

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 728**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2005 E 10185573 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2335722**

54 Título: **Uso de gelsolina para tratar infecciones**

30 Prioridad:

12.05.2004 US 570233 P

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

12.11.2019

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
75 Francis Street
Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 730 728 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 infecciones

Campo de la invención

5 La invención se refiere a métodos de identificación de si un sujeto se beneficiaría de la administración de un agente para reducir el riesgo de una infección bacteriana.

Antecedentes de la invención

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

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

Sumario de la invención

25 La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que gelsolina trata infecciones y protege frente a las manifestaciones tóxicas de las infecciones. Los presentes inventores han encontrado que ratones inyectados con gelsolina tras la exposición a un agente infeccioso sobrevivieron inesperadamente mejor que los ratones administrados con solución salina. Así, la invención implica en un aspecto, se proporciona un método de identificación de si un sujeto se beneficiaría de la administración de un agente para reducir el riesgo de una infección bacteriana, comprendiendo el método: obtener un nivel de gelsolina plasmática en el sujeto, comparar el nivel de gelsolina plasmática con un valor predeterminado, en el que el valor predeterminado es el nivel de gelsolina promedio de un grupo de población probado de individuos aparentemente sanos, y caracterizar el beneficio del sujeto de la administración de un agente para reducir el riesgo de una infección bacteriana basándose en el nivel de gelsolina plasmática de dicho sujeto en comparación con el valor predeterminado, en el que un nivel de gelsolina plasmática por debajo del valor predeterminado es indicativo de que el sujeto está en un alto riesgo de desarrollar una infección bacteriana y se beneficiaría de la administración de un agente para reducir el riesgo de una infección bacteriana, y en el que un nivel de gelsolina plasmática por encima del valor predeterminado es indicativo de que el sujeto no está en un alto riesgo de desarrollar una infección bacteriana y no se beneficiaría de la administración de un agente para reducir el riesgo de una infección bacteriana.

35 La gelsolina (GSN), específicamente la gelsolina citoplásmica (GSNc), descubierta por primera vez como una proteína de unión a actina intracelular implicada en la motilidad celular (Yin, H. L. y Stossel, T. P. (1979) Nature 281, 583-6) también es una proteína secretora abundante (Yin, H. L., Kwiatkowski, D. J., Mole, J. E. y Cole, F. S. (1984) J Biol Chem 259, 527-16). La isoforma exportada de la gelsolina, denominada gelsolina plasmática (GSNp), tiene 25 aminoácidos adicionales y se origina a partir del corte y empalme alternativo de un solo gen (Kwiatkowski, D. J., Stossel, T. P., Orkin, S. H., Mole, J. E., Colten, H. R. & Yin, H. L. (1986) Nature 323, 455-8).

En cada una de las siguientes realizaciones de la invención, se prefiere el uso de GSNp.

45 La infección bacteriana se puede causar por una bacteria Gram-negativa, una bacteria Gram-positiva, un bacilo acidorresistente, una espiroqueta, un actinomiceto, una especie de *Ureaplasma*, o una especie de *Mycoplasma*, o especie de *Chlamydia*.

50 Un "nivel de gelsolina por debajo de la normalidad" es un nivel de gelsolina que es al menos 10 % inferior al nivel medio medido para una población de sujetos dada. El nivel medio de gelsolina puede depender de la población de sujetos particular. Por ejemplo, una población aparentemente sana tendrá un intervalo de gelsolina "normal" diferente que el de una población de sujetos que había tenido una infección previa u otra afección. En algunas realizaciones, el nivel de gelsolina es al menos 10 % inferior al nivel medio medido para una población de sujetos dada. En otras realizaciones, el nivel de gelsolina es al menos 20 % inferior al nivel medio medido para una población de sujetos dada. En otras realizaciones más, el nivel de gelsolina es al menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % inferior al nivel medio medido para una población de sujetos dada. En una de las realizaciones preferidas, el nivel de gelsolina está por debajo de aproximadamente 2,4 µM/l (micromoles/litro) de plasma.

En algunas realizaciones, el sujeto está por lo demás libre de indicaciones que exijan el tratamiento con el agente para reducir el riesgo de una infección bacteriana. Cuando el agente es un agente antiinfeccioso, un sujeto libre de indicaciones que exija el tratamiento con un agente antiinfeccioso es un sujeto que no tiene signos o síntomas de una infección. Los expertos habituales en la técnica conocen bien los signos y los síntomas de una infección. La gelsolina se indica para el tratamiento de trastornos relacionados con actina tales como síndrome disneico del adulto (SDRA), necrosis hepática fulminante, insuficiencia renal aguda, lesión muscular, trastornos caracterizados por niveles elevados de BUN y/o creatinina. Los expertos habituales en la técnica conocen los trastornos relacionados con actina.

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

La gelsolina se puede administrar por vía oral, sublingual, bucal, intranasal, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, tópica, rectal, vaginal, intrasinoval o intravítrea.

En algunas realizaciones, el valor predeterminado es aproximadamente 2,4 µM/l de plasma o inferior.

Cada una de las limitaciones de la invención puede englobar diversas realizaciones de la invención. Se anticipa, por tanto, que cada una de las limitaciones de la invención que implica cualquier elemento o combinación de elementos se puede incluir en cada aspecto de la invención. La invención es capaz de otras realizaciones y de ser puesta en práctica o de ser llevada a cabo de diversas formas. Por tanto, la fraseología y terminología usada en el presente documento es con el fin de descripción y no se debe considerar como limitante. Se pretende que el uso de "que incluye", "que comprende" o "que tiene", "que contiene", "que implican", y sus variaciones en el presente documento, englobe los puntos enumerados a partir de aquí y sus equivalentes, así como puntos adicionales.

Estos y otros aspectos de la invención se describirán más abajo con más detalle a propósito de la descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras son únicamente ilustrativas y no se requieren para la adaptación de la invención desvelada en el presente documento.

La Figura 1 es un gráfico de niveles de gelsolina plasmática en ratones sépticos. (A) Se inyectaron ratones con dosis crecientes de LPS no letal por vía intraperitoneal (IP) y luego se extrajo sangre 24 horas después. El nivel de GSNp se correlacionó inversamente con las dosis de LPS ($P < 0,05$, correlación de Spearman). En cambio, no varió la albúmina. (B) Se sometieron ratones a CLP (ligadura y punción cecal) o no se sometieron a cirugía y se recogió plasma 24 horas después. El gráfico izquierdo muestra que los niveles de GSNp de ratones sometidos a CLP fueron significativamente más bajos que los de ratones de control ($P < 0,001$), mientras que el gráfico derecho muestra que los niveles de albúmina plasmática fueron en realidad mayores en ratones con CLP ($P = 0,02$).

La Figura 2 es un gráfico de supervivencia en ratones sépticos. (A) En los ratones expuestos a LPS letal, los tratados con GSNp tuvieron significativamente mejor supervivencia en comparación con los ratones tratados con BSA ($P < 0,001$) o solución salina ($P < 0,001$). (B) Los ratones sometidos a CLP tuvieron respuesta favorable similar a GSNp y tuvieron mucha mejor supervivencia ($P = 0,001$).

La Figura 3 es un gráfico de los niveles de GSNp en los ratones endotoxémicos letales tratados con o sin GSNp exógena. Las barras blancas indican ratones que recibieron tratamiento con solución salina y las barras negras indican ratones que recibieron tratamiento con GSNp exógena. Los niveles de GSNp endógena disminuyeron hasta próximos a 50 % de la normalidad en el plazo de 6 horas desde la exposición a LPS letal y persistieron durante al menos 24 horas ($*P < 0,015$, en comparación con los ratones sin exponer). La administración de GSNp exógena en el momento de la exposición a LPS aumentó satisfactoriamente los niveles de GSNp ($**P < 0,021$, en comparación con ratones tratados con GSNp y sin tratar dentro del mismo grupo).

La Figura 4 es un gráfico de los perfiles de citocinas de ratones endotoxémicos tratados con o sin GSNp 6 h y 24 h después de LPS (eje y en escala logarítmica). (A) Los perfiles de citocinas no se diferenciaron entre ratones tratados con GSNp (barras negras) y sin tratar (barras blancas) 6 horas después de la exposición a LPS. (B) Sin embargo, 24 horas después de LPS, los ratones tratados con solución salina tuvieron niveles significativamente más altos de GM-CSF, IFN- γ e IL-1 β ($P < 0,03$ para todos) de nada menos que 10 veces en comparación con los ratones tratados con GSNp. A diferencia, el nivel de IL-10 fue significativamente más alto en ratones tratados con GSNp ($P < 0,03$).

La Figura 5 es un gráfico de niveles de gelsolina plasmática en ratones C3H/HeJ expuestos a LPS de *E. coli* y sin exponer. El LPS no tuvo efecto sobre los niveles de GSNp de mutantes TLR4. Los ratones C3H/HeJ inyectados con LPS que fue letal para los ratones C57BL/6 no presentaron signos de enfermedades y tuvieron niveles de GSNp inalterados.

La Figura 6 es un análisis de transferencia Western, tinción para GSNp, en extractos de tejido de ratones expuestos con o sin LPS. La transferencia muestra que el pulmón tiene la mayor concentración de GSNp en comparación con músculo esquelético, corazón, riñón e hígado tanto en ratones normales como endotóxicos.

5 La Figura 7 es un gráfico que compara la unión a LPS de GSNp frente a BSA. El estudio de unión basado en fluorescencia de GSNp y LPS muestra una curva de unión clásica de LPS fluorescente que alcanzó una meseta a 250 µg/pocillo de GSNp. La proteína BSA, que sirve de control, mostró afinidad mínima por LPS.

La Figura 8 es un gráfico de niveles de TNF-α de medios de células THP-1 tratadas sin LPS (sin estimular), LPS solo, GSNp solo, LPS y GSNp, LPS y BSA, y BSA sola. Las células THP-1 estimuladas con LPS tratadas con GSNp o BSA tuvieron niveles similares de TNF-α (P>0,05).

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la administración de gelsolina protege a un sujeto de infección. Así, la divulgación incluye, en algunos aspectos, administrar gelsolina a un sujeto para el tratamiento de infección en el sujeto. Los presentes inventores han descubierto que la gelsolina antagoniza los efectos tóxicos de la endotoxina lipopolisacárido (LPS), el material de la pared celular de bacterias Gram-negativas que se conoce que es el responsable de muchas de las manifestaciones de la infección por bacterias Gram-negativas.

15 Los presentes inventores también han descubierto que la administración de gelsolina a un sujeto tras la exposición del sujeto a una infección puede tratar una infección y puede reducir o prevenir los efectos tóxicos de la infección en el sujeto. Preferentemente, el tratamiento de una infección implica el tratamiento de los signos y los síntomas de la infección.

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

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" significa cualquier mamífero que pueda estar en 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, hámsteres y ratas. Los sujetos preferidos son los sujetos humanos.

25 Como se usa en el presente documento, el término "gelsolina" engloba gelsolina no mutada (Nº de acceso de GenBank: X04412), isoformas, análogos, variantes, fragmentos o derivados funcionales de la gelsolina. La gelsolina engloba gelsolina nativa, así como sintética y recombinante, y análogos de gelsolina. La gelsolina, específicamente GSNc, es una proteína secretora abundante (Yin, H. L., Kwiatkowski, D. J., Mole, J. E. & Col, F. S. (1984) J Biol Chem 259, 5271-6). La isoforma exportada de la gelsolina, GSNp, tiene 25 aminoácidos adicionales y se origina a partir del corte y empalme alternativo de un solo gen (Kwiatkowski, D. J., Stossel, T. P., Orkin, S. H., Mole, J. E., Colten, H. R. & Yin, H. L. (1986) Nature 323, 455-8). En los diferentes aspectos y realizaciones de la invención, se prefiere el uso de GSNp.

