

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 263**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/554 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2009** **E 13186249 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2708603**

54 Título: **Usos de diagnóstico terapéuticos de gelsolina en insuficiencia renal**

30 Prioridad:

25.01.2008 US 23789 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2017

73 Titular/es:

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(33.3%)

55 Fruit Stret

Boston, MA 02114, US;

THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(33.3%) y

BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER,
INC. (33.3%)

72 Inventor/es:

THADHANI RAVI;

STOSSEL THOMAS P.;

LEE, PO-SHUN y

KARUMANCHI, ANANTH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 634 263 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

Usos de diagnóstico terapéuticos de gelsolina en insuficiencia renal

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a usos de diagnóstico y terapéuticos de gelsolina.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La hemodiálisis crónica (HD) ha reducido drásticamente la mortalidad aguda de enfermedad renal de etapa terminal (ESRD). No obstante, los pacientes con insuficiencia renal crónica que sufren HD todavía mueren a una tasa marcadamente acelerada. Este resultado adverso aparece de forma temprana, ocurriendo la muerte mucho más rápidamente que en poblaciones de control de edad similar dentro del año de iniciar la diálisis, y las causas más frecuentes de muerte son sucesos cardiovasculares e infecciones agudas¹⁻³. Los pacientes con insuficiencia renal crónica muestran manifestaciones de lesión tisular difusa, inflamación crónica, pérdida de masa muscular e hipoalbuminemia, y malnutrición severa, y todos ellos se han relacionado fuertemente con resultados adversos⁴⁻⁸. La patogénesis que media la conexión entre la suma de estas condiciones subyacentes y la mortalidad acelerada es esencialmente desconocida. De este modo, la investigación de nuevos biomarcadores que pueden identificar de forma fiable esos pacientes con ESRD y/o HD con riesgo incrementado de muerte prematura, y especialmente esos marcadores que están relacionados con terapias potenciales, pueden tener un impacto clínico significativo a la hora de mejorar los resultados de esta población de otro modo desafortunada.

SUMARIO DE LA INVENCION

La gelsolina plasmática (pGSN) es un marcador sensible de lesión tisular con fuertes relaciones con el estado nutricional, inflamación, y masa muscular, y de forma importante, con utilidad terapéutica posible⁹⁻¹². pGSN es la variante extracelular de una proteína, codificada en el cromosoma 9 humano, con isoformas celulares y segregadas desplegadas por ajuste de ARNm alternativo¹³. La gelsolina celular (cGSN) es un mediador expresado ampliamente del cambio de forma y movilidad celulares a través de su función de unión a filamentos de actina regulada¹⁴. La gelsolina plasmática es una proteína plasmática abundante que circula en individuos sanos a una concentración promedio de 250 mg/l¹⁴. cGSN y pGSN son idénticas en estructura primaria y con respecto a funciones bioquímicas *in vitro*, excepto que pGSN contiene 25 aminoácidos adicionales en su término amino, y tiene una secuencia señal procesada responsable de su secreción¹³. Muchos tipos de células segregan pGSN, aunque el órgano del cuerpo más voluminoso, el músculo estriado, da cuenta de la mayoría de la producción de pGSN. La secuencia de aminoácidos de pGSN está muy conservada entre especies, y no se han descrito anticuerpos anti-pGSN no humanos¹⁵.

Diversas afecciones asociadas con lesión tisular aguda dan como resultado reducciones en la concentración circulante de pGSN; la disminución en los niveles es proporcional al grado de lesión, y los grados críticos de reducción de pGSN están asociados con resultados adversos, incluyendo la muerte^{11, 14, 16-18}. Aunque la exposición de la actina citoplásmica al entorno extracelular debido a la destrucción de la membrana en lesión tisular y endotelial es probablemente el mecanismo de agotamiento de pGSN^{19, 20}, el agotamiento de pGSN también resulta de almacenar una variedad de mediadores inflamatorios circulantes (por ejemplo, factor activante de plaquetas, ácido lisofosfatídico, lipopolisacárido)^{12, 21} que median potencialmente complicaciones adversas.

Esta invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que, en sujetos sometidos a diálisis crónica, los niveles de gelsolina plasmática de valor inicial son bajos, y de que los niveles de gelsolina están relacionados de forma inversa con el riesgo de mortalidad, tal como por causas infecciosas o causas cardíacas. De este modo, la invención implica, en un aspecto, el uso de gelsolina para caracterizar un riesgo de mortalidad en un sujeto con insuficiencia renal crónica, y para monitorizar la eficacia de la terapia. La invención también se basa en el descubrimiento de que, en sujetos sometidos a diálisis crónica, los niveles elevados de actina en plasma están relacionados con riesgo de mortalidad. De este modo, la invención implica, en un aspecto, el uso de actina para caracterizar un riesgo de mortalidad en un sujeto con insuficiencia renal crónica, y para monitorizar la eficacia de la terapia. Una correlación de estas observaciones es que la monitorización de los niveles de gelsolina en plasma y/o los niveles de actina podría ser parte de la estrategia de manejo de insuficiencia renal.

Según un aspecto de la invención, se proporciona un método para caracterizar un riesgo de mortalidad en un sujeto con insuficiencia renal crónica. El método comprende comparar un nivel de gelsolina del sujeto con un valor predeterminado, y caracterizar el riesgo de mortalidad del sujeto basándose en el nivel de gelsolina en comparación con el nivel predeterminado. Un nivel de gelsolina por debajo del valor predeterminado indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de mortalidad. En algunas realizaciones, el valor predeterminado es alrededor de 190 nanogramos/microlitro (ng/μl) de plasma. En algunas realizaciones, el valor predeterminado es alrededor de 150 ng/μl de plasma. En algunas otras realizaciones, el valor predeterminado es alrededor de 120 ng/μl de plasma. En algunas realizaciones, un menor nivel de gelsolina indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de mortalidad. El método puede comprender además obtener el nivel de gelsolina del sujeto.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para caracterizar un riesgo de mortalidad de un

- 5 sujeto con insuficiencia renal realizaciones. El método comprende comparar un nivel de actina del sujeto con un valor predeterminado, y caracterizar el riesgo de mortalidad del sujeto basándose en el nivel de actina en comparación con el valor predeterminado. Un nivel de actina por encima del valor predeterminado indica que el sujeto tiene un riesgo de mortalidad incrementado. En algunas realizaciones, el valor predeterminado es alrededor de 0,01 microgramos/mililitro ($\mu\text{g/ml}$) de plasma. En algunas realizaciones, el valor predeterminado es alrededor de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de plasma. En algunas realizaciones, un mayor nivel de actina se correlaciona con un mayor riesgo de mortalidad. El método puede comprender además obtener el nivel de actina del sujeto.
- 10 Según todavía otro aspecto de la invención, se proporciona un método para caracterizar un riesgo de mortalidad de un sujeto con insuficiencia renal crónica. El método comprende comparar el nivel de gelsolina del sujeto con un primer valor predeterminado para establecer un primer valor de riesgo, y comparar un nivel de actina del sujeto con un segundo valor predeterminado, para establecer un segundo valor de riesgo. El riesgo de mortalidad del sujeto se caracteriza basándose en la combinación del primer valor de riesgo y del segundo valor de riesgo, en el que la combinación del primer valor de riesgo y el segundo valor de riesgo establece un tercer valor de riesgo, diferente de dichos valores de riesgo primero y segundo. En algunas realizaciones, el primer valor predeterminado es alrededor de 190 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de plasma. En algunas realizaciones, el primer valor predeterminado es alrededor de 150 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de plasma. En otras realizaciones, el primer valor predeterminado es alrededor de 120 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de plasma. En algunas realizaciones, el segundo valor predeterminado es alrededor de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ de plasma. En algunas realizaciones, el valor predeterminado es alrededor de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de plasma.
- 15 El método implica además obtener el nivel de gelsolina del sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende además obtener el nivel de actina del sujeto.
- 20 Según todavía otro aspecto de la invención, se proporciona un método para evaluar la eficacia de una terapia en un sujeto con insuficiencia renal crónica. El método implica comparar el nivel de gelsolina del sujeto con un valor predeterminado y determinar si el nivel de gelsolina está en o por encima del nivel predeterminado, siendo dicha determinación indicativa de que la terapia es eficaz.
- 25 Las etapas del método se pueden repetir para monitorizar los niveles de gelsolina del sujeto a lo largo del tiempo. En algunas realizaciones, el valor predeterminado es alrededor de 190 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de plasma. En algunas realizaciones, el valor predeterminado es alrededor de 150 $\text{ng}/\mu\text{l}$. En otras realizaciones, el valor predeterminado es alrededor de 120 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de plasma.
- 30 Se describe además un método para tratar un sujeto con insuficiencia renal. El método implica administrar una cantidad eficaz de gelsolina a un sujeto que necesita tal tratamiento, para elevar el nivel de gelsolina en el sujeto por encima de un valor predeterminado. El valor predeterminado es alrededor de 190 $\text{ng}/\mu\text{l}$, alrededor de 150 $\text{ng}/\mu\text{l}$ o alrededor de 120 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de plasma.
- 35 La gelsolina puede ser gelsolina plasmática (pGSN), gelsolina citoplásmica (cGSN), advillina, villina, capG, proteínas flightless, fragmina, severina, adseverina, protovillina, y/o supervillina. La gelsolina se puede administrar oralmente, sublingualmente, bucalmente, intranasalmente, intravenosamente, intramuscularmente, intratecalmente, intraperitonealmente, o subcutáneamente.
- 40 Según todavía otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar un sujeto con insuficiencia renal crónica que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección. El método implica administrar gelsolina a un sujeto que necesita de tal tratamiento, en una cantidad eficaz para reducir el riesgo de la infección.
- 45 Se divulga además un método de tratamiento para elevar el nivel de gelsolina en un sujeto con insuficiencia renal. El método comprende dar instrucciones al sujeto con insuficiencia renal que necesita de tal tratamiento para tomar una cantidad eficaz de gelsolina con el fin de elevar el nivel de gelsolina en el sujeto por encima de un valor predeterminado. El valor predeterminado es alrededor de 190 $\text{ng}/\mu\text{l}$, alrededor de 150 $\text{ng}/\mu\text{l}$ o alrededor de 120 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de plasma.
- 50 La gelsolina puede ser gelsolina plasmática (pGSN), gelsolina citoplásmica (cGSN), advillina, villina, capG, proteínas flightless, fragmina, severina, adseverina, protovillina, y/o supervillina. La gelsolina se puede administrar oralmente, sublingualmente, bucalmente, intranasalmente, intravenosamente, intramuscularmente, intratecalmente, intraperitonealmente, o subcutáneamente.
- 55 Se describe aquí un método para tratar un sujeto con insuficiencia renal para elevar el nivel de gelsolina en el sujeto. El método comprende proporcionar al sujeto un paquete que contiene gelsolina, y proporcionar al sujeto indicaciones que indican que la gelsolina es para elevar el nivel de gelsolina en el sujeto por encima de un valor predeterminado. El valor predeterminado es alrededor de 190 $\text{ng}/\mu\text{l}$, alrededor de 150 $\text{ng}/\mu\text{l}$ o alrededor de 120 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de plasma.
- La gelsolina puede ser gelsolina plasmática (pGSN), gelsolina citoplásmica (cGSN), advillina, villina, capG, proteínas flightless, fragmina, severina, adseverina, protovillina, y/o supervillina. La gelsolina se puede administrar oralmente, sublingualmente, bucalmente, intranasalmente, intravenosamente, intramuscularmente, intratecalmente, intraperitonealmente, o subcutáneamente.

También se describe un producto para tratamiento médico. El producto comprende un envase que contiene gelsolina e indicaciones que indican que la gelsolina es para elevar el nivel de gelsolina en un sujeto con insuficiencia renal por encima de un valor predeterminado. El valor predeterminado es alrededor de 190 ng/μl, alrededor de 150 ng/μl o alrededor de 120 ng/μl de plasma.

- 5 La gelsolina puede ser gelsolina plasmática (pGSN), gelsolina citoplásmica (cGSN), advillina, villina, capG, proteínas flightless, fragmina, severina, adseverina, protovillina, y/o supervillina. La gelsolina se puede administrar oralmente, sublingualmente, bucalmente, intranasalmente, intravenosamente, intramuscularmente, intratecalmente, intraperitonealmente, o subcutáneamente.

- 10 Adicionalmente, se proporciona el uso de gelsolina en la fabricación de un medicamento para elevar el nivel de gelsolina en un sujeto con insuficiencia renal por encima de un valor predeterminado. La gelsolina puede ser gelsolina plasmática (pGSN), gelsolina citoplásmica (cGSN), advillina, villina, capG, proteínas flightless, fragmina, severina, adseverina, protovillina, y/o supervillina. La gelsolina se puede administrar oralmente, sublingualmente, bucalmente, intranasalmente, intravenosamente, intramuscularmente, intratecalmente, intraperitonealmente, o subcutáneamente.

- 15 La divulgación proporciona también un método que comprende comparar un nivel de gelsolina en un sujeto con insuficiencia renal con un valor predeterminado y, si el nivel de gelsolina está por debajo del valor predeterminado, identificar al sujeto por tener un riesgo de mortalidad incrementado. El método comprende aconsejar al sujeto sobre el riesgo, tratamiento, o cuidado médico. Por ejemplo, el tratamiento comprende gelsolina. El método comprende obtener el nivel de gelsolina del sujeto. El valor predeterminado es alrededor de 190 ng/μl, alrededor de 150 ng/μl o
20 alrededor de 120 ng/μl de plasma.

- Según otro aspecto, se divulga aquí un método que comprende comparar un nivel de actina en un sujeto con insuficiencia renal con un valor predeterminado, y, si el nivel de actina está por encima del valor predeterminado, identificar el sujeto por tener un riesgo de mortalidad incrementado. En algunos aspectos, el método comprende aconsejar al sujeto sobre el riesgo, tratamiento, o cuidado médico. El tratamiento puede comprender gelsolina. En
25 algunos aspectos, el método comprende obtener el nivel de actina del sujeto. El valor predeterminado es alrededor de 0,01 μg/ml o alrededor de 0,1 μg/ml de plasma.

- Según todavía otro aspecto, la divulgación proporciona un método que comprende llevar a cabo un ensayo para detectar un nivel de gelsolina en un sujeto con insuficiencia renal, en el que el ensayo comprende un valor
30 predeterminado que predice riesgo de mortalidad incrementado en el sujeto. En algunos aspectos, el método comprende aconsejar al sujeto sobre el riesgo, tratamiento, o cuidado médico. El tratamiento puede comprender gelsolina. El valor predeterminado es alrededor de 190 ng/μl, alrededor de 150 ng/μl o alrededor de 120 ng/μl de plasma.

- Según todavía otro aspecto, la divulgación proporciona un método que comprende llevar a cabo un ensayo para detectar un nivel de actina en un sujeto con insuficiencia renal, en el que el ensayo comprende un valor
35 predeterminado que predice riesgo de mortalidad incrementado en el sujeto. El método comprende aconsejar al sujeto sobre el riesgo, tratamiento, o cuidado médico. El tratamiento puede comprender gelsolina. El valor predeterminado es alrededor de 0,01 μg/ml o alrededor de 0,1 μg/ml de plasma.

- El nivel de gelsolina o actina puede estar en un fluido corporal del sujeto. Los ejemplos de fluidos corporales incluyen, pero no se limitan a, sangre, plasma, suero, orina, fluido sinovial, fluido cerebroespinal o alveolar. En
40 algunas realizaciones importantes, el fluido corporal es plasma.

La mortalidad puede estar provocada por una infección. La infección puede estar provocada por una bacteria grampositiva, una bacteria gramnegativa, un bacilo resistente a ácidos, una espiroqueta, un actinomiceto, un virus, un hongo, un parásito, una especie de Ureaplasma, una especie de Mycoplasma, especie de Chlamydia, o especie de Pneumocystis.

- 45 Los ejemplos de bacterias grampositivas incluyen, pero no se limitan a, especie de Pasteurella, especie de Staphylococcus, especie de Streptococcus, Bacillus anthracis, especie de Corynebacterium, especie de Diphtheroids, especie de Listeria, especie de Erysipelothrix, y especie de Clostridium.

