

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 619**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01)
A61K 38/35 (2006.01)
A61K 49/04 (2006.01)
A61K 49/06 (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2007** **PCT/US2007/006581**
87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2007** **WO07106577**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2007** **E 07753226 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017** **EP 2002258**

54 Título: **Uso de gelsolina para tratar esclerosis múltiple y diagnosticar enfermedades neurológicas**

30 Prioridad:

15.03.2006 US 782509 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
29.01.2018

73 Titular/es:

THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(50.0%)
75 Francis Street
Boston, MA 02115, US y
BLOODCENTER RESEARCH FOUNDATION, INC.
(50.0%)

72 Inventor/es:

STOSSEL, THOMAS, P.;
LEE, PO-SHUN;
DITTEL, BONNIE y
MARESZ, KATARZYNA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 651 619 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

Uso de gelsolina para tratar esclerosis múltiple y diagnosticar enfermedades neurológicas

Campo de la invención

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

5 Antecedentes de la invención

A pesar de los avances significativos en el diagnóstico y la terapia, las enfermedades neurológicas siguen siendo una causa principal de morbilidad en todo el mundo. Las enfermedades neurológicas son habituales y costosas. Según una estimación reciente, el coste anual para tratar enfermedades neurológicas en los Estados Unidos de América supera los 600 mil millones de dólares. De este modo, existe una fuerte motivación para identificar nuevos tratamientos para las enfermedades neurológicas.

Debido a que el resultado del tratamiento depende de un diagnóstico apropiado, es importante tener ensayos apropiados para diagnosticar enfermedades neurológicas y monitorizar el tratamiento de esas enfermedades. Un diagnóstico apropiado permite al médico instituir una terapia apropiada y oportuna. La monitorización apropiada del tratamiento permite al médico decidir sobre el curso del tratamiento y aconsejar a los pacientes y a sus familiares sobre el curso esperado de la enfermedad. De este modo, también hay una fuerte motivación para identificar nuevos ensayos y enfoques mejorados para diagnosticar y evaluar los tratamientos de enfermedades neurológicas. Se ha descrito (documento WO 02/05904 A2) un método de diagnóstico de la esclerosis múltiple analizando fluido corporal en busca de la presencia de isoformas proteicas asociadas con la esclerosis múltiple. También se ha descrito (documento WO 2007/041245 A2) el uso de biomarcadores para evaluar la eficacia del tratamiento sobre la esclerosis múltiple.

Recientemente se ha implicado a la gelsolina, descubierta por primera vez como una proteína de unión a actina intracelular implicada en la movilidad celular (Yin, H. L. y Stossel, T. P. (1979) Nature 281, 583-6), en un número de enfermedades. Aunque la función verdadera de la gelsolina plasmática es desconocida, los estudios clínicos y con animales han mostrado que el agotamiento de gelsolina plasmática por lesión e inflamación está asociado con resultados adversos. El mecanismo propuesto de agotamiento de gelsolina es que se une a actina abundante en células expuestas por ruptura de tejidos. Más recientemente, se encontró que gelsolina se une a mediadores inflamatorios bioactivos, ácido lisofosfatídico, fosfato de diadenosina, péptido A β (un péptido implicado en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer), factor activador de plaquetas, y posiblemente otros.

Sumario de la invención

La gelsolina (GSN), específicamente la gelsolina citoplasmática (cGSN), además de ser una proteína que se une a actina intracelular implicada en la movilidad celular, también 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, denominada gelsolina plasmática (pGSN), tiene 25 aminoácidos adicionales, y se origina del ajuste alternativo de un único gen (Kwiatkowski, D. J., Stossel, T. P., Orkin, S. H., Mole, J. E., Colten, H. R. y Yin, H. L. (1986) Nature 323, 455-8).

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona gelsolina para uso en un método para tratar un sujeto que tiene esclerosis múltiple, según las reivindicaciones independientes 1 y 7. También se proporciona un método para evaluar la eficacia de una terapia para tratar o reducir el riesgo de esclerosis múltiple, según la reivindicación independiente 8. En las reivindicaciones dependientes se describen otras características de la invención.

Esta invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que los niveles de gelsolina plasmática se reducen en un modelo de animal de esclerosis múltiple, y que la reducción en los niveles de gelsolina plasmática precede a las manifestaciones de la esclerosis múltiple. La invención también se basa en el hallazgo de que la administración de gelsolina previene y/o suprime la manifestación de la enfermedad. De este modo, la descripción implica, en un aspecto, la administración de gelsolina a un sujeto para tratar esclerosis múltiple. La descripción también se refiere a métodos para usar gelsolina para diagnosticar enfermedades neurológicas y monitorizar el efecto de la terapia.

Según un aspecto de la descripción, se proporciona un método para caracterizar un perfil de riesgo del sujeto de desarrollar una enfermedad neurológica futura (por ejemplo, esclerosis múltiple). El método comprende obtener un nivel de gelsolina en el sujeto y comparar el nivel de gelsolina con un valor predeterminado. El perfil de riesgo del sujeto de desarrollar una enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple) se caracteriza basándose en el nivel de gelsolina en comparación con el valor predeterminado. Un nivel de gelsolina en o por debajo del nivel predeterminado es indicativo de que el sujeto está en un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad neurológica, y un nivel de gelsolina en o por encima del nivel predeterminado es indicativo de que el sujeto no está en un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad neurológica.

En algunas realizaciones, el método comprende además llevar a cabo uno o más ensayos para evaluar la

enfermedad neurológica. Los ejemplos de ensayos para evaluar una enfermedad neurológica incluyen, pero no se limitan a, examen neurológico, electroencefalografía (EEG), examen del fluido cerebroespinal (CSF), potenciales suscitados (sensorial, motor, visual, somatosensorial, o cognitivo), electromiografía (EMG), conducción nerviosa, formación de imágenes mediante tomografía computerizada (CT), formación de imágenes mediante resonancia magnética (MRI), angiografía mediante resonancia magnética (MRA), formación de imágenes mediante MR ecoplanares, tomografía de emisión positrónica (PET), mielografía, y angiografía.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple). El método comprende administrar una cantidad eficaz de gelsolina al sujeto que necesita de tal tratamiento para tratar el sujeto.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple). El método comprende administrar una cantidad eficaz de gelsolina al sujeto que necesita de tal tratamiento para elevar el nivel de gelsolina en el sujeto por encima de un valor predeterminado.

En algunas realizaciones, el sujeto está de otro modo libre de indicaciones que requieren el tratamiento con gelsolina. La gelsolina se administra preferiblemente de forma oral, sublingual, bucal, intranasal, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, o subcutánea. La gelsolina se puede administrar profilácticamente.

En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento comprenden además administrar un segundo agente para tratar la enfermedad neurológica (por ejemplo esclerosis múltiple). Los ejemplos de agentes para tratar la enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple) incluyen, pero no se limitan a, interferón (IFN) - $\beta 1b$ (Betaseron o Betaferon), IFN - $\beta 1a$ (Avonex, Rebif), acetato de glatiramer (Copaxona), mitoxantrona (Novantrona), azatioprina, ciclosporina, metotrexato, ciclofosfamida, inmunoglobulina intravenosa, prednisona, metilprednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, hormona adreno-corticotrópica (ACTH), corticotropina, 2-clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina), inosina, anticuerpo anti-interleucina-2 (Zenapax, daclizumab), leucovorina, teriflunomida, estroprogestágenos, desogestrel, etinilestradiol, BHT-3009, ABT-874, vacuna de Bacilo Calmette-Guérin (BCG), vacunación con células T, CNTO 1275, Rituximab, Tysabri (natalizumab), N-acetilcisteína, minociclina, RO0506997, y estatinas (por ejemplo, atorvastatina (Lipitor), lovastatina (Mevacor), pravastatina (Pravachol), fluvastatina (Lescol) y simvastatina (Zocor)).

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para tratar un sujeto para reducir el riesgo de una enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple). El método comprende seleccionar un sujeto sobre la base de que se sabe que el sujeto tiene un nivel de gelsolina por debajo del normal, y administrar al sujeto una cantidad eficaz de gelsolina y/o un segundo agente para reducir el riesgo del sujeto de desarrollar la enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple).

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para tratar un sujeto para reducir el riesgo de una enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple). El método comprende seleccionar un sujeto sobre la base de que se sabe que el sujeto tiene un nivel de gelsolina por debajo del normal, y administrar una cantidad eficaz de gelsolina y/o un segundo agente al sujeto para elevar el nivel de gelsolina en el sujeto por encima de un valor predeterminado.

En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto un segundo agente para tratar la enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple). Los ejemplos de agentes para tratar la enfermedad neurológica se dan más arriba.

Según todavía otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para tratar un sujeto con un nivel de gelsolina por debajo del normal. El método comprende tratar el sujeto con una primera terapia para tratar o reducir el riesgo de una enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple). Se obtiene un nivel de gelsolina en el sujeto. El nivel de gelsolina se compara con un valor predeterminado que corresponde a un nivel predeterminado de gelsolina (por ejemplo, en una población de control aparentemente sana). Si el nivel predeterminado de gelsolina no se alcanza, el sujeto se trata con un segundo agente para tratar o reducir el riesgo de enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple) hasta que se alcance el nivel predeterminado de gelsolina.

