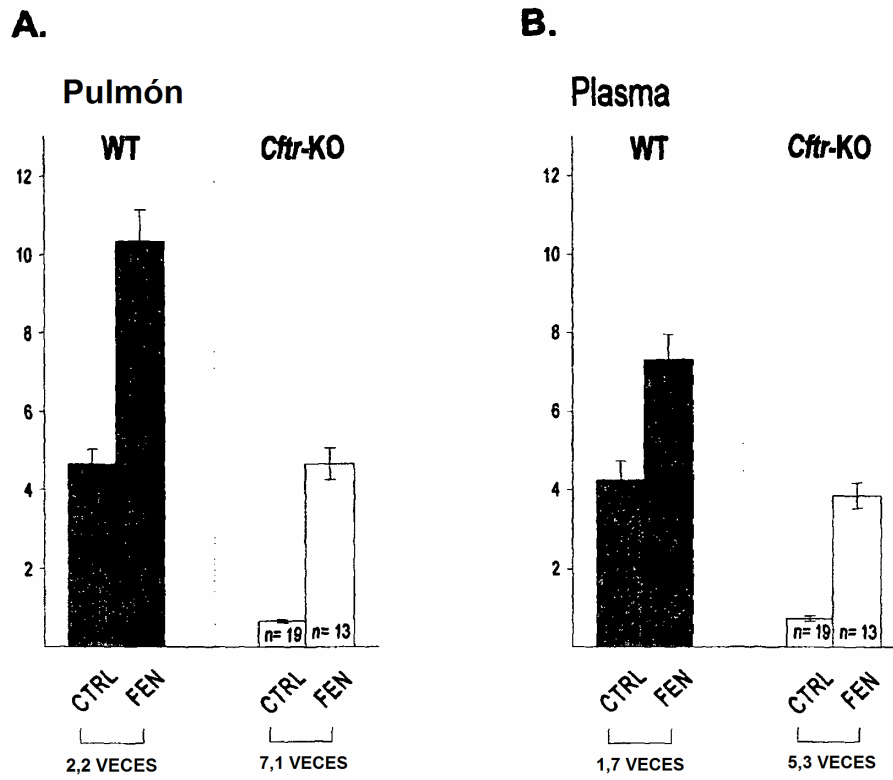


FIGURA 3

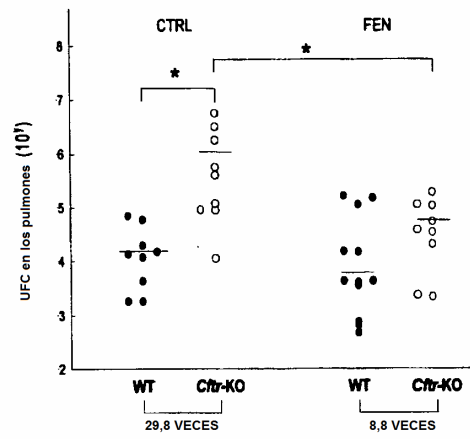
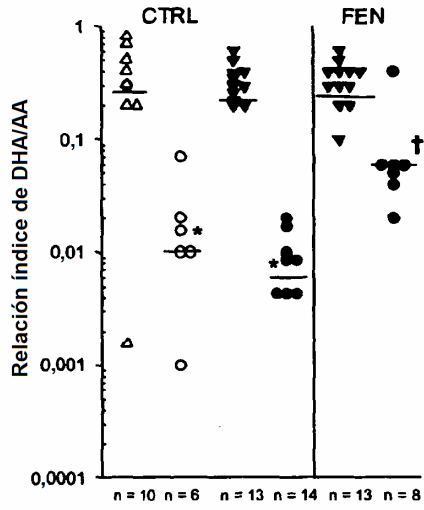


FIGURA 4

A. (pulmones)



B. (plasma)

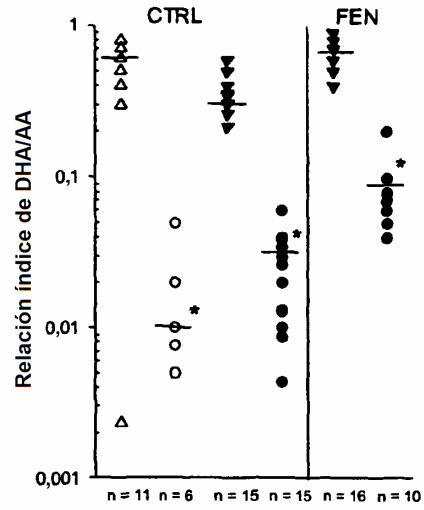
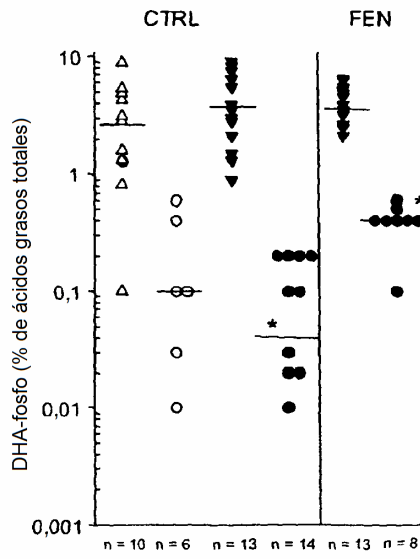


FIGURA 5

A. (pulmones)



B. (plasma)

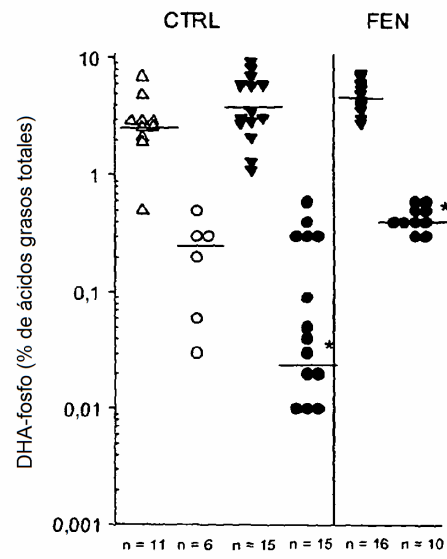
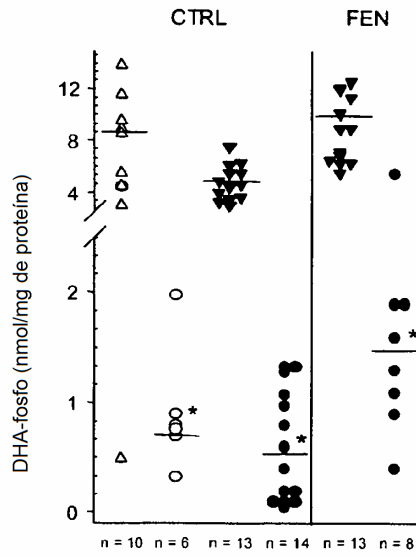