- Los ejemplos de bacterias gramnegativas incluyen, pero no se limitan a, especie de Neisseria, especie de Branhamella, especie de Escherichia, especie de Enterobacter, especie de Proteus especie de Pseudomonas,
50 especie de Klebsiella, especie de Salmonella, especie de Shigella, especie de Serratia, especie de Acinetobacter, especie de Haemophilus, especie de Brucella, especie de Yersinia, especie de Francisella, especie de Pasturella, especie de Vibrio cholerae, especie de Flavobacterium, especie de Pseudomonas, especie de Campylobacter, especie de Bacteroides, especie de Fusobacterium, especie de Calymmatobacterium, especie Streptobacillus, y especie de Legionella.

- 55 El bacilo resistente a ácidos puede ser una especie de Mycobacterium. La espiroqueta puede ser especie de Treponema, especie de Borrelia, o especie de Leptospira.

Los ejemplos de virus incluyen, pero no se limitan a, Retrovirus, virus de la inmunodeficiencia humana, citomegalovirus, picornavirus, virus de la polio, virus de la hepatitis A, enterovirus, virus de Coxsackie, rinovirus, ecovirus, calcivirus, togavirus, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola, flavivirus, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla, coronavirus, rabdovirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, filovirus, virus del ébola, paramixovirus, virus de la parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, ortomixovirus, virus de la gripe, Hantavirus, Bungavirus, flevovirus, virus de Nairo, virus Arena, virus de la fiebre hemorrágica, reovirus, orbivirus, rotavirus, birnavirus, hepadnavirus, virus de la hepatitis B, parvovirus, Papovavirus, virus del papiloma, virus del polioma, adenovirus, virus del herpes, virus de varicela zóster, poxvirus, virus de la viruela, virus de la vacuna, iridovirus, virus de la fiebre porcina africana, virus de la hepatitis delta, virus de la hepatitis no A, no B, hepatitis C, virus de Norwalk, astrovirus, y virus sin clasificar.

Los ejemplos de hongos incluyen, pero no se limitan a, especie de Cryptococcus, especie de Histoplasma, especie de Coccidioides, especie de Paracoccidioides, especie de Blastomyces, especie de Chlamydia, especie de Candida, especie de Sporothrix, especie de Aspergillus, y hongos de mucormicosis.

Los ejemplos de parásitos incluyen, pero no se limitan a, especie de Plasmodio, especie de Toxoplasma, especie de Babesia, especie de Leishmania, y especie de Trypanosoma.

La mortalidad puede estar provocada por un suceso cardiovascular. El suceso cardiovascular puede ser síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, apoplejía, o muerte repentina.

El sujeto puede estar en diálisis. La diálisis puede ser hemodiálisis o diálisis peritoneal. En algunas realizaciones, el sujeto tiene enfermedad renal de etapa terminal (ESRD).

En algunas realizaciones, el sujeto está de otro modo libre de indicaciones que exijan tratamiento. Un sujeto libre de indicaciones que exijan tratamiento con gelsolina es un sujeto que no tiene signos o síntomas que exijan tratamiento con gelsolina. La gelsolina está indicada para el tratamiento de choque séptico. La gelsolina también está indicada para el tratamiento de trastornos relacionados con actina, tales como síndrome disneico del adulto (ARDS), necrosis hepática fulminante, insuficiencia renal aguda, lesión muscular, trastornos caracterizados por niveles elevados de BUN y/o creatinina. Los trastornos relacionados con actina son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

En algunas realizaciones, el primer valor predeterminado puede ser una pluralidad de intervalos de niveles de gelsolina predeterminados, estando uno de una pluralidad de intervalos por debajo de alrededor de 190 ng/μl de plasma y estando otro de dichos intervalos por encima de alrededor de 190 ng/μl de plasma, y la etapa de comparación comprende determinar en cuál de dicha pluralidad de intervalos de niveles de gelsolina predeterminados cae dicho nivel de gelsolina del sujeto.

En algunas realizaciones, el primer valor predeterminado puede ser una pluralidad de intervalos de niveles de gelsolina predeterminados, estando uno de una pluralidad de intervalos por debajo de alrededor de 150 ng/μl de plasma y estando otro de dichos intervalos por encima de alrededor de 150 ng/μl de plasma, y la etapa de comparación comprende determinar en cuál de dicha pluralidad de intervalos de niveles de gelsolina predeterminados cae dicho nivel de gelsolina del sujeto. En algunas realizaciones, el primer valor predeterminado puede ser una pluralidad de intervalos de niveles de gelsolina predeterminados, estando uno de una pluralidad de intervalos por debajo de alrededor de 120 ng/μl de plasma y estando otro de dichos intervalos por encima de alrededor de 120 ng/μl de plasma.

También, la fraseología y terminología usada aquí es con el fin de describir, y no se debe de considerar como limitante. El uso de “incluyendo”, “comprendiendo”, o “teniendo”, “conteniendo”, “implicando”, y sus variaciones aquí, pretende englobar los apartados enunciados después y sus equivalentes, así como apartados adicionales.

Estos y otros aspectos de la invención, así como diversas ventajas y utilidades, serán manifiestos con referencia a la Descripción Detallada de la Invención. Cada aspecto de la invención puede englobar diversas realizaciones como se entenderá.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un histograma que muestra la distribución de gelsolina plasmática en un muestreo al azar de 150 sujetos con ESRD procedentes de todos los Estados Unidos de América. La línea discontinua representa el nivel medio de pGSN de 250 mg/l en controles sanos.

La FIG. 2 son dos gráficas que muestran la supervivencia a 1 año entre pacientes con diálisis crónica según el nivel de gelsolina plasmática de la mediana indicado (panel superior) o según los niveles de valores iniciales de gelsolina plasmática subdivididos en terciles indicados (panel inferior).

La FIG. 3 es una foto de una transferencia Western que detecta actina plasmática de sujetos con terciles de pGSN indicados.

La FIG. 4 es un histograma que muestra el riesgo de mortalidad a 1 año según los niveles de gelsolina y actina en plasma de valor inicial.

La FIG. 5 es una gráfica que muestra la correlación entre los niveles de gelsolina plasmática (pGSN) de valor inicial y la velocidad de filtración glomerular estimada en 53 pacientes con enfermedad renal crónica.

5 La FIG. 6 es un histograma que muestra niveles de pGSN de la mediana en pacientes con enfermedad renal crónica. Etapa 1 (n = 5), velocidad de filtración glomerular estimada (eGFR) > 90 ml/min./1,73 m²; Etapa 2 (n = 11), eGFR 60-89 ml/min./1,73 m²; Etapa 3 (n = 18), eGFR 30-59 ml/min./1,73 m²; Etapa 4 (n = 19), eGFR 15-29 ml/min./1,73 m². Las barras de error representan intervalos intercuartiles.

10 La FIG. 7 es una foto de algunos mecanismos posibles para el agotamiento de pGSN y sus consecuencias en insuficiencia renal crónica. La insuficiencia renal crónica inhibe la síntesis de pGSN y acelera el aclaramiento. El músculo es la fuente principal de la biosíntesis de pGSN, y la reducción de la masa muscular asociada con insuficiencia renal crónica reduciría la producción neta de pGSN. El fallo para eliminar toxinas en insuficiencia renal provoca destrucción tisular ampliamente extendida, especialmente endotelial, que conduce a exposición de actina citoplásmica en el plasma, y al secuestro de pGSN en células rotas. Además, la liberación de vesículas de la membrana dentro-fuera con filamentos de actina adheridos procedentes de células dañadas daría como resultado actina circulante detectable, y la actina circulante acelera el aclaramiento de pGSN. pGSN baja da como resultado una acumulación alterada de mediadores inflamatorios, tales como el factor activante de plaquetas, que promueven complicaciones vasculares, y hacen a los pacientes susceptibles a los efectos letales de la septicemia.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que, en sujetos sometidos a diálisis crónica, los niveles de gelsolina plasmática de valor inicial son bajos, y los niveles de gelsolina están inversamente relacionados con la mortalidad (por ejemplo, mortalidad por causas infecciosas o cardíacas). La invención también se basa, en parte, en el descubrimiento de que, en sujetos sometidos a diálisis crónica, los niveles elevados de actina plasmática están directamente relacionados con la mortalidad. Por lo tanto, el agotamiento de gelsolina y/o la actina en exceso predice mortalidad en sujetos con insuficiencia renal crónica (por ejemplo, sujetos sometidos a diálisis crónica). Se cree que gelsolina se puede usar para reducir la mortalidad y/o para reducir el riesgo de infección en un sujeto con insuficiencia renal (por ejemplo, sujeto sometido a diálisis crónica).

30 De este modo, la invención implica, en algunos aspectos, administrar gelsolina a un sujeto con insuficiencia renal crónica (por ejemplo, un sujeto sometido a diálisis crónica) para elevar el nivel de gelsolina en el sujeto y para reducir la mortalidad y/o para reducir el riesgo de infección en el sujeto con insuficiencia renal (por ejemplo, sujeto sometido a diálisis crónica). El término "tratar" o "tratamiento" pretende incluir profilaxis, mejora, prevención o cura de la afección.

35 Como se usa aquí, el término "gelsolina" engloba gelsolina de tipo salvaje (número de acceso GenBank: X04412), isoformas, análogos, variantes, fragmentos o derivados funcionales de gelsolina.

La gelsolina (GSN), a diferencia de otras proteínas de mamíferos, tiene isoformas tanto citoplásmica (cGSN) como segregada o exportada, también denominada gelsolina plasmática (pGSN), que derivan del ajuste alternativo del mensaje de un único gen (Sun et al. J. Biol. Chem. 274:33179-33182 (1999)). Como se usa aquí, las isoformas de gelsolina incluyen versiones de gelsolina con algunas pequeñas diferencias en sus secuencias de aminoácidos, habitualmente una variante de ajuste o el resultado de cierta modificación post-traducciona.

40 Gelsolina engloba gelsolina nativa así como gelsolina sintética y recombinante. La gelsolina es una proteína secretora abundante (Yin, H. L., Kwiatkowski, D. J., Mole, J. E. y Cole, F. S. (1984) J Biol Chem 259, 5271-6). La isoforma exportada de gelsolina, pGSN, tiene 25 aminoácidos adicionales, y se origina a partir del ajuste alternativo de un solo gen (Kwiatkowski, D. J., Stossel, T. P., Orkin, S. H., Mole, J. E., Colten, H. R. y Yin, H. L. (1986) Nature 323, 455-8). La gelsolina humana recombinante (rhGSN) (Biogen IDEC, Inc., Cambridge, MA) se produce en *E. coli*, y aunque tiene la misma estructura primaria que la proteína nativa, en condiciones estándar de purificación, difiere de la gelsolina plasmática humana natural por un enlace de disulfuro que está presente en la proteína natural. Por lo tanto, la proteína recombinante se oxida apropiadamente tras la purificación, y su estructura y funciones son indistinguibles de gelsolina plasmática humana (Wen et. al., Biochemistry 35:9700-9709 (1996)). En algunos de los aspectos terapéuticos y de las realizaciones de la invención, se prefiere el uso de rhGSN. En algunos de los aspectos de diagnóstico y realizaciones de la invención, se prefiere el uso de pGSN.

55 Un "análogo de gelsolina" se refiere a un compuesto sustancialmente similar en función a la gelsolina nativa o a un fragmento de la misma. Los análogos de gelsolina incluyen secuencias de aminoácidos biológicamente activas sustancialmente similares a las secuencias de gelsolina, y pueden tener secuencias sustituidas, suprimidas, alargadas, reemplazadas, o de otro modo modificadas, que poseen bioactividad sustancialmente similar a la de la gelsolina. Por ejemplo, un análogo de gelsolina es aquel que no tiene la misma secuencia de aminoácidos que la gelsolina pero que es suficientemente homólogo a gelsolina para retener la bioactividad de gelsolina. La bioactividad se puede determinar, por ejemplo, evaluando la capacidad del análogo de gelsolina para estimular la nucleación de

actina. Los ensayos de bioactividad de la gelsolina son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

Una "variante" de gelsolina se refiere a un compuesto que es sustancialmente similar en estructura y bioactividad a gelsolina nativa, o a un fragmento de la misma. El término variante engloba la familia de proteínas de gelsolina. La familia de proteínas de gelsolina es un grupo de proteínas que se unen a actina que comparten repeticiones de dominios homólogos de alrededor de 15 kDa que adoptan un plegamiento similar. Los ejemplos de proteínas de la familia de gelsolina incluyen, pero no se limitan a, advillina, villina, capG, proteínas flightless, fragmina, severina, adseverina, protovillina, y supervillina.

Un "fragmento" de gelsolina pretende incluir cualquier porción de una molécula de gelsolina que proporciona un segmento de gelsolina que mantiene la bioactividad de gelsolina; la expresión pretende incluir fragmentos de gelsolina que proceden de cualquier fuente, tal como, por ejemplo, secuencias peptídicas de origen natural, secuencias peptídicas sintéticas o sintetizadas químicamente, y secuencias peptídicas manipuladas genéticamente mediante ingeniería.

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

La invención implica, en algunos aspectos, métodos para tratar un sujeto con insuficiencia renal crónica (por ejemplo, sujeto sometido a diálisis crónica). La gelsolina se administra en una cantidad eficaz para elevar el nivel de gelsolina y o para reducir el nivel de actina en el sujeto.

Una respuesta a un método de tratamiento de la invención se puede determinar, por ejemplo, midiendo la gelsolina plasmática o sanguínea y/o la actina plasmática o sanguínea para determinar si los niveles de gelsolina en plasma o en sangre están incrementados y/o si los niveles de actina en plasma o en sangre están disminuidos como resultado del tratamiento. Los ensayos y métodos para medir gelsolina y/o actina en plasma o en sangre, y para interpretar los resultados de tales ensayos, son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para monitorizar la terapia en un sujeto con insuficiencia renal crónica. El método implica obtener un nivel de gelsolina y/o un nivel de actina en un sujeto sometido a terapia. El nivel de gelsolina se compara con un valor predeterminado que corresponde a un nivel de control de gelsolina (por ejemplo, en una población aparentemente sana). El nivel de actina se compara con un valor predeterminado que corresponde a un nivel de control de actina (por ejemplo, en una población aparentemente sana). Una determinación de si el nivel de gelsolina y/o actina está a, por debajo o por encima de un nivel predeterminado indicará si el sujeto se beneficiaría de la terapia continuada con la misma terapia, o si se beneficiaría de un cambio en la terapia. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una determinación de que el nivel de gelsolina está a o por encima de un nivel predeterminado, y/o el nivel de actina está a o por debajo de un nivel predeterminado, indicará que el sujeto se beneficiaría de la terapia continuada con la misma terapia. En algunas realizaciones, una determinación de que el nivel de gelsolina está a o por debajo de un nivel predeterminado, y/o el nivel de actina está a o por encima de un nivel predeterminado, indica que el sujeto se beneficiaría del cambio en la terapia. En algunas realizaciones, la obtención de un nivel de gelsolina y/o actina se repite para monitorizar los niveles de gelsolina y/o actina del sujeto a lo largo del tiempo.

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

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para evaluar la eficacia de una terapia de insuficiencia renal crónica en un sujeto. El método comprende comparar un nivel de gelsolina con un valor predeterminado y determinar si el nivel de gelsolina está a o por encima de un nivel predeterminado, siendo dicha determinación indicativa de que la terapia es eficaz. En algunas realizaciones, el método comprende comparar un nivel de actina con un valor predeterminado y determinar si el nivel de actina está a o por debajo de un nivel predeterminado, siendo dicha determinación indicativa de que la terapia es eficaz.

En algunas realizaciones, el sujeto puede haber estado sometido a la terapia durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o más. En algunas realizaciones, el sujeto puede haber estado sometido a la terapia durante al menos 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas o más. En algunas realizaciones, el sujeto puede haber estado sometido a la terapia durante al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más.