Un "nivel de gelsolina por debajo del normal" es un nivel de gelsolina que es al menos 10% menor que el nivel medio medido para una población dada de sujetos. El nivel medio de gelsolina puede depender de la población particular de sujetos. Por ejemplo, una población aparentemente sana tendrá un intervalo "normal" diferente de gelsolina que el que tendrá una población de sujetos que ha tenido una afección previa. En algunas realizaciones, el nivel de gelsolina es al menos 10% menor que el nivel medio medido para una población dada de sujetos. En otras realizaciones, el nivel de gelsolina es al menos 20% menor que el nivel medio medido para una población dada de sujetos. En todavía otras realizaciones, el nivel de gelsolina es al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% menor que el nivel medio medido para una población dada de sujetos. En una de las realizaciones, el nivel de gelsolina está por debajo de alrededor de 250 mg/l de plasma. En otras realizaciones importantes, el nivel de gelsolina está por debajo de alrededor de 2,4 $\mu M/l$ (micromoles/litro) de plasma.

En algunas realizaciones, el sujeto está de otro modo libre de indicaciones que requieran el tratamiento con el agente. Cuando el agente es gelsolina, un sujeto libre de indicaciones que requieran el tratamiento con gelsolina es un sujeto que no tiene signos o síntomas que requieran tratamiento con gelsolina. La gelsolina está indicada para el tratamiento de septicemia e infecciones. La gelsolina está indicada para el tratamiento de trastornos relacionados con la actina, tales como el 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 la actina son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

En otras realizaciones, el sujeto está aparentemente sano. Como se usa aquí, un "sujeto aparentemente sano" es un sujeto que no tiene signos y/o síntomas de una enfermedad.

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para evaluar la eficacia de una terapia para tratar o reducir el riesgo de una enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple). El método comprende obtener un nivel de gelsolina en un sujeto sometido a terapia con un agente para tratar o reducir el riesgo de enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple). El nivel de gelsolina obtenido se compara con un valor predeterminado que corresponde a un nivel de gelsolina (por ejemplo, en una población de control aparentemente sana). Una determinación de si el nivel de gelsolina está por encima del nivel predeterminado es indicativo de si la terapia es eficaz. En algunas realizaciones, la obtención de un nivel de la gelsolina se repite para monitorizar el nivel del paciente humano de la gelsolina a lo largo del tiempo.

La terapia puede ser con gelsolina, interferón (IFN) - β 1b (Betaseron o Betaferon), IFN - β 1a (Avonex, Rebif), acetato de glatiramer (Copaxona), mitoxantrona (Novantrona), azatioprina, ciclosporina, metotrexato, ciclofosfamida, inmunoglobulina intravenosa, prednisona, metilprednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, hormona adreno-corticotrópica (ACTH), corticotropina, 2-clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina), inosina, anticuerpo anti-interleucina-2 (Zenapax, daclizumab), leucovorina, teriflunomida, estroprogestágenos, desogestrel, etinilestradiol, BHT-3009, ABT-874, vacuna de Bacilo Calmette-Guérin (BCG), vacunación con células T, CNTO 1275, Rituximab, Tysabri (natalizumab), N-acetilcisteína, minociclina, RO0506997, o una estatina (por ejemplo, atorvastatina (Lipitor), lovastatina (Mevacor), pravastatina (Pravachol), fluvastatina (Lescol) y simvastatina (Zocor)).

Según todavía otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para decidir sobre el curso de una terapia en un sujeto. El método comprende obtener un nivel de gelsolina en un sujeto sometido a terapia para tratar o reducir el riesgo de una enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple). El nivel de gelsolina se compara con un valor predeterminado que corresponde a un nivel de gelsolina (por ejemplo, en una población de control aparentemente sana). Se determina si el nivel de gelsolina obtenido está en o por encima o en o por debajo del nivel predeterminado, y se decide el curso de la terapia en base a tal determinación. En algunas realizaciones, la obtención de un nivel de gelsolina se repite para monitorizar el nivel del sujeto de gelsolina a lo largo del tiempo.

Las siguientes realizaciones se aplican a diversos aspectos de la invención expuestos aquí, excepto que se indique de otro modo.

La enfermedad neurológica puede ser una enfermedad desmielinizante. En algunas realizaciones importantes, la enfermedad neurológica es esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple puede ser aguda, recidivante, remitente, estable, crónica, o probable.

La enfermedad neurológica puede ser enfermedad de Alzheimer, encefalomiелitis diseminada aguda, miелitis transversal, leucoencefalopatía multifocal progresiva, adrenoleucodistrofia, adrenomiелoneuropatía, miелinolisis central pontina, neuritis óptica, neuromiелitis óptica (síndrome de Devic), neuropatía óptica hereditaria de Leber, paraparesia espástica tropical (mielopatía asociada a HTLV), síndrome de Guillain-Barré (también denominado polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, polirradiculoneuritis idiopática aguda, polineuritis idiopática aguda, Polio Francesa o parálisis ascendente de Landry).

El nivel de gelsolina puede estar en un fluido corporal del sujeto. Los ejemplos de fluidos corporales incluyen, pero no se limitan a, sangre, plasma, suero, fluido cerebroespinal (CSF), y orina.

El nivel de gelsolina puede estar en un tejido corporal del sujeto. En algunas realizaciones importantes, el tejido corporal es un tejido neuronal. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto aparentemente sano.

En algunas realizaciones, el valor predeterminado es 250 mg/l de plasma o menor. En algunas realizaciones, el valor predeterminado de gelsolina es alrededor de 240 mg/l, 230 mg/l, 220 mg/l, 210 mg/l, 200 mg/l, 190 mg/l, 180 mg/l, 170 mg/l, 160 mg/l, 150 mg/l, 140 mg/l, 130 mg/l, 120 mg/l, 110 mg/l, 100 mg/l, 90 mg/l, 80 mg/l, 70 mg/l, 60 mg/l, 50 mg/l, 40 mg/l, 30 mg/l, 20 mg/l, o 10 mg/l de plasma o menor.

En algunas otras realizaciones, el valor predeterminado es 2,4 μ M/l de plasma o menor. En algunas realizaciones, el valor predeterminado de gelsolina es alrededor de 2,3 μ M/l, 2,2 μ M/l, 2,1 μ M/l, 2,0 μ M/l, 1,9 μ M/l, 1,8 μ M/l, 1,7 μ M/l, 1,6 μ M/l, 1,5 μ M/l, 1,4 μ M/l, 1,3 μ M/l, 1,2 μ M/l, 1,1 μ M/l, 1,0 μ M/l, 0,9 μ M/l, 0,8 μ M/l, 0,7 μ M/l, 0,6 μ M/l, 0,5 μ M/l, 0,4 μ M/l, 0,3 μ M/l, 0,2 μ M/l de plasma o menor.

Cada una de las limitaciones de la invención puede englobar diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, se

anticipa que cada una de las limitaciones de la invención que implican cualquier elemento o combinaciones de elementos se puede incluir en cada aspecto de la invención. La invención es capaz de otras realizaciones y de ponerse en práctica o de ser llevada a cabo de diversas maneras. También, la fraseología y terminología usada aquí es con fines descriptivos, y no se debe considerar como limitante. El uso de “que incluye”, “que comprende”, o “que tiene”, “que contiene”, “que implica”, y sus variaciones aquí, engloba los artículos enunciados después y sus equivalentes, así como artículos 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. Como se entenderá, cada aspecto de la invención puede englobar diversas realizaciones.

10 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un histograma que muestra los niveles de gelsolina en ratones de control (tratados con irradiación *per se*) y en ratones con lesión primaria de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE).

La FIG. 2 es una gráfica que muestra la puntuación de la enfermedad en ratones con EAE en función del tiempo para los tratamientos indicados.

15 La FIG. 3 es una gráfica que muestra la puntuación clínica en controles y animales con EAE (que carecen de la función de integrina) en función del tiempo para los tratamientos indicados.

Se entenderá que los dibujos no son necesarios para llevar a cabo la invención.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la administración de gelsolina protege a un sujeto de esclerosis múltiple. De este modo, en algunos aspectos, la descripción implica administrar gelsolina a un sujeto para el tratamiento de esclerosis múltiple en el sujeto. Hemos descubierto que el tratamiento con gelsolina retrasó el comienzo, atenuó notablemente la gravedad, y apresuró la remisión de los síntomas de la esclerosis múltiple.

El término “tratamiento” o “tratar” incluye profilaxis, mejora, prevención o cura de la enfermedad.

25 Como se usa aquí, el término “sujeto” significa cualquier mamífero que pueda tener necesidad de tratamiento. Los sujetos incluyen, pero no se limitan a: seres humanos, primates no humanos, gatos, perros, ovejas, cerdos, caballos, vacas, roedores tales como ratones, hámster, y ratas. Los sujetos preferidos son sujetos humanos.