FIGURA 6

A. (pulmones)



B. (plasma)

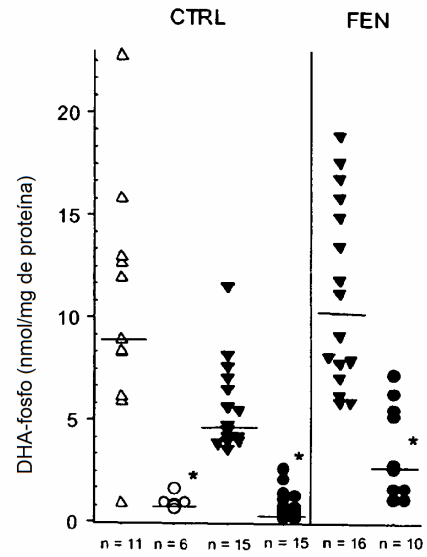
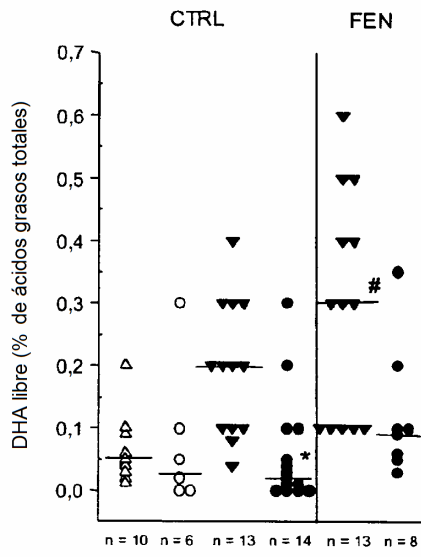


FIGURA 7

A. (pulmones)



B. (plasma)

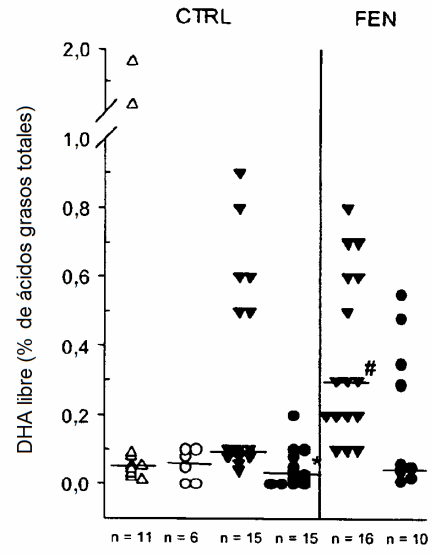
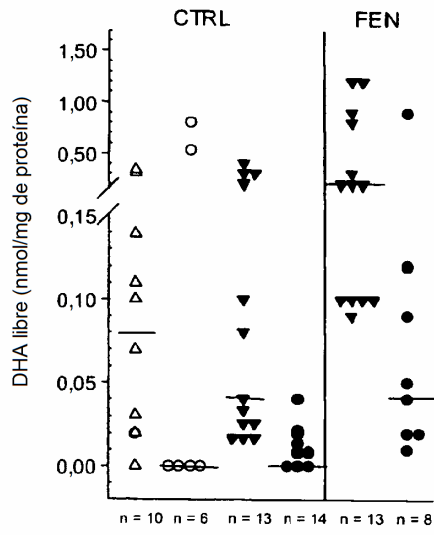