5 Un aspecto de la divulgación está dirigido a la medición de los niveles de gelsolina y/o niveles de actina para guiar los tratamientos a fin de mejorar el resultado en los sujetos. Los niveles de gelsolina y/o actina tienen valor predictivo para la respuesta a tratamientos para reducir el riesgo de mortalidad en un sujeto con insuficiencia renal. Los sujetos que se beneficiarían de este aspecto de esta invención son sujetos con insuficiencia renal que están sometidos a terapia para reducir el riesgo de mortalidad (por ejemplo, por infecciones o causas cardíacas) y para elevar el nivel de gelsolina. Un sujeto en terapia es un sujeto que ya ha sido diagnosticado con insuficiencia renal (por ejemplo, un sujeto en hemodiálisis crónica) y está en el curso de tratamiento con una terapia. La terapia puede ser cualquiera de los agentes terapéuticos usados en el tratamiento de insuficiencia renal. Los agentes terapéuticos usados en el tratamiento de insuficiencia renal son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. La terapia también pueden ser tratamientos no farmacéuticos. La terapia es aquella que incrementa los niveles de gelsolina y/o disminuye los niveles de actina. La terapia puede ser una terapia con gelsolina. El sujeto que se beneficiará muy probablemente de esta invención es un sujeto humano en terapia (por ejemplo, un sujeto humano con insuficiencia renal en terapia para insuficiencia renal) y que tiene un nivel de gelsolina a o por debajo de alrededor de 190 ng/μl (ng/μl) de plasma o que tiene un nivel de actina a o por encima de alrededor de 0,01 μg/ml de plasma. En algunas realizaciones, el sujeto humano en terapia tiene un nivel de gelsolina a o por debajo de alrededor de 150 ng/μl de plasma. En algunas realizaciones, el sujeto humano en terapia tiene un nivel de gelsolina a o por debajo de alrededor de 120 ng/μl de plasma. En algunas realizaciones, el sujeto humano en terapia tiene un nivel de actina a o por encima de alrededor de 0,1 μg/ml de plasma.

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

30 En algunas realizaciones, el tratamiento es gelsolina. La gelsolina se puede administrar sola, en una composición farmacéutica, o combinada con otros regímenes terapéuticos. La gelsolina y otro agente o agentes terapéuticos se pueden administrar simultánea o secuencialmente. Cuando los otros agentes terapéuticos se administran simultáneamente, se pueden administrar en la misma formulación o en formulaciones separadas, pero se administran al mismo tiempo. Los otros agentes terapéuticos se pueden administrar secuencialmente entre sí y con gelsolina cuando la administración de los otros agentes terapéuticos y de la gelsolina se espacia temporalmente. La separación en el tiempo entre la administración de estos compuestos puede ser cuestión de minutos, o puede ser mayor.

40 Al poner en práctica ciertos métodos descritos aquí, se obtiene un nivel de gelsolina en un sujeto. Este nivel se compara entonces con un valor predeterminado, en el que el nivel de gelsolina en comparación con el valor predeterminado es indicativo de la probabilidad de que el sujeto se beneficiará de la terapia continuada. El sujeto se puede caracterizar entonces en términos del beneficio neto probable a obtener de un cambio en la terapia.

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

50 La invención también implica comparar el nivel de gelsolina y/o el nivel de actina para el sujeto con un valor predeterminado. El valor predeterminado puede tomar una variedad de formas. Puede ser un único valor de corte, tal como una mediana o media. Se puede establecer basándose en grupos comparativos, tales como, por ejemplo, cuando el riesgo en un grupo definido es doble del riesgo en otro grupo definido. Puede ser un intervalo, por ejemplo cuando la población ensayada se divide por igual (o desigualmente) en grupos, tales como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio y un grupo de riesgo elevado, o en cuartiles, siendo el cuartil más bajo los sujetos con el riesgo más elevado, y siendo el cuartil más alto los sujetos con el riesgo más bajo, o en terciles, siendo el tercil más bajo los sujetos con el riesgo más elevado, y siendo el tercil más alto los sujetos con el riesgo más bajo. El valor predeterminado puede ser un valor de corte que se predetermina por el hecho de que un grupo que tiene un nivel de gelsolina menor que el valor de corte demuestra un incremento estadísticamente significativo en el riesgo de mortalidad en comparación con un grupo comparativo. En algunas realizaciones, el grupo comparativo es un grupo que tiene un mayor nivel de gelsolina.

60 El valor predeterminado puede depender de la población particular de sujetos seleccionada. En consecuencia, los

valores predeterminados seleccionados pueden tener en cuenta la categoría en la que caen los sujetos. Los intervalos y categorías apropiados se pueden seleccionar con una experimentación no más allá de la habitual por aquellos de pericia normal en la técnica. Los fluidos corporales preferidos son plasma y sangre. En algunas realizaciones, el valor predeterminado de gelsolina es alrededor de 190 ng/μl de plasma. En algunas realizaciones, el valor predeterminado de gelsolina es alrededor de 150 ng/μl de plasma. En algunas realizaciones, el valor predeterminado de gelsolina es alrededor de 120 ng/μl de plasma. Por supuesto, el valor predeterminado dependerá de las características de la población de sujetos en la que se encuentra el sujeto. A la hora de caracterizar el riesgo, se pueden establecer numerosos valores predeterminados.

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

Al poner en práctica ciertos métodos de la presente invención, se requiere obtener un nivel de actina en un sujeto. Este nivel se compara entonces con un valor predeterminado, en el que el nivel de actina en comparación con el valor predeterminado es indicativo de la probabilidad de que el sujeto se beneficiará de la terapia continuada. El sujeto se puede caracterizar entonces en términos del beneficio neto probable a obtener de un cambio en la terapia.

El nivel de la actina para el sujeto se puede obtener mediante cualquier método reconocido en la técnica. Típicamente, el nivel se determina midiendo el nivel de actina en un fluido corporal, por ejemplo sangre, suero, plasma, linfa, saliva, orina y similar. El nivel se puede determinar como se describe en el Ejemplo más abajo, u otros ensayos u otras técnicas convencionales para determinar la presencia de actina. Los métodos convencionales pueden incluir enviar una muestra o muestras de un fluido corporal del sujeto a un laboratorio comercial para la medición.

La invención también implica comparar el nivel de actina para el sujeto con un valor predeterminado. El valor predeterminado puede tomar una variedad de formas. Puede ser un único valor de corte, tal como una mediana o media. Se puede establecer basándose en grupos comparativos, tales como, por ejemplo, cuando el riesgo en un grupo definido es doble del riesgo en otro grupo definido. Puede ser un intervalo, por ejemplo cuando la población ensayada se divide por igual (o desigualmente) en grupos, tales como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio y un grupo de riesgo elevado, o en cuartiles, siendo el cuartil más bajo los sujetos con el riesgo más bajo, y siendo el cuartil más alto los sujetos con el riesgo más elevado, o en terciles, siendo el tercil más bajo los sujetos con el riesgo más bajo, y siendo el tercil más elevado los sujetos con el riesgo más elevado. El valor predeterminado puede ser un valor de corte que se predetermina por el hecho de que un grupo que tiene un nivel de actina mayor que el valor de corte demuestra un incremento estadísticamente significativo en el riesgo de mortalidad en comparación con un grupo comparativo.

El valor predeterminado puede depender de la población particular de sujetos seleccionada. En consecuencia, los valores predeterminados seleccionados pueden tener en cuenta la categoría en la que caen los sujetos. Los intervalos y categorías apropiados se pueden seleccionar con una experimentación no más allá de la habitual por aquellos de pericia normal en la técnica. En algunas realizaciones, el valor predeterminado de actina es alrededor de 0,01 μg/ml de plasma. En algunas realizaciones, el valor predeterminado de actina es alrededor de 0,1 μg/ml de plasma. Por supuesto, el valor predeterminado dependerá de las características de la población de sujetos en la que se encuentra el sujeto. A la hora de caracterizar el riesgo, se pueden establecer numerosos valores predeterminados.

La divulgación proporciona métodos para determinar si un sujeto se beneficiará de la terapia continuada, o se beneficiará de un cambio en la terapia. El beneficio es típicamente una reducción en los signos y síntomas o complicaciones de insuficiencia renal (por ejemplo, complicaciones infecciosas o cardiovasculares). Los signos, síntomas, manifestaciones y complicaciones de insuficiencia renal son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

Estos métodos tienen implicaciones importantes para el tratamiento de pacientes, y también para el desarrollo clínico de nuevas terapias. La determinación de si un sujeto se beneficiará de la terapia continuada, o se beneficiará de un cambio en la terapia, es clínicamente útil. Un ejemplo de utilidad clínica de los métodos de esta invención incluye identificar sujetos que tienen menos probabilidad o más probabilidad de responder a una terapia. Los métodos son también útiles para predecir o determinar que un sujeto se beneficiará de la terapia continuada o se beneficiará de un cambio en la terapia. Los médicos y sanitarios seleccionan regímenes terapéuticos para el tratamiento basándose en el beneficio neto esperado para el sujeto. El beneficio neto deriva de la relación riesgo a beneficio. La presente descripción permite la determinación de si un sujeto se beneficiará de la terapia continuada o si se beneficiará de un cambio en la terapia, ayudando de este modo al médico a seleccionar una terapia.

Otro ejemplo de utilidad clínica, por ejemplo en el caso de sujetos humanos, incluye ayudar a los investigadores clínicos en la selección de ensayos clínicos de sujetos con una gran probabilidad de obtener un beneficio neto. Se espera que los investigadores clínicos usen ahora la presente invención para determinar criterios de entrada para los ensayos clínicos.

Un sujeto que se beneficiará de terapia continuada es un sujeto cuyo nivel de gelsolina en terapia alcanza un cierto

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

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

10 Como se usa aquí, un “cambio en la terapia” se refiere a un incremento o disminución en la dosis de la terapia existente, un cambio de una terapia a otra terapia, una adición de otra terapia a la terapia existente, o una combinación de los mismos. Un cambio de una terapia a otra puede implicar un cambio a una terapia con un perfil de riesgo elevado pero en la que la probabilidad del beneficio esperado está incrementada. En algunas realizaciones, las terapias preferidas son terapias que incrementan el nivel o niveles de gelsolina y/o que disminuyen el nivel o niveles de actina. Un sujeto que se beneficiaría de un cambio en la terapia al aumentar la dosis de la
 15 terapia existente es un sujeto que, por ejemplo, estaba en la terapia pero no estaba recibiendo la dosis máxima tolerada o la dosis máxima permitida de la terapia, y cuyo nivel de gelsolina y/o actina no alcanzó un cierto valor predeterminado. En tales casos, la dosis de la terapia existente se incrementa hasta que el nivel de gelsolina y/o actina alcanza un cierto valor predeterminado. En algunos casos, la dosis de la terapia existente se incrementa desde la dosis existente hasta una dosis mayor, que no es la dosis máxima tolerada ni la dosis máxima permitida de la terapia. En otros casos, la dosis se incrementa hasta la dosis máxima tolerada o hasta la dosis máxima permitida de la terapia. Un sujeto que se beneficiaría de un cambio en la terapia al disminuir la dosis de la terapia existente es,
 20 por ejemplo, un sujeto cuyo nivel de gelsolina y/o actina en la terapia alcanza o puede alcanzar un cierto valor predeterminado con una dosis más baja de la terapia.

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

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

También se describen métodos para determinar la eficacia de una terapia. La eficacia es típicamente la eficacia de la terapia a la hora de incrementar el nivel de gelsolina y/o disminuir el nivel de actina. Esto también se denomina algunas veces como una respuesta positiva o respuesta favorable. La eficacia se puede determinar mediante un ensayo o ensayos en sangre de gelsolina y/o un ensayo o ensayos en sangre de actina para determinar si aumentó
 40 el nivel o niveles de gelsolina o disminuyó el nivel o niveles de actina como resultado de la terapia. La invención también proporciona métodos para decidir sobre el curso de una terapia en un sujeto que está sometido a terapia. Tal curso de la terapia se decide en base al nivel o niveles de gelsolina y/o nivel o niveles de actina.

La medida de gelsolina o actina se da típicamente en ng/μl (nanogramos/microlitro), μM/l (micromoles/litro), mg/dl (miligramos/decilitro), mg/l (miligramos/litro) o μg/ml (microgramos/mililitro).

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

Una cantidad eficaz es una dosis del agente terapéutico suficiente para proporcionar un resultado médicamente deseable. Una cantidad eficaz también puede depender, por ejemplo, del grado al que un sujeto tiene niveles anormalmente disminuidos de gelsolina y/o niveles anormalmente elevados de actina. Se debería entender que los
 55 agentes terapéuticos de la invención se usan, por ejemplo, para tratar o prevenir complicaciones (por ejemplo, infecciosas o cardíacas) en un sujeto con insuficiencia renal. De este modo, por ejemplo, una cantidad eficaz es aquella cantidad que puede reducir el riesgo de, ralentizar, o quizás prevenir totalmente el desarrollo de una infección o una complicación cardíaca en un sujeto con insuficiencia renal.

Los factores implicados a la hora de determinar una cantidad eficaz son bien conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica, y se pueden abordar con una experimentación no más allá de la normal. En algunas realizaciones, se prefiere usar una dosis máxima de los agentes farmacológicos descritos aquí (solos o en combinación con otros agentes terapéuticos), esto es, la dosis segura más elevada según el juicio médico. Se entenderá por aquellos de pericia normal en la técnica, sin embargo, que un sujeto puede insistir en una menor dosis o dosis tolerable por razones médicas, razones fisiológicas, o por virtualmente cualesquiera otras razones.

La cantidad terapéuticamente eficaz de un agente farmacológico es aquella cantidad eficaz para incrementar el nivel de gelsolina y/o disminuir el nivel de actina, o para tratar o prevenir una infección o una complicación cardiaca en un sujeto con insuficiencia renal. Por ejemplo, la respuesta deseada puede ser inhibir la progresión de una infección o una complicación cardiaca. Esto puede implicar solamente ralentizar la progresión de la infección o la complicación cardiaca temporalmente, aunque más preferiblemente, implica detener la progresión de la infección o la complicación cardiaca. Esto se puede monitorizar mediante métodos de diagnóstico habituales conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. La respuesta deseada al tratamiento también puede ser un incremento en el nivel de gelsolina plasmática o una disminución en el nivel plasmático de actina.

Los agentes farmacológicos usados en los métodos divulgados aquí son preferiblemente estériles, y contienen una cantidad eficaz de gelsolina para producir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un sujeto. Las dosis de los agentes farmacológicos administrados a un sujeto se pueden escoger según diferentes parámetros, en particular según el modo de administración usado y el estado del sujeto. Otros factores incluyen el período de tratamiento deseado. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear mayores dosis (o dosis eficazmente mayores mediante una vía de suministro diferente, más localizada) hasta el grado en que lo permita la tolerancia del paciente. La dosis de un agente farmacológico se puede ajustar por el médico o veterinario individual, particularmente en el caso de cualquier complicación. Una cantidad terapéuticamente eficaz varía típicamente de 0,01 mg/kg a alrededor de 1000 mg/kg, preferiblemente de alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 500 mg/kg, y muy preferiblemente de alrededor de 0,2 mg/kg a alrededor de 250 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o más días.

La gelsolina y opcionalmente otras sustancias terapéuticas se pueden administrar *per se* o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

Aquellos de pericia normal en la técnica conocen diversos modos de administración que suministran eficazmente los agentes farmacológicos de la invención a un tejido, célula o fluido corporal deseado. Los métodos de administración se explican en otra parte en la solicitud. La divulgación no está limitada por los modos particulares de administración divulgados aquí. Referencias estándar en la técnica (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore MD, 2001) proporcionan modos de administración y formulaciones para el suministro de diversas preparaciones y formulaciones farmacéuticas en vehículos farmacéuticos. Otros protocolos que son útiles para la administración de agentes farmacológicos serán conocidos por alguien de pericia normal en la técnica, en los que la cantidad de dosis, el calendario de administración, los sitios de administración, el modo de administración, y similar, varían con respecto a aquellos presentados aquí.

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

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

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

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

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

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

10 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones oleosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones muy concentradas.

15 Como alternativa, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, disolución salina, tampón, agua libre de pirógenos estéril) antes del uso.