Como se usa aquí, el término “gelsolina” engloba gelsolina de tipo salvaje (nº de acceso GenBank: X04412), isoformas, análogos, variantes, fragmentos o derivados funcionales de gelsolina.

30 La gelsolina (GSN), a diferencia de otras proteínas de mamífero, tiene tanto isoformas citoplásmicas (cGSN) como segregadas o exportadas, también denominadas 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 alguna modificación post-traducciona.

35 La gelsolina engloba gelsolina nativa así como sintética y recombinante, y análogos de gelsolina. 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 del ajuste alternativo de un único gen (Kwiatkowski, D. J., Stossel, T. P., Orkin, S. H., Mole, J. E., Colten, H. R. y Yin, H. L. (1986) Nature 323, 455-8). La gelsolina humana recombinante (rhGSN) (Biogen IDEC, Inc., Cambridge, MA) es producida en *E.*

40 *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 el proteína natural. Por lo tanto, la proteína recombinante se oxida apropiadamente tras la purificación, y su estructura y funciones son indistinguibles de la gelsolina plasmática humana (Wen et. al., Biochemistry 35:9700-9709 (1996)). En algunos de los aspectos terapéuticos importantes y realizaciones de la invención, se prefiere el uso de rhGSN. En algunos de los aspectos de diagnóstico importantes y realizaciones de la invención, se prefiere el uso de pGSN.

50 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, eliminadas, alargadas, reemplazadas, o de otro modo modificadas que poseen bioactividad sustancialmente similar a la de 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 la gelsolina para retener la bioactividad de la gelsolina. La bioactividad se puede determinar, por ejemplo, determinando las propiedades del análogo de gelsolina y/o determinando la capacidad del análogo de gelsolina para tratar o prevenir la esclerosis múltiple. Un ejemplo de un ensayo de bioactividad de la gelsolina es la capacidad de la gelsolina para estimular la nucleación de la actina. Los

ensayos de bioactividad de la gelsolina se describen en el Ejemplo, y son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

Un “fragmento” incluye cualquier porción de una molécula de gelsolina que proporcione un segmento de gelsolina que mantiene la bioactividad de gelsolina; el término incluye fragmentos de gelsolina que están hechos de cualquier fuente, tales como, por ejemplo, de secuencias peptídicas de origen natural, secuencias peptídicas sintéticas o sintetizadas químicamente, y secuencias peptídicas modificadas mediante ingeniería genética.

Una “variante” de gelsolina se refiere a un compuesto sustancialmente similar en estructura y bioactividad a gelsolina nativa, o a un fragmento de la misma. 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 “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 la 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 el 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” incluye los “fragmentos”, “variantes”, “análogos”, o “derivados químicos” de gelsolina.

La descripción implica, en algunos aspectos, métodos para tratar una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad neurológica tal como esclerosis múltiple) en un sujeto. Se sabe que el sujeto tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de tener la enfermedad. La gelsolina se administra en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad en el sujeto.

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

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para monitorizar la terapia en un sujeto. El método implica obtener un nivel de gelsolina en un sujeto sometido a terapia para tratar una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad neurológica tal como esclerosis múltiple). El nivel de gelsolina se compara con un valor predeterminado que corresponde a un nivel de control de gelsolina (por ejemplo, en una población aparentemente sana). Una determinación de si el nivel de gelsolina está en o por debajo de un nivel predeterminado es indicativo de si el sujeto se beneficiaría de la terapia continuada con la misma terapia, o se beneficiaría de un cambio en la terapia. En algunas realizaciones, la obtención de un nivel de gelsolina se repite para monitorizar los niveles de gelsolina del sujeto a lo largo del tiempo. 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 meses o más.

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

Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para evaluar la eficacia de una terapia para tratar o reducir el riesgo de una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad neurológica tal como esclerosis múltiple). El método implica obtener un nivel de gelsolina en un sujeto sometido a terapia para tratar la enfermedad. El nivel de gelsolina se compara con un valor predeterminado que corresponde a un nivel de control de gelsolina (por ejemplo, en una población aparentemente sana). Una determinación de que el nivel de gelsolina está en o por encima de un nivel predeterminado sería indicativo 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, 8, 9, 10, 11, 12 o más semanas. En algunas realizaciones, el sujeto puede haber estado sometido a la terapia durante al menos 3, 4, 5, 6 o más meses.

Un aspecto de la descripción se refiere a la medida de gelsolina para guiar los tratamientos a fin de mejorar el resultado en los sujetos. Los niveles de gelsolina en terapia tienen valor predictivo para la respuesta a tratamientos de la enfermedad (por ejemplo, una enfermedad neurológica tal como esclerosis múltiple). Los niveles de gelsolina en terapia son aditivos a predictores de la técnica anterior del resultado de la enfermedad.

Los sujetos que se beneficiarían de este aspecto de esta descripción son sujetos que están sometidos a terapia para tratar o prevenir la enfermedad tal como, por ejemplo, esclerosis múltiple (es decir, un sujeto “en terapia”). Un sujeto en terapia es un sujeto que ya ha sido diagnosticado y está en el curso de tratamiento con una terapia para tratar la

esclerosis múltiple. La terapia puede ser cualquiera de los agentes terapéuticos citados aquí. La terapia también puede ser tratamientos no farmacéuticos. En realizaciones importantes, la terapia es aquella que incrementa los niveles de gelsolina. En una realización particularmente importante, la terapia es una terapia con gelsolina. Los sujetos preferidos son sujetos humanos. El sujeto que más probablemente se beneficiará de esta descripción es un sujeto humano en terapia y que tiene un nivel de gelsolina en o por debajo de alrededor de 250 mg/l (o 2,4 µM/l) de plasma.

En algunas realizaciones, el sujeto ya tiene la enfermedad. En algunas realizaciones, el sujeto puede estar en un riesgo elevado de tener la enfermedad.

Los factores de riesgo para las enfermedades son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. Por ejemplo, los factores de riesgo para esclerosis múltiple incluyen: edad (entre 20 y 40 años), género femenino, etnia caucásica, e historial familiar positivo. El grado de riesgo de esclerosis múltiple depende de la multitud y la gravedad o la magnitud de los factores de riesgo que tiene el sujeto. Existen tablas de riesgo y algoritmos de predicción para evaluar el riesgo de la esclerosis múltiple en un sujeto en base a la presencia y gravedad de factores de riesgo. En algunas realizaciones, el sujeto que está en riesgo elevado de tener la enfermedad puede ser un sujeto aparentemente sano. Un sujeto aparentemente sano es un sujeto que no tiene signos o síntomas de la enfermedad.

Otros métodos para evaluar el riesgo de esclerosis múltiple en un sujeto son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

El tratamiento preferido de la actual descripción es la gelsolina. La gelsolina se puede administrar sola, en una composición farmacéutica, o combinada con otros regímenes terapéuticos. La gelsolina y opcionalmente otro agente o agentes terapéuticos se pueden administrar de forma simultánea o secuencial. Cuando los otros agentes terapéuticos se administran simultáneamente, se pueden administrar en las mismas formulaciones o en formulaciones independientes, 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 la gelsolina se separan temporalmente. La separación en el tiempo entre la administración de estos compuestos puede ser una cuestión de minutos o puede ser más prolongada.

Para la práctica de ciertos métodos de la presente descripción, es necesario obtener un nivel de gelsolina en un sujeto. Este nivel se compara entonces con un valor predeterminado, en el que el nivel de gelsolina en comparación con el valor predeterminado es indicativo de la probabilidad de que el sujeto se beneficiará de la terapia continuada. El sujeto se puede caracterizar entonces en términos del beneficio neto probablemente a obtener de un cambio en la terapia.

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 o 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 su medida. Los métodos para medir gelsolina se describen en el Ejemplo.

La descripción también implica comparar el nivel de gelsolina para el sujeto con un valor predeterminado. El valor predeterminado puede tomar una variedad de formas. Puede ser un único valor de corte, tal como una mediana o una media. Se puede establecer basándose en grupos comparativos, tal como, por ejemplo, cuando el riesgo en un grupo definido es el doble del riesgo en otro grupo definido. Puede ser un intervalo, por ejemplo cuando la población ensayada se divide por igual (o de forma no igualitaria) en grupos, tal como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio y un grupo de riesgo alto, 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 no menor que el valor de corte demuestra un incremento estadísticamente significativo en el riesgo de desarrollar una enfermedad neurológica (por ejemplo, esclerosis múltiple) en comparación con un grupo comparativo. En algunas realizaciones, el grupo comparativo es un grupo que tiene un menor nivel de gelsolina.

El valor predeterminado puede depender de la población particular de sujetos seleccionada. Por ejemplo, una población aparentemente sana puede tener un intervalo "normal" diferente de gelsolina que el que tendrán poblaciones de sujetos que tienen otras afecciones. En consecuencia, los valores predeterminados seleccionados pueden tomar en cuenta la categoría en la que cae un sujeto. 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.