30 Un "análogo de gelsolina" se refiere a un compuesto sustancialmente similar en función a cualquiera de 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, delecionadas, alargadas, sustituidas, o modificadas de otro modo, que poseen bioactividad sustancialmente similar a la de la gelsolina. Por ejemplo, un análogo de gelsolina es uno 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 reducir o prevenir los efectos de una infección. Un ejemplo del ensayo de bioactividad de gelsolina es la capacidad de la gelsolina para estimular la nucleación de actina. Los ensayos de bioactividad de la gelsolina se describen en el ejemplo y son conocidos por los expertos habituales en la técnica.

35 Un "fragmento" pretende incluir cualquier porción de una molécula de gelsolina que proporcione un segmento de gelsolina que mantiene la bioactividad de gelsolina; el término pretende incluir fragmentos de gelsolina que están hechos de cualquier fuente, tales como, por ejemplo, de secuencias de péptidos que existen de forma natural, secuencias de péptidos sintéticas o químicamente sintetizadas, y secuencias de péptidos genéticamente manipuladas.

40 Una "variante" de gelsolina pretende referirse a un compuesto sustancialmente similar en estructura y bioactividad tanto a la gelsolina nativa como a un fragmento de la misma.

45 Un "derivado funcional" de gelsolina es un derivado que posee una bioactividad que es sustancialmente similar a la bioactividad de la gelsolina. Por "sustancialmente similar" se indica la actividad que es cuantitativamente diferente, pero cualitativamente la misma. Por ejemplo, un derivado funcional de gelsolina podría contener el mismo esqueleto 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 covalentemente unido,

dependiendo de la necesidad de dichas modificaciones para el rendimiento del ensayo de diagnóstico o tratamiento terapéutico. Como se usa en el presente documento, el término también pretende incluir un derivado químico de gelsolina. Dichos derivados pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica, de la gelsolina, etc. Los derivados también pueden disminuir la toxicidad de la gelsolina, o eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseable de la gelsolina, etc. Los derivados, y específicamente, los restos químicos capaces de mediar en dichos efectos, se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences (1980). Se conocen bien en la técnica procedimientos de acoplamiento de dichos restos a una molécula tal como gelsolina. El término "derivado funcional" pretende incluir los "fragmentos", "variantes", "análogos" o "derivados químicos" de la gelsolina.

La divulgación implica en algunos aspectos métodos de tratamiento de infección en un sujeto. Los métodos implican administrar gelsolina a un sujeto para tratar la infección. Se conoce que el sujeto tiene, se sospecha que ha estado expuesto a, o está en riesgo de estar expuesto a, o se ha expuesto a, una infección. La gelsolina se administra en una cantidad eficaz para tratar la infección en el sujeto.

Se puede medir una respuesta a un método de tratamiento de la divulgación, por ejemplo, determinando los efectos fisiológicos del tratamiento, tales como la disminución o ausencia de síntomas tras la administración del tratamiento.

Una "infección" o "enfermedad infecciosa", como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno que surge de la invasión de un hospedador, superficialmente, locamente, o por vía sistémica, por un organismo infeccioso.

Las bacterias incluyen bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Los ejemplos de bacterias Gram-positivas incluyen especies de *Pasteurella*, especies de *Staphylococcus* que incluyen *Staphylococcus aureus*, especies de *Streptococcus* que incluyen grupo A de *Streptococcus pyogenes*, grupo de *Streptococcus viridans*, grupo B de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus bovis*, especies anaerobias de *Streptococcus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus faecalis*, *Bacillus anthracis*, especies de *Corynebacterium* que incluyen *Corynebacterium diphtheriae*, especies aerobias de *Corynebacterium* y especies anaerobias de *Corynebacterium*, especies de difteroides, especies de *Listeria* que incluyen *Listeria monocytogenes*, especies de *Erysipelothrix* que incluyen *Erysipelothrix rhusiopathiae*, especies de *Clostridium* que incluyen *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani* y *Clostridium difficile*.

Las bacterias Gram-negativas incluyen especies de *Neisseria* que incluyen *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*, especies de *Branhamella* que incluyen *Branhamella catarrhalis*, especies de *Escherichia* que incluyen *Escherichia coli*, especies de *Enterobacter*, especies de *Proteus* que incluyen *Proteus mirabilis*, especies de *Pseudomonas* que incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mallei* y *Pseudomonas pseudomallei*, especies de *Klebsiella* que incluyen *Klebsiella pneumoniae*, especies de *Salmonella*, especies de *Shigella*, especies de *Serratia*, especies de *Acinetobacter*, especies de *Haemophilus* que incluyen *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus ducreyi*, especies de *Brucella*, especies de *Yersinia* que incluyen *Yersinia pestis* y *Yersinia enterocolitica*, especies de *Francisella* que incluyen *Francisella tularensis*, especies de *Pasteurella* que incluyen *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, especies de *Flavobacterium*, meningosepticum, especies de *Campylobacter* que incluyen *Campylobacter jejuni*, especies de *Bacteroides* (orales, faríngeas) que incluyen *Bacteroides fragilis*, especies de *Fusobacterium* que incluyen *Fusobacterium nucleatum*, *Calymmatobacterium granulomatis*, especies de *Streptobacillus* que incluyen *Streptobacillus moniliformis*, especies de *Legionella* que incluyen *Legionella pneumophila*.

Otros tipos de bacterias incluyen bacilos acidorresistentes, esquiropetas y actinomicetos.

Los ejemplos de bacilos acidorresistentes incluyen especies de *Mycobacterium* que incluyen *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*.

Los ejemplos de esquiropetas incluyen especies de *Treponema* que incluyen *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, especies de *Borrelia* que incluyen *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme) y *Borrelia recurrentis*, y especies de *Leptospira*.

Los ejemplos de actinomicetos incluyen: especies de *Actinomyces* que incluyen *Actinomyces israelii* y especies de *Nocardia* que incluyen *Nocardia asteroides*.

Un aspecto de la divulgación se refiere a la medición de gelsolina para guiar los tratamientos para mejorar el resultado en los sujetos. Los niveles de gelsolina en terapia tienen valor predictivo para respuesta a tratamientos de infecciones o septicemia. Los niveles de gelsolina en terapia son aditivos a los factores pronósticos del estado de la técnica de resultado en infecciones.

Los sujetos que se beneficiarían de este aspecto de la presente divulgación son sujetos que están recibiendo terapia para tratar o prevenir una infección (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 una infección. La terapia puede ser cualquiera de los agentes terapéuticos citados en el presente documento. La terapia también puede ser tratamientos no farmacéuticos. En realizaciones importantes, la terapia es una que aumenta 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 se beneficiará lo más probablemente de la presente invención es un sujeto humano en terapia y que tiene un nivel de gelsolina por debajo de aproximadamente 2,4 $\mu\text{M/l}$ de plasma.

5 En algunas realizaciones, el sujeto ya tiene o ha tenido una infección. Un sujeto que tiene o ha tenido una (primera) infección primaria bacteriana, viral, fúngica, parasítica o protozoica puede estar en alto riesgo de una (segunda) infección secundaria. En algunas realizaciones, el sujeto no ha tenido una infección primaria, pero está en alto riesgo de tener una infección debido a que el sujeto tiene uno o más factores de riesgo para tener una infección. Los factores de riesgo para una infección primaria incluyen: inmunosupresión, inmunodepresión, edad, traumatismo, quemaduras (por ejemplo, quemaduras térmicas), cirugía, cuerpos extraños, cáncer, recién nacidos, especialmente recién nacidos prematuramente. El grado de riesgo de una infección depende de la multitud y la gravedad o la magnitud de los factores de riesgo que tiene el sujeto. Están disponibles gráficas de riesgos y algoritmos de predicción para evaluar el riesgo de una infección en un sujeto basándose en la presencia y gravedad de factores de riesgo.

Los expertos habituales en la técnica conocen otros métodos de evaluación del riesgo de una infección en un sujeto.

15 En otras realizaciones más, el sujeto ha tenido una infección primaria y tiene uno o varios de otros factores de riesgo.

El tratamiento preferido de la presente divulgación es gelsolina. La gelsolina se puede administrar sola, en una composición farmacéutica o combinada con otras pautas terapéuticas. La gelsolina y otro(s) agente(s) terapéutico(s) se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente. Cuando los otros agentes terapéuticos se administran simultáneamente, se pueden administrar en las mismas formulaciones o separadas, pero se administran al mismo tiempo. Los otros agentes terapéuticos se pueden administrar secuencialmente entre sí y con gelsolina cuando la administración de los otros agentes terapéuticos y la gelsolina se separa temporalmente. La separación en el tiempo entre la administración de estos compuestos puede ser una cuestión de minutos o puede ser mayor. Otros agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agente(s) antiinfeccioso(s). Los ejemplos de agente(s) antiinfeccioso(s) incluyen: agente(s) antibacteriano(s), agente(s) antiviral(es), agente(s) antifúngico(s) o agente(s) antiprotozoico(s).

25 Los términos tales como "agente antiinfeccioso", "agente antibacteriano", "agente antiviral", "agente antifúngico", "agente antiparasítico" y "parasiticida" tienen significados bien establecidos para los expertos habituales en la técnica y se definen en libros de texto convencionales. Brevemente, los agentes antibacterianos destruyen o inhiben el crecimiento o la función de las bacterias. Los agentes antibacterianos incluyen antibióticos, así como otros compuestos sintéticos o naturales que tienen funciones similares. Los antibióticos, normalmente, son moléculas de bajo peso molecular que se producen como metabolitos secundarios por células, tales como microorganismos. En general, los antibióticos interfieren con una o más funciones bacterianas o estructuras que son específicas para el microorganismo y que no están presentes en células hospedadoras.

35 Una clase grande de agentes antibacterianos es los antibióticos. Los antibióticos que son eficaces para la destrucción o inhibición de un amplio intervalo de bacterias se denominan antibióticos de amplio espectro. Otros tipos de antibióticos son predominantemente eficaces contra las bacterias de la clase Gram-positiva o Gram-negativa. Estos tipos de antibióticos se denominan antibióticos de estrecho espectro. Otros antibióticos que son eficaces contra un único organismo o enfermedad y no contra otros tipos de bacterias se denominan antibióticos de espectro limitado. Los agentes antibacterianos se clasifican algunas veces basándose en su modo de acción primario. En general, los agentes antibacterianos son inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhibidores de la membrana celular, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos o funcionales, e inhibidores competitivos.