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

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

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

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

45 Para asegurar una resistencia gástrica completa, es esencial un revestimiento impermeable a al menos pH 5.0. Los ejemplos de ingredientes inertes más habituales que se usan como revestimientos entéricos son acetato-trimelitato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, acetato-ftalato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, acetato-ftalato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S, y goma laca. Estos revestimientos se pueden usar como películas mixtas.

Un revestimiento o mezcla de revestimientos también se puede usar sobre comprimidos, que no están destinados para la protección frente al estómago. Esto puede incluir revestimientos de azúcar, o revestimientos que hacen al

- comprimido más fácil de tragar. Las cápsulas pueden consistir en una cubierta dura (tal como gelatina) para el suministro de la sustancia terapéutica seca, es decir, polvo; para formas líquidas se puede usar una cubierta de gelatina blanda. El material de cubierta de los saquitos podría ser almidón espeso u otro papel comestible. Para pastillas, tabletas, comprimidos moldeados o triturados de comprimidos, se pueden usar técnicas de masificación en húmedo.
- 5 La sustancia terapéutica puede incluirse en la formulación como múltiples partículas finas en forma de gránulos o peletes de tamaño de partículas de alrededor de 1 mm. La formulación del material para la administración de cápsulas podría ser también como un polvo, tarugos ligeramente comprimidos, o incluso como comprimidos. La sustancia terapéutica se podría preparar mediante compresión.
- 10 Se pueden incluir todos los colorantes y los agentes saborizantes. Por ejemplo, la gelsolina se puede formular (tal como mediante encapsulamiento de liposomas o microesferas) y después se puede encerrar adicionalmente en un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes saborizantes.
- 15 Se puede diluir o incrementar el volumen de la sustancia terapéutica con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir hidratos de carbono, especialmente manitol, lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. También se podrían usar ciertas sales inorgánicas como cargas, incluyendo trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro de sodio. Algunos diluyentes comercialmente disponibles son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.
- 20 Los disgregantes se pueden incluir en la formulación de la sustancia terapéutica en una forma de dosificación sólida. Los materiales usados como disgregantes incluyen, pero no se limitan a, almidón, incluyendo el disgregante comercial basado en almidón, Explotab. Se pueden usar glicolato de almidón sódico, Amberlite, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato de sodio, gelatina, piel de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de los disgregantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Las gomas en polvo se pueden usar como disgregantes y como aglutinantes, y estos pueden incluir gomas en polvo tales como agar, Karaya o tragacanto. El ácido algínico y su sal de sodio también son útiles como disgregantes.
- 25 Los aglutinantes se pueden usar para mantener junto el agente terapéutico para formar un comprimido duro, e incluyen materiales de productos naturales tales como goma arábiga, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). La polivinilpirrolidona (PVP) y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) se podrían usar ambas en disoluciones alcohólicas para granular la sustancia terapéutica.
- 30 En la formulación de la sustancia terapéutica se puede incluir un agente contra la fricción, para evitar la pegajosidad durante el proceso de formulación. Se pueden usar lubricantes como una capa entre la sustancia terapéutica y la pared de la matriz, y éstos pueden incluir, pero no se limitan a: ácido esteárico, incluyendo sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. También se pueden usar lubricantes solubles, tales como laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.
- 35 Se pueden añadir agentes de deslizamiento que pueden mejorar las propiedades de flujo del fármaco durante la formulación, y para ayudar al reordenamiento durante la compresión. Los agentes deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirógena y silicoaluminato hidratado.
- 40 Para ayudar a la disolución de la sustancia terapéutica en el entorno acuoso se puede añadir un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y dioctilsulfonato de sodio. Se pueden usar detergentes catiónicos, y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que se podrían incluir en la formulación como tensioactivos son lauromacrogol 400, polioxil 40 estearato, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso con sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación de gelsolina ya sea solos o como una mezcla en diferentes relaciones.
- 45 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar oralmente incluyen cápsulas de cierre a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas cerradas herméticamente hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de cierre a presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes.
- 50 También se pueden usar microesferas formuladas para la administración oral. Tales microesferas se han definido muy bien en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en dosis adecuadas para tal administración.
- 55 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o tabletas, formuladas de

manera convencional.

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

También se contempla aquí el suministro pulmonar de gelsolina. La gelsolina se suministra a los pulmones de un mamífero mientras se inhala y atraviesa a lo largo del forro epitelial pulmonar hasta el torrente sanguíneo. Otros informes de moléculas inhaladas incluyen Adjei et al., 1990, *Pharmaceutical Research*, 7:565-569; Adjei et al., 1990, *International Journal of Pharmaceutics*, 63:135-144 (acetato de leuprolida); Braquet et al., 1989, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13 (supl. 5):143-146 (endotelina-1); Hubbard et al., 1989, *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, p. 206-212 (α 1-antitripsina); Smith et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (α -1-proteinasa); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, Marzo, (hormona del crecimiento humana recombinante); Debs et al., 1988, *J. Immunol.* 140:3482-3488 (interferón- γ y factor alfa necrosis tumoral) y Platz et al., patente U.S. nº 5.284.656 (factor estimulante de colonias de granulocitos). En la patente U.S. nº 5.451.569, expedida el 19 de septiembre de 1995 a Wong et al, se describe un método y composición para el suministro pulmonar de fármacos para efecto sistémico.

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

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

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

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

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

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

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

Para la administración nasal, un dispositivo útil es una botella dura pequeña a la que se une un pulverizador de dosis medida. En una realización, la dosis medida se puede suministrar extrayendo la disolución de la composición farmacéutica a una cámara de volumen definido, cámara la cual tiene una abertura dimensionada para aerosolizar una formulación de aerosol que forma una pulverización cuando se comprime un líquido en la cámara. La cámara se

comprime para administrar la composición farmacéutica. En un ejemplo específico, la cámara es un montaje de pistón. Tales dispositivos están comercialmente disponibles.

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

10 Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases convencionales para supositorios tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

15 Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de actuación prolongada se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados apenas solubles, por ejemplo como una sal apenas soluble.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase de gel. Los ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles.

20 Las formas de preparación farmacéutica líquidas o sólidas adecuadas son, por ejemplo, disoluciones acuosas o salinas para inhalación, microencapsuladas, encocleadas, revestidas sobre partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, peletes para implantación en la piel, o secas sobre un objeto afilado para ser raspado en la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación se usan habitualmente como se describe anteriormente excipientes y aditivos y/o auxiliares tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes de hinchamiento, lubricantes, saborizantes, edulcorantes o solubilizantes. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para uso en una variedad de sistemas de suministro de fármacos. Para un breve repaso de métodos para el suministro de fármacos, véase Langer, Science 249:1527-1533, 1990.

30 El agente o agentes terapéuticos, incluyendo específicamente pero sin limitarse a gelsolina, se pueden proporcionar en partículas. Partículas, como se usa aquí, significa nano o micropartículas (o en algunos casos más grandes) que pueden consistir en todo o en parte de gelsolina u otro agente o agentes terapéuticos como se describe aquí. Las partículas pueden contener el agente o agentes terapéuticos en un núcleo rodeado por un revestimiento, incluyendo, pero sin limitarse a, un revestimiento entérico. El agente o agentes terapéuticos también se pueden dispersar a lo largo de las partículas. El agente o agentes terapéuticos también se pueden adsorber en las partículas. Las partículas pueden ser de una cinética de liberación de cualquier orden, incluyendo liberación de orden cero, liberación de primer orden, liberación de segundo orden, liberación retrasada, liberación sostenida, liberación inmediata, y cualquier combinación de las mismas, etc. La partícula puede incluir, además del agente o agentes terapéuticos, cualquiera de aquellos materiales usados habitualmente en la técnica de farmacia y medicina, incluyendo, pero sin limitarse a, material erosionable, no erosionable, biodegradable, o no biodegradable, o sus combinaciones. Las partículas pueden ser microcápsulas que contienen la gelsolina en una disolución o en un estado semisólido. Las partículas pueden ser virtualmente de cualquier forma.

45 En la fabricación de partículas para suministrar el agente o agentes terapéuticos se pueden usar materiales poliméricos tanto no biodegradables como biodegradables. Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona basándose en el período de tiempo a lo largo del cual se desea la liberación. Los polímeros bioadhesivos de particular interés incluyen hidrogeles bioerosionables descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak y J.A. Hubell en *Macromolecules*, (1993) 26:581-587. Estos incluyen ácidos polihalúricos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, poliácido acrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo).

55 El agente o agentes terapéuticos pueden estar contenidos en sistemas de liberación controlada. La expresión "liberación controlada" pretende referirse a cualquier formulación que contiene un fármaco en la cual se controla la manera y perfil de liberación del fármaco desde la formulación. Esto se refiere a formulaciones de liberación inmediata así como no inmediata, incluyendo la formulación de liberación no inmediata, pero sin limitarse a, formulaciones de liberación sostenida y de liberación retrasada. La expresión "liberación sostenida" (también denominada "liberación extendida") se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona liberación gradual de un fármaco durante un período de tiempo prolongado, y que preferiblemente, aunque no necesariamente, da como resultado niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco

durante un período de tiempo prolongado. La expresión “liberación retrasada” se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco en la que hay un retraso de tiempo entre la administración de la formulación y la liberación del fármaco a partir de ella. “Liberación retrasada” puede implicar o no la liberación gradual del fármaco durante un período de tiempo prolongado, y de este modo puede ser o no una “liberación sostenida”.

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

Para la administración tópica al ojo, membranas nasales, membranas mucosas, o a la piel, la gelsolina se puede formular como ungüentos, cremas o lociones, o como un parche transdérmico o inserto intraocular o iontoforesis. Por ejemplo, los ungüentos y cremas se pueden formular con una base acuosa u oleosa sola o junto con agentes espesantes y/o gelantes adecuados. Las lociones se pueden formular con una base acuosa u oleosa, e incluyen además, típicamente, uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, o agentes colorantes. (Véase, por ejemplo, el documento U.S. 5.563.153, titulado “Gel Anestésico Tópico Estéril”, expedido a Mueller, D., et al., para una descripción de un vehículo tópico a base de gel farmacéuticamente aceptable).

En general, la gelsolina o la molécula de unión a actina se presenta en una formulación tópica en una cantidad que oscila de alrededor de 0,01% a alrededor de 30,0% en peso, basado en el peso total de la composición. Preferiblemente, la gelsolina está presente en una cantidad que oscila de alrededor de 0,5 a alrededor de 30% en peso, y, muy preferiblemente, la gelsolina está presente en una cantidad que oscila de alrededor de 0,5 a alrededor de 10% en peso. En una realización, las composiciones comprenden una mezcla de gel para maximizar el contacto con la superficie del dolor localizado y minimizar el volumen y la dosis necesaria para aliviar el dolor localizado. Un vehículo tópico farmacéuticamente aceptable preferido es GELFOAM® (un gel a base de metilcelulosa fabricado por Upjohn Corporation). Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen iontoforesis para el suministro transdérmico de fármacos.

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

La presente divulgación se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo, que de ningún modo se debe de interpretar como limitante adicionalmente.

EJEMPLO

Resumen:

La mortalidad acelerada en sustitución renal (ArMORR) es un estudio de cohorte prospectivo nacionalmente representativo de pacientes que inició la hemodiálisis crónica en los centros de diálisis de los Estados Unidos de América operados por Fresenius Medical Care, Fresenius Medical Care, North America (FMC, Lexington, Massachusetts). La información recogida incluyó de forma prospectiva demografía de pacientes, comorbilidades al inicio de la hemodiálisis, ensayos de laboratorio (llevados a cabo por Spectra East, Rockland, NJ), terapias intravenosas, y resultados clínicos. Los datos se introdujeron en una base de datos central por los médicos y enfermeros en el centro de salud, con auditoría de garantía de calidad/control de calidad rigurosa encargada por FMC^{22, 23}. Este estudio fue aprobado por el Institutional Review Board del Hospital General de Massachusetts.

Población de estudio:

Entre el 1 de julio de 2004 y el 30 de junio de 2005, se enrolaron prospectivamente en ArMORR 10.044 pacientes con hemodiálisis incidente que representan 1056 unidades de diálisis de los Estados Unidos de América. Todos los pacientes con hemodiálisis incidente que iniciaron la terapia en una unidad de Fresenius radicada en los Estados Unidos de América fueron aptos para la inclusión en la cohorte de ArMORR. En el estudio se incluyó una muestra aleatoria de 150 pacientes con una muestra de sangre de valor inicial (recogida en 14 días desde el inicio de la hemodiálisis crónica) disponible para gelsolina y actina plasmáticas, y proteína reactiva C de sensibilidad elevada sérica. De estos 150 sujetos, 41 (27%) murieron en 365 días desde el inicio de la diálisis, y 109 sobrevivieron

durante al menos 365 días. Para estudiar de forma eficiente los efectos de los niveles de pGSN sobre la supervivencia, también se llevó a cabo un estudio de casos y controles anidados que define casos como sujetos con ESRD que murieron dentro de 365 días de iniciar la diálisis, y los controles son aquellos que sobrevivieron durante al menos 365 días. Para incrementar la potencia, se añadieron a la muestra original los siguientes 75 participantes de ArMORR consecutivos que murieron dentro de los 365 días de iniciar la diálisis (n = 116 casos totales), para crear una muestra de casos y controles de relación ~ 1:1 con un total de 225 sujetos. Se pretendió incluir un número similar de muertes por CVD y muertes por infecciones (definidas más abajo). Subsiguientemente, se encontró que 2 pacientes no tienen suficiente muestra de sangre, y por tanto se excluyeron, dejando un total de 223 sujetos para el estudio. Con una muestra de casos y controles de 223 y una relación de ~1:1, se tuvo una potencia > 80% para detectar una relación de momios de al menos 2 entre pacientes con deficiencia de pGSN (por ejemplo, categoría más baja si se examina en terciles) en comparación con aquellos con mayores niveles.

Comprobación de exposiciones y resultados:

La exposición primaria fue los niveles de pGSN de valor inicial, y el resultado primario fue la mortalidad a un año global. pGSN se examinó como una variable continua y binomial (basado en los niveles de la mediana en el azar), y se examinó pGSN en análisis terciles. Además de la mortalidad global, también se definieron los resultados con causas cardiovasculares (por ejemplo, murieron de enfermedades del sistema circulatorio, ICD-9 390-459,9; enfermedades hipertensivas, 401-405; enfermedad cardíaca isquémica, 410-414; infarto agudo del miocardio, 410; y enfermedad cerebrovascular, 430-438) e infecciosas de mortalidad (por ejemplo, neumonías bacterianas, fúngicas, y virales ICD-9 480,0-487,8; enfisema, 510,0; absceso pulmonar, 513,0; septicemia, septicemia grave, y choque séptico, 038, 995-996, 785) dentro del año de iniciar HD crónica. La muerte se confirmó mediante descarga de informes de diagnóstico de los centros de diálisis individuales.

La covariable primaria de interés fue los niveles de actina en plasma que se semicuantificaron (véase más abajo). Otras covariables incluyeron la edad, raza, sexo, índice de masa corporal, causa asignada de insuficiencia renal (por ejemplo, diabetes, hipertensión, glomerulonefritis, enfermedad renal policística, u otra), tensión arterial, índice de masa corporal, acceso vascular al inicio (fístula arteriovenosa, injerto o catéter veno-venoso), y dosis de diálisis (Kt/V) como hicimos en análisis previos^{22, 23}. Se analizaron los niveles sanguíneos de valor inicial de albúmina, creatinina, calcio, fósforo, y recuento plaquetario y leucocitario. También se midió el nivel sérico de CRP de sensibilidad elevada (hsCRP) en el valor inicial usando técnicas estándar (ensayo de N Latex CRP, Dade Behring).