FIGURA 8

A. (pulmones)



B. (plasma)

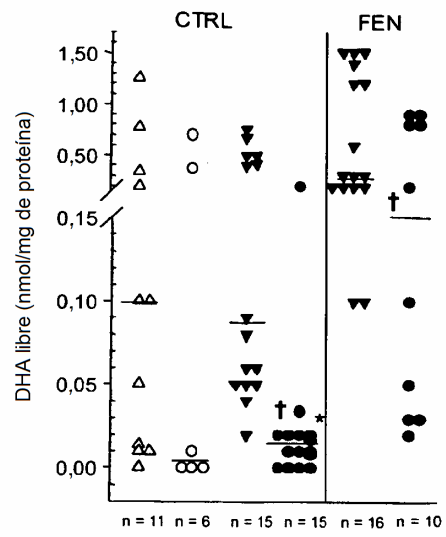


FIGURA 9

A. (pulmones)

B. (plasma)

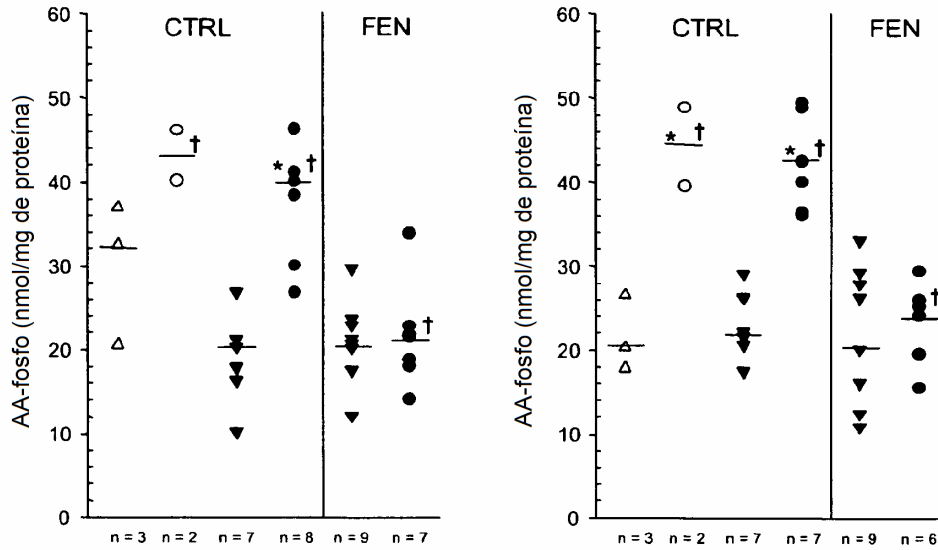


FIGURA 10

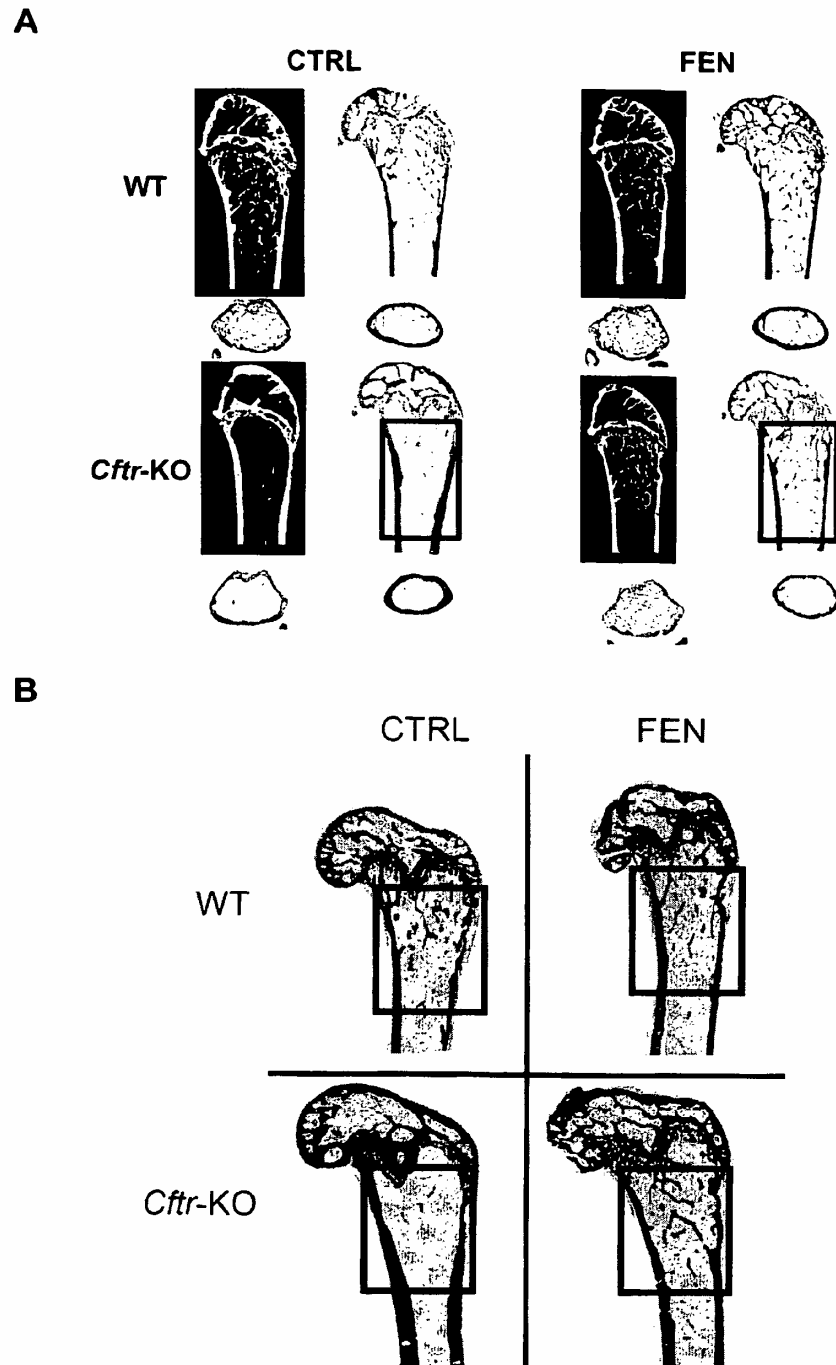


FIGURA 11