Los agentes antibacterianos incluyen, pero no se limitan a, aminoglucósidos, agentes β -lactámicos, cefalosporinas, macrólidos, penicilinas, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas. Los ejemplos de agentes antibacterianos incluyen, pero no se limitan a: Acedapsona, acetosulfona sódica, alamecina, alexidina, amdinocilina, clavulanato potásico, amdinocilina, amdinocilina pivoxilo, ampicilina, amifloxacina, mesilato de amifloxacina, amikacina, sulfato de amikacina, aminoácido salicílico, aminosalicilato sódico, amoxicilina, anfomicina, ampicilina, ampicilina sódica, apalcilina sódica, apramicina, aspartocina, sulfato de astromicina, avilamicina, avoparcina, azitromicina, azlocilina, azlocilina sódica, clorhidrato de bacampicilina, bacitracina, metilendisalicilato de bacitracina, bacitracina cinc, bambermicinas, benzoilpas cálcico, beritromicina, sulfato de betamicina, biapenam, biniramicina, clorhidrato de bifenamina, bispirtionina magsulfex, butikacina, sulfato de butirosina, sulfato de capreomicina, carbadox, carbenicilina disódica, carbenicilina indanil sódica, carbenicilina fenil sódica, carbenicilina potásica, carumonam sódico, cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, nafato de cefamandol, cefamandol sódico, cefaparol, cefatrizina, cefazaflur sódico, cefazolina, cefazolina sódica, cefbuperazona, cefdinir, cefditoren pivoxilo, cefepima, clorhidrato de cefepima, cefetecol, cefixima, clorhidrato de cefmenoxima, cefmetazol, cefmetazol sódico, cefonicid monosódico, cefonicid sódico, cefoperazona sódica, ceforanida, cefotaxima, cefotaxima sódica, cefotetan, cefotetan disódico, clorhidrato de cefotiam, cefoxitina, cefoxitina sódica, cefpimizol, cefpimizol sódico, cefpiramida, cefpiramida sódica, sulfato de cefpiroma, cefpodoxima proxetilo, cefprozilo, cefroxadina, cefsulodina sódica, ceftazidima, ceftazidima sódica, ceftibuteno, ceftizoxima sódica, ceftriaxona sódica, cefuroxima, cefuroxima axetilo, cefuroxima pivoxetilo, cefuroxima sódica, cefacetilo sódico, cefalexina, clorhidrato de cefalexina, cefaloglicina, cefaloridina, cefalotina sódica, cefapirina sódica, cefradina, clorhidrato de cetociclina, cetofenicol, cloranfenicol, palmitato de cloranfenicol, complejo

de pantotenato de cloranfenicol, succinato sódico de cloranfenicol, fosfanilato de clorhexidina, cloroxilenol, bisulfato de clortetraciclina, clorhidrato de clortetraciclina, cilastatina, cinoxacina, ciprofloxacina, clorhidrato de ciprofloxacina, cirolemicina, claritromicina, clavulanato potásico, clorhidrato de clinafloxacina, clindamicina, dextrosa de clindamicina, clorhidrato de clindamicina, clorhidrato de palmitato de clindamicina, fosfato de clindamicina, 5 clofazimina, cloxacilina benzatina, cloxacilina sódica, cloxiquina, colistimetato, colistimetato sódico, sulfato de colistina, coumermicina, coumermicina sódica, ciclacilina, cicloserina, dalfopristina, dapsona, daptomicina, demeclociclina, clorhidrato de demeclociclina, demeciclina, denofungina, diaveridina, dicloxacilina, dicloxacilina sódica, sulfato de dihidroestreptomicina, dipirritona, diritromicina, doxiciclina, doxiciclina cálcica, doxiciclina fosfatex, hiclato de doxiciclina, monohidrato de doxiciclina, droxacina sódica, enoxacina, epicilina, clorhidrato de 10 epitetraciclina, ertapenem, eritromicina, acistrato de eritromicina, estolato de eritromicina, etilsuccinato de eritromicina, gluceptato de eritromicina, lactobionato de eritromicina, propionato de eritromicina, estearato de eritromicina, clorhidrato de etambutol, etionamida, fleroxacina, floxacilina, fludalanina, flumequina, fosfomicina, fosfomicina trometamina, fumoxicilina, cloruro de furazolio, tartrato de furazolio, fusidato sódico, ácido fusídico, gatifloxacina, genifloxacina, sulfato de gentamicina, gloximonom, gramicidina, haloprogina, hetacilina, hetacilina 15 potásica, hexedina, ibafloxacina, imipenem, isoconazol, isepamicina, isoniazida, josamicina, sulfato de kanamicina, kitasamicina, levofloxacina, levofuraltadona, levopropilcilina potásica, lexitromicina, lincomicina, clorhidrato de lincomicina, linezolid, lomefloxacina, clorhidrato de lomefloxacina, mesilato de lomefloxacina, loracarbef, mafenida, meclociclina, sulfosalicilato de meclociclina, fosfato de megalomicina potásico, mequidox, meropenem, metaciclina, clorhidrato de metaciclina, metenammina, hipurato de metenammina, mandelato de metenammina, meticilina sódica, 20 metioprim, clorhidrato de metronidazol, fosfato de metronidazol, mezlocilina, mezlocilina sódica, minociclina, clorhidrato de minociclina, clorhidrato de mirincamicina, monensina, monensina sódica, clorhidrato de moxifloxacina, nafcilina sódica, nalidixato sódico, ácido nalidíxico, natamicina, nebramicina, palmitato de neomicina, sulfato de neomicina, undecilenato de neomicina, sulfato de netilmicina, neutramicina, nifuradeno, nifuraldeazona, nifuratel, nifuratrona, nifurdazilo, nifurimida, nifurpirinol, nifurquinazol, nifurtiazol, nitrociolina, nitrofurantoína, nitromida, 25 norfloxacina, novobiocina sódica, ofloxacina, ormetoprim, oxacilina sódica, oximonam, oximonam sódico, ácido oxolínico, oxitetraciclina, oxitetraciclina cálcica, clorhidrato de oxitetraciclina, paldimicina, paraclorfenol, paulomicina, pefloxacina, mesilato de pefloxacina, penamecilina, penicilina G benzatina, penicilina G potásica, penicilina G procaína, penicilina G sódica, penicilina V, penicilina V, benzatina, penicilina V hidrabamina, penicilina V 30 potásica, pentizidona sódica, fenilaminosalicilato, piperacilina, piperacilina sódica, pirbenicilina sódica, piridicilina sódica, clorhidrato de pirlimicina, clorhidrato de pivampicilina, pamoato de pivampicilina, probenato de pivampicilina, sulfato de polimixina b, porfiromicina, propicacina, pirazinamida, piritona cinc, acetato de quindecamina, quinupristina, racefenicol, ramoplanina, ranimicina, relomicina, repromicina, rifabutina, rifametano, rifamexilo, rifamida, rifampina, rifapentina, rifaximina, rolitetraciclina, nitrato de rolitetraciclina, rosaramicina, butirato de 35 rosaramicina, propionato de rosaramicina, fosfato de rosaramicina sódica, estearato de rosaramicina, rosoxacina, roxarsona, roxitromicina, sanciclina, sanfetrinem sódico, sarmoxicilina, sarcipilina, escopafungina, sisomicina, sulfato de sisomicina, esparfloxacina, clorhidrato de espectinomicina, espiramicina, clorhidrato de estalimicina, estefimicina, ticarcilina disódica estéril, sulfato de estreptomicina, estreptonicozida, sulbactam sódico, sulfabenz, sulfabenzamida, sulfacetamida, sulfacetamida sódica, sulfacitina, sulfadiazina, sulfadiazina sódica, sulfadoxina, sulfaleno, sulfamerazina, sulfameter, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfamonometoxina, sulfamoxol, sulfanilato 40 cinc, sulfanitrán, sulfasalazina, sulfasomizol, sulfatiazol, sulfazamet, sulfisoxazol, sulfisoxazol acetilo, sulfisoxazol diolamina, sulfomixina, sulopenem, sultamicilina, suncilina sódica, clorhidrato de talampicilina, tazobactam, teicoplanina, clorhidrato de temafloxacina, temocilina, tetraciclina, clorhidrato de tetraciclina, complejo de fosfato de tetraciclina, tetroxoprim, tianfenicol, tifencilina potásica, ticarcilina cresil sódica, ticarcilina disódica, ticarcilina monosódica, ticlatona, cloruro de tiodonio, tobramicina, sulfato de tobramicina, tosufloxacina, trimetoprim, sulfato de 45 trimetoprim, trisulfapirimidinas, troleandomicina, sulfato de trospectomicina, trovafloxacina, tirotricina, vancomicina, clorhidrato de vancomicina, virginiamicina, zorbamicina.

Los agentes antivirales se pueden aislar de fuentes naturales o sintetizarse y son útiles para destruir o inhibir el crecimiento o la función de virus. Los agentes antivirales son compuestos que previenen la infección de células por virus o la replicación del virus dentro de la célula. Existen varios estados dentro del proceso de infección viral que se 50 pueden bloquear o inhibir por agentes antivirales. Estos estados incluyen unión del virus a la célula hospedadora (inmunoglobulina o péptidos de unión), desnudado del virus (por ejemplo, amantadina), síntesis o traducción de ARNm viral (por ejemplo, interferón), replicación de ARN o ADN viral (por ejemplo, análogos de nucleótidos), maduración de nuevas proteínas de virus (por ejemplo, inhibidores de la proteasa), y gemación y liberación del virus.

Los agentes antivirales útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a: inmunoglobulinas, amantadina, 55 interferones, análogos de nucleótidos e inhibidores de la proteasa. Los ejemplos específicos de antivirales incluyen, pero no se limitan a, acemanano; aciclovir; aciclovir sódico; adefovir; alovudina; alvircept sudotox; clorhidrato de amantadina; arantona; arildona; mesilato de atevirdina; avridina; cidofovir; cipamfilina; clorhidrato de citarabina; mesilato de delavirdina; desciclovir; didanosina; disoxarilo; edoxudina; envirodeno; enviroxima; famciclovir; clorhidrato de famotina; fiacitabina; fialuridina; fosarilato; foscarnet sódico; fosfonet sódico; ganciclovir; ganciclovir sódico; idoxuridina; cetoxal; lamivudina; lobucavir; clorhidrato de memotina; metisazona; nevirapina; penciclovir; 60 pirodovir; ribavirina; clorhidrato de rimantadina; mesilato de saquinavir; clorhidrato de somantadina; sorivudina; estatolona; estavudina; clorhidrato de tilorona; trifluridina; clorhidrato de valaciclovir; vidarabina; fosfato de vidarabina; fosfato sódico de vidarabina; viroxima; zalcitabina; zidovudina; y zinviroxima.

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

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

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

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

40 En la práctica de la presente invención, se requiere 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 beneficie de la terapia continuada. El sujeto se puede caracterizar entonces en términos del beneficio neto que probablemente se va a obtener de un cambio en la terapia.

45 Se puede obtener el nivel de gelsolina para el sujeto por cualquier método reconocido en la técnica. Normalmente, el nivel se determina midiendo el nivel del marcador en un líquido corporal, por ejemplo, sangre, linfa, saliva, orina y similares. El nivel se puede determinar por ELISA, o inmunoensayos u otras técnicas convencionales para determinar la presencia del marcador. Los métodos convencionales incluyen envío de una muestra(s) del líquido corporal de un sujeto a un laboratorio comercial para la medición. Los métodos de medición de gelsolina se describen en el ejemplo.

La invención también implica comparar el nivel de gelsolina para el sujeto con un valor predeterminado. El valor predeterminado puede adoptar una variedad de formas. Puede ser un valor de corte único, tal como una mediana o media

50 El líquido corporal preferido es sangre. Un valor de gelsolina predeterminado preferido es aproximadamente 2,4 μ M/l de plasma.

55 Un valor de gelsolina predeterminado importante es un valor que es el promedio para una población de sujetos sanos (es decir, sujetos que ni tienen signos ni síntomas de enfermedad). El valor predeterminado dependerá, por supuesto, de las características de la población de sujetos en la que se encuentra el sujeto. En la caracterización del riesgo, se pueden establecer numerosos valores predeterminados.