Gelsolina plasmática (pGSN):

Se midió la pGSN para determinar su capacidad para estimular la nucleación de actina como se describe previamente²⁴. Este ensayo funcional es altamente reproducible y detecta niveles totales de pGSN independientemente de si está complejada con actina o con otros ligandos de pGSN. De forma breve, se diluyó plasma de valor inicial 1:5 veces en KCl 0,1 M, MgCl₂ 0,2 mM, EGTA 1 mM, ATP 0,5 mM, β-mercaptoetanol 0,5 mM, y tampón de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 (Tampón B). De la muestra plasmática diluida, se añadieron 5 μl a 280 μl de Tampón B suplementado con CaCl₂ 1,5 mM y falacidina 0,4 μM en tubos de cultivo de borosilicato 6 x 50 mm. La reacción de polimerización de actina se inició añadiendo 15 μl de actina marcada con pireno²⁵ 20 μM en ATP 0,5 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, CaCl₂ 0,2 mM, tampón de Tris-HCl 0,2 mM, pH 7,4 (Tampón A). La polimerización se monitorizó durante 200 segundos en un espectrofluorímetro a longitudes de onda de excitación y de emisión de 366 y 386 nm respectivamente. Las concentraciones de pGSN se estimaron a partir de una curva patrón usando pGSN humana recombinante purificada sintetizada en *E. coli*. Todas las medidas se llevaron a cabo sin que el técnico de laboratorio supiera los resultados.

Detectando actina circulante:

El plasma se diluyó 1:10 veces en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se analizó mediante un sistema de gel al 8% *E-PAGE 48* según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada muestra se calentó a 70°C durante 10 minutos en tampón de muestras que contiene β-mercaptoetanol antes de cargarla sobre gel *E-PAGE 48*, y después se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana en leche deshidratada desnatada al 5% en disolución salina tamponada con Tris (TBS) con 0,05% de Tween 20, se añadieron anticuerpos primarios anti-β-actina (AC-15, Sigma, St. Louis, MO) a una dilución 1:2000 y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Los anticuerpos primarios unidos se sondaron con anti-IgG de conejo enlazados a HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a una dilución de 1:2000. La quimioluminiscencia de HRP se desarrolló con Super Signal West Pico Kit (Pierce, Rockford, IL). La presencia de actina se definió como la aparición sobre las transferencias de bandas discretas que coemigran con actina de músculo esquelético de conejo purificada (Cytoskeleton, Denver, CO). La especificidad de la actina sobre las transferencias Western se confirmó sometiendo a espectrometría de masas 10 muestras seleccionadas al azar (Beth Israel Deaconess Medical Center Mass Spectrometry Core Facility). Todas las medidas se llevaron a cabo sin que el técnico de laboratorio conociese los resultados.

Análisis estadísticos:

Se usaron las pruebas de la *t* de dos muestras y la prueba exacta de Fisher para comparar características

demográficas y de laboratorio y pGSN y niveles y la presencia de actina al comienzo de la diálisis entre los pacientes que murieron y aquellos que no lo hicieron. Para examinar si los ensayos de laboratorio habituales estaban asociados con los niveles de pGSN, se usaron los coeficientes de correlación de Spearman. Se usaron modelos de regresión lineal para examinar relaciones independientes entre pGSN y otras covariables. El análisis univariable de la supervivencia se llevó a cabo en la toma de muestras aleatoria inicial de 150 sujetos usando las curvas de Kaplan-Meier con pruebas de log-rank después de dividir los valores iniciales de pGSN en valores binarios o terciles. El número total de sujetos censurados para la recuperación de la función renal, trasplante de riñón, o pérdida hasta el seguimiento debido a que transfirieron su cuidado a un centro no FMC fue menor que 8%.

Se usaron modelos de regresión logística multivariable para examinar la asociación independiente entre pGSN de valor inicial y las causas de todos los tipos, cardiovascular, e infecciosa de la mortalidad a un año. Se incluyeron covariables en los modelos de multivariables que se habían asociado con la mortalidad en diálisis en estudios previos^{22, 23}, y aquellas que fueron significativamente diferentes entre casos y controles en el estudio actual. También se ajustaron todos los modelos para los niveles de proteína reactiva C, dada su relación con la enfermedad vascular y con mortalidad entre pacientes sometidos a hemodiálisis⁵. Los puntos de datos en covariables individuales se perdieron en < 5% de los sujetos; para los análisis de multivariables, estas covariables se trataron como variables categóricas con una categoría adicional para los valores perdidos. De otro modo, las variables continuas se analizaron en una escala continua. Se examinó la relación entre pGSN y los resultados estratificados mediante niveles plasmáticos de actina, dada la relación biológica de estas dos medidas. Finalmente, se examinaron las interacciones de primer orden entre pGSN y las covariables (*pGSNx covariable*) en modelos de univariable y multivariable, y cuando se detectó interacción significativa ($p \leq 0,1$), se presentaron modelos estratificados. Finalmente, se llevaron a cabo análisis usando SAS 9.1 (Cary, NC), y los valores de p a dos colas < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados:

Características del valor inicial: La muestra inicial de 150 sujetos con ESRD representó 148 centros de diálisis distintos a lo largo de los Estados Unidos de América. Las características del valor inicial de estos sujetos se presentan en la Tabla 1, y se asemejan a las características del valor inicial de poblaciones más grandes de sujetos con ESRD al inicio de la hemodiálisis crónica²⁶. En la Figura 1 se muestra la distribución de los niveles de pGSN de valor inicial. Los niveles medios de pGSN fueron 140 ± 42 mg/l, y sólo 2 (1%) de los sujetos demostraron niveles de valor inicial a o por encima de 250 mg/ml, el nivel medio dado a conocer en voluntarios sanos (línea discontinua en la Figura 1 y Tabla 5)^{14, 27}. Los valores de gelsolina en plasma se correlacionan de forma inversa con la edad ($r = 0,18$, $p < 0,01$) y las medidas de valor inicial de masa muscular y nutrición, tales como niveles séricos de creatinina ($r = 0,26$, $p < 0,01$) y albúmina ($r = 0,34$, $p < 0,01$). La correlación entre pGSN y el índice de masa corporal fue 0,02 ($p > 0,05$). Cuando los niveles de valor inicial de hs-CRP se examinaron en terciles, aquellos con los niveles más bajos de hs-CRP demostraron los niveles más elevados de pGSN: tercil 1, hs-CRP < 12 mg/l, pGSN 145 ± 39 mg/l; terciles 2 y 3, hs-CRP ≥ 12 mg/l, pGSN 131 ± 53 mg/l, $P=0,048$). Los análisis de regresión lineal confirmaron que entre las variables continuas en la Tabla 1 que satisficieron un valor p umbral de 0,1, sólo la albúmina sérica se correlacionó de forma independiente con los niveles de pGSN ($p < 0,01$).

pGSN plasmática y supervivencia a un año: El nivel de la mediana de pGSN entre los 150 sujetos fue 141 mg/l (IQR 116-161 mg/l). Los análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia a 1 año según los niveles de pGSN binarios (< o ≥ 141 mg/ml) demostraron una diferencia de supervivencia significativa según los niveles de pGSN de valor inicial (Figura 2 – panel superior). De forma similar, la división de pGSN en terciles reveló una relación catalogada con los niveles de pGSN de valor inicial y con la mortalidad a un año (Figura 2 – panel inferior). El día de muerte de la mediana entre aquellos que murieron dentro de un año fue 188 días (IQR 89-297 días).

La muestra de casos y controles de 223 pacientes se utilizó subsiguientemente para examinar la supervivencia a un año. Las características de valor inicial según los resultados a un año se presentan en la Tabla 2. Aquellos que murieron dentro de un año fueron ligeramente más viejos, fue más probable que tuviesen un catéter intravenoso como su acceso vascular inicial (en comparación con fístula arterio-venosa o injerto), y tuvieron menores recuentos de seroalbúmina y mayores recuentos de leucocitos en el valor inicial. Estas diferencias del valor inicial se han dado a conocer en estudios previos de mortalidad por hemodiálisis²⁶. Los niveles medios de pGSN fueron significativamente menores en pacientes que murieron (117 ± 38 mg/l) en comparación con los supervivientes (147 ± 42 mg/l, $p < 0,001$). Los niveles de pGSN de valor inicial no difirieron entre muertes cardiovasculares ($n = 59$, 116 ± 41 mg/l) e infecciosas ($n = 55$, 117 ± 34 mg/l, $p = 0,91$).

Análisis multivariable de la mortalidad: A continuación se examinó la relación de los niveles de pGSN y la mortalidad a 1 año después de ajustar covariables importantes y factores de confusión potenciales (Tabla 3). Por cada reducción de 10 mg/l en pGSN de valor inicial, el riesgo de mortalidad subsiguiente se incrementó en 15% (95% CI, 7-23%). El riesgo entre aquellos con los niveles de valor inicial más bajos (tercil 1, < 130 mg/l) demostró el riesgo más elevado para causas de todo tipo y causas infecciosas de mortalidad a un año. Ambos hallazgos fueron significativos y demostraron una fuerte tendencia lineal. Los resultados para las causas cardiovasculares de muerte fueron menos significativos. En estos análisis, hs-CRP no se asoció significativamente con la mortalidad a un año. Además, la creatinina sérica, que fue significativa en el análisis univariable, ya no fue significativa una vez que el modelo se ajustó para pGSN.

La seroalbúmina, una medida de nutrición y masa muscular, se ha asociado fuertemente con mortalidad por ESRD²⁸. Se examinó entonces el efecto de seroalbúmina sobre los modelos multivariantes y se observó que mientras que las estimaciones de punto para cada tercil de pGSN fueron modestamente más grandes sin seroalbúmina, el nivel y la dirección de la significancia no cambió añadiendo seroalbúmina. Como alternativa, la inclusión o exclusión de pGSN dio los siguientes resultados con seroalbúmina: *excluyendo pGSN*, tercil 1 (seroalbúmina < 3,2 mg/dl), OR 3,0, 95% CI 1,1-6,4; tercil 2 (3,2-3,6 mg/dl), OR 1,1, 0,5-2,4; tercil 3 (> 3,6 mg/dl), OR 1,0 (ref); *incluyendo pGSN*, tercil 1, OR 2,0, 95% CI 0,8-4,9; tercil 2, OR 1,0, 0,5-2,4; tercil 3, OR 1,0 (ref). Cuando la seroalbúmina se utilizó como modelo como una variable continua, siguió siendo significativa incluso después del ajuste para pGSN (*excluyendo pGSN*, OR 0,32 para cada incremento de 1 mg/dl de seroalbúmina, 95% CI 0,15-0,67; *incluyendo pGSN*, OR 0,39, 95% CI 0,18-0,83). Por lo tanto, la adición de pGSN a los modelos atenuó pero no extinguió la asociación entre seroalbúmina y la mortalidad.

Actina circulante, pGSN, y mortalidad: Se usó transferencia Western para detectar actina plasmática. Aunque los polipéptidos de actina fueron claramente visibles como bandas discretas en las transferencias, y estas bandas se verificaron como actina auténtica mediante espectrometría de masas, la presencia de tinción de fondo no específica debido a concentraciones de proteína plasmática elevadas y la afinidad relativamente baja de anticuerpos anti-actina excluyeron la cuantificación detallada de la proteína actina en las muestras. Sesenta y nueve por ciento de pacientes tuvieron actina circulante en el valor inicial, y los pacientes con insuficiencia renal diabética tuvieron más probabilidad de tener actina circulante (85%) que los pacientes con otras causas de insuficiencia renal (59%, $P < 0,001$). En comparación con aquellos sin actina, los niveles de pGSN fueron menores en pacientes con actina (141 ± 36 mg/l frente a 127 ± 45 mg/l, respectivamente, $P = 0,02$) (Figura 3), que fue consistente con los resultados previos en muestras de septicemia¹⁰.

Por lo tanto se examinó la relación de actina plasmática de valor inicial (presencia frente a ausencia) y la mortalidad a 1 año. En el análisis univariante, la presencia de actina confirió un incremento de 3,5 veces (95% CI 1,9-6,4) en el riesgo de muerte a un año. Esta relación persistió en análisis multivariantes (OR 4,6, 95% CI 2,0-10,5). La presencia de insuficiencia renal diabética, que se asoció significativamente con mortalidad prematura en análisis univariantes (OR 1,8, 95% CI 1,1-3,0), se hizo no significativa después de ajustar para la actina circulante (OR 1,3, 95% CI 0,7-2,3). Dado que pGSN se une a actina liberada por daño tisular y puede abolir la lesión inducida por actina^{14, 20, 27, 42}, se teoriza que pGSN baja y actina elevada incrementarían el riesgo de resultados adversos.

A continuación se examinó el riesgo de mortalidad a un año según los niveles de pGSN y la presencia o ausencia de actina (Figura 4). En estos análisis, pGSN se dividió en una variable binomial como antes. Estos resultados sugirieron que los parámetros combinados de pGSN baja y actina detectable estaban potencialmente asociados de forma sinérgica en lugar de aditivamente con riesgo de muerte.

Catéter veno-venoso y mortalidad: Se buscaron modificaciones de efecto adicionales incluyendo términos de interacción (por ejemplo, *pGSNx covariable*) en modelos multivariantes con covariables de interés. La única interacción adicional sugerida fue el tipo de acceso vascular ($P = 0,04$). Aunque el acceso vascular mediante catéter veno-venoso se asocia con un mayor riesgo de mortalidad prematura²⁹, el descifrado de aquellos más susceptibles a la muerte ha sido un reto. Los pacientes que inician hemodiálisis con un catéter (129 ± 49 mg/l) o con una fistula arterio-venosa o injerto (136 ± 32 mg/l, $P = 0,24$) no difieren en el valor inicial en los niveles de pGSN, ni en la frecuencia de actina circulante (71% frente a 68%, respectivamente, $P = 0,67$). No obstante, un catéter veno-venoso parece que influye sobre el riesgo de mortalidad a un año (Tabla 4). Entre los pacientes con un catéter veno-venoso, aquellos con pGSN baja y actina circulante detectable tuvieron un marcado incremento en la mortalidad global en comparación con aquellos con pGSN elevada y sin actina detectable (OR 25,9, 95% CI 4,3 - 157,0).

pGSN, actina circulante, y enfermedad renal crónica:

Los niveles de pGSN se correlacionaron directamente con la velocidad de filtración glomerular estimada ($r = 0,39$, $P = 0,003$) en sujetos con enfermedad renal crónica no sometidos a diálisis (Figura 5). Los hombres (153 ± 43 mg/l) tendieron a tener mayores niveles de pGSN en comparación con las mujeres (136 ± 52 mg/l, $p = 0,09$). Los niveles en las etapas tardías de enfermedad renal (por ejemplo, etapas 3 y 4) fueron comparables a los encontrados al inicio de la hemodiálisis crónica. Sin embargo, estos niveles fueron significativamente menores que en muestras obtenidas de las etapas 1 y 2 ($P = 0,002$) (Figura 6). La frecuencia de la actina circulante fue 11% en esta cohorte previa a la diálisis, en contraste con 69% en la cohorte sometida a diálisis ($P < 0,001$).

Discusión:

Los pacientes que inician hemodiálisis tienen niveles de pGSN reducidos hasta un promedio de 30-50% menores que los encontrados en controles sanos. pGSN disminuye con enfermedad renal progresiva, sugiriendo mecanismos aguas arriba del inicio de la diálisis crónica que dan cuenta de la reducción de pGSN. Tras el inicio de la hemodiálisis crónica, pGSN demostró una relación inversa, graduada, con resultados adversos – cuanto menor es el nivel, mayor es el riesgo de mortalidad a un año.

Se cree que el secuestro de pGSN en sitios de lesión o aclaramiento con actina circulante puede ser la causa principal de concentraciones disminuidas de pGSN tras los ataques agudos. Estos factores también pueden

contribuir a pGSN disminuida en ESRD, pero, además, la alteración de la síntesis puede ser importante. Por ejemplo, la uremia se caracteriza por una mayor actividad de la ruta de ubiquitina-proteasoma⁴³, y recientemente la actividad incrementada de esta ruta se ha relacionado con una mayor degradación de cGSN, la isoforma intracelular de pGSN⁴⁴. Además, puesto que el peso molecular de pGSN es ~ 93 kDa, es improbable que pGSN sea aclarada mediante hemodiálisis. Como se resalta en la Figura 7, la combinación de una menor producción y un mayor consumo debido a lesión tisular continuada en pacientes sometidos a diálisis es alguna de las posibles etiologías de los menores niveles circulantes de pGSN en sujetos con insuficiencia renal de etapa terminal. La síntesis de pGSN es constitutiva y no aumenta como los agentes reaccionantes de fase aguda en inflamación³⁵. Puesto que el músculo es la fuente principal de pGSN, las correlaciones con seroalbúmina y creatinina sugieren que el desgaste energético proteico característico de ESRD puede contribuir a la reducción de pGSN^{4, 8, 28, 36, 37, 38, 43, 45, 46}. pGSN atenúa la relación de otro modo fuerte entre creatinina y albúmina séricas y la mortalidad por hemodiálisis⁸, sugiriendo al menos un solapamiento parcial entre estos parámetros a la hora de explicar la mortalidad.