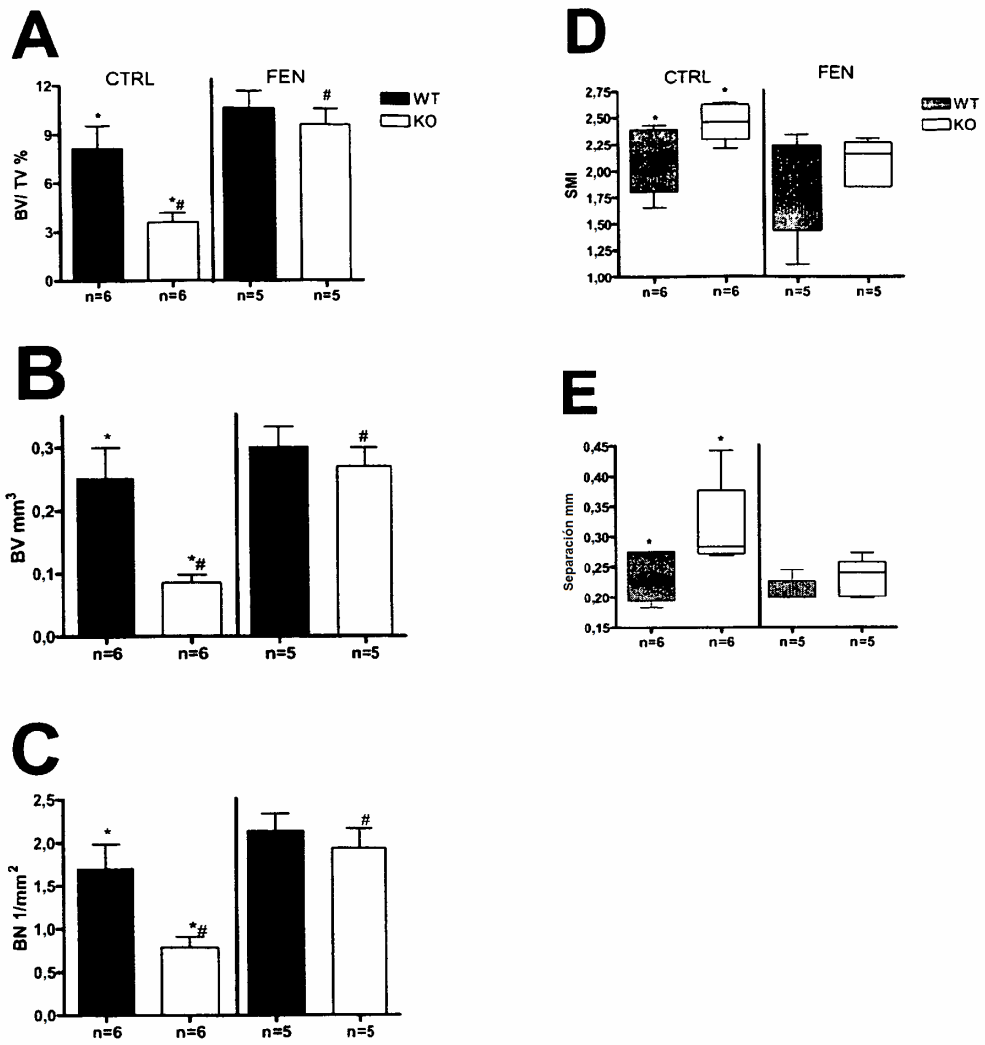


FIGURA 12

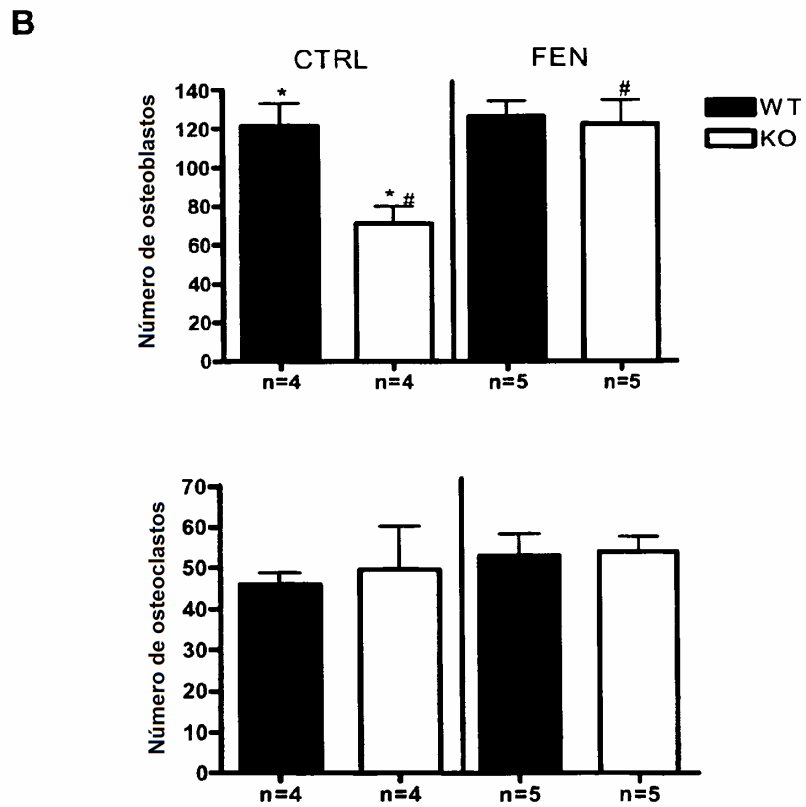
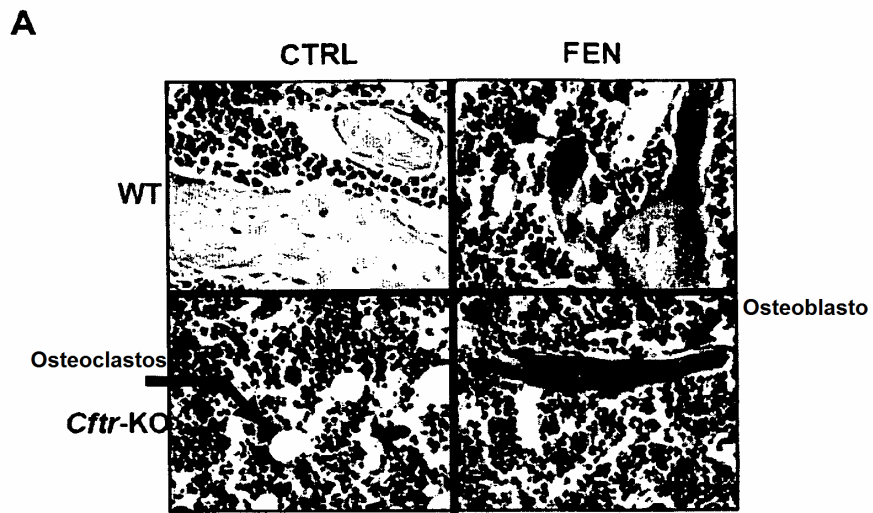


FIGURA 13

C

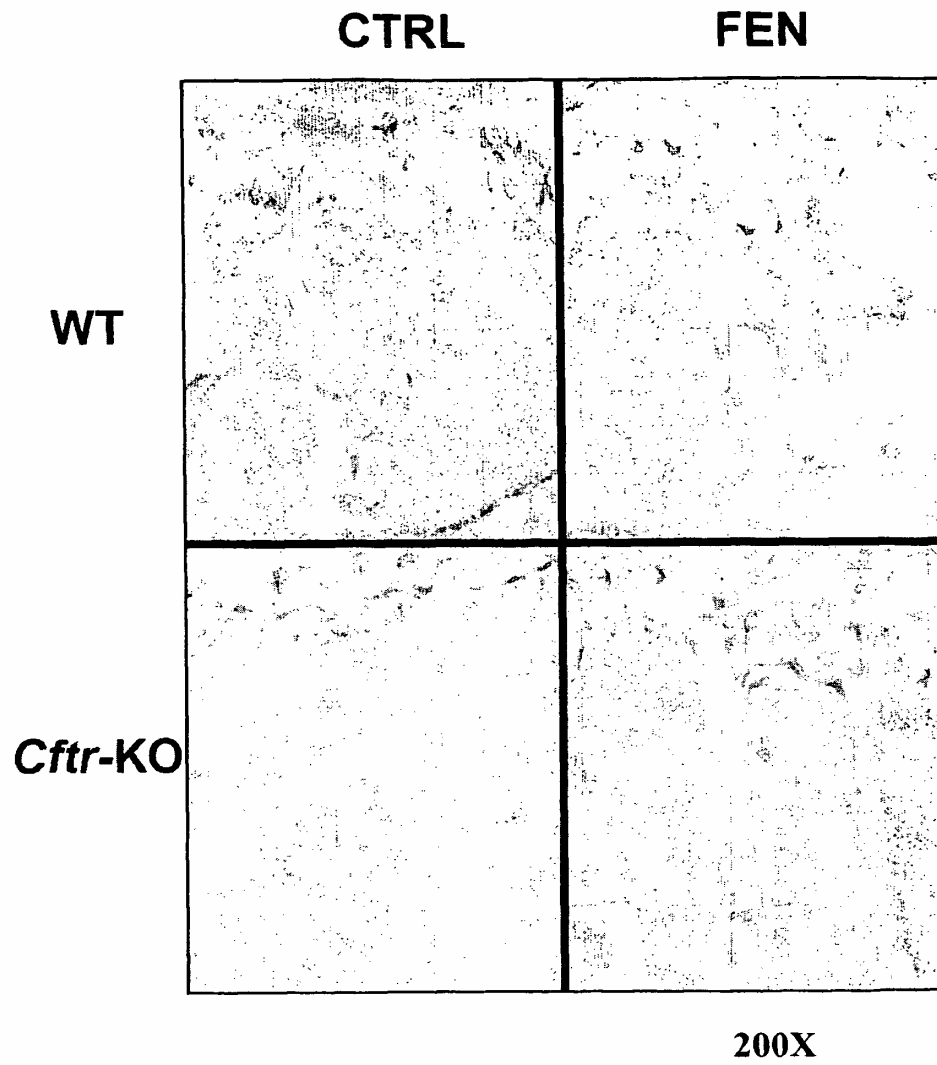


FIGURA 13 (continuación)