El fluido corporal preferido es sangre. En algunas realizaciones, el valor predeterminado de gelsolina es alrededor de 250 mg/l de plasma o menor. En algunas realizaciones, el valor predeterminado de gelsolina es alrededor de 240 mg/l, 230 mg/l, 220 mg/l, 210 mg/l, 200 mg/l, 190 mg/l, 180 mg/l, 170 mg/l, 160 mg/l, 150 mg/l, 140 mg/l, 130 mg/l, 120 mg/l, 110 mg/l, 100 mg/l, 90 mg/l, 80 mg/l, 70 mg/l, 60 mg/l, 50 mg/l, 40 mg/l, 30 mg/l, 20 mg/l, o 10 mg/l de plasma o menor.

En algunas realizaciones, el valor predeterminado de gelsolina es alrededor de 2,4 $\mu\text{M/l}$ de plasma o menor. En algunas realizaciones, el valor predeterminado de gelsolina es alrededor de 2,3 $\mu\text{M/l}$, 2,2 $\mu\text{M/l}$, 2,1 $\mu\text{M/l}$, 2,0 $\mu\text{M/l}$, 1,9 $\mu\text{M/l}$, 1,8 $\mu\text{M/l}$, 1,7 $\mu\text{M/l}$, 1,6 $\mu\text{M/l}$, 1,5 $\mu\text{M/l}$, 1,4 $\mu\text{M/l}$, 1,3 $\mu\text{M/l}$, 1,2 $\mu\text{M/l}$, 1,1 $\mu\text{M/l}$, 1,0 $\mu\text{M/l}$, 0,9 $\mu\text{M/l}$, 0,8 $\mu\text{M/l}$, 0,7 $\mu\text{M/l}$, 0,6 $\mu\text{M/l}$, 0,5 $\mu\text{M/l}$, 0,4 $\mu\text{M/l}$, 0,3 $\mu\text{M/l}$, 0,2 $\mu\text{M/l}$ de plasma o menor.

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

10 Actualmente, hay 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).

15 En algunas realizaciones, la descripción comprende además medir el nivel de gelsolina junto con un nivel de un segundo marcador de una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad neurológica tal como esclerosis múltiple). Los ejemplos de marcadores para esclerosis múltiple incluyen, por ejemplo, Rantes, el anticuerpo anti-glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) (anti-MOG) y el anticuerpo anti-proteína básica de mielina (MBP) (anti-MBP), y el microsatélite del gen *ERBB3*. Se obtiene un nivel de gelsolina en el sujeto. El nivel de gelsolina se compara con un valor predeterminado para establecer un primer valor de riesgo. También se obtiene un nivel del segundo marcador en el sujeto. El nivel del segundo marcador en el sujeto se compara con un segundo valor predeterminado para establecer un segundo valor de riesgo. El perfil de riesgo del sujeto de desarrollar la enfermedad se caracteriza entonces basándose en la combinación del primer valor de riesgo y el 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 los valores de riesgo primero y segundo. En algunas realizaciones, el tercer valor de riesgo es mayor que cualquiera de los valores de riesgo primero y segundo. Los sujetos preferidos para ensayar valores predeterminados son como se describen anteriormente. La enfermedad puede ser una enfermedad neurológica, tal como cualquiera de las enfermedades neurológicas descritas anteriormente.

25 La descripción 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 una recuperación más rápida de las manifestaciones de la enfermedad. Los signos, síntomas y manifestaciones de la enfermedad son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. Por ejemplo, en la esclerosis múltiple, los signos y síntomas de la enfermedad incluyen: debilidad de las extremidades, neuritis óptica, diplopía, síntomas sensoriales, ataxia, disfunción de la vejiga, disfunción cognitiva, depresión, sensibilidad al calor, y fatiga.

30 La debilidad de las extremidades se puede manifestar como fatiga, perturbación del andar, y/o pérdida de destreza.

35 La neuritis óptica generalmente se presenta como agudeza visual disminuida y/o penumbra o desaturación del color en el campo de visión central. Los síntomas de la neuritis óptica pueden ser leves, o pueden progresar a lo largo de las horas o días a pérdida visual severa o a la pérdida completa de la percepción de la luz. Los síntomas visuales son generalmente monoculares, pero pueden ocurrir bilateralmente. El dolor periorbital puede preceder o acompañar a la agudeza visual disminuida.

La diplopía se puede manifestar como nistagmo prominente. Otra perturbación de la mirada habitual en esclerosis múltiple es la parálisis de la mirada horizontal.

40 Los síntomas sensoriales en la esclerosis múltiple incluyen parestesias (hormigueo o quemazón dolorosa) o hiperestesias (embotamiento o sensación de "muerte"). Son habituales las quejas de "sensaciones desagradables" en diferentes partes del cuerpo.

La ataxia del andar y de las extremidades son manifestaciones habituales de la esclerosis múltiple.

La disfunción de la vejiga se manifiesta como tenesmo vesical o dificultad para comenzar a orinar, vaciado incompleto de la vejiga, o incontinencia.

45 La disfunción cognitiva se manifiesta como pérdida de memoria, atención alterada, dificultades para resolver problemas, procesamiento de la información ralentizado y dificultades para cambiar entre tareas cognitivas. El juicio alterado y la inestabilidad emocional pueden ser evidentes.

La aparición de fatiga es habitual en la mayoría de los pacientes con esclerosis múltiple. Los síntomas de la fatiga incluyen debilidad motora generalizada, capacidad limitada para concentrarse o leer, laxitud, y somnolencia.

50 Otros síntomas de la esclerosis múltiple incluyen disartria, estreñimiento o incontinencia del intestino, dolor facial, debilidad facial, mioquimia facial (contracciones intermitentes crónicas de los músculos faciales) y vértigo.

Estos métodos tienen implicaciones importantes para el tratamiento del paciente, 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 la utilidad clínica de los métodos de esta invención incluye

identificar sujetos que probablemente responden menos o más a una terapia. Los métodos de la descripción también son útiles para predecir o determinar que un sujeto se beneficiaría de la terapia continuada, o se beneficiaría de un cambio en la terapia. Los médicos seleccionan los regímenes terapéuticos para el tratamiento en base al beneficio neto esperado para el sujeto. El beneficio neto deriva de la relación de riesgo a beneficio. La presente descripción permite la determinación de si un sujeto se beneficiará de la terapia continuada o se beneficiará de un cambio en la terapia, ayudando de ese 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 alta probabilidad de obtener un beneficio neto. Se espera que los investigadores clínicos usarán ahora la presente descripción para determinar criterios de entrada para ensayos clínicos.

Un sujeto que se beneficiaría de la terapia continuada es un sujeto cuyo nivel de gelsolina en terapia alcanza un cierto valor predeterminado, o cuyo nivel de gelsolina está creciendo. 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.

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, la 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 se incrementa la probabilidad del beneficio esperado. En algunas realizaciones, las terapias preferidas son terapias que incrementan los niveles de gelsolina. Un sujeto que se beneficiaría de un cambio en la terapia al incrementar la dosis de la terapia existente es un sujeto que, por ejemplo, estaba en la terapia pero no estaba recibiendo la dosis máxima tolerada o la dosis máxima permitida de la terapia y cuyo nivel de gelsolina no alcanzó un cierto valor predeterminado. En tales casos, la dosis de la terapia existente se incrementa hasta que el nivel de gelsolina alcanza un cierto valor predeterminado. En algunos casos, la dosis de la terapia existente se incrementa desde la dosis existente hasta una mayor dosis que no es la dosis máxima tolerada ni la dosis máxima permitida de la terapia. En otros casos, la dosis se incrementa hasta la dosis máxima tolerada o hasta la dosis máxima permitida de la terapia. Un sujeto que se beneficiaría de un cambio en la terapia al disminuir la dosis de la terapia existente es, por ejemplo, un sujeto cuyo nivel de gelsolina en la terapia alcanza o puede alcanzar un cierto valor predeterminado con una menor dosis de la terapia.

Un sujeto que se beneficiaría de un cambio de una terapia a otra terapia es, por ejemplo, un sujeto que estaba en la dosis máxima tolerada o en la dosis máxima permitida de la terapia y cuyo nivel de gelsolina no alcanzó un cierto valor predeterminado. Otro ejemplo es un sujeto que no estaba en la dosis máxima tolerada o en la dosis máxima permitida de la terapia pero que se determinó por el médico que se beneficiaría más probablemente 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.

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

La descripción también proporciona métodos para determinar la eficacia de una terapia. La eficacia es típicamente la eficacia de la terapia incrementando el nivel de gelsolina. Esto se denomina algunas veces como una respuesta positiva o una respuesta favorable. La eficacia se puede determinar mediante un ensayo o ensayos de gelsolina en sangre, para determinar si los niveles de gelsolina se incrementan como resultado de la terapia. En algunas realizaciones, la determinación de la eficacia se basa en la eficacia de una terapia al incrementar tanto la gelsolina como normalizando los recuentos de glóbulos blancos (WBC).

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

La descripción también proporciona métodos para decidir sobre el curso de una terapia en un sujeto sometido a terapia para una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad neurológica tal como esclerosis múltiple). Tal curso de la terapia se decide en base al nivel de gelsolina. En algunas realizaciones, el sujeto ya tiene la enfermedad o está en riesgo de tener la enfermedad. En algunas realizaciones, el sujeto está en un riesgo elevado de tener la enfermedad, el sujeto tiene uno o más factores de riesgo para tener la enfermedad.