Los pacientes con mayor riesgo de muerte con los niveles más bajos de pGSN fueron aquellos con actina circulante detectable. La actina ha sido detectable en plasma de pacientes con lesión pulmonar o hepática aguda¹⁴, pacientes con trauma severo, e incluso en donantes de sangre sanos⁴⁷. La actina circulante en alrededor de dos tercios de pacientes sometidos a hemodiálisis es consistente con lesión tisular ampliamente extendida y exceso de catabolismo proteico del músculo dado a conocer en pacientes con ESRD^{43, 48, 49, 50}. La mayoría (85%) de pacientes con insuficiencia renal diabética, un grupo con lesión de células endoteliales ampliamente extendida y tasas de mortalidad marcadamente elevadas^{1, 51, 52}, tuvieron actina circulante, y fue interesante encontrar que el ajuste para la actina circulante eliminó la relación entre el estado de diabetes y la mortalidad que se había dado a conocer previamente⁴¹. La actina circulante se ha documentado en pacientes con síndrome disneico agudo²⁰ y en modelos de animales de septicemia (Tabla 5)¹¹. En contraste con el agotamiento de pGSN, la actina circulante detectable fue mucho menos prevalente en enfermedad renal avanzada antes de la diálisis, sugiriendo que la propia diálisis, posiblemente resultante de flujos hemodinámicos agudos o bioincompatibilidades de la membrana de diálisis⁵³, puede contribuir a daño tisular que libera actina en la circulación.

El agotamiento de pGSN puede relacionar el desgaste muscular, lesión tisular, inflamación y muerte debida a sucesos cardiovasculares y septicemia en ESRD. El agotamiento de pGSN puede caracterizar de hecho a otros estados de desgaste crónicos. pGSN se une ávidamente a mediadores inflamatorios, incluyendo el factor activante de plaquetas, ácido lisofosfatídico, ácido lipoteicoico, péptido a β y endotoxina de lipopolisacárido, y disminuye los efectos de estos agonistas sobre células diana^{12, 30, 31, 32, 33}. La pérdida de acumulación de estos mediadores debido al agotamiento de pGSN podría exacerbar la enfermedad vascular y su contribución a la mortalidad. Los efectos tóxicos de la actina circulante sobre la vasculatura también pueden ser importantes^{20, 54}. La deficiencia de pGSN también puede empeorar el resultado de infección superpuesta^{10, 11, 34}. La pGSN baja y la actina circulante confirieron un riesgo marcadamente incrementado de mortalidad temprana en pacientes sometidos a catéter en comparación con los sometidos a injerto o a fístulas. La atenuación de la capacidad de pGSN para destruir biopelículas que contienen actina puede ser un mecanismo. La pGSN baja y la actina elevada predisponen a resultados adversos en pacientes sometidos a catéter^{55, 56}. Además, la actina altera la actividad de polipéptidos antimicrobianos catiónicos derivados de leucocitos, conocidos como defensinas⁴².

Tabla 1

Tabla 1. Características del Valor Inicial	N = 150	
Edad (Años)	64 ± 15	
Mujer (%)	45	
Raza (%)		
	Blanca	53
	Negra	41
	Otra	6
BMI (kg/m ²)	28 ± 19	
Diabetes Mellitus (%)	20	
Etiología de insuficiencia renal (% Diabetes)	43	
Acceso vascular (% Catéter)	57	
Presión arterial sistólica (mmHg)	145 ± 20	
Presión arterial diastólica (mmHg)	74 ± 13	

Albúmina (g/dl)	3,5 ± 0,4
Calcio (mg/dl)	8,5 ± 0,8
Fósforo (mg/dl)	4,6 ± 1,4
Creatinina (mg/dl)	6,4 ± 2,6
eKT/V	1,3 ± 0,4
Hemoglobina (g/dl)	10,0 ± 1,4
Proteína reactiva C de alta sensibilidad (mg/l)	29 ± 38
Recuento leucocitario (células/mcl)	7,5 ± 2,6
Plaquetas (células/dl)	236 ± 95

Tabla 2. Características del Valor Inicial de la Muestra de Casos y Controles *

N	Casos N=114	Controles N=109	Valor de p
Edad (Años)	67 ± 13	63 ± 15	0,02
Mujer (%)	45	45	0,99
Raza (%)			0,22
Blanca	59	47	
Negra	36	47	
Otra	5	6	
BMI (kg/m ²)	26 ± 3	27 ± 7	0,20
Diabetes Mellitus (%)	21	20	0,86
Etiología de insuficiencia renal (% Diabetes)	50	36	0,03
Acceso vascular (% Catéter)	70	46	< 0,01
Presión arterial sistólica (mmHg)	140 ± 25	145 ± 20	0,02
Presión arterial diastólica (mmHg)	71 ± 14	74 ± 12	0,05
Albúmina (g/dl)	3,2 ± 0,6	3,5 ± 0,5	<0,01
Calcio (mg/dl)	8,3 ± 0,7	8,4 ± 0,8	0,20
Fósforo (mg/dl)	4,4 ± 1,4	4,6 ± 1,3	0,05
Creatinina (mg/dl)	5,5 ± 2,6	6,5 ± 2,6	0,01
eKt/V	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,4	0,56
Hemoglobina (g/dl)	10,1 ± 1,3	10,0 ± 1,4	0,40
Proteína reactiva C de alta sensibilidad (mg/l) **	20 (7-47)	13 (3-24)	0,20
Recuento leucocitario (células/mcl)	8,7 ± 4,1	7,5 ± 2,6	0,01
Plaquetas (células/dl)	210 ± 84	236 ± 95	0,08

* Los valores son frecuencias o medias ± desviaciones estándar.

** Proteína reactiva C de alta sensibilidad (hs-CRP) dada como valores de la mediana e intervalo de intercuartiles (IQR, 25%-75%).

Tabla 3.

Riesgo multivariante (relación de momios) de la mortalidad a un año según los terciles de pGSN y Todas las Causas, CVD, y Causas Infecciosas de muerte a un año.

Riesgo de Muerte por Todas la Causas		Relación de momios *	95% CI	Valor de P
Terciles de pGSN				
Tercil 1	≥ 150 mg/l	1,0	(ref,)	
Tercil 2	130-149 mg/l	2,1	0,7-6,7	0,19
Tercil 3	< 130 mg/l	3,4	1,2-9,4	0,01
				P para la tendencia = 0,01
Riesgo de Muerte por CVD				
Tercil 1	≥ 150 mg/l	1,0	(ref)	
Tercil 2	130-149 mg/l	1,4	0,3-5,2	0,65
Tercil 3	< 130 mg/l	2,4	0,6-8,2	0,10
				P para la tendencia = 0,05
Riesgo de Muertes Infecciosas				
Tercil 1	≥ 150 mg/l	1,0	(ref,)	
Tercil 2	130-149 mg/l	3,2	0,7-15,5	0,13
Tercil 3	< 130 mg/l	5,4	1,3-22,5	0,03
				P para la tendencia = 0,01

* Modelo ajustado para edad, género, raza, BMI, causa de ESRD, tensión arterial, acceso vascular, en el valor inicial, y seroalbúmina, calcio, fósforo, creatinina, WBC, recuento plaquetario, y proteína reactiva C de alta sensibilidad, en el valor inicial.

5 Tabla 4. Riesgo multivariable (relación de momios) de la mortalidad a un año según el estado de catéter veno-venoso en el valor inicial, y el estado de pGSN y actina*. pGSN de valor inicial elevada (pGSN ≥ 141 mg/l, + pGSN), pGSN de valor inicial baja (pGSN < 141 mg/l, - pGSN); Actina no detectable (- Actina); Actina detectable (+ Actina).

	Casos	Controles	Relación de momios *	95% CI
Catéter no veno-venoso				
<i>(n=93)</i>				
+ pGSN, - Actina	4	14	1,0	(ref.)
- pGSN, - Actina	3	8	0,3	0,1 - 7,2
+ pGSN, + Actina	5	16	1,0	0,2 - 7,9

- pGSN, + Actina 22 21 2,4 0,5 - 12,1

Catéter veno-venoso

(n=130)

+ pGSN, - Actina	4	12	1,0	(ref.)
- pGSN, - Actina	11	12	3,9	0,6 - 26,4
+ pGSN, + Actina	15	14	11,1	1,8 - 69,5
- pGSN, + Actina	50	12	25,9	4,3 - 157,0

* Modelo ajustado para edad, género, raza, índice de masas corporal, causa de ESRD, tensión arterial, acceso vascular, en el valor inicial, y seroalbúmina, calcio, fósforo, creatinina, recuento leucocitario, recuento plaquetario, y proteína reactiva C de alta sensibilidad, en el valor inicial.

Tabla 5. Niveles de gelsolina plasmática (mg/l) en estados clínicos

Fuente	N	Media (intervalo/SD)	Mediana	Metodología
<u>Normal</u>				
Dahl, et al. (1999) ⁵⁸	25	207 (151-621)	200	Nefelometría
DiNubile, et al. (1998) ⁵⁹	11	440 ± 150		Transferencia Western
Ito, et al. (1992) ⁶⁰	43	226 ± 52	220	ELISA
Smith, et al. (1987) ⁶¹	56	240 ± 50	250	ELISA, nucleación
Mounzer, et al. (1999) ¹⁸	11	517 ± 134	500	Transferencia Western
Smith, et al. (1988) ⁶²				
Niños gambianos sanos	11	367 ± 67		Nucleación
Convalescientes de malaria	11	263 ± 160	240	Nucleación
Suhler, et al. (1997) ¹⁶	25	260 ± 20		Transferencia Western
<u>Lesión pulmonar aguda</u>				
Lind, et al. (1988) ^{63†}	20	89 ± 33	86	Nucleación
<u>Necrosis hepática fulminante</u>				
Suhler, et al. (1997) ¹⁶	18	100 ± 15		Transferencia Western
<u>Hepatitis aguda</u>				

Ito, et al. (1992) ^{60†}	14	80 ± 40	80	ELISA
<u>Transplante de células madre post-hematopoyéticas con muerte por neumonía intersticial</u>				
DiNubile, et al. (1998) ⁵⁹	9	100 ± 50		Transferencia Western
<u>Infarto agudo de miocardio</u>				
Suhler, et al. (1997) ¹⁶	10	180 ± 20		Transferencia Western
<u>Rabdomiolisis</u>				
Suhler, et al. (1997) ¹⁶	12	170 ± 20		Transferencia Western
Löfberg, et al. (1998) ⁶⁴	5	116 ± 22	100	RIA
<u>Neumonía bacteriana</u>				
Smith, et al. (1988) ⁶²	8	116 ± 89		Nucleación
Lind, et al. (1988) ⁶³	6	117 ± 21	115	Nucleación
<u>Septicemia</u>				
Suhler, et al. (1997) ¹⁶	6	130 ± 20		
<u>Malaria aguda por falciparum</u>				
Smith, et al. (1988) ⁶²	18	126 ± 45		Nucleación
<u>Trauma importante, cirugía, quemaduras</u>				
Lee, et al. (2006) ¹¹				
Global	31	73	70	Nucleación
Supervivientes de UCI	28	81(20-181)		Nucleación
No supervivientes de UCI	3	26 (25-60)		Nucleación
Dahl, et al. (1999) ⁵⁸	23	51 (7-967)	55	Nefelometría
Mounzer, et al. (1999) ¹⁸	64	339 ± 82	290	Transferencia Western

Todos los valores están en mg/l. Excepto que se señale de otro modo, no se llevaron a cabo efectos para detector actina.

† Actina detectada en plasma.

‡ Actin no detectada en plasma.

Referencias:

1. U.S. Renal Data System, USRDS 2006 Annual Data Report. Bethesda: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2006.
- 5 2. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998;32(5 Suppl 3):S112-9.
3. Meyer TW, Hostetter TH. Uremia. *N Engl J Med* 2007;357(13):1316-25.
4. Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Block G, Humphreys MH. A malnutrition-inflammation score is correlated with morbidity and mortality in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001;38(6):1251-63.
- 10 5. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999;55(2):648-58.
6. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Traditional and emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl* 2003(85):S105-10.
7. Johansen KL, Young B, Kaysen GA, Chertow GM. Association of body size with outcomes among patients beginning dialysis. *Am J Clin Nutr* 2004;80(2):324-32.
- 15 8. Fouque D, Kalantar-Zadeh K, Kopple J, et al. A proposed nomenclature and diagnostic criteria for protein-energy wasting in acute and chronic kidney disease. *Kidney Int* 2007.
9. Christofidou-Solomidou M, Scherpereel A, Solomides CC, et al. Recombinant plasma gelsolin diminishes the acute inflammatory response to hyperoxia in mice. *J Investig Med* 2002;50(1):54-60.
- 20 10. Lee PS, Waxman AB, Cotich KL, Chung SW, Perrella MA, Stossel TP. Plasma gelsolin is a marker and therapeutic agent in animal sepsis. *Crit Care Med* 2007;35(3):849-55.
11. Lee PS, Drager LR, Stossel TP, Moore FD, Rogers SO. Relationship of plasma gelsolin levels to outcomes in critically ill surgical patients. *Annals of surgery* 2006;243(3):399-403.
12. Osborn TM, Dahlgren C, Hartwig JH, Stossel TP. Modifications of cellular responses to lysophosphatidic acid and platelet-activating factor by plasma gelsolin. *American journal of physiology* 2007;292(4):C 1323-30.
- 25 13. Kwiatkowski DJ, Stossel TP, Orkin SH, Mole JE, Colten HR, Yin HL. Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature* 1986;323(6087):455-8.
14. Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N Engl J Med* 1992;326(20):1335-41.
- 30 15. Kwiatkowski DJ. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Current opinion in cell biology* 1999;11(1):103-8.
16. Suhler E, Lin W, Yin HL, Lee WM. Decreased plasma gelsolin concentrations in acute liver failure, myocardial infarction, septic shock, and myonecrosis. *Crit Care Med* 1997;25(4):594-8.
17. Jordan JR, Moore EE, Damle SS, et al. Gelsolin is depleted in post-shock mesenteric lymph. *The Journal of surgical research* 2007;143(1):130-5.
- 35 18. Mounzer KC, Moncure M, Smith YR, Dinubile MJ. Relationship of admission plasma gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5 Pt 1):1673-81.
19. Lind SE, Smith DB, Janmey PA, Stossel TP. Role of plasma gelsolin and the vitamin D-binding protein in clearing actin from the circulation. *J Clin Invest* 1986;78(3):736-42.
- 40 20. Erukhimov JA, Tang ZL, Johnson BA, et al. Actin-containing sera from patients with adult respiratory distress syndrome are toxic to sheep pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(1):288-94.
21. Mintzer E, Sargsyan H, Bittman R. Lysophosphatidic acid and lipopolysaccharide bind to the PIP2-binding domain of gelsolin. *Biochimica et biophysica acta* 2006;1758(1):85-9.
22. Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med* 2003;349(5):446-56.
- 45 23. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, et al. Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(4):1115-25.