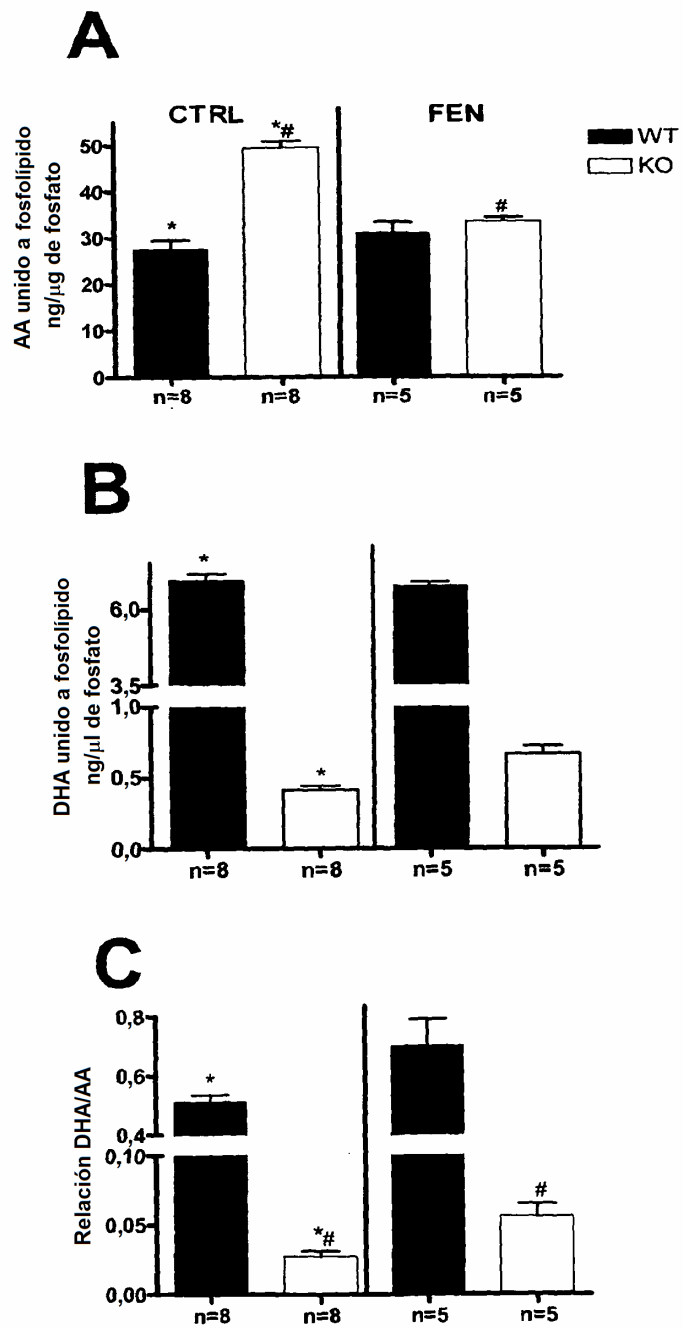


FIGURA 14

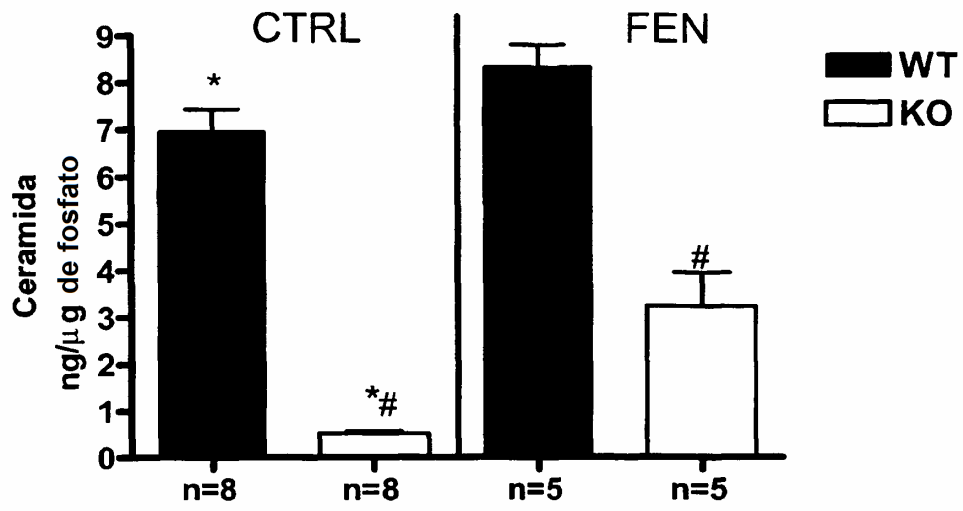


FIGURA 15

A.