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

La invención comprende además medir el nivel de gelsolina junto con un nivel de otro marcador de infección tal como, por ejemplo, un nivel glóbulos blancos (WBCs) para caracterizar el riesgo de un sujeto de desarrollar una infección. Se obtiene un nivel de gelsolina en el sujeto. El nivel de gelsolina se compara con un valor predeterminado para establecer un primer valor de riesgo. También se obtiene un nivel de WBCs en el sujeto. Se compara el nivel de WBCs en el sujeto con un segundo valor predeterminado para establecer un segundo valor de riesgo. Entonces se caracteriza el perfil de riesgo del sujeto de desarrollar una infección basándose en la combinación del primer valor de riesgo y 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 del primer y segundo valores de riesgo. En algunas realizaciones, el tercer valor de riesgo es mayor que cualquiera del primer y segundo valores de riesgo. Los sujetos preferidos para los valores de ensayo y predeterminados son como se han descrito anteriormente. La infección puede ser cualquier infección tal como se ha descrito anteriormente.

La invención proporciona métodos de determinación de si un sujeto se beneficiará de la terapia continuada o se beneficiará de un cambio en la terapia. El beneficio normalmente es una reducción en la tasa de manifestación de una infección o una recuperación más rápida de una infección. Es clínicamente útil la determinación de si un sujeto se beneficiará de la terapia continuada o se beneficiará de un cambio en la terapia. Un ejemplo de utilidad clínica de los métodos de la presente invención incluye identificar sujetos que es menos probable o más probable que respondan a una terapia. Los métodos de la invención también son útiles en la predicción o determinación de que un sujeto se beneficiará de la terapia continuada o se beneficiará de un cambio en la terapia. Otro ejemplo de utilidad clínica, en el caso de sujetos humanos incluye, por ejemplo, ayudar a 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 usen ahora la presente invención para determinar criterios de entrada para los ensayos clínicos.

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

Como se usa en el presente documento, un "cambio en terapia" se refiere a un aumento o disminución en la dosis de la terapia existente, un cambio de una terapia a otra terapia, una adición de otra terapia a la terapia existente, o una combinación de los mismos. Un cambio de una terapia a otra puede implicar un cambio a una terapia con un perfil de riesgo elevado pero donde aumenta la probabilidad de beneficio esperado. En algunas realizaciones, las terapias preferidas son terapias que aumentan los niveles de gelsolina. Un sujeto que se beneficiará de un cambio en la terapia aumentando la dosis de la terapia existente es un sujeto que, por ejemplo, estaba en la terapia pero no estaba recibiendo la máxima dosis tolerada o la máxima dosis permitida de la terapia y cuyo nivel de gelsolina no alcanzó un cierto valor predeterminado. En dichos casos, se aumenta la dosis de la terapia existente hasta que el nivel de gelsolina alcance un cierto valor predeterminado. En algunos casos, se aumenta la dosis de la terapia existente desde la dosis existente hasta una mayor dosis que no es la máxima dosis tolerada ni la máxima dosis permitida de la terapia. En otros casos, se aumenta la dosis hasta la máxima dosis tolerada o hasta la máxima dosis permitida de la terapia. Un sujeto que se beneficiará de un cambio en la terapia disminuyendo la dosis de la terapia existente es, por ejemplo, un sujeto cuyo nivel de gelsolina en terapia alcanza o puede alcanzar un cierto valor predeterminado con una dosis de la terapia más baja.

Un sujeto que se beneficiará de un cambio de una terapia a otra terapia es, por ejemplo, un sujeto que estaba en la máxima dosis tolerada o la máxima dosis 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 máxima dosis tolerada o la máxima permitida de la terapia pero un profesional sanitario determinó que se beneficiará más probablemente de otra terapia. Dichas determinaciones se basan, por ejemplo, en el desarrollo en el sujeto de efectos secundarios no deseados en la terapia inicial o una falta de respuesta a la terapia inicial.

Un sujeto que se beneficiará de un cambio en la terapia mediante 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 dichos 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 en aumentar el nivel de gelsolina que la terapia existente. En algunos casos, se puede usar una combinación de los cambios anteriormente mencionados en la terapia.

La divulgación también proporciona métodos de determinación de la eficacia de una terapia. La eficacia normalmente es la eficacia de la terapia en aumentar el nivel de gelsolina. Esto también se denomina algunas veces una respuesta positiva o una respuesta favorable. Se puede determinar la eficacia por un análisis de gelsolina en sangre para determinar si aumentan los niveles de gelsolina como resultado de la terapia. En algunas realizaciones, la determinación de la eficacia se basa en la eficacia de una terapia en aumentar tanto la gelsolina como en normalizar los números de WBCs.

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

La divulgación también proporciona métodos de decisión del curso de una terapia en un sujeto que recibe terapia para tratar una infección. Dicho curso de terapia se decide basándose en el nivel de gelsolina. Las terapias para tratar o reducir el riesgo de una infección son como se han descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el sujeto ya ha tenido una infección o está en riesgo de tener una infección. Un sujeto que ha tenido una (primera) infección primaria está en un alto riesgo de una (segunda) infección secundaria debido a la infección primaria. En algunas realizaciones, el sujeto está en un alto riesgo de una infección debido a que el sujeto tiene uno o más factores de riesgo para tener una infección. Los ejemplos de factores de riesgo para tener una infección son como se han descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el sujeto que está en un alto riesgo de una infección puede ser un sujeto aparentemente sano. Un sujeto aparentemente sano es un sujeto que ni tiene signos ni síntomas de enfermedad.

Estos métodos tienen implicaciones importantes para el tratamiento de pacientes y también para el desarrollo clínico de nuevas terapias. También se espera que los investigadores clínicos usen ahora los presentes métodos para determinar criterios de entrada para sujetos humanos en ensayos clínicos. Los profesionales sanitarios seleccionan pautas terapéuticas para el tratamiento basándose en el beneficio neto esperado para el sujeto. El beneficio neto deriva de la relación entre riesgo y beneficio. La presente invención permite la determinación de si un sujeto se beneficiará de la terapia continuada o se beneficiaría de un cambio en la terapia, ayudando así al médico a seleccionar una terapia.

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

Una cantidad eficaz es una dosificación del agente terapéutico suficiente para proporcionar un resultado medicamente deseable. Una cantidad eficaz puede depender, por tanto, por ejemplo, del grado al que un individuo tiene niveles de gelsolina anormalmente reducidos. Se debe entender que los agentes terapéuticos de la invención se usan para tratar o prevenir infecciones, es decir, se pueden usar profilácticamente en sujetos en riesgo de desarrollar una infección. Así, una cantidad eficaz es la cantidad que puede reducir el riesgo de, ralentizar o quizás prevenir por completo el desarrollo de una infección. Se reconocerá cuando el agente terapéutico se usa en circunstancias agudas, se usa para prevenir uno o más resultados medicamente no deseables que normalmente surgen de dichos acontecimientos adversos.

Los expertos habituales en la técnica conocen bien los factores implicados en determinar una cantidad eficaz y se pueden tratar son más que una experimentación rutinaria. Generalmente se prefiere que se use una dosis máxima de los agentes farmacológicos de divulgación (solos o en combinación con otros agentes terapéuticos), es decir, la mayor dosis segura según el criterio médico sensato. Sin embargo, se entenderá por los expertos habituales en la técnica que un paciente puede insistir en una dosis más baja o dosis tolerable por motivos médicos, motivos psicológicos o por prácticamente cualquier otro motivo.

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

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

Los expertos habituales en la técnica conocen diversos modos de administración para administrar eficazmente los agentes farmacológicos a un tejido, célula, o líquido corporal deseado. Los métodos de administración se tratan en cualquier parte en la solicitud. La divulgación no se limita por los modos particulares de administración desvelados

en el presente documento. 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 la administración de diversas preparaciones farmacéuticas y formulaciones en vehículos farmacéuticos. Otros protocolos que son útiles para la administración de agentes farmacológicos de la divulgación serán conocidos por un experto habitual en la técnica, en los que la cantidad de dosis, programa de administración, sitios de administración, modo de administración y similares varían de los presentados en el presente documento.

La administración de los agentes farmacológicos de la divulgación a mamíferos distintos de seres humanos, por ejemplo con fines de ensayo o fines terapéuticos veterinarios, se lleva a cabo en sustancialmente las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Se entenderá por un experto habitual en la técnica que la presente divulgación es aplicable tanto a enfermedades humanas como animales. Así, la presente divulgación tiene la finalidad de ser usada en medicina ganadera y veterinaria, así como en terapéutica humana.

Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas de la divulgación se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos. Dichas preparaciones pueden contener rutinariamente sales, agentes de tamponamiento, conservantes, vehículos compatibles, y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden usar convenientemente sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sus sales farmacéuticamente aceptables y no se excluyen del alcance de la invención. Dichas sales farmacológicamente y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico, y similares. Por tanto, se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables como sales de metal alcalino o metal alcalinotérreo, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

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

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

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de poner el agente activo en asociación con un vehículo, que constituye uno o más componentes accesorios. En general, las composiciones se preparan por poniendo uniforme e íntimamente el compuesto activo en asociación con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto.

Las composiciones adecuadas para administración por vía oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas para chupar, 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.

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

También se contemplan específicamente formas farmacéuticas orales del componente o componentes anteriores. El componente o componentes se pueden modificar químicamente de manera que sea eficaz la administración oral del derivado. Generalmente, la modificación química contemplada es la unión de al menos un resto a la propia molécula del componente, donde dicho resto permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) la captación en la corriente sanguínea desde el estómago o intestino. También se desea el aumento en la estabilidad global del componente o

componentes y el aumento en la circulación tiempo en el cuerpo. Los ejemplos de dichos restos incluyen: polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona y poliprolina. Abuchowski y Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" en: Enzymes as Drugs, Hochenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp. 367-383; Newmark, et al., 1982, J. Appl. Biochem. 4:185-189. Otros polímeros que se podrían usar son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano. Los preferidos para uso farmacéutico, como se indica anteriormente, son 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, aunque liberarán el material en el duodeno o en cualquier parte en el intestino. Preferentemente, la liberación evitará los efectos perjudiciales del entorno estomacal, ya sea mediante protección de gelsolina o mediante liberación del material biológicamente activo más allá del entorno estomacal, tal como en el intestino.

Para garantizar la resistencia gástrica completa, es esencial un recubrimiento impermeable a al menos pH 5,0. Los ejemplos de los componentes inertes más comunes que se usan como recubrimientos entéricos son acetato-trimelitato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, poli(acetato-ftalato de vinilo) (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, acetato-ftalato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S y Shellac. Estos recubrimientos se pueden usar como películas mixtas.

También se puede usar un recubrimiento o mezcla de recubrimientos sobre comprimidos, que no están destinados para la protección frente al estómago. Esto puede incluir recubrimientos de azúcar, o recubrimientos que hacen el comprimido más fácil de tragar. Las cápsulas pueden consistir en una cubierta dura (tal como gelatina) para la administración de terapéutico seco, es decir, polvo; para formas líquidas, se puede una cubierta de gelatina blanda. El material de cubierta de los sellos podría ser almidón espeso u otro papel comestible. Para píldoras, pastillas para chupar, comprimidos moldeados o comprimidos triturados, se pueden usar técnicas de aglomeración en húmedo.

El terapéutico se puede incluir en la formulación como múltiples partículas finas en forma de gránulos o pellas de tamaño de partículas de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para la administración de cápsulas también podría ser como un polvo, tapones ligeramente comprimidos o incluso como comprimidos. El terapéutico se podría preparar por compresión.

Se pueden incluir todos los agentes colorantes y saborizantes. Por ejemplo, se puede formular la gelsolina (tal como por encapsulación en liposomas o microesferas) y luego contener adicionalmente dentro de un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene agentes colorantes y saborizantes.