24. Keltai M, Tonelli M, Mann JF, et al. Renal function and outcomes in acute coronary syndrome: impact of clopidogrel. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14(2):312-8.
25. Kouyama T, Mihashi K. Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *European journal of biochemistry / FEBS* 1981;114(1):33-8.
26. Wolf M, Shah A, Gutierrez O, et al. Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int* 2007;72(8):1004-13.
27. Janmey PA, Lind SE. Capacity of human serum to depolymerize actin filaments. *Blood* 1987;70(2):524-30.
28. Owen WF, Jr., Lew NL, Liu Y, Lowrie EG, Lazarus JM. The urea reduction ratio and serum albumin concentration as predictors of mortality in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 1993;329(14):1001-6.
29. Powe NR, Jaar B, Furth SL, Hermann J, Briggs W. Septicemia in dialysis patients: incidence, risk factors, and prognosis. *Kidney Int* 1999;55(3):1081-90.
30. Chauhan VP, Ray I, Chauhan A, Wisniewski HM. Binding of gelsolin, a secretory protein, to amyloid beta-protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258(2):241-6.
31. Goetzl EJ, Lee H, Azuma T, Stossel TP, Turck CW, Karliner JS. Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 2000;275(19):14573-8.
32. Yamamoto H, Ito H, Nakamura H, et al. Human plasma gelsolin binds adenosine triphosphate. *Journal of biochemistry* 1990;108(4):505-6.
33. Lind SE, Janmey PA. Human plasma gelsolin binds to fibronectin. *J Biol Chem* 1984;259(21):13262-6.
34. DiNubile MJ, Stossel TP, Ljunghusen OC, Ferrara JL, Antin JH. Prognostic implications of declining plasma gelsolin levels after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002;100(13):4367-71.
35. Rothenbach PA, Dahl B, Schwartz JJ, et al. Recombinant plasma gelsolin infusion attenuates burn-induced pulmonary microvascular dysfunction. *J Appl Physiol* 2004;96(1):25-31.
36. McIntyre CW, Selby NM, Sigrist M, Pearce LE, Mercer TH, Naish PF. Patients receiving maintenance dialysis have more severe functionally significant skeletal muscle wasting than patients with dialysis-independent chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(8):2210-6.
37. Kaysen GA, Greene T, Daugirdas JT, et al. Longitudinal and cross-sectional effects of C-reactive protein, equilibrated normalized protein catabolic rate, and serum bicarbonate on creatinine and albumin levels in dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003;42(6):1200-11.
38. Kalantar-Zadeh K, McAllister CJ, Lehn RS, Lee GH, Nissenson AR, Kopple JD. Effect of malnutrition-inflammation complex syndrome on EPO hyporesponsiveness in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003;42(4):761-73.
39. Besarab A, Bolton WK, Browne JK, et al. The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Engl J Med* 1998;339(9):584-90.
40. Eknoyan G, Beck GJ, Cheung AK, et al. Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 2002;347(25):2010-9.
41. Wanner C, Krane V, Marz W, et al. Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2005;353(3):238-48.
42. Weiner DJ, Bucki R, Janmey PA. The antimicrobial activity of the cathelicidin LL37 is inhibited by F-actin bundles and restored by gelsolin. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2003;28(6):738-45.
43. Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med* 1996;335(25):1897-905.
44. Ni XG, Zhou L, Wang GQ, et al. The ubiquitin-proteasome pathway mediates gelsolin protein downregulation in pancreatic cancer. *Mol Med* 2008;14(9-10):582-9.
45. Beddhu S, Cheung AK, Larive B, et al. Inflammation and inverse associations of body mass index and serum creatinine with mortality in hemodialysis patients. *J Ren Nutr* 2007;17(6):372-80.
46. Semba RD, Ricks MO, Ferrucci L, Xue QL, Guralnik JM, Fried LP. Low serum selenium is associated with anemia among older adults in the United States. *Eur J Clin Nutr* 2007.

47. Mejean C, Roustan C, Benyamin Y. Anti-actin antibodies. Detection and quantitation of total and skeletal muscle actin in human plasma using a competitive ELISA. *Journal of immunological methods* 1987;99(1):129-35.
48. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002;62(5): 1524-38.
- 5 49. Mezzano D, Pais EO, Aranda E, et al. Inflammation, not hyperhomocysteinemia, is related to oxidative stress and hemostatic and endothelial dysfunction in uremia. *Kidney Int* 2001;60(5):1844-50.
50. Mezzano D, Tagle R, Pais E, et al. Endothelial cell markers in chronic uremia: relationship with hemostatic defects and severity of renal failure. *Thromb Res* 1997;88(6):465-72.
- 10 51. Jensen T, Bjerre-Knudsen J, Feldt-Rasmussen B, Deckert T. Features of endothelial dysfunction in early diabetic nephropathy. *Lancet* 1989;1(8636):461-3.
52. Hsueh WA, Anderson PW. Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes mellitus. *Hypertension* 1992;20(2):253-63.
53. Lazarus JM, Owen WF. Role of bioincompatibility in dialysis morbidity and mortality. *Am J Kidney Dis* 1994;24(6):1019-32.
- 15 54. Haddad JG, Harper KD, Guoth M, Pietra GG, Sanger JW. Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(4):1381-5.
55. Walker TS, Tomlin KL, Worthen GS, et al. Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infection and immunity* 2005;73(6):3693-701.
- 20 56. Trautner BW, Darouiche RO. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *American journal of infection control* 2004;32(3):177-83.
57. Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Block G, Humphreys MH. A malnutrition-inflammation score is correlated with morbidity and mortality in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001;38(6):1251-63.
58. Dahl B, Schiødt FV, Ott P, Gvozdenovic R, Yin HL, Lee WM. Plasma gelsolin is reduced in trauma patients. *Shock (Augusta, Ga)* 1999;12(2):102-4.
- 25 59. DiNubile M, Antin J, Bressler S, Stossel T, Ferrara J. Decreased gelsolin levels are associated with interstitial pneumonia after allogeneic BMT. *Blood* 1998;92(Supplement):683a.
60. Ito H, Kambe H, Kimura Y, et al. Depression of plasma gelsolin level during acute liver injury. *Gastroenterology* 1992;102(5):1686-92.
- 30 61. Smith DB, Janmey PA, Herbert TJ, Lind SE. Quantitative measurement of plasma gelsolin and its incorporation into fibrin clots. *J Lab Clin Med* 1987;110(2):189-95.
62. Smith DB, Janmey PA, Sherwood JA, Howard RJ, Lind SE. Decreased plasma gelsolin levels in patients with *Plasmodium falciparum* malaria: a consequence of hemolysis? *Blood* 1988;72(1):214-8.
- 35 63. Lind SE, Smith DB, Janmey PA, Stossel TP. Depression of gelsolin levels and detection of gelsolin-actin complexes in plasma of patients with acute lung injury. *The American review of respiratory disease* 1988;138(2):429-34.
64. Lofberg M, Paunio T, Tahtela R, Kiuru S, Somer H. Serum gelsolin and rhabdomyolysis. *Journal of the neurological sciences* 1998;157(2):187-90.

REIVINDICACIONES

1. Un método para caracterizar un riesgo de mortalidad en un sujeto con insuficiencia renal crónica, donde el método comprende
 medir un nivel de gelsolina en una muestra de sangre de un sujeto;
- 5 comparar el nivel de gelsolina del sujeto con un valor predeterminado, y
 caracterizar el riesgo de mortalidad del sujeto basándose en el nivel de gelsolina en comparación con el nivel predeterminado, donde el nivel de gelsolina por debajo del valor predeterminado indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de mortalidad.
2. El método de la reivindicación 1, donde la mortalidad está provocada por una infección.
- 10 3. El método de la reivindicación 2, donde la infección está provocada por una bacteria grampositiva, una bacteria gramnegativa, un bacilo resistente a ácidos, una espiroqueta, un actinomiceto, un virus, un hongo, un parásito, una especie de *Ureoplasma*, una especie de *Mycoplasma*, una especie de *Chlamydia* o una especie de *Pneumocystis*.
4. El método de la reivindicación 1, donde la mortalidad está provocada por un evento cardiovascular.
- 15 5. Un método para caracterizar un riesgo de mortalidad en un sujeto con insuficiencia renal crónica, donde el método comprende:
 medir un nivel de actina en una muestra de sangre de un sujeto;
 comparar el nivel de actina del sujeto con un valor predeterminado, y
 caracterizar el riesgo de mortalidad del sujeto basándose en el nivel de actina en comparación con el nivel predeterminado, donde el nivel de actina por encima del valor predeterminado indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de mortalidad.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, donde el valor predeterminado es alrededor de 0.01 µg/ml o alrededor de 0.1 µg/ml de plasma.
7. El método de la reivindicación 5, donde la mortalidad está provocada por una infección.
- 25 8. El método de la reivindicación 7, donde la infección está provocada por una bacteria grampositiva, una bacteria gramnegativa, un bacilo resistente a ácidos, una espiroqueta, un actinomiceto, un virus, un hongo, un parásito, una especie de *Ureoplasma*, una especie de *Mycoplasma*, una especie de *Chlamydia* o una especie de *Pneumocystis*.
9. El método de la reivindicación 5, donde la mortalidad está provocada por un evento cardiovascular.
10. Un método para caracterizar un riesgo de mortalidad en un sujeto con insuficiencia renal crónica, donde el método comprende
- 30 medir un nivel de gelsolina en una muestra de sangre de un sujeto
 comparar el nivel de gelsolina del sujeto con un primer valor predeterminado para establecer un primer valor de riesgo,
 medir el nivel de actina en una muestra de sangre de un sujeto, comparar un nivel de actina de un sujeto con un segundo valor predeterminado para establecer un segundo valor de riesgo, y
- 35 caracterizar el riesgo de mortalidad del sujeto basándose en la combinación del primer valor de riesgo y el segundo valor de riesgo, donde la combinación del primer valor de riesgo y el segundo valor de riesgo establece un tercer valor de riesgo diferente de dichos valores de riesgo primero y segundo.
11. Un método para evaluar la eficacia de una terapia para la insuficiencia renal crónica en un sujeto con insuficiencia renal crónica, donde el método comprende:
- 40 medir un nivel de gelsolina en una muestra de sangre de un sujeto
 comparar el nivel de gelsolina del sujeto con un valor predeterminado, y
 determinar si el nivel de gelsolina está en o por encima del nivel predeterminado, siendo dicha determinación indicativa de si la terapia es eficaz.
- 45 12. La gelsolina para uso en el tratamiento de un sujeto con insuficiencia renal crónica que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección, donde la gelsolina se administra a un sujeto con insuficiencia renal que necesita tal tratamiento, en una cantidad eficaz para reducir el riesgo de la infección.
13. El uso de gelsolina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la insuficiencia renal crónica en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección.

14. El método tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 10 a 11, donde el valor predeterminado de gelsolina o el primer valor predeterminado de gelsolina es alrededor de 190 ng/μl, alrededor de 150 ng/μl o alrededor de 120 ng/μl de plasma.

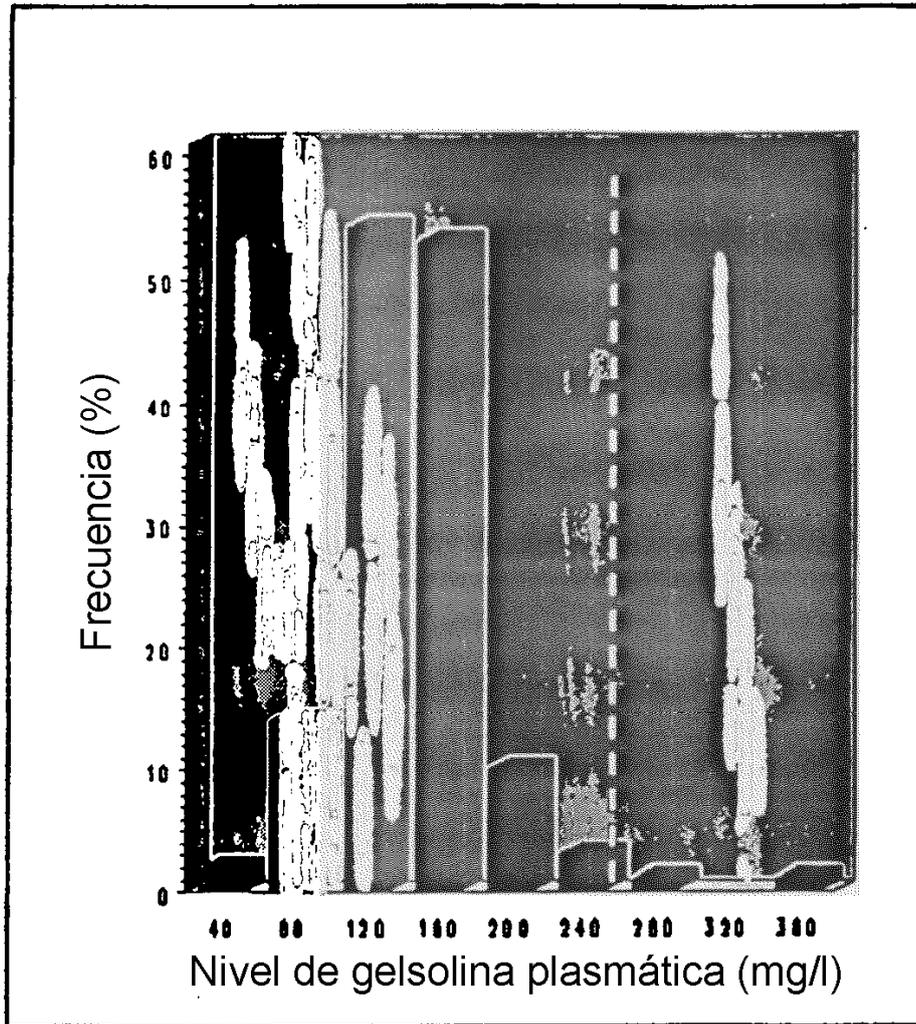


Figura 1

Distribución de los niveles de gelsolina plasmática en la toma de muestras aleatoria de 150 sujetos con ESRD indidentes procedentes de todos los Estados Unidos de América. La línea discontinua representa el nivel medio de pGSN de 250 mg/l en controles sanos.

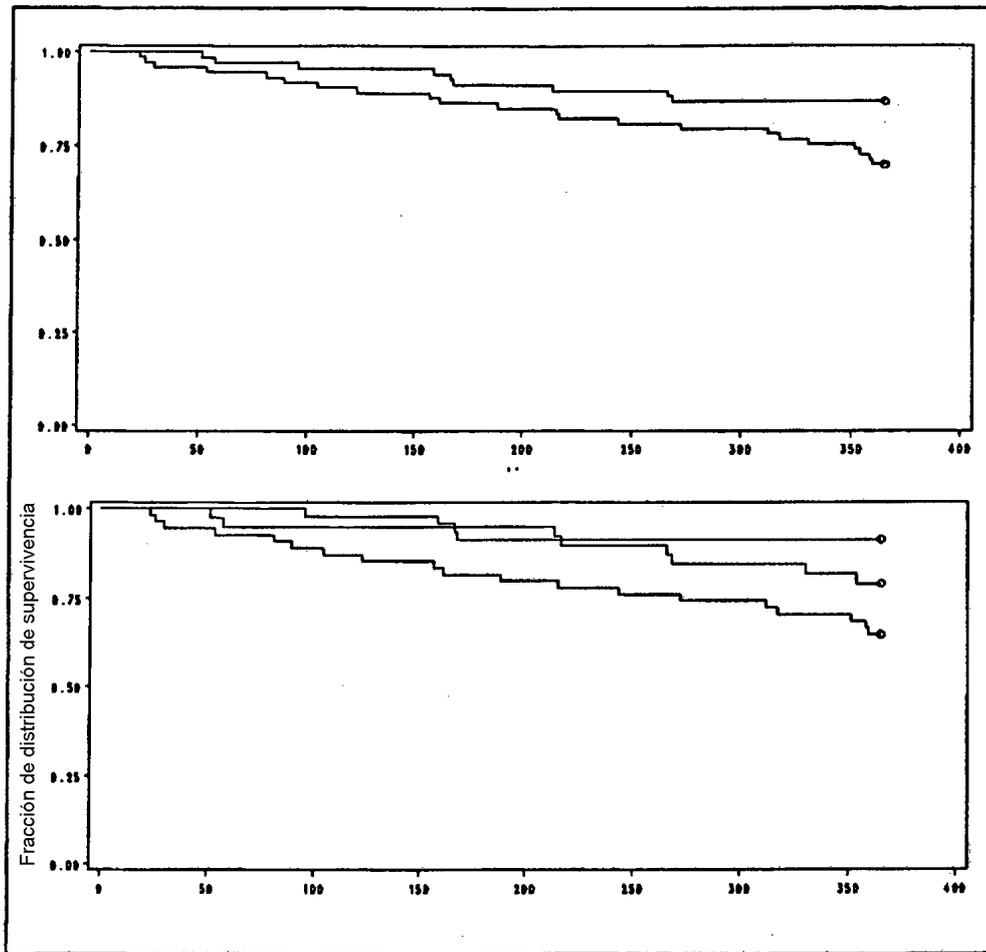


Figura 2

Análisis de Kaplan Meier de la supervivencia a un año según los niveles de pGSN de valor inicial categorizados mediante el nivel de la mediana (Panel A, Parte superior) y terciles (Panel B, Parte inferior) en los controles. Panel A, log-rank $p = 0,05$; Panel B, log-rank $p = 0,02$.