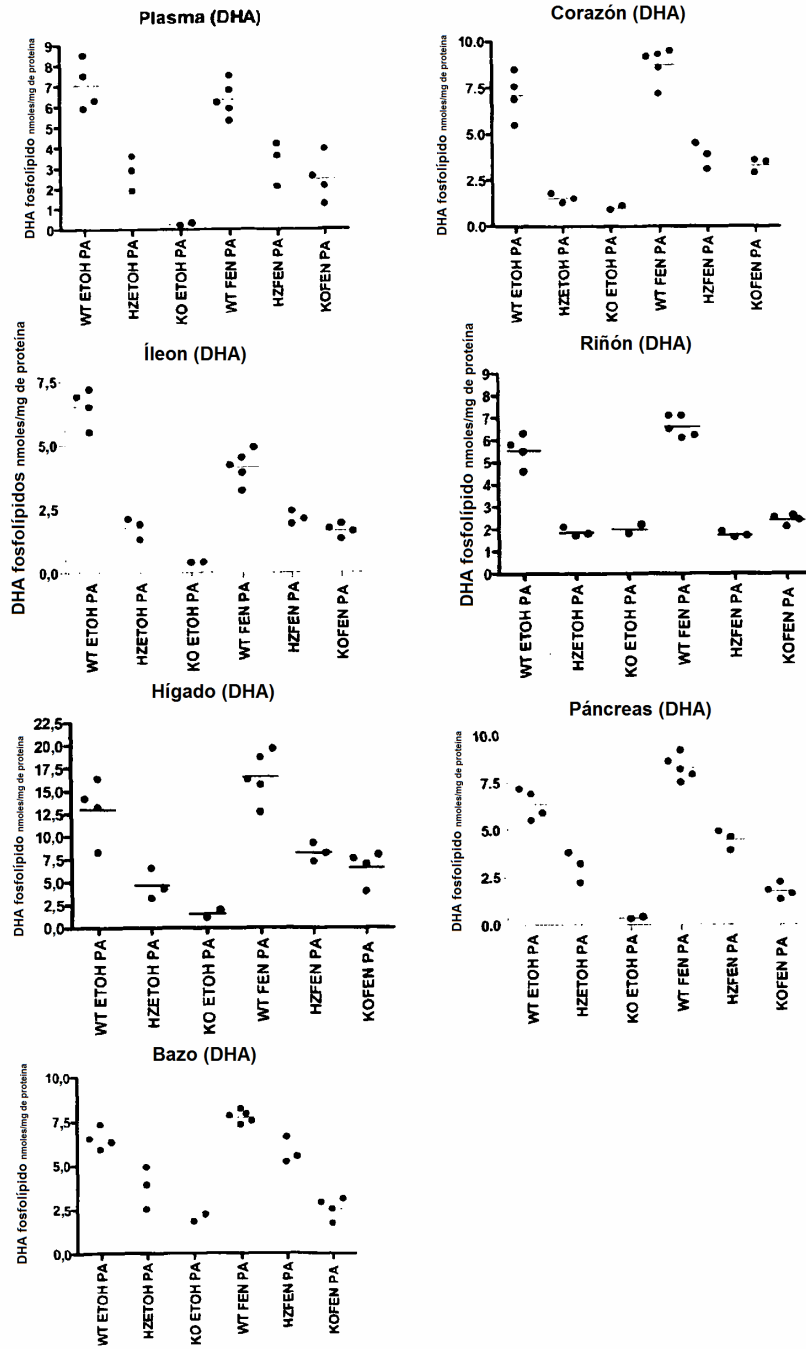


FIGURA 16

B.

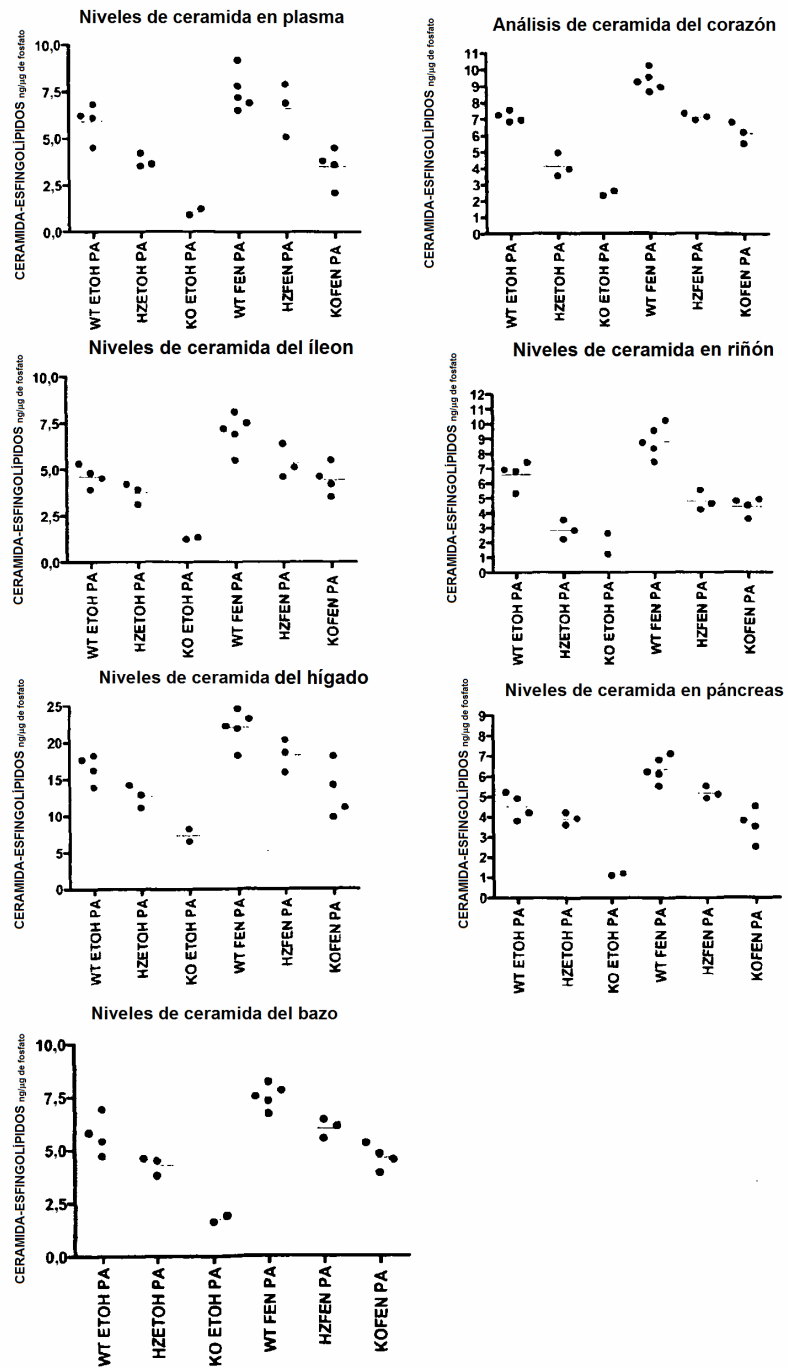


FIGURA 16 (continuación)

C.