La cantidad de tratamiento se puede variar, por ejemplo, incrementando o disminuyendo la cantidad de gelsolina o de agente farmacológico o de una composición terapéutica, cambiando la composición terapéutica administrada, cambiando la vía de administración, cambiando el momento de la dosificación, etc. La cantidad eficaz variará con la afección particular que se esté tratando, con la edad y estado físico del sujeto que esté siendo tratado, 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 de administración, y los factores similares están dentro del conocimiento y experiencia del médico. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede depender de la duración durante la cual el individuo haya tenido la enfermedad.

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 en el que un individuo ha disminuido anormalmente los niveles de gelsolina. Se entendería que los agentes terapéuticos de la descripción se usan para tratar o prevenir la enfermedad (por ejemplo, esclerosis múltiple), es decir, se pueden usar profilácticamente en sujetos con riesgo de desarrollar la enfermedad (por ejemplo, esclerosis múltiple). De este modo, una cantidad eficaz es aquella cantidad que puede reducir el riesgo de, ralentizar, o quizás prevenir totalmente el desarrollo de esclerosis múltiple. Se reconocerá que cuando el agente terapéutico se usa en circunstancias agudas, se usa para prevenir uno o más resultados médicamente indeseables que surgen típicamente de tales sucesos adversos.

Los factores implicados en determinar una cantidad eficaz son bien conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica, y se pueden abordar con una experimentación no más allá de la normal. Generalmente se prefiere usar una dosis máxima de los agentes farmacológicos de la descripción (solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, es decir, la dosis segura más elevada según el juicio del médico. Se entenderá por aquellos de pericia normal en la técnica, sin embargo, que un paciente puede insistir en una dosis menor o dosis tolerable por razones médicas, razones psicológicas, o virtualmente por cualquier otra razón.

La cantidad terapéuticamente eficaz de un agente farmacológico de la descripción es aquella cantidad eficaz para tratar la enfermedad. Por ejemplo, en el caso de una enfermedad neurológica tal como esclerosis múltiple, la respuesta deseada es inhibir la progresión de la esclerosis múltiple. Esto puede implicar solamente ralentizar la progresión de la esclerosis múltiple de forma temporal, aunque más preferiblemente implica detener permanentemente la progresión de la esclerosis múltiple. Esto se puede monitorizar mediante métodos de diagnóstico normales conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. La respuesta deseada al tratamiento de esclerosis múltiple también puede ser retrasar el comienzo o incluso prevenir el comienzo de la esclerosis múltiple.

Los agentes farmacológicos usados en los métodos de la descripción 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 administradas 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 en el que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a la dosis inicial aplicada, se pueden emplear mayores dosis (o dosis eficazmente mayores mediante una vía de suministro diferente, más localizada) hasta el grado que lo permita la tolerancia del paciente. La dosis de un agente farmacológico se puede ajustar mediante un 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 lo más preferible, 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.

Aquellos de pericia normal en la técnica conocen diversos modos de administración que suministran de forma eficaz los agentes farmacológicos de la descripción a un tejido, célula, o fluido corporal deseado. Los métodos de administración se explican en cualquier otra parte en la solicitud. La descripción no está limitada por los modos particulares de administración descritos aquí. Las 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 de la descripción serán conocidos por alguien de pericia normal en la técnica, en los que la cantidad de la dosis, el calendario de administración, los sitios de administración, el modo de administración, y similares, varían de los presentados aquí.

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

Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas de la descripción 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 de forma habitual sales, agentes amortiguadores, conservantes, vehículos compatibles, y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales no farmacéuticamente aceptables se pueden usar convenientemente para preparar sus sales farmacéuticamente aceptables, y no se excluyen del alcance de la descripción. Tales sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: 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, potasio o calcio.

- Un agente farmacológico o composición 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, diluyentes o sustancias encapsulantes, sólidas o líquidas, compatibles, que son adecuados para administración a un ser humano. El término "vehículo" significa 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 descripción, y entre sí, de una manera tal que no hay ninguna interacción que afectase sustancialmente a la eficacia farmacéutica deseada.
- 10 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes amortiguadores 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.
- 15 Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en una 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.
- 20 Los compuestos, cuando es deseable suministrarlos sistémicamente, se pueden formular para 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, agentes estabilizantes y/o agentes dispersantes.
- 25 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 para inyección oleosas 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 para inyección acuosas 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.
- 30 Como alternativa, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, disolución salina, amortiguador, o agua estéril libre de pirógenos) antes del uso.
- 35 Las composiciones adecuadas para 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.
- 40 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener como excipiente sólido, triturando opcionalmente una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, tras 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, hidroxipropilmetil celulosa, 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 amortiguadores, es decir, EDTA para neutralizar condiciones ácidas internas, o se pueden administrar sin ningún vehículo.
- 45 También están específicamente contempladas las 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. En general, la modificación química contemplada es la unión de al menos un resto a la propia molécula del componente, en la que dicho resto permite (a) la inhibición de la proteólisis y (b) la absorción en el torrente sanguíneo desde el estómago o el 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, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, y poliprolina. Abuchowski y Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" en: Enzymes as Drugs, Hocenberg y Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, p. 367-383; Newmark, et al.,
- 50
- 55

1982, J. Appl. Biochem. 4:185-189. Otros polímeros que podrían usarse son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-trioxocano. Para uso farmacéutico se prefieren, como se indica anteriormente, restos de polietilenglicol.

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

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

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

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

Los colorantes y agentes saborizantes pueden estar todos ellos incluidos. Por ejemplo, la gelsolina se puede formular (tal como mediante encapsulamiento liposómico o de microesferas), y entonces se podría introducir posteriormente en un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes saborizantes.

Se puede diluir o incrementar el volumen de la sustancia terapéutica con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir hidratos de carbono, especialmente manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. Ciertas sales inorgánicas también se pueden usar como cargas, incluyendo trifosfato cálcico, carbonato magnésico y cloruro sódico. Algunos diluyentes comercialmente disponibles son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

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 a base de almidón Explotab. Se pueden usar glicolato de almidón sódico, Amberlite, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato sódico, 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 éstas pueden incluir gomas en polvo tales como agar, karaya o tragacanto. El ácido algínico y su sal sódica también son útiles como disgregantes.

Los aglutinantes se pueden usar para retener el agente terapéutico junto para formar un comprimido duro, e incluyen materiales procedentes 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 en disoluciones alcohólicas para granular la sustancia terapéutica.

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

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

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 laurmacrogol 400, estearato de polioxilo 40, 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 solos o como una mezcla en diferentes relaciones.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar oralmente incluyen cápsulas de cierre a presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de cierre a presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En las 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.

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

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar las formas de comprimidos o tabletas formulados de manera convencional.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos para uso según la presente descripción se pueden suministrar convenientemente en forma de una presentación de pulverización en 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. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base de 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 la inhala, y atraviesa el forro epitelial del pulmón 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 (al-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, March, (hormona del crecimiento humana recombinante); Debs et al., 1988, *J. Immunol.* 140:3482-3488 (interferón-γ y factor alfa de 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 una composición para el suministro pulmonar de fármacos para efecto sistémico.

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

Algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles útiles para la práctica de esta descripción 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 la 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, adyuvantes y/o vehículos habituales útiles en la terapia. También, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión, u otros tipos de vehículos. La gelsolina modificada químicamente 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 amortiguador 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 atomización de la disolución al formar el aerosol.

Las formulaciones para uso con un dispositivo inhalador de dosis medida generalmente comprenderán 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, diclorotetrafluoroetanol, y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico también puede ser útil como un tensioactivo.

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

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

- 15 Para la administración nasal, un dispositivo útil es una botella dura pequeña a la cual se adjunta un pulverizador de dosis medida. En una realización, la dosis medida se suministra extrayendo la composición farmacéutica de la presente descripción a una cámara de volumen definido, cámara la cual tiene una abertura de un tamaño para aerosolizar una formulación de aerosol formando una pulverización cuando se comprime un líquido en la cámara. La cámara se comprime para administrar la composición farmacéutica de la presente descripción. En una realización específica, la cámara es un montaje de pistón. Tales dispositivos están comercialmente disponibles.

- 20 Como alternativa, se usa una botella exprimible de plástico, con una apertura o abertura dimensionada para aerosolizar una formulación de aerosol formando una pulverización cuando se exprime. La abertura se encuentra habitualmente en la parte superior de la botella, y la parte superior generalmente está estrechada 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 administración de una dosis medida del fármaco.

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

- 30 Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción 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.

- 35 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes en fase sólida o de gel adecuados. 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.

- 40 Las formas de preparación farmacéutica sólidas o líquidas 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 implante en la piel, o secas sobre un objeto afilado para ser raspado sobre la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación extendida de compuestos activos, en cuya preparación se usan habitualmente excipientes y aditivos y/o auxiliares tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes de hinchamiento, lubricantes, saborizantes, edulcorantes o solubilizantes como se describen anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para uso en una variedad de sistemas de suministro de fármacos. Para un breve repaso de los métodos para el suministro de fármacos, véase Langer, Science 249:1527-1533, 1990.