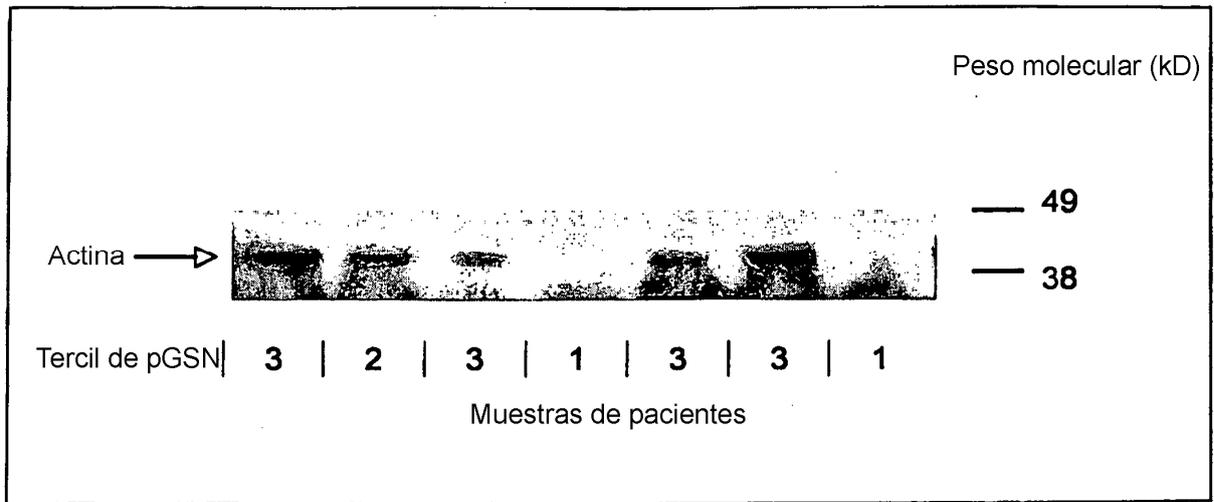


Figura 3

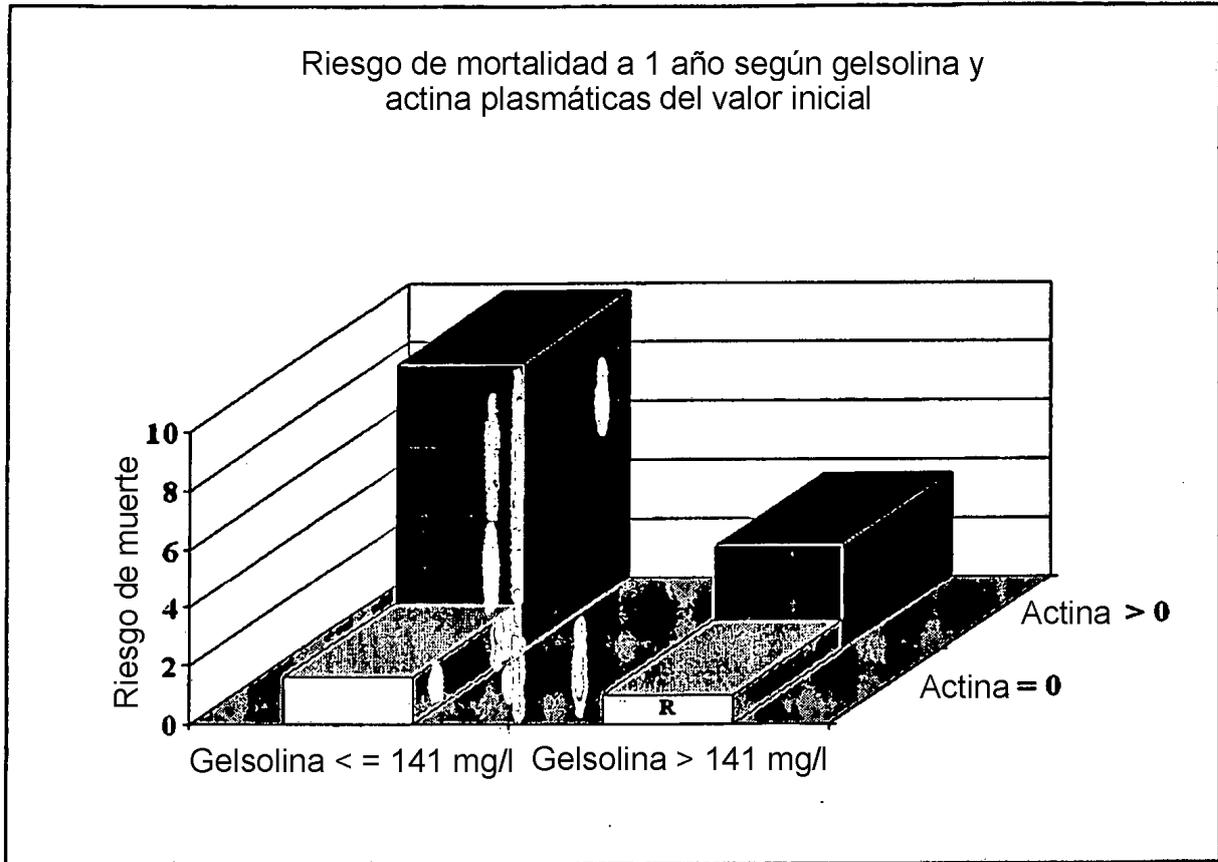


Figura 4

Riesgo de mortalidad a un año según pGSN de valor inicial y la presencia o ausencia de actina. Comparado con aquellos con pGSN de valor inicial elevada (+ pGSN) y actina no detectable (- actina), el riesgo multivariable de muerte a un año entre aquellos con pGSN de valor inicial baja (- pGSN) y actina detectable (+ actina) era significativamente elevado: - pGSN, + actina, OR 9,8, 95% CI 2,9 – 33,5; + pGSN, + actina, OR 3,6, 95% CI 1,0 – 13,5; - pGSN, - actina, OR 1,6, 95% CI 0,3 – 7,7; + pGSN, - actina, OR 1,0 (ref). * p = 0,05, ** p = 0,01.

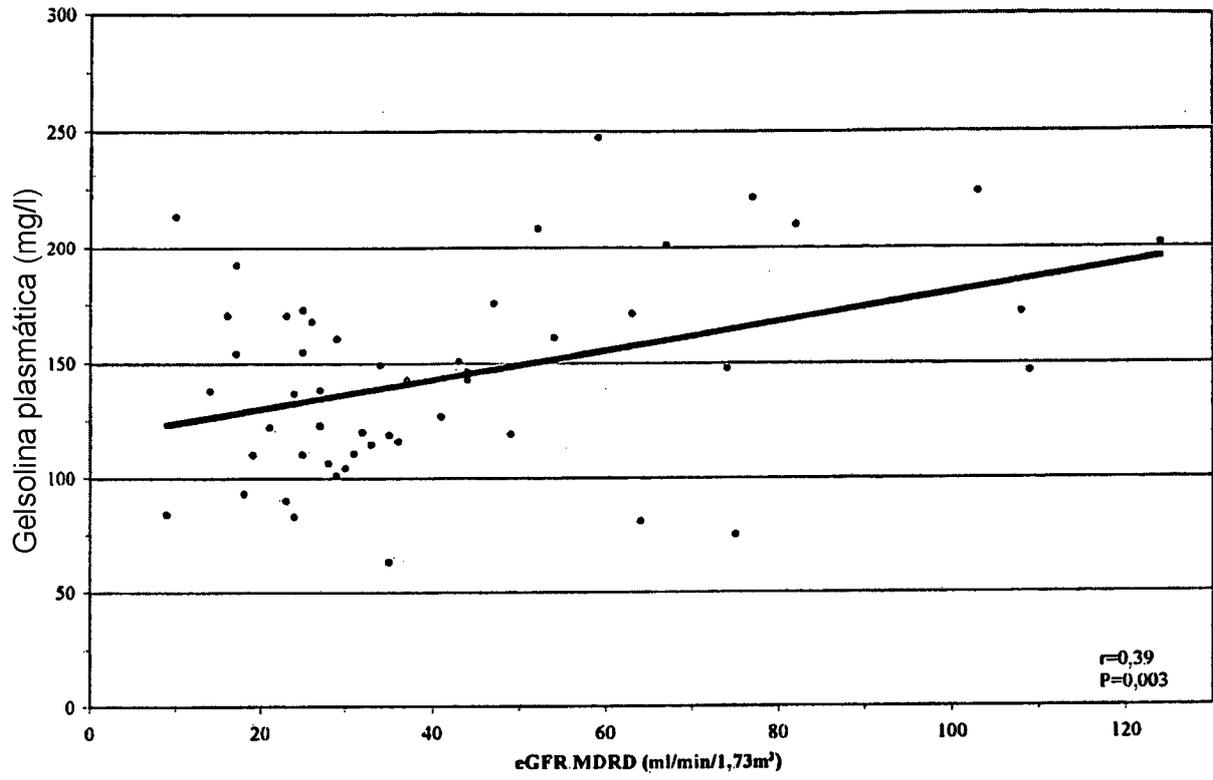


Figura 5

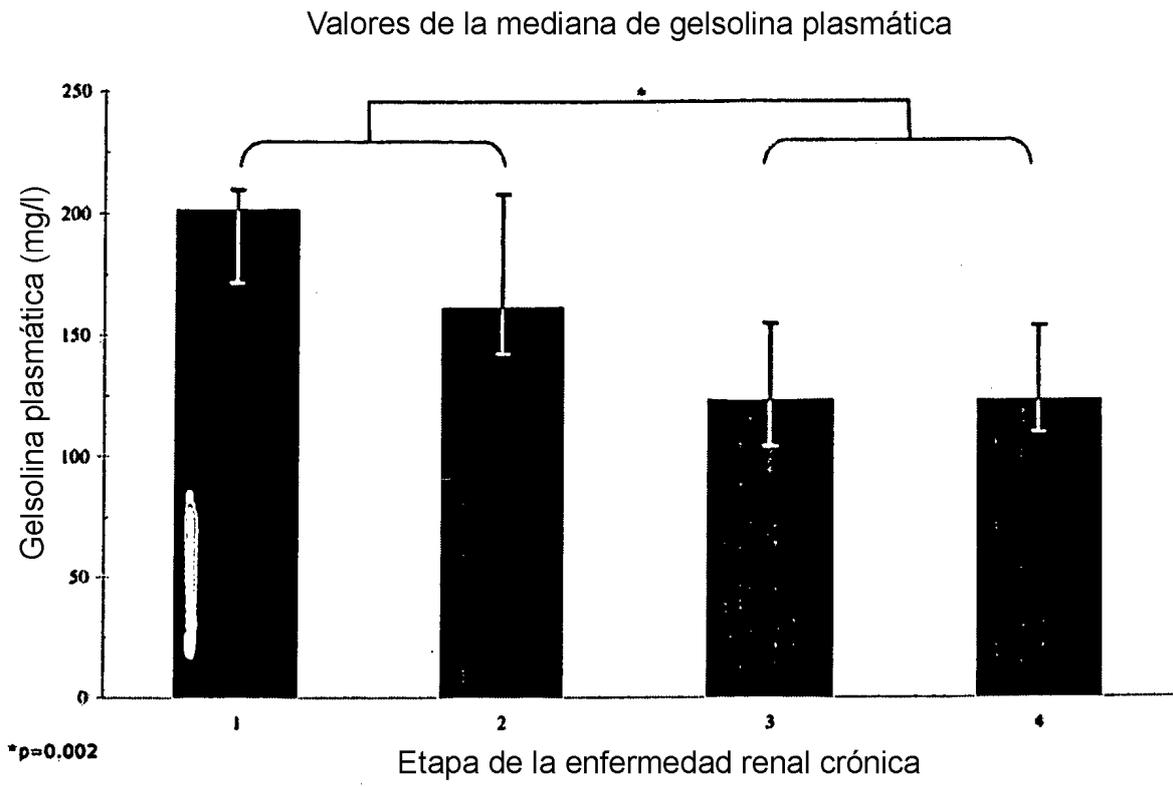


Figura 6

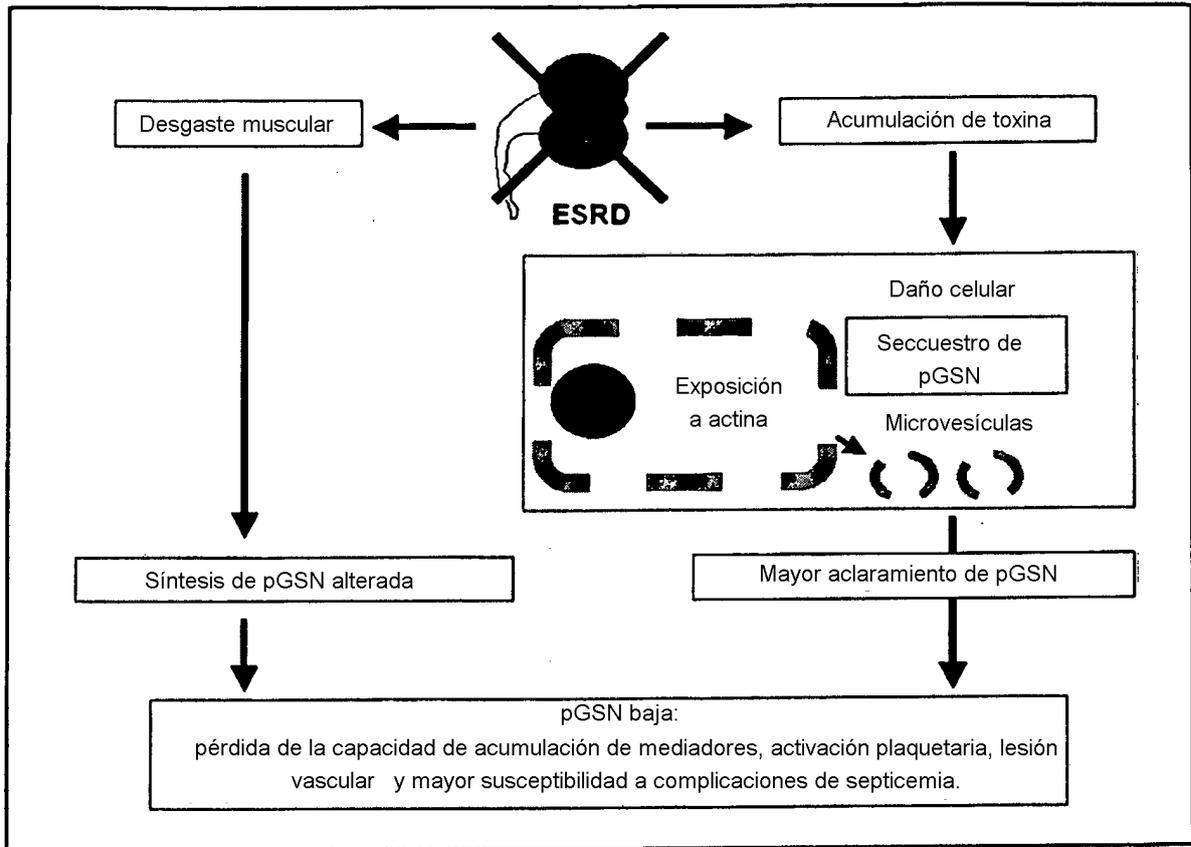


Figura 7