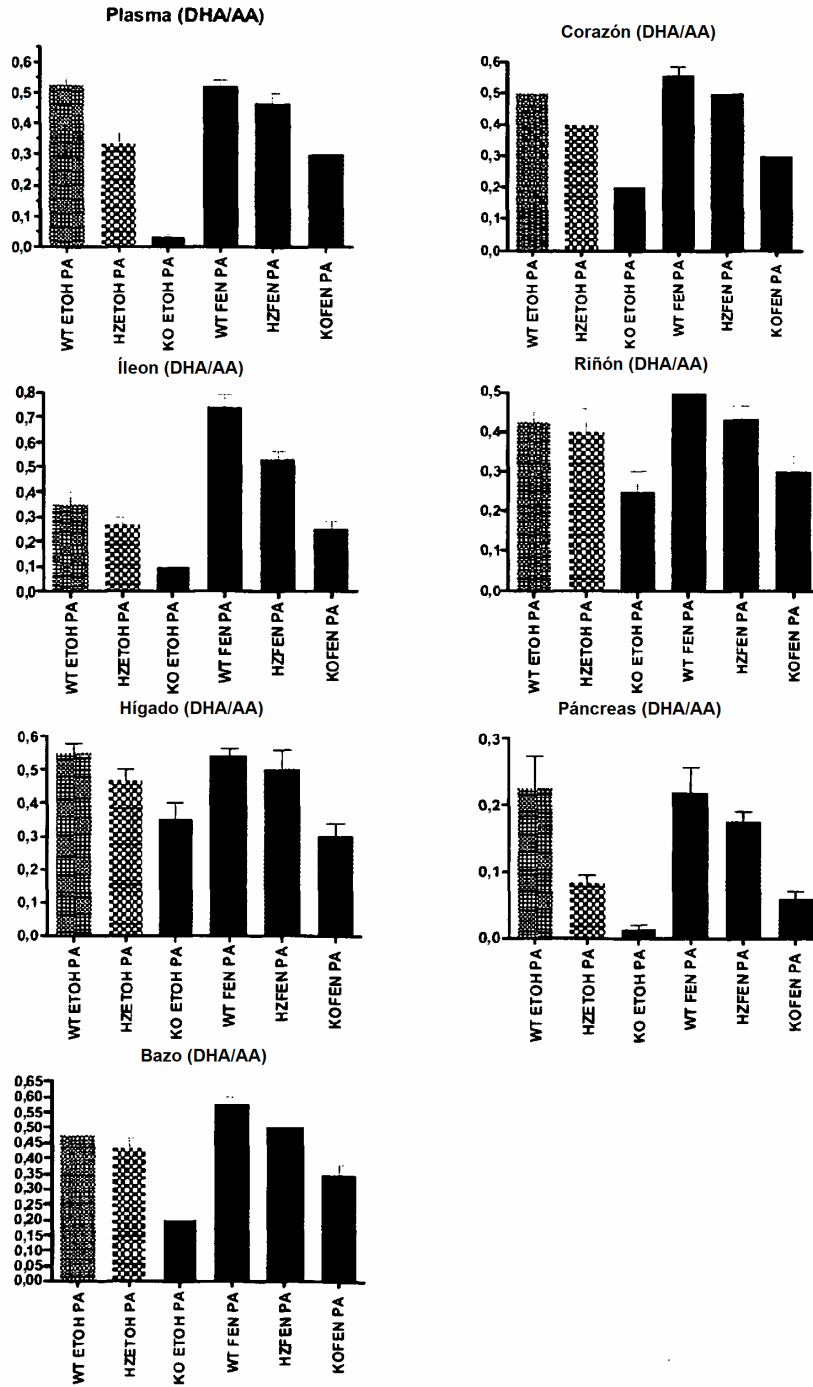


FIGURA 16 (continuación)

D.

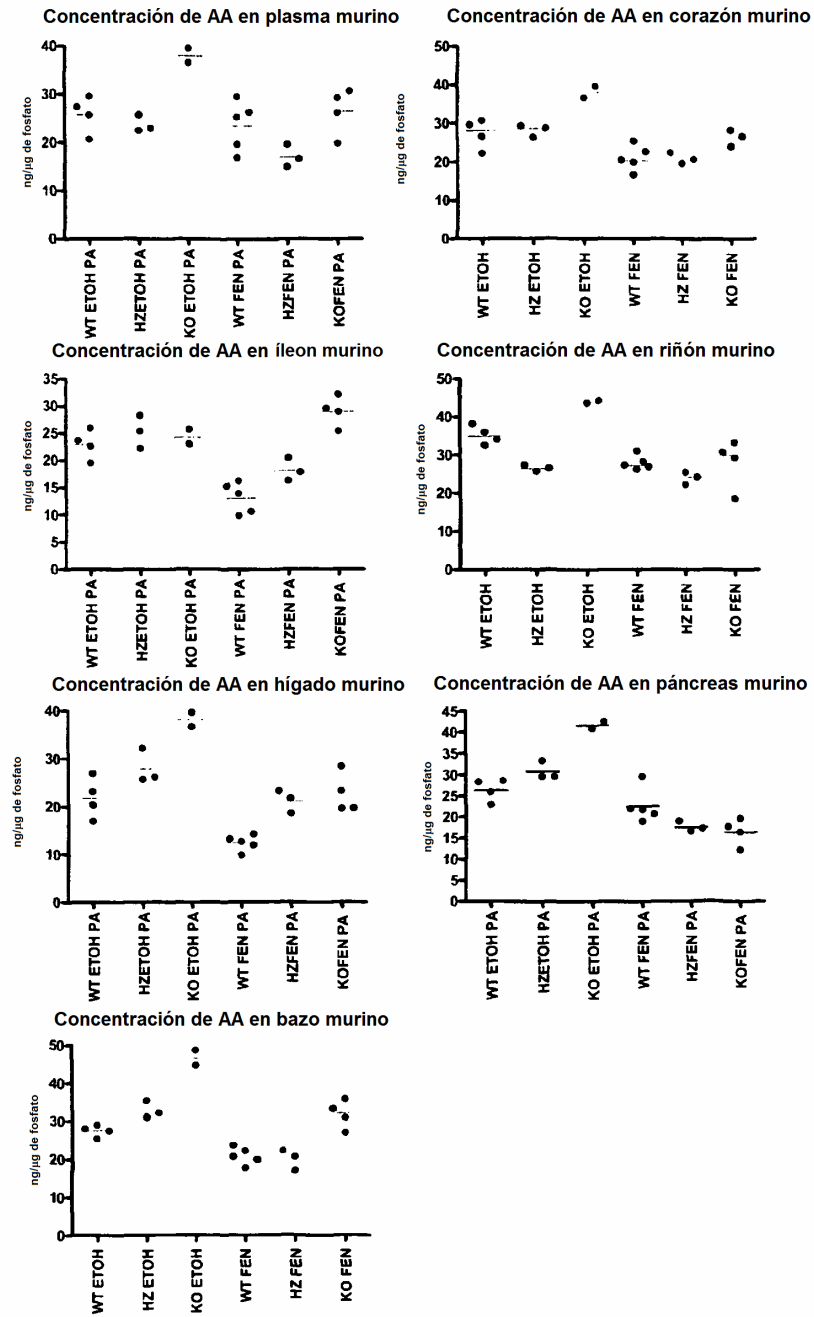
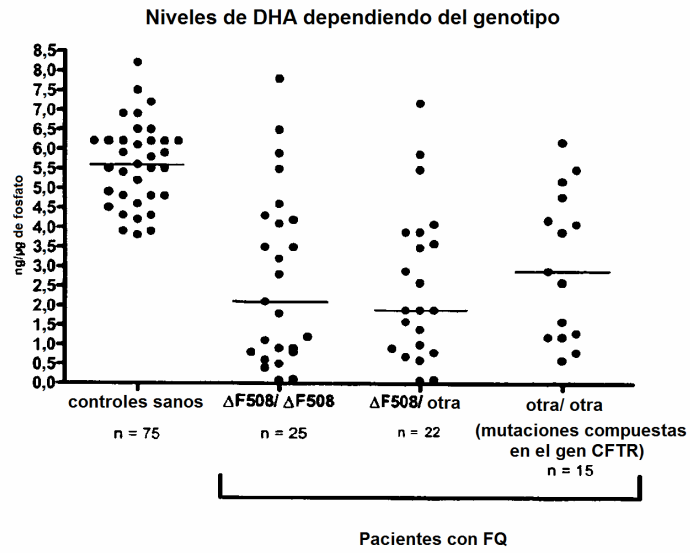


FIGURA 16 (continuación)

A.



Prueba de comparaciones múltiples de Dunn

Grupos	Diferencia en la suma de rangos	Valor de p	Resumen
controles sanos frente a DF508/DF508	37,45	P < 0,001	***
controles sanos frente a DF508/otra	39,09	P < 0,001	***
controles sanos frente a otra/otra	32,04	P < 0,01	**
DF508/DF508 frente a DF508/otra	1,634	P > 0,05	ns
DF508/DF508 frente a otra/otra	-5,413	P > 0,05	ns
DF508/otra frente a otra/otra	-7,047	P > 0,05	ns

FIGURA 17

B.