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

- 50 El agente o agentes terapéuticos, incluyendo específicamente, pero sin limitarse a, gelsolina, se pueden proporcionar en partículas. Las partículas, como se usa aquí, significan nano o micropartículas (o en algunos casos más grandes) que pueden consistir en todo o en parte en gelsolina o el otro u otros agentes terapéuticos como se describe aquí. Las partículas pueden contener el agente o agentes terapéuticos en un núcleo rodeado de 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 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 combinaciones de los mismos. Las partículas pueden ser microcápsulas que contienen la gelsolina en una disolución o en un estado semisólido. Las partículas pueden ser de virtualmente cualquier forma.

Los materiales poliméricos tanto no biodegradables como biodegradables se pueden usar en la fabricación de partículas para suministrar el agente o agentes terapéuticos. Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona en base al 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, cuyas enseñanzas se incorporan aquí. Éstos incluyen poliácidos hialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, poliácido acrílico, alginato, quitosán, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilatos 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).

El agente o agentes terapéuticos pueden estar contenidos en sistemas de liberación controlada. La expresión "liberación controlada" está destinada a referirse a cualquier formulación que contenga fármaco en la que se controla la manera y el perfil de liberación del fármaco desde la formulación. Esto se refiere a formulaciones de liberación inmediata así como no inmediata, incluyendo las formulaciones 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 farmacéutica que proporciona una liberación gradual de un fármaco a lo largo de un período de tiempo prolongado, y que preferiblemente, aunque no necesariamente, da como resultado niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco a lo largo de un período de tiempo prolongado. La expresión "liberación retrasada" se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación farmacéutica en la que hay un retraso de tiempo entre la administración de la formulación y la liberación del fármaco a partir de ella. La "liberación retrasada" puede implicar o no la liberación gradual de fármaco a lo largo de un período de tiempo prolongado, y de este modo puede ser o no "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.

La descripción también contempla el uso de kits. En algunos aspectos de la descripción, el kit puede incluir un vial de preparación farmacéutica, un vial de diluyente de la preparación farmacéutica, y gelsolina. El vial que contiene el diluyente para la preparación farmacéutica es opcional. El vial del diluyente contiene un diluyente, tal como disolución salina fisiológica, para diluir lo que podría ser una disolución concentrada o polvo liofilizado de gelsolina. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para mezclar una cantidad particular del diluyente con una cantidad particular de la preparación farmacéutica concentrada, con lo que se prepara una formulación final para inyección o infusión. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para tratar un sujeto con una cantidad eficaz de gelsolina. También se entenderá que los recipientes que contienen las preparaciones, ya sea que el recipiente sea una botella, un vial con un tabique, una ampolla con un tabique, una bolsa de infusión, y similar, pueden contener señales 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 invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo, que de ningún modo debería interpretarse como limitante adicionalmente.

Ejemplo

La gelsolina plasmática es una proteína segregada que circula en los fluidos extracelulares de seres humanos a concentraciones promedio de 250 mg/l. Diversos tipos de lesión tisular conducen a reducciones prolongadas en los niveles de gelsolina plasmática. Tras la lesión tisular grave encontrada en trauma grave, quemaduras, septicemia, cirugía importante y pacientes con trasplante de células madre hematopoyéticas, las disminuciones en los niveles de gelsolina hasta aproximadamente menos de 25% de lo normal preceden y, por lo tanto, predicen complicaciones asistenciales críticas medidas mediante requisitos de ventilación asistida, duración de la residencia en unidades de cuidado intensivo y permanencias hospitalarias globales, muerte y secuelas específicas tales como lesión pulmonar secundaria (por ejemplo, síndrome disneico del adulto (ARDS), lesión pulmonar aguda (ALI), síndromes de disfunción multiorgánica (MODS)). Reducciones similares de gelsolina plasmática en modelos de animales preceden a los cambios de la permeabilidad pulmonar e inflamación, y la infusión de gelsolina plasmática recombinante mejora estos efectos.

El mecanismo propuesto de agotamiento de la gelsolina es que se une a abundante actina en células expuestas por ruptura tisular. La gelsolina se une a mediadores inflamatorios bioactivos, ácido lisofosfatídico, fosfato de diadenosina, péptido A β (implicado como patógeno en la enfermedad de Alzheimer), factor activador de plaquetas, y posiblemente otros, y por lo tanto la pérdida de esta unión en la sangre mediante agotamiento de gelsolina periférica

puede explicar la promoción de lesión tisular secundaria y su inhibición por la reposición de gelsolina. Además, el tratamiento de ratones con gelsolina plasmática evita complicaciones letales de inyecciones de endotoxina, y retrasa significativamente la mortalidad en el modelo de septicemia bacteriana de ligadura y punción cecal.

Aunque el mecanismo protector de acción de gelsolina no está claro, las pruebas sugieren que inhibe múltiples mediadores inflamatorios que, ya sea debido a que surgen tardíamente tras la lesión primaria o debido a su persistencia, infligen complicaciones asistenciales críticas. La gelsolina está genéticamente muy conservada, sin signos de inmunogenicidad en seres humanos. No ha aparecido toxicidad tras la instilación de gelsolina plasmática humana recombinante en las vías respiratorias de seres humanos, o tras la infusión intravenosa en roedores y primates no humanos.

El curso de tiempo de la patogénesis de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), en la que los linfocitos inician una respuesta inmune frente a mielina neuronal y después más tarde una variedad de células efectoras participan en la destrucción neuronal, se correlaciona con el comienzo retrasado de otras lesiones secundarias afectadas de forma favorable por la gelsolina. La hipótesis sugerida por esta información fue que los niveles de gelsolina plasmática pueden caer en respuesta a la lesión inicial infligida en el modelo de EAE. Si es así, la sustitución de gelsolina periférica puede mejorar la lesión secundaria.

Se ensayó la hipótesis de que la administración periférica de gelsolina podría reflejar e impactar sobre los procesos patológicos en el sistema nervioso central. Los experimentos se llevaron a cabo sobre ratones con encefalomiелitis alérgica experimental EAE (EAE), un modelo clásico de roedor para esclerosis múltiple (MS) humana (Dittel B, Merchant R, Janeway C, Jr. Evidence for Fas-dependent and Fas-independent mechanisms in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 1999; 162:6392-6400). En apoyo de esta hipótesis se encuentra la bibliografía relativa al posible papel de la gelsolina en la enfermedad de Alzheimer (AD). Supuestamente, la gelsolina es un componente de placas de AD humanas, se une al péptido A β , y cuando se administra intraperitonealmente, elimina el péptido A β de los cerebros con AD de ratones con AD transgénicos que expresan niveles elevados de péptido A β (Matsuoka Y, Saito M, LaFrancois J, et al. Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to β -amyloid. J. Neurosci 2003; 23:29-33).

Como se muestra en la Figura 1, los niveles de gelsolina cayeron tras el comienzo de la lesión primaria de EAE, que implicó la transferencia adoptiva en ratones de ensayo irradiados de células T cebadas para unir proteínas básicas de mielina. Las barras de "control" muestran que la irradiación *per se* redujo de forma aguda los niveles de gelsolina plasmática, consistente con hallazgos previos en seres humanos sometidos a trasplante de células madre (DiNubile M, Stossel T, Ljunghusen O, Ferrara J, Antin J. Prognostic implications of declining plasma gelsolin levels after allogeneic stem cell transplantation. Blood 2002; 100:4367-4371). Hacia el día 4, los animales del control y los irradiados tuvieron niveles equivalentes de gelsolina plasmática. Sin embargo, los niveles de gelsolina de los animales de control continuaron elevándose hasta el día 7, y permanecieron constantes después. Los niveles de los animales con EAE cayeron posteriormente, y, aunque se elevaron en cierto modo subsiguientemente, siguieron persistentemente menores que los de los controles durante el día 21. Como se muestra en la Figura 2, este intervalo corresponde al comienzo, empeoramiento y remisión de las manifestaciones neurológicas de EAE.

Se llevó a cabo un ensayo terapéutico en el que un conjunto de animales de ensayo recibió subcutáneamente 8 mg de seroalbúmina bovina u 8 mg de gelsolina plasmática recombinante humana, una vez en el día diez (1x) o tres dosis en los días 2, 5 y 10 (3x). Se ha mostrado previamente que esta vía de administración y dosificación eleva los niveles de gelsolina agotados 50% por septicemia hasta el normal. Los niveles cayeron con un tiempo medio de 24 horas. Como se muestra en la Figura 2, el tratamiento con gelsolina 3x retrasó el comienzo, atenuó notablemente la gravedad, y apresuró la remisión de los síntomas.