Se puede diluir o aumentar el volumen del terapéutico con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir hidratos de carbono, especialmente manitol, a-lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. También se pueden usar ciertas sales inorgánicas como cargas, que incluyen trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro sódico. Algunos diluyentes comercialmente disponibles son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

Se pueden incluir disgregantes en la formulación del terapéutico en una forma farmacéutica sólida. Los materiales usados como disgregantes incluyen, pero no se limitan a, almidón, incluyendo el disgregante comercial basado en almidón, Explotab. Se pueden usar todos de glicolato sódico de almidón, Amberlite, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato de sodio, gelatina, cáscara de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de los disgregantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Se pueden usar gomas en polvo como disgregantes y como aglutinantes y estas pueden incluir gomas en polvo tales como agar, karaya o tragacanto. También son útiles como disgregantes ácido alginico y su sal de sodio.

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

Se puede incluir un agente contra la fricción en la formulación del terapéutico para prevenir la pegajosidad durante el proceso de formulación. Se pueden usar lubricantes como capa entre el terapéutico y la pared de la matriz, y estos pueden incluir, pero no se limitan a; ácido esteárico que incluye 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, lauril sulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.

Se podrían añadir deslizantes que podrían mejorar las propiedades de flujo del fármaco durante la formulación y para ayudar en el reordenamiento durante la compresión. Los deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirogénica y silicoaluminato hidratado.

Para ayudar en la disolución del terapéutico en el entorno acuoso se podría añadir un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como laurilsulfato de sodio,

diocetilsulfosuccinato de sodio y diocetilsulfonato de sodio. Se podrían usar detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de posibles detergentes no iónicos 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 de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación de gelsolina tanto solos o como una mezcla en diferentes relaciones.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. 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 estabilizadores.

También se pueden usar microesferas formuladas para administración por vía oral. Dichas microesferas se han definido muy bien en la materia. Todas las formulaciones para administración por vía oral deben estar en dosificaciones adecuadas para dicha administración.

Para administración por vía oral, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

Para administración por inhalación, los compuestos para su uso según la presente invención pueden ser convenientemente administrados en forma de una presentación de spray en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

También se contempla en el presente documento la administración pulmonar de gelsolina. La gelsolina se administra a los pulmones de un mamífero mientras inhala y atraviesa a través del revestimiento epitelial pulmonar hasta la corriente sanguínea. 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, pp. 206-212 (a1-antitripsina); Smith et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (a-1-proteinasa); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, March, (hormona humana de crecimiento recombinante); Debs et al., 1988, *J. Immunol.* 140: 3482-3488 (interferón- γ y factor de necrosis tumoral alfa) y Platz et al., la patente de EE.UU. N° 5.284.656 (factor estimulante de colonias de granulocitos). Un método y composición para administración pulmonar de fármacos para efecto sistémico se describe en la patente de EE.UU. N° 5.451.569, concedida el 19 de septiembre de 1995 a Wong et al.

Se contempla para su uso en la práctica de la presente divulgación un amplio intervalo de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, nebulizadores, inhaladores de dosis medidas e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para los expertos en la técnica.

Algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles adecuados para la práctica de la presente invención 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 aquellos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para dispensar gelsolina. Normalmente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propulsor apropiado, además de los diluyentes, adyuvantes y/o vehículos usuales útiles en terapia. Por tanto, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión, u otros tipos de vehículos. También se puede preparar en diferentes formulaciones gelsolina químicamente modificada dependiendo del tipo de modificación química o del tipo de dispositivo empleado.

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

- Las formulaciones para su uso con un dispositivo inhalador de dosis medida generalmente comprenderán un polvo finamente dividido que contiene la gelsolina suspendida en un propulsor con la ayuda de un tensioactivo. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para este fin, tal como un clorofluorocarbono, un hidrocloreofluorocarbono, un hidrofluorocarbono, o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o sus combinaciones. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitano y lecitina de soja. También puede ser útil como tensioactivo el ácido oleico.
- Las formulaciones para dispensación de un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene gelsolina y también puede incluir un agente de carga, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa o manitol en cantidades que facilitan la dispersión del polvo del dispositivo, por ejemplo, 50 a 90 % en peso de formulación. La gelsolina se debe preparar lo más ventajosamente en forma de partículas con un tamaño de partículas promedio menor de 10 mm (o micrómetros), lo más preferentemente 0,5 a 5 mm, para la administración más eficaz al pulmón distante.
- También se contempla la administración nasal (o intranasal) de una composición farmacéutica de la presente divulgación. La administración nasal permite el paso de una composición farmacéutica de la presente divulgación a la corriente sanguínea directamente después de administrar el producto terapéutico a la nariz, sin la necesidad de deposición del producto en el pulmón. Las formulaciones para administración nasal incluyen aquellas con dextrano o ciclodextrano.
- Para administración nasal, un dispositivo útil es una botella dura pequeña a la que se une un pulverizador de dosis medida. En una realización, la dosis medida se administra metiendo la disolución de la composición farmacéutica de la presente invención en una cámara de volumen definido, cámara que tiene una abertura dimensionada para aerosolizar una formulación en aerosol formando un spray cuando se comprime un líquido en la cámara. La cámara se comprime para administrar la composición farmacéutica de la presente invención. En una realización específica, la cámara es un montaje de pistón. Dichos dispositivos están comercialmente disponibles.
- Alternativamente, se usa una botella de plástico oprimible con una abertura u orificio dimensionado para aerosolizar una formulación en aerosol formando un spray cuando se oprime. La abertura se encuentra normalmente en la parte superior de la botella, y la parte superior generalmente se estrecha para ajustarse parcialmente en las fosas nasales para la administración eficiente de la formulación en aerosol. Preferentemente, el inhalador nasal proporcionará una cantidad dosificada de la formulación en aerosol, para administración de una dosis medida del fármaco.
- Los compuestos, cuando se desea administrarlos por vía sistémica, se pueden formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma farmacéutica 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 aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.
- Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones oleosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.
- Alternativamente, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de uso.
- Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.
- Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de liberación prolongada. Dichas 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 moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.
- Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato cálcico, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles.

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

La gelsolina y opcionalmente otros terapéuticos se pueden administrar por sí mismos o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

El (Los) agente(s) terapéutico(s), que incluyen específicamente, pero no se limitan a, gelsolina, se pueden proporcionar en partículas. Partículas, como se usa en el presente documento, significa nano o micropartículas (o en algunos casos mayores) que pueden consistir en todo o en parte de gelsolina o el (los) agente(s) terapéutico(s) como se describen en el presente documento. Las partículas pueden contener el (los) agente(s) terapéutico(s) en un núcleo rodeado por un recubrimiento, que incluye, pero no se limita a, un recubrimiento entérico. El (Los) agente(s) terapéutico(s) también se pueden dispersar a lo largo de las partículas. El (Los) agente(s) terapéutico(s) también se pueden adsorber en las partículas. Las partículas pueden ser de una cinética de liberación de cualquier orden, que incluye liberación de orden cero, liberación de primer orden, liberación de segundo orden, liberación retardada, liberación sostenida, liberación inmediata, y cualquier combinación de las mismas, etc. La partícula puede incluir, además del (de los) agente(s) terapéutico(s), cualquiera de los materiales rutinariamente usados en la materia de la farmacia y la medicina, que incluyen, pero no se limitan a, material erosionable, no erosionable, biodegradable, o no biodegradable, o sus combinaciones. Las partículas pueden ser microcápsulas que contienen la gelsolina en una disolución o en un estado semisólido. Las partículas pueden ser de prácticamente cualquier forma.

En la fabricación de partículas para administrar el (los) agente(s) terapéutico(s), se pueden usar materiales poliméricos tanto no biodegradables como biodegradables. Dichos polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona basándose en el periodo de tiempo durante el cual se desea la liberación. Los polímeros bioadhesivos de particular interés incluyen hidrogeles bioerosionables descritos por H. S. Sawhney, C. P. Pathak y J.A. Hubell en *Macromolecules*, (1993) 26: 581-587. Estos incluyen ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo).

El (Los) agente(s) terapéutico(s) pueden estar contenidos en sistemas de liberación controlada. El término "liberación controlada" pretende referirse a cualquier formulación que contiene un fármaco en la que se controlan el modo y perfil de liberación del fármaco de la formulación. Esto se refiere a formulaciones de liberación inmediata así como no inmediata, incluyendo formulaciones de liberación no inmediata, pero no se limitan a formulaciones de liberación sostenida y liberación retardada. El término "liberación sostenida" (también denominado "liberación prolongada") se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona liberación gradual de un fármaco durante un periodo de tiempo prolongado, y que preferentemente, aunque no necesariamente, da como resultado niveles en sangre sustancialmente constantes de un fármaco durante un período de tiempo prolongado. El término "liberación retardada" se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco en la que hay un retraso de tiempo entre la administración de la formulación y la liberación del fármaco del mismo. "Liberación retardada" puede o puede no implicar la liberación gradual del fármaco durante un periodo de tiempo prolongado, y así puede o puede no ser "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 en el presente documento, significa que el implante se construye y dispone para administrar niveles terapéuticos del principio activo durante al menos 7 días, y preferentemente 30-60 días. Los expertos habituales en la técnica conocen bien los implantes de liberación sostenida a largo plazo e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

La divulgación también contempla el uso de kits. En algunos aspectos de la divulgación, 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 de diluyente contiene un diluyente tal como solución salina fisiológica para diluir lo que podría ser una disolución concentrada o polvo liofilizado de la gelsolina. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para mezclar una cantidad particular del diluyente con una cantidad particular de la preparación farmacéutica concentrada, por 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, si el recipiente es una botella, un vial con un tapón, una ampolla con un tapón, una bolsa de infusión, y similares, pueden contener indicios tales como

marcas convencionales que cambian de color cuando la preparación se ha esterilizado en autoclave o esterilizado de otro modo.

La presente divulgación se ilustra además por el siguiente Ejemplo.

Ejemplo

5 La septicemia está asociada con diversas anomalías bioquímicas, que incluyen el agotamiento de gelsolina plasmática. Aunque se desconoce la función real de la gelsolina plasmática, estudios clínicos y en animales han mostrado que el agotamiento de gelsolina plasmática por lesión e inflamación se asocia con resultados adversos. Los presentes inventores examinaron la gelsolina plasmática en ratones sépticos y encontraron que el agotamiento de gelsolina plasmática ocurre después de exposiciones sépticas y que el agotamiento significativo acompaña a septicemia mortal. La reposición de gelsolina plasmática conduce a un perfil de citocinas más favorable y mejora la mortalidad. La gelsolina plasmática tiene una función fisiológica en la inflamación sistémica y la sustitución de gelsolina puede representar una nueva terapia para infecciones y septicemia.

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

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

20 Los presentes inventores suponen que si la inflamación sistémica asociada a septicemia disminuye GSNp, podría ser beneficiosa la restauración de GSNp. Aquí, los presentes inventores muestran que los niveles de GSNp disminuyen en ratones sometidos a endotoxemia o peritonitis, y la reposición de GSNp conduce a supervivencia y desplazamiento del perfil de citocinas mejorados en ratones sépticos.

45 **Materiales y métodos**

Animales

Se compraron ratones C57BL/6 macho no mutantes de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Se compraron ratones C3H/HeJ macho mutantes en el receptor del tipo toll 4 (TLR4) de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). A los ratones se les dio acceso libre a pienso estándar y agua, y todos los procedimientos y estudios descritos aquí han sido autorizados por el Harvard Medical Area Standing Committee on Animals según las normas que se exponen en *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

Respuesta a la dosis de LPS

Se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) con LPS (serotipo 10 de *Pseudomonas aeruginosa*, de Sigma (St. Louis, MO) ratones C57BL/6 macho de 6-8 semanas de edad que pesaban 18-20 g a las dosis de 0, 10, 20 y 40 mg/kg en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se usaron 3-4 en cada grupo. 24 horas después de la administración de LPS, se anestesiaron los animales con 0,015-0,017 mg/g de avertina i.p. (Fluka Chemie, Buchs, Suiza). Entonces se recogió sangre por sangrado retro-orbital en 0,1 volúmenes de disolución anticoagulante de

Aster-Jandl (Gamulescu, M. A., Seifert, K., Tingart, M., Falet, H. & Hoffmeister, K. M. (2003) Platelets 14, 211-7) y se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos para generar plasma. El plasma se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C.