Niveles de AA unido a fosfolípido dependiendo del genotipo

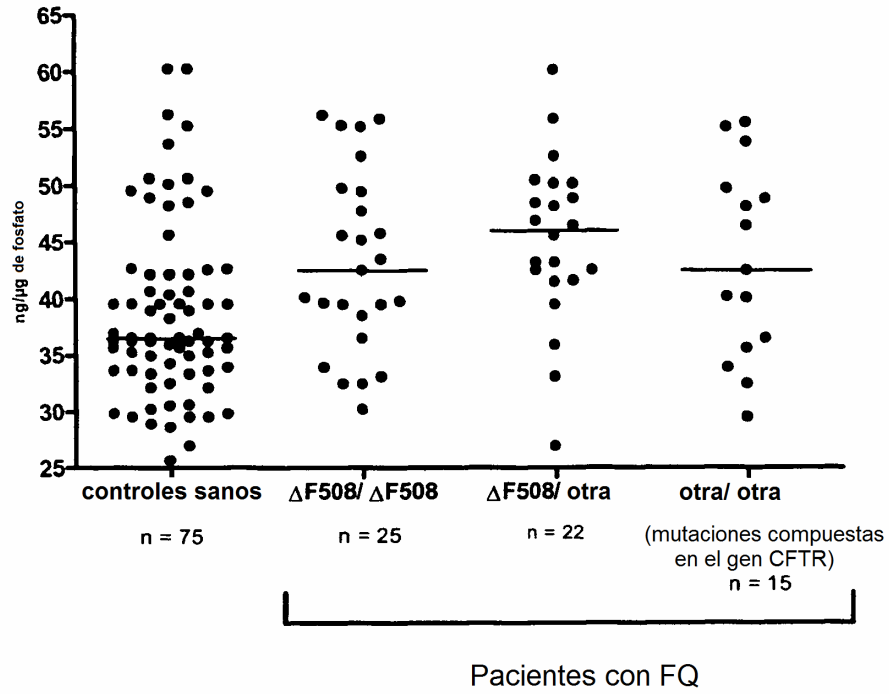
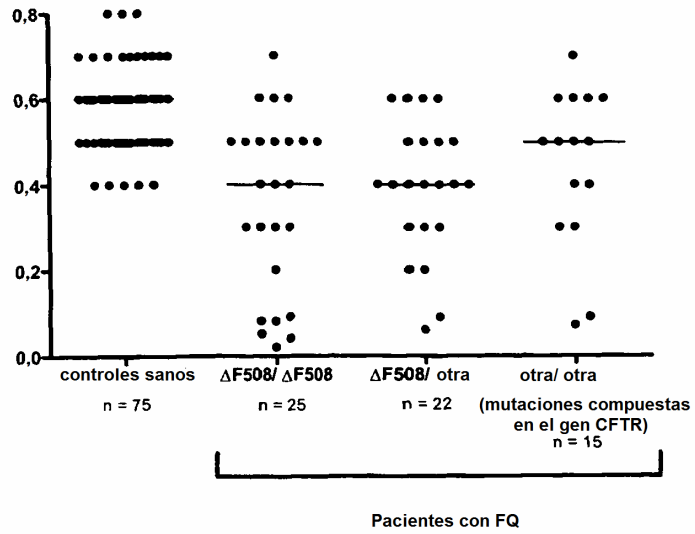


FIGURA 17 (continuación)

C.

Relación de DHA/AA unido a fosfolípido dependiendo del genotipo

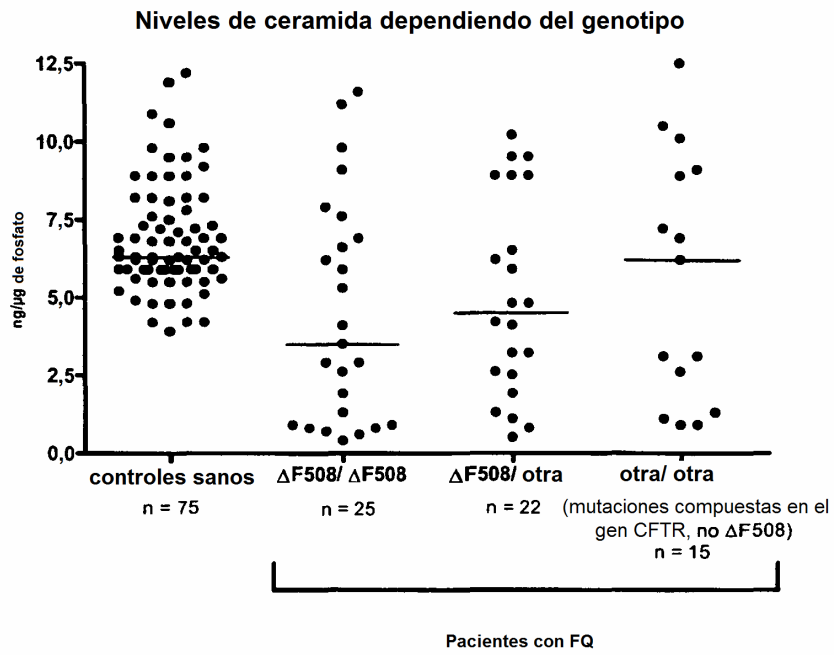


Prueba de comparaciones múltiples de Dunn

Grupos	Diferencia en la suma de rangos	Valor de p	Resumen
controles sanos frente a $\Delta F508/\Delta F508$	46,15	$p < 0,001$	***
controles sanos frente a $\Delta F508/otra$	45,05	$p < 0,001$	***
controles sanos frente a otra/otra	30,10	$p < 0,05$	*
$\Delta F508/\Delta F508$ frente a $\Delta F508/otra$	-1,102	$p > 0,05$	ns
$\Delta F508/\Delta F508$ frente a otra/otra	-16,05	$p > 0,05$	ns
$\Delta F508/otra$ frente a otra/otra	-14,95	$p > 0,05$	ns

FIGURA 17 (continuación)

D.



Prueba de comparaciones múltiples de Dunn

Grupos	Diferencia en la suma de rangos	Valor de p	Resumen
controles sanos frente a DF508/DF508	28,83	P < 0,01	**
controles sanos frente a DF508/otra	24,14	P > 0,05	ns
controles sanos frente a otra/otra	12,95	P > 0,05	ns
DF508/DF508 frente a DF508/otra	-4,688	P > 0,05	ns
DF508/DF508 frente a otra/otra	-15,89	P > 0,05	ns
DF508/otra frente a otra/otra	-11,20	P > 0,05	ns

Figura 17 (continuación)