La Figura 3 muestra los resultados de publicaciones previas que describen el curso de EAE en animales que carecen de funciones de integrina, estando las integrinas implicadas en la destrucción neuronal de este modelo y de esclerosis múltiple humana. Dos paneles muestran el efecto de un anticuerpo monoclonal dirigido contra integrinas $\alpha 4$, y otro representa el curso de EAE en ratones que carecen de integrinas $\beta 2$ (Kent S, Karlik S, Cannon C, et al. A monoclonal antibody to $\alpha 4$ integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis. J Neuroimmunol 1995; 58:1-10; Bullard D, Hu X, Schoeb T, Axtell R, Raman C, Barnum S. Critical requirement of CG11b (Mac-2) on T cells and accessory cells for development of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2005; 175:6327-62330). Los datos muestran que los efectos de la sustitución de gelsolina son tan buenos o mejores en el modelo de EAE que con la selección de integrina como diana. Los anticuerpos dirigidos contra integrinas $\alpha 4$ son el ingrediente activo en el producto Tysabri, desarrollado por Biogen-Idec and Elan, aprobado por la FDA como extremadamente eficaz frente a la esclerosis múltiple (Miller D, Khan O, Sheremata W, et al. A controlled trial of Natalizumab for relapsing multiple sclerosis. N. Engl J Med 2003; 348:15-23) y después retirado del mercado debido a una complicación grave, meningoleucoencefalitis polifocal (PML).

En resumen, los experimentos apoyan los dos aspectos de la hipótesis planteada, a saber, que las reducciones en los niveles de gelsolina plasmática preceden a las manifestaciones neurológicas de EAE, y que el tratamiento sistémico con gelsolina plasmática previene y/o suprime estas manifestaciones. Una correlación clínica de estas observaciones es que la monitorización en serie de los niveles de gelsolina plasmática podría formar parte de la

estrategia del manejo de la esclerosis múltiple, señalando cuándo intensificar la terapia antes de que se establezca el daño neurológico. Otra correlación es que parte de esta intensificación de la terapia puede incluir terapia con gelsolina. Una tercera correlación es que la elevación profiláctica de los niveles de gelsolina plasmática puede proteger a los pacientes con esclerosis múltiple de las secuelas neurológicas.

5 Medidas de gelsolina y albúmina:

- La gelsolina plasmática se mide típicamente en muestras por duplicado mediante su capacidad para estimular la nucleación de actina (Janmey, P. A., Chaponnier, C., Lind, S. E., Zaner, K. S., Stossel, T. P. y Yin, H. L. (1985) *Biochemistry* 24, 3714-23). Se diluye plasma de ratón 1:5 veces en 0,1 M de KCl, 0,2 mM de $MgCl_2$, 1 mM de EGTA, 0,5 mM de ATP, 0,5 mM de β -mercaptoetanol, 10 mM de amortiguador de Tris-HCl, pH 7,4 (Amortiguador B). De la muestra de plasma diluida, se añaden 5 μ l a 280 μ l de Amortiguador B suplementado con 1,5 mM de $CaCl_2$ y 0,4 μ M de falacina en tubos de cultivo de borosilicato de 6 x 50 mm. La reacción de polimerización de la actina se inicia añadiendo 15 μ l de 20 μ M de actina marcada con pireno en 0,5 mM de ATP, 5 mM de β -mercaptoetanol, 0,2 mM de $CaCl_2$, 0,2 mM de amortiguador de Tris-HCl, pH 7,4 (Amortiguador A). La polimerización se monitoriza durante 200 segundos en un espectrofluorímetro a longitudes de onda de excitación y de emisión de 366 y 386 nm, respectivamente. Las concentraciones de gelsolina se estiman a partir de una curva patrón usando pGSN humana recombinante. La actina marcada con pireno de la disolución madre para estos ensayos, preparada mediante el método de Kouyama y Mihashi (Kouyama, T. y Mihashi, K. (1981) *Eur J Biochem* 114, 33-8), se almacena a -80°C en lotes, se descongela y se diluye 10x con Amortiguador A, se centrifuga a 250.000 x g durante 30 minutos después de dejar reposar toda la noche.
- La cuantificación de la gelsolina mediante el ensayo de nucleación de la actina se correlaciona bien con los niveles obtenidos de las medidas de transferencia Western (Mounzer, K. C., Moncure, M., Smith, Y. R. y Dinubile, M. J. (1999) *Am J Respir Crit Care Med* 160, 1673-81). El ensayo es muy específico. Sin embargo, el ensayo no discrimina entre cGSN y pGSN. Tampoco es específico de la especie, y de este modo es capaz de aproximar los niveles de gelsolina total en ratones tratados con pGSN humana recombinante. Los lípidos que se complejen con pGSN no afectan a la actividad de nucleación de la actina debida a pGSN (Janmey, P. A., lida, K., Yin, H. L. y Stossel, T. P. (1987) *J Biol Chem* 262, 12228-36).

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

Equivalentes

- Se considera que la memoria descriptiva escrita anteriormente es suficiente para permitir a alguien de pericia normal en la técnica poner en práctica la invención. La presente invención no estará limitada en el alcance por los ejemplos proporcionados, puesto que los ejemplos están destinados a ser meras ilustraciones de uno o más aspectos de la invención. Otras realizaciones funcionalmente equivalentes se consideran dentro del alcance de la invención. Diversas modificaciones de la invención, además de aquellas mostradas y descritas aquí, serán manifiestas para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Cada una de las limitaciones de la invención puede englobar diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones de la invención que implica cualquier elemento o combinaciones de elementos se puede incluir en cada aspecto de la invención. Esta invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y el montaje de los componentes expuestos o ilustrados en los dibujos. La invención es capaz de otras realizaciones y de ser puesta en práctica o de ser llevada a cabo de diversas maneras.

También, la fraseología y terminología usada aquí es con fines descriptivos, y no se debe considerar limitante. El uso de "que incluye", "que comprende", o "que tiene", "que contiene", "que implica", y sus variaciones aquí, engloba los apartados enunciados después y sus equivalentes, así como apartados adicionales.

REIVINDICACIONES

1. Gelsolina para uso en un método para tratar un sujeto que tiene esclerosis múltiple, comprendiendo el método la administración múltiple de gelsolina al sujeto.
- 5 2. Gelsolina para uso en un método para tratar un sujeto que tiene esclerosis múltiple según la reivindicación 1, en el que el sujeto está de otro modo libre de indicaciones que requieran el tratamiento con gelsolina.
3. Gelsolina para uso en un método para tratar un sujeto que tiene esclerosis múltiple según la reivindicación 1, en el que el método comprende además administrar un segundo agente para tratar esclerosis múltiple.
- 10 4. Gelsolina para uso en un método para tratar un sujeto que tiene esclerosis múltiple según la reivindicación 3, en el que el segundo agente es interferón (IFN) - β 1b (Betaseron o Betaferon), IFN - β 1a (Avonex, Rebif), acetato de glatiramer (Copaxona), mitoxantrona (Novantrona), azatioprina, ciclosporina, metotrexato, ciclofosfamida, inmunoglobulina intravenosa, prednisona, metilprednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, hormona adreno-corticotrópica (ACTH), corticotropina, 2-clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina), inosina, anticuerpo anti-interleucina-2 (Zenapax, daclizumab), leucovorina, teriflunomida, estroprogestágenos, desogestrel, etinilestradiol, BHT-3009, ABT-874, vacuna de Bacilo Calmette-Guérin (BCG), vacunación con células T, CNTO 1275, Rituximab, Tysabri (natalizumab), N-acetilcisteína, minociclina, RO0506997, o una estatina.
- 15 5. Gelsolina para uso en un método para tratar un sujeto que tiene esclerosis múltiple según la reivindicación 1, en el que el método comprende además
seleccionar un sujeto sobre la base de que se sabe que el sujeto tiene un nivel de gelsolina al menos 10% menor que el nivel medio medido para una población aparentemente sana de sujetos; y
20 administrar gelsolina al sujeto en una cantidad eficaz para tratar al sujeto que tiene esclerosis múltiple.
6. Gelsolina para uso en un método para tratar un sujeto que tiene esclerosis múltiple según la reivindicación 5, en combinación con un segundo agente para tratar esclerosis múltiple.
7. Gelsolina para uso en un método para tratar un sujeto que tiene esclerosis múltiple, comprendiendo el método:
 - (i) tratar el sujeto con una primera terapia para tratar la esclerosis múltiple,
 - 25 (ii) obtener un nivel de gelsolina en el sujeto,
 - (iii) comparar el nivel de gelsolina obtenido en (ii) con un valor predeterminado que corresponde a un nivel predeterminado de gelsolina en una población de control aparentemente sana, y, si no se alcanza el nivel predeterminado de gelsolina,
 - 30 (iv) tratar el sujeto con un segundo agente para tratar la esclerosis múltiple, y repetir (ii) y (iii) hasta que se alcance el nivel predeterminado de gelsolina.
8. Un método para evaluar la eficacia de una terapia para tratar o reducir el riesgo de esclerosis múltiple en un sujeto, que comprende:
 - (i) obtener in vitro un nivel de gelsolina en sangre, plasma o suero de un sujeto sometido a terapia con un agente para tratar la esclerosis múltiple,
 - 35 (ii) comparar el nivel de gelsolina obtenido en (i) con un valor predeterminado que corresponde a un nivel predeterminado de gelsolina en una población de control aparentemente sana, y
 - (iii) determinar si el nivel de gelsolina en (i) está en o por encima del nivel predeterminado, siendo dicha determinación indicativa de si la terapia es eficaz.
9. El método de la reivindicación 8, en el que la etapa (i) y la etapa (ii) y/o la etapa (iii) se repiten para monitorizar los niveles de gelsolina del sujeto a lo largo del tiempo.
- 40 10. El método de la reivindicación 8, en el que el agente es gelsolina, interferón (IFN) - β 1b (Betaseron o Betaferon), IFN - β 1a (Avonex, Rebif), acetato de glatiramer (Copaxona), mitoxantrona (Novantrona), azatioprina, ciclosporina, metotrexato, ciclofosfamida, inmunoglobulina intravenosa, prednisona, metilprednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, hormona adreno-corticotrópica (ACTH), corticotropina, 2-clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina), inosina, anticuerpo anti-interleucina-2 (Zenapax, daclizumab), leucovorina, teriflunomida, estroprogestágenos, desogestrel, etinilestradiol, BHT-3009, ABT-874, vacuna de Bacilo Calmette-Guérin (BCG), vacunación con células T, CNTO 1275, Rituximab, Tysabri (natalizumab), N-acetilcisteína, minociclina, RO0506997, o una estatina.
- 45