Septicemia murina por CLP (ligadura y punción cecal)

5 Primero se anestesiaron ratones C57BL/6 macho de 8-10 semanas de edad con 0,015-0,017 mg/g i.p. de avertina. Se expuso el ciego de cada animal anestesiado a través de una pequeña incisión en el abdomen anterior inferior, y se pinchó por una aguja de 19 de calibre. Se extruyó una pequeña cantidad del contenido intestinal y se ligó el ciego con sutura de seda 6-0 sin obstruir el tubo digestivo. Después de volver a colocar los contenidos intestinales, se cerró el abdomen con una sutura de seda 4-0. Para el estudio del nivel de GSNp, los 5 animales recibieron 1 ml de
 10 PBS por vía subcutánea inmediatamente después de la cirugía. Los cinco animales que no se sometieron a CLP sirvieron de controles. Se dejó que los animales se recuperaran con acceso libre a comida y agua. 24 horas después de CLP, se anestesiaron entonces los animales y se recogió el plasma como se ha descrito antes. Además, se recogieron el corazón, pulmones, hígado, riñones y músculos esqueléticos de la pata trasera de cada animal y se congelaron a -80 °C. Los pulmones se recogieron después de la perfusión perforando primero el ventrículo derecho del corazón e inyectando 1 ml de PBS en el ventrículo izquierdo. Para el estudio de mortalidad, se sometieron 20
 15 animales a CLP y 10 animales recibieron inyecciones subcutáneas (s.c.) de 1 ml de 1) NaCl 150 mM (solución salina) o 2) 8 mg/ml de GSNp humana recombinante (Biogen, Boston, MA) con Ca 0,4 mM en solución salina inmediatamente y 24 horas después de CLP.

Mortalidad por LPS y citocinas plasmáticas

20 Se inyectaron i.p. con 25 mg/kg de LPS (*Escherichia coli* O55:B5, St. Louis, Sigma) ratones macho C57BL/6 de 6-8 semanas de edad que pesaban 18-20 g y se dividieron para recibir 400 µl de inyección subcutánea dorsal de 1) GSNp: 20 mg/ml de GSNp humana recombinante con Ca 1 mM en solución salina (8 animales), 2) BSA: 20 mg/ml de albúmina de suero bovino (Serologicals, Norcross, GA) con Ca 1 mM en solución salina (9 animales), o 3)
 25 solución salina: solución salina estéril sola (9 animales), inmediatamente, y 24, 48 y 72 horas después de las inyecciones de LPS. Se monitorizaron frecuentemente los animales y se registró la mortalidad durante 7 días. Se sacrificaron los ratones supervivientes. En un experimento separado, los ratones recibieron la misma exposición a LPS y se dividieron para recibir tratamiento con GSNp o solución salina como se describe y se sacrificaron para las recogidas de plasma y órganos 6 horas (5 ratones por grupo de tratamiento) y 24 horas (4 ratones por grupo de
 30 tratamiento) después de la exposición a LPS. Además, los ratones de control sin exposición a LPS se administraron únicamente s.c. con solución salina (5 ratones) o GSNp (3 ratones) 24 horas antes de ser sacrificados para la recogida de sangre y órganos. Se recogieron el plasma y los órganos de cada ratón como se ha descrito.

GSNp en ratones resistentes a LPS

Se inyectaron i.p. con 25 mg/kg de LPS de *E. coli* (4 ratones) ratones C3H/Hej macho de 6-8 semanas de edad que pesaban 19-20 g y ratones sin exponer sirvieron de controles (4 ratones). 24 horas después de la exposición a LPS,
 35 se recogieron muestras de plasma de los ratones anestesiados como se ha descrito anteriormente. Se midió el nivel de gelsolina en cada muestra de plasma.

Medidas de citocinas de ratón

Se midieron las citocinas plasmáticas GM-CSF, INF-γ, IL-1β, IL-6, IL-10 y TNF-α usando ensayos de ELISA (LINCO Research, St. Charles, MO). El intervalo más bajo del ensayo es ≤3,2 pg/ml para cada citocina, y a niveles ≤ 3,2
 40 pg/ml se les asignó un valor de cero.

Medidas de gelsolina y albúmina

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

La cuantificación de la gelsolina por el ensayo de nucleación de actina se correlaciona bien con los niveles obtenidos de mediciones de transferencia Western (Mounzer, K. C., Moncure, M., Smith, Y. R. & Dinubile, M. J. (1999) Am J
 55 Respir Crit Care Med 160, 1673-81). El ensayo es altamente específico, como se evidencia por la actividad prácticamente cero en plasma de ratones sin gelsolina tratados con LPS (datos no mostrados); sin embargo, el

ensayo no discrimina entre GSNc y GSNp. Tampoco es específico de la especie y así es capaz de aproximar niveles de gelsolina totales en ratones tratados con GSNp humana recombinante. Los lípidos que se complejan a GSNp no afectan la actividad de nucleación de actina de GSNp (Janmey, P. A., Iida, K., Yin, H. L. & Stossel, T. P. (1987) *J Biol Chem* 262, 12228-36).

- 5 Se midieron colorimétricamente los niveles de albúmina usando un kit comercial (Stanbio, Boerne, TX) según las instrucciones del fabricante.

Extracción de proteína a partir de órganos

- 10 Se analizaron los órganos recogidos 6 h después de haber sido expuestos a 25 mg/kg i.p. de LPS de *E coli*, o CLP. Los órganos de ratones no expuestos sirvieron de controles. Cada órgano se homogeneizó en tampón RIPA (Boston Bioproducts, Ashland, MA), complementado con mezcla de inhibidores de proteínas (Calbiochem, La Jolla, CA) a concentración 1:100 y ortovanadato sódico y se incubaron sobre hielo durante 30 minutos antes de la centrifugación a 2.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 10.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se mantuvo a -80 °C hasta el análisis.

Análisis de transferencia Western

- 15 Se determinó la concentración de proteína para cada muestra usando DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se calentaron 10 µg de cada muestra a 85 °C durante 3 minutos en tampón de muestra de SDS (Boston Bioproducts), luego se analizaron por SDS-PAGE usando 12 % de gel Tris-glicina (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore, Bedford, MA). Después de bloquear la membrana durante la noche en 5 % de leche desnatada en polvo en solución salina tamponada con Tris - (TBS) con 0,05 % de Tween 20, se añadió antisuero de GSNp de ratón a 1:1000 y luego se sondó con IgG anti-conejo unida a HRP (Cell Signaling, Beverly, MA) a 1:2000. Se desarrolló quimioluminiscencia con LumiGLO (Cell Signaling, Beverly, MA) y se expuso y se reveló la fopelícula. Los sueros anti-GSNp de ratón se produjeron inmunizando conejos contra un péptido derivado de la extensión plasmática de GSNp de ratón usando un servicio comercial (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se ha probado la especificidad y sensibilidad de los antisueros usando ELISA y la transferencia Western mostró que eran específicos únicamente contra GSNp de ratón y no gelsolina citoplásmica (GSNc) (datos no mostrados).
- 25

Unión a LPS de gelsolina

- 30 Todos los estudios se hicieron por duplicado. Se recubrió cada pocillo de una placa Microlite 2 blanca de fondo plano de 96 pocillos (Dynex Technologies, Chantilly, VA) con diversa cantidad de GSNp humana recombinante o BSA y se incubaron a 4 °C durante la noche. Después de 4 lavados con tampón PB (NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, NaH₂PO₄ 3,5 mM, glucosa 10 mM, Hepes 10 mM, 3 mg/ml de BSA, CaCl₂ 1 mM, pH 7,4), se añadieron a cada pocillo 2 µg de LPS marcado con Alexa488 (serotipo 055:B5 de *Escherichia coli*, Molecular Probes, Eugene, OR) con 100 µl de tampón PB y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de 4 lavados con tampón PB, se analizó la fluorescencia de cada pocillo en un espectrofluorímetro a longitudes de onda de excitación y de emisión de 488 y 520 nm, respectivamente. Se estimó la cantidad de Alexa488-LPS unido extrapolando de una curva patrón generada por siembra de diversas cantidades de Alexa488-LPS en tampón PB.
- 35

Estimulación de LPS de células monocíticas

- 40 Se compró la línea celular monocítica humana THP-1 de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA. Las células se mantuvieron en RPMI (GIBCO, Grand Island, NY) complementado con 10 % de suero bovino fetal y 2 % de penicilina-estreptomicina (GIBCO) a 37 °C. Se sembraron 50.000 células en cada pocillo en una placa de 24 pocillos y se estimularon con o sin 100 ng de LPS de *E. coli* y se trataron con 200 µg/ml de GSNp humana recombinante o BSA. 2 horas después de LPS, se recogieron 200 µl de medio y las células se retiraron por centrifugación a 1000 x g durante 10 minutos. Se determinaron por ELISA los niveles de TNF-α de medio libre de células (R&D Systems, Mineápolis, MN).

45 *Estadística*

- Se presentan los valores como media ± DE. Se usó una prueba no paramétrica, la correlación de rangos de Spearman, para analizar correlaciones en el estudio de dosis-respuesta. Se representa la mortalidad de animales como curvas de Kaplan-Meier, y se usó la prueba del orden logarítmico para analizar el impacto del tratamiento sobre la mortalidad de animales. Se usó la prueba de la U de Mann-Whiney para evaluar las diferencias entre los niveles de citocinas y de GSNp. Se consideró significativo un valor de P inferior a 0,05.
- 50

Resultados

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

La Figura 1A muestra que la inyección de dosis crecientes no letales de LPS de *Pseudomonas* condujo a una disminución progresiva, máxima a una dosis de 20 mg/kg, de niveles de GSNp en ratones (P<0,05). No se alteraron

los niveles de albúmina plasmática con el tratamiento de LPS. Similarmente, disminuyeron los niveles de GSNp ($P < 0,001$) mientras que aumentaron los niveles de albúmina ($P = 0,02$) en ratones después de CLP. Estos datos sugieren que la inflamación sistémica debida a septicemia tiene un efecto específico sobre GSNp.

La reposición de GSNp mejoró la supervivencia en ratones sépticos

5 LPS de *E. coli* a una dosis de 25 mg/kg i.p. induce >90 % de mortalidad en ratones en el plazo de 7 días desde la inyección, y parece que los ratones supervivientes se recuperaron completamente y no presentan signos de peligro. Como se muestra en la Figura 2A, la administración de GSNp exógena en el momento de la exposición a LPS potenció significativamente la supervivencia en ratones endotoxémicos en comparación con los tratados con solución salina ($P < 0,001$), o BSA ($P < 0,001$). La Figura 2B muestra que los ratones que recibieron GSNp también
10 tuvieron supervivencia significativamente mejor que los que recibieron solución salina después de CLP ($P = 0,001$).