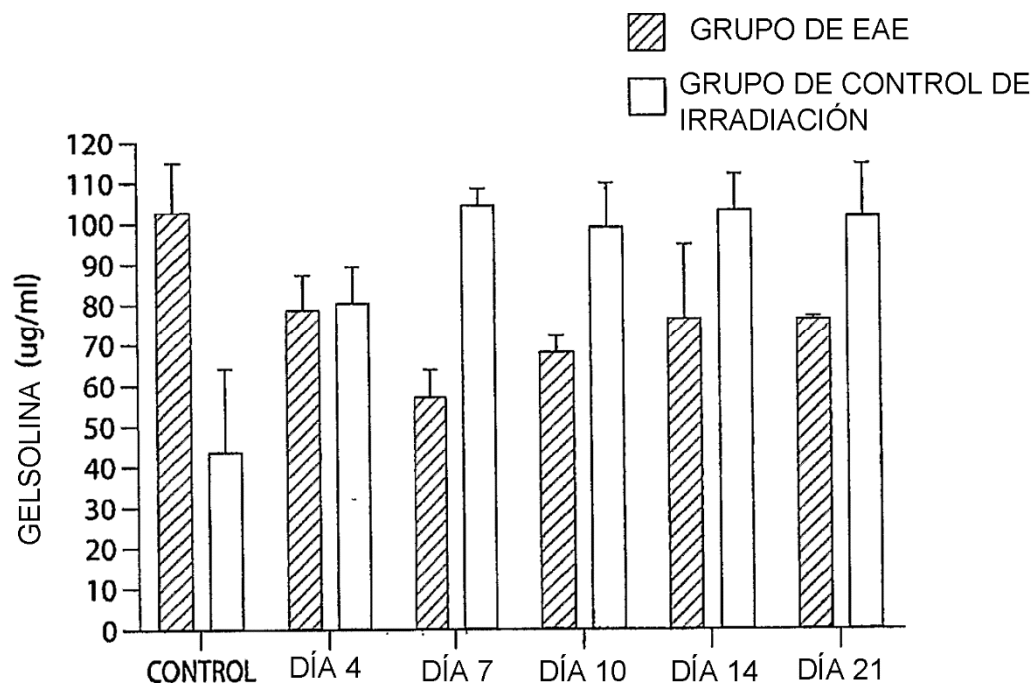


Fig. 1

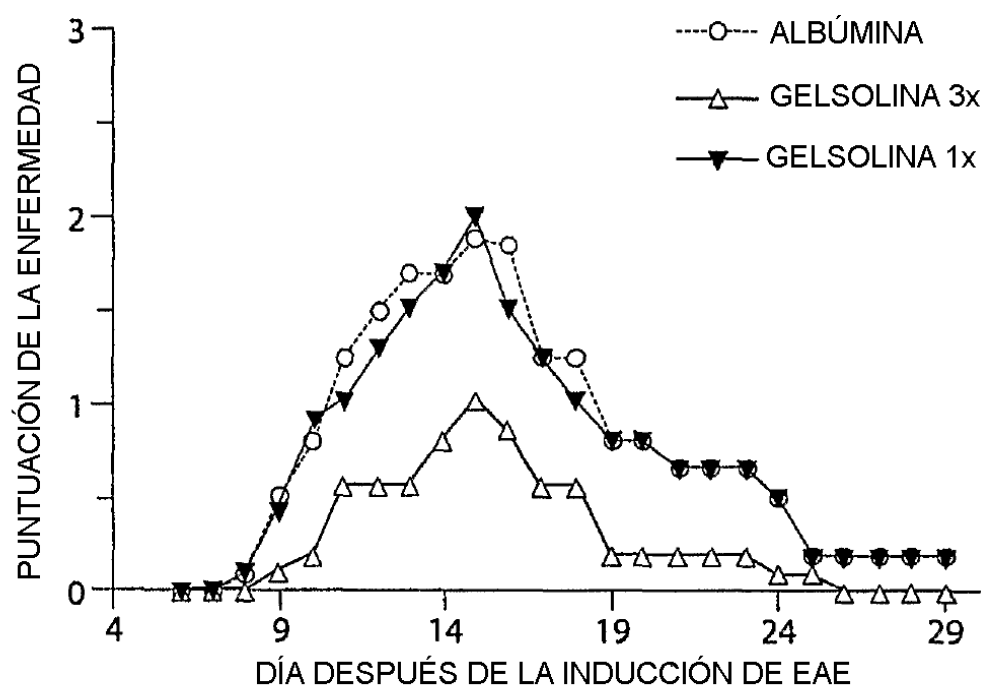


Fig. 2

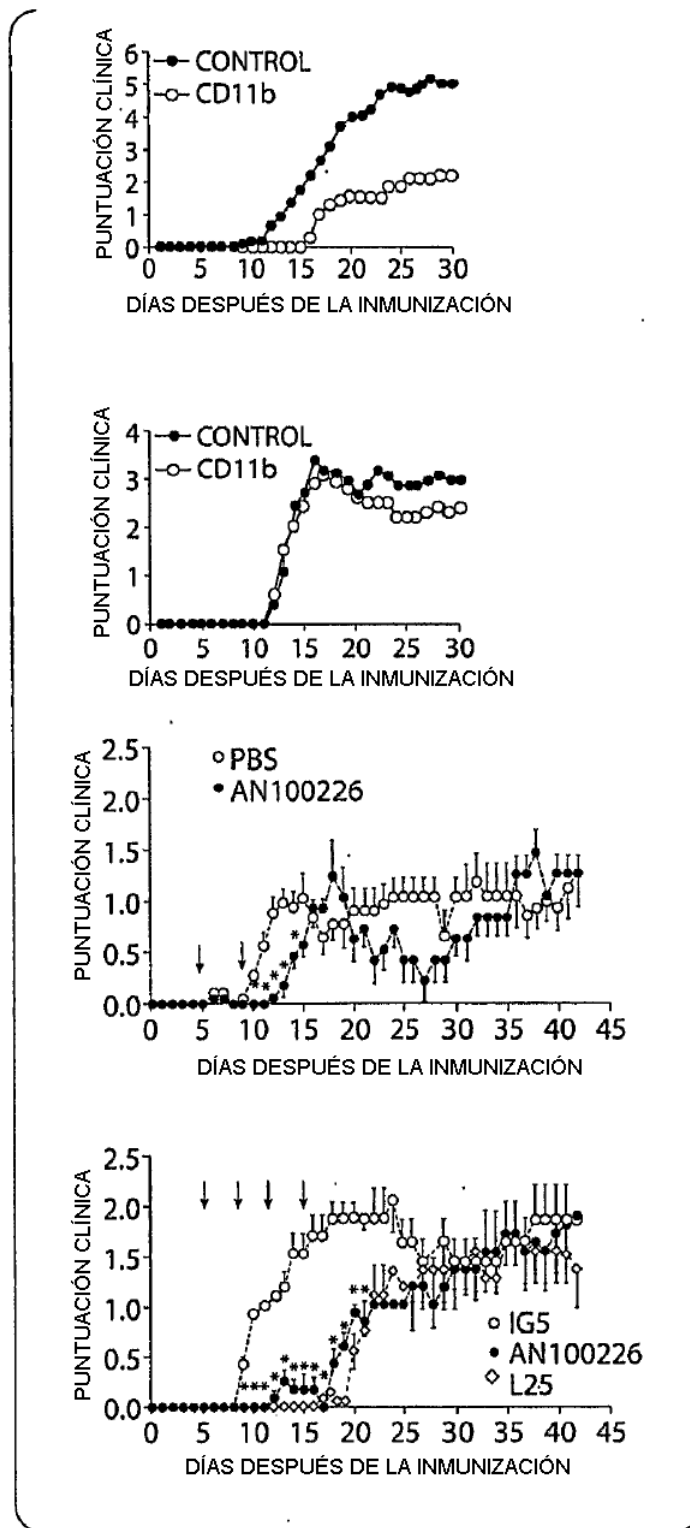


Fig. 3