La administración de GSNp exógena aumentó eficazmente los niveles de GSNp en ratones endotoxémicos

La Figura 3 muestra el nivel de GSNp en ratones expuestos a una dosis letal de LPS de *E. coli*. A diferencia de LPS de *Pseudomonas* no letal que solo provocó que GSNp disminuyera el 14 %, una dosis letal de LPS de *E. coli* indujo una disminución de 50 % en el nivel de GSNp en el plazo de 6 horas desde la exposición a LPS. La inyección
15 subcutánea de 8 mg de GSNp recombinante mantuvo satisfactoriamente GSNp en o por encima del intervalo normal en ratones endotoxémicos.

Efectos de la reposición de GSNp sobre los perfiles de citocinas de ratones endotoxémicos

Los presentes inventores examinaron si la administración de GSNp alteraba el perfil de citocinas de ratones endotoxémicos. La Figura 4A no muestra diferencias en el perfil de citocinas plasmáticas entre ratones
20 endotoxémicos tratados con GSNp y tratados con solución salina 6 horas después de LPS ($P > 0,05$ para todas las citocinas mostradas). Los niveles de TNF- α estuvieron próximos al nivel inicial, de acuerdo con informes publicados que muestran los picos de TNF- α y empieza a disminuir en el plazo de 2-3 horas desde la exposición a LPS en ratones (Villa, P., Sartor, G., Angelini, M., Sironi, M., Conni, M., Gnocchi, P., Isetta, A. M., Grau, G., Buurman, W., van Tits, L. J. & et al. (1995) Clin Diagn Lab Immunol 2, 549-53).

25 Sin embargo, 24 horas después de la exposición a LPS, los ratones tratados con GSNp tuvieron niveles significativamente más bajos de varias citocinas pro-inflamatorias (GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β), aunque los niveles de IL-6 y TNF- α no fueron detectablemente diferentes (Figura 4B). Además, el tratamiento con GSNp produjo un nivel de IL-10 significativamente más alto. No parece que GSNp estimule directamente la secreción de IL-10, ya que los ratones no expuestos con o sin administración de GSNp no tuvieron perfiles de citocinas significativamente
30 diferentes; específicamente, IL-10 no aumentó en los ratones no expuestos tratados con GSNp (datos no mostrados).

Distribución tisular de GSNp

Se muestra en la Figura 6 un análisis de transferencia Western representativo de músculos esqueléticos, corazones, riñones, hígados y pulmones recogidos de ratones 6 horas después de ser tratados con o sin 25 mg/kg de LPS de
35 *E. coli*, usando antisueros de GSNp de ratón. Los presentes inventores encontraron que el pulmón tiene la concentración más alta de GSNp en tanto estados normales como endotoxémicos. Puesto que los pulmones se perfundieron con PBS para retirar la sangre intravascular antes de la recogida, es poco probable que la contaminación por sangre explicara el resultado de los presentes inventores. Los presentes inventores encontraron distribución tisular similar de GSNp en ratones sometidos a CLP (datos no mostrados).

GSNp se une a LPS pero no inhibe los monocitos activantes de LPS

Puesto que GSNp puede unirse a lípidos bioactivos tales como ácido lisofosfatídico (Goetzl, E. J., Lee, H., Azuma, T., Stossel, T. P., Turck, C. W. & Karlner, J. S. (2000) J Biol Chem 275, 14573-8), los presentes inventores exploraron la posibilidad de que GSNp también pudiera unirse a LPS. La Figura 7 muestra que GSNp se une
45 específicamente a LPS fluorescente, mientras que la proteína de control, BSA, presentó poca afinidad por LPS. Sin embargo, no parece que GSNp interfiera con la capacidad de LPS para provocar la secreción de TNF- α de monocitos humanos puesto que las células THP-1 estimuladas con LPS tratadas con GSNp o BSA secretaron cantidad similar de TNF- α en los medios de cultivo (Figura 8).

GSNp no se afecta en ratones mutantes en TLR4 expuestos a LPS

Para examinar si LPS provoca directamente el agotamiento de GSNp, los presentes inventores estudiaron los niveles de GSNp en ratones C3H/HeJ, una cepa que expresa TLR4 mutado que convierte los ratones en resistentes a la inflamación inducida por LPS (Beutler, B. & Poltorak, A. (2001) Crit Care Med 29, S2-6; discusión S6-7). La Figura 5 muestra que los niveles de GSNp no se diferenciaron significativamente entre ratones C3H/HeJ expuestos a LPS de *E. coli* y no expuestos. De acuerdo con su resistencia conocida a LPS, los ratones C3H/HeJ también
50 parecieron completamente normales después de la exposición a LPS.

Discusión

Los presentes inventores han demostrado aquí que el significativo agotamiento de GSNp ocurre después del ataque séptico por endotoxina o peritonitis, y que GSNp exógena mejora espectacularmente la supervivencia de ratones sépticos. Estos datos indican que GSNp cumple una importante función pro-supervivencia en la septicemia.

- 5 La hipótesis de que GSNp es un "depurador de actina" procede de estudios sobre gelsolina citoplásmica (GSNc), y sobre un informe que demuestra la infusión de moléculas de actina en ratas, provocando la muerte. Sin embargo, GSNp no puede actuar como un depurador para actina circulante en septicemia debido a que no se conoce que la septicemia temprana conduzca a la liberación de actina, y los presentes inventores no han sido capaces de demostrar complejos de gelsolina-actina en el plasma de ratones endotoxémicos (datos sin publicar).
- 10 Los presentes inventores exploraron la posibilidad de que GSNp funcionara interaccionando directamente con LPS. Aunque GSNp se puede unir a LPS, los presentes inventores no encontraron evidencia de que GSNp interfiriera con la capacidad de LPS para iniciar la inflamación en células de cultivo. Aunque se inyectó GSNp en ratones inmediatamente después de la exposición a LPS, hubo un retraso en que GSNp se administrase a la circulación debido a la vía de administración subcutánea. Por tanto, es poco probable que GSNp funcione por interferencia
- 15 directa de LPS, y los perfiles de citocinas tempranas de ratones endotoxémicos tratados y no tratados soportan esta conclusión. Es posible que la capacidad de GSNp para unirse a LPS altere un acontecimiento posterior en la respuesta inflamatoria inducida por LPS. Los perfiles de citocinas de fase temprana similares de los ratones de control tratados con GSNp de los presentes inventores también sugieren que es poco probable que GSNp funcione con la señalización temprana de citocinas, específicamente TNF- α , puesto que la inhibición de TNF- α en el modelo murino de endotoxemia reduce los niveles plasmáticos de IL-1 β y IL-6 en el plazo de 3-4 horas desde la exposición a LPS (Fong, Y., Tracey, K. J., Moldawer, L. L., Hesse, D. G., Manogue, K. B., Kenney, J. S., Lee, A. T., Kuo, G. C., Allison, A. C., Lowry, S. F. & et al. (1989) *J Exp Med* 170, 1627-33). Por otra parte, los perfiles de citocinas de los ratones tratados y sin tratar 24 horas después de LPS muestran que GSNp es capaz de disminuir varias citocinas pro-inflamatorias nada menos que 90 % mientras que regula por incremento IL-10, una citocina que se cree que
- 20 tiene una función antiinflamatoria en la septicemia e inflamación (Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. (2001) *Annu Rev Immunol* 19, 683-765). Puesto que la dosis letal de LPS está asociada con citocinas pro-inflamatorias persistentemente elevadas, tales como IL- β ; y IFN- γ (Joshi, V. D., Kalvakolanu, D. V., Hebel, J. R., Hasdía, J. D. & Cross, A. S. (2002) *Infect Immun* 70, 6896-903), los presentes inventores creen que el desplazamiento del perfil de citocinas está de acuerdo con GSNp que promueve la resolución de inflamación.
- 30 Parece que el pulmón tiene la concentración más alta de GSNp en comparación con otros órganos por análisis de transferencia Western, y puede ser la fuente principal de GSNp. Esto es a diferencia de un estudio previo que concluye que el músculo esquelético es la fuente principal de GSNp usando análisis de transferencia Northern (Kwiatkowski, D. J., Mehl, R., Izumo, S., Nadal-Ginard, B. & Yin, H. L. (1988) *J Biol Chem* 263, 8239-43). La contradicción puede ser debida a la capacidad cuantificadora limitada del análisis de transferencia Northern, o a que
- 35 la expresión de ARNm no es representativa de la producción de proteínas.

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

- 40 Desde el descubrimiento de la gelsolina hace más de 20 años, la mayoría de la investigación se ha centrado en GSNc y su interacción con actina (Kwiatkowski, D. J. (1999) *Curr Opin Cell Biol* 11, 103-8), y GSNp ha recibido poca atención. El estudio de los presentes inventores muestra que GSNp desempeña una función crítica en la inflamación sistémica y la administración de GSNp mejora la supervivencia en septicemia murina y promueve un desplazamiento de citocinas hacia la resolución de la inflamación.

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificación de si un sujeto se beneficiaría de la administración de un agente para reducir el riesgo de una infección bacteriana, comprendiendo el método:
 - 5 determinar un nivel de gelsolina plasmática en una muestra del sujeto, comparar el nivel de gelsolina plasmática con un valor predeterminado, en el que el valor predeterminado es el nivel de gelsolina promedio de un grupo de población probado de individuos aparentemente sanos, y
 - 10 caracterizar el beneficio del sujeto de la administración de un agente para reducir el riesgo de una infección bacteriana basándose en el nivel de gelsolina plasmática de dicho sujeto en comparación con el valor predeterminado, en el que un nivel de gelsolina plasmática por debajo del valor predeterminado es indicativo de que el sujeto está en un alto riesgo de desarrollar una infección bacteriana y se beneficiaría de la administración de un agente para reducir el riesgo de una infección bacteriana, y en el que un nivel de gelsolina plasmática por encima del valor predeterminado es indicativo de que el sujeto no está en un alto riesgo de desarrollar una infección bacteriana y no se beneficiaría de una administración de un agente para reducir el riesgo de una infección bacteriana.
- 15 2. Un método según la reivindicación 1, en el que la infección se provoca por una bacteria Gram-negativa, una bacteria Gram-positiva, un bacilo acidorresistente, una espiroqueta, un actinomiceto, una especie de *Ureaplasma*, o una especie de *Mycoplasma*, una especie de *Chlamydia*.
3. Un método según la reivindicación 2, en el que la infección es provocada por:
 - 20 (a) una bacteria Gram-negativa seleccionada del grupo que consiste en especie de *Neisseria*, especie de *Branhamella*, especie de *Escherichia*, especie de *Enterobacter*, especie de *Proteus*, especie de *Pseudomonas*, especie de *Klebsiella*, especie de *Salmonella*, especie de *Shigella*, especie de *Serratia*, especie de *Acinetobacter*, especie de *Haemophilus*, especie de *Brucella*, especie de *Yersinia*, especie de *Francisella*, especie de *Pasteurella*, especie de *Vibrio cholera*, especie de *Flavobacterium*, especie de *Campylobacter*, especie de *Bacteroides*, especie de *Fusobacterium*, especie de *Calymmatobacterium*, especie de *Streptobacillus* y especie de *Legionella*;
 - 25 (b) una bacteria Gram-positiva seleccionada del grupo que consiste en especie de *Pasteurella*, especie de *Staphylococcus*, especie de *Streptococcus*, *Bacillus anthracis*, especie de *Corynebacterium*, especie de difteroides, especie de *Listeria*, especie de *Erysipelothrix* y especie de *Clostridium*;
 - 30 (c) un bacilo acidorresistente que es una especie de *Mycobacterium*; o
 - (d) una espiroqueta seleccionada del grupo que consiste en especie de *Treponema*, especie de *Borrelia* y especie de *Leptospira*.
4. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el sujeto es un sujeto aparentemente sano.
5. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el nivel de gelsolina plasmática en el sujeto se determina por ELISA, inmunoensayo o enviando una muestra(s) del líquido corporal de un sujeto a un laboratorio comercial.
- 35 6. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que se repiten la etapa de obtener y comparar para monitorizar la gelsolina plasmática del sujeto con el tiempo.
7. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el valor predeterminado es un único valor de corte, tal como una mediana o media.
- 40 8. Un método según la reivindicación 7, en el que el valor predeterminado es aproximadamente 2,4 µM/l de plasma o inferior.
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además obtener un nivel de otro marcador de infección junto con obtener el nivel de gelsolina plasmática en el sujeto.
- 45 10. Un método según la reivindicación 9, en el que el otro marcador de infección es un nivel de glóbulos blancos (WBCs).

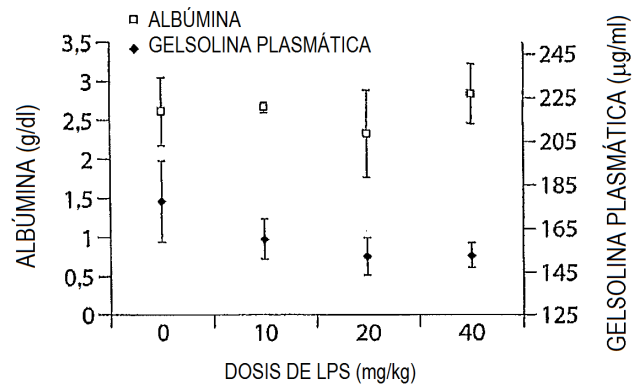


Fig. 1A

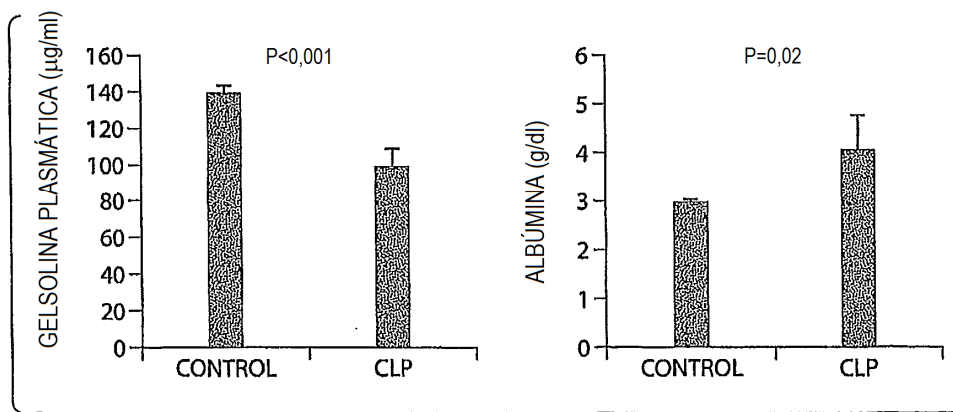


Fig. 1B

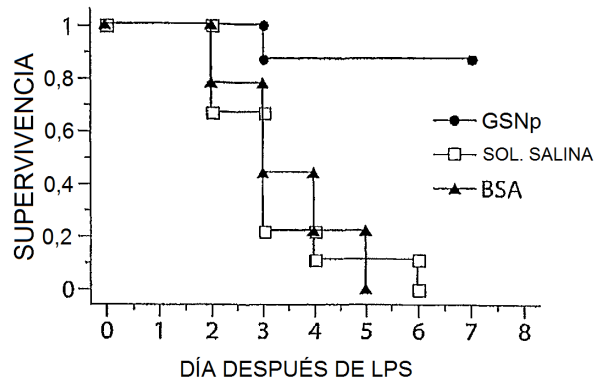


Fig. 2A

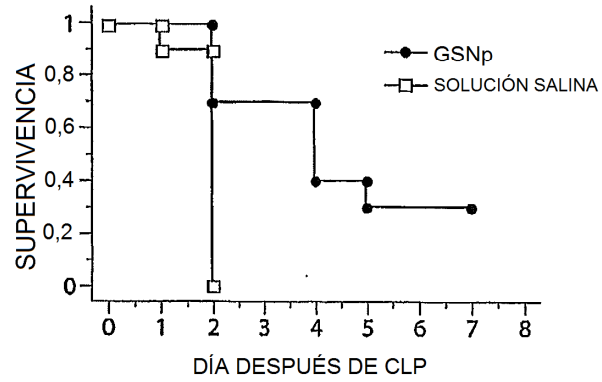


Fig. 2B

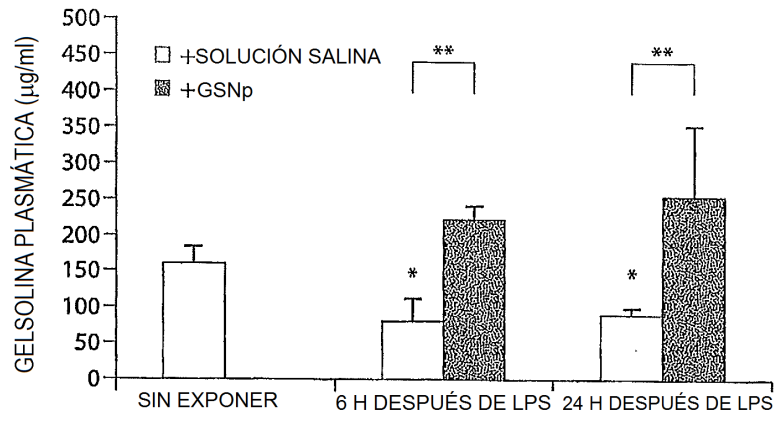


Fig. 3

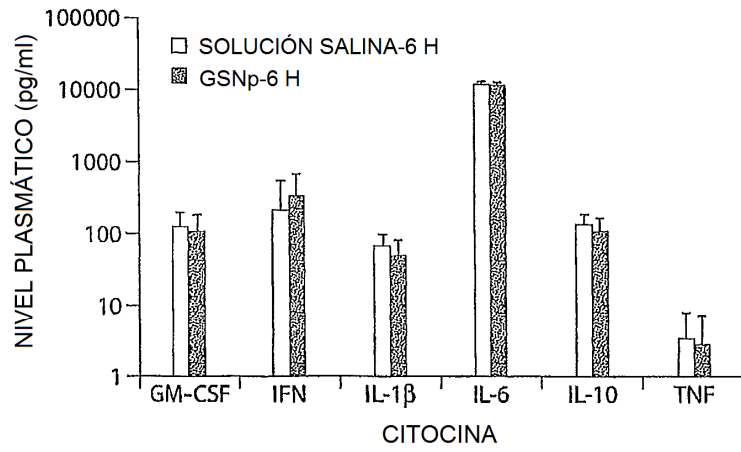


Fig. 4A

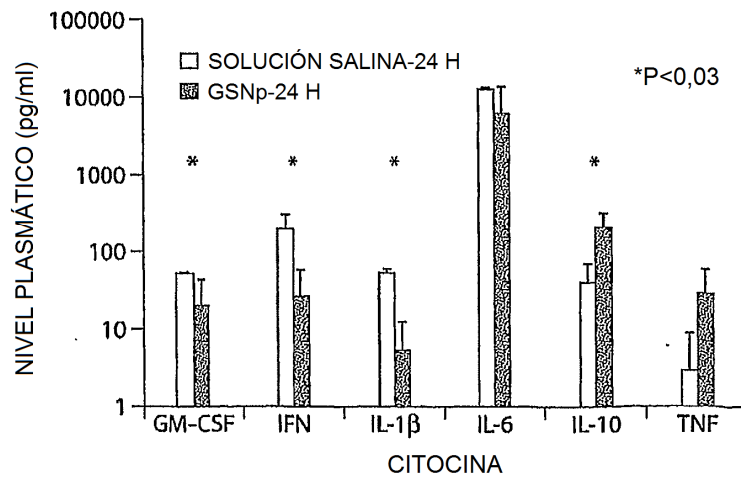


Fig. 4B

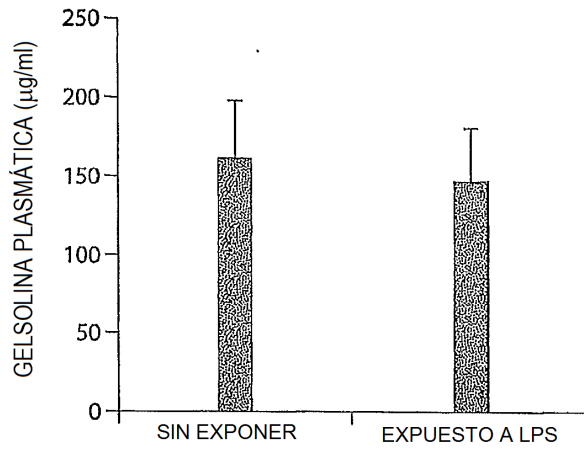


Fig. 5

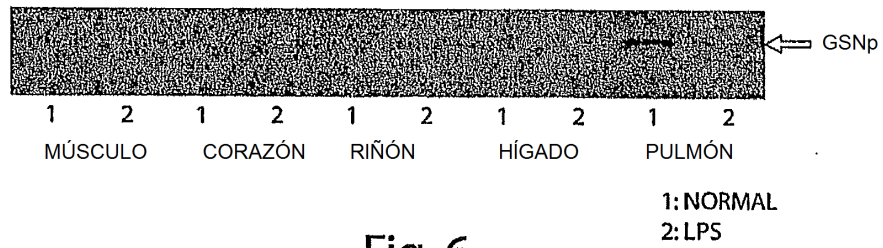


Fig. 6

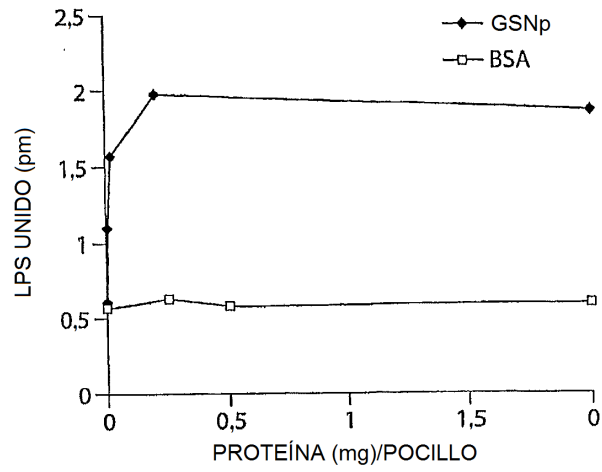


Fig. 7

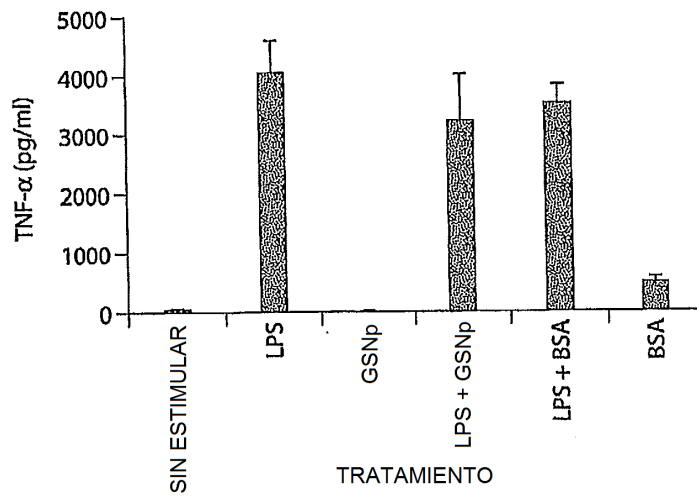


Fig. 8