

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 128**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A61K 38/50** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2013 PCT/US2013/043608**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13181530**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2013 E 13797635 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 2854910**

54 Título: **Niveles de ceramida en el tratamiento y prevención de infecciones**

30 Prioridad:

**01.06.2012 US 201261654519 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.10.2020**

73 Titular/es:

**ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI  
(50.0%)  
One Gustave L. Levy Place  
New York, NY 10029, US y  
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.  
AT THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHUCHMAN, EDWARD, H.;  
GULBINS, ERICH;  
FUTERMAN, ANTHONY y  
PEWZNER-JUNG, YAEL**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 786 128 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

Niveles de ceramida en el tratamiento y prevención de infecciones

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. de Serie 61/654,519, presentada el 1 de junio de 2012.

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la normalización de los niveles de ceramida para prevenir y/o tratar infecciones bacterianas en un sujeto con fibrosis quística.

Antecedentes de la invención

10 La fibrosis quística ("CF") es el trastorno autosómico recesivo más común en Europa y Estados Unidos, afectando a uno de cada 2500 niños nacidos en países occidentales. Es una enfermedad causada por mutaciones de la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la CF ("CFTR"). Si bien esta mutación genética conduce a varias complicaciones respiratorias, reproductivas y gastrointestinales, la causa principal de morbilidad y mortalidad en estos sujetos es el resultado de los efectos destructivos de la colonización pulmonar crónica con *Pseudomonas aeruginosa* ("*P. aeruginosa*"). Los registros médicos indican que aproximadamente el 80% de los sujetos con CF  
15 albergarán *P. aeruginosa* a la edad de 25 años. Véase Cystic Fibrosis Foundation Subject Registry: Annual Data Report (2010). Además de la mayor susceptibilidad a *P. aeruginosa*, los pulmones con CF se caracterizan por inflamación crónica y fibrosis progresiva. En la actualidad, los mecanismos moleculares que median las características de la enfermedad de la CF, esto es, la susceptibilidad a la infección, la inflamación y la fibrosis, requieren definición.

20 La infección por *P. aeruginosa* de las células epiteliales se inicia por contacto del patógeno con la superficie celular. Se han identificado varias moléculas de unión para *P. aeruginosa*, incluyendo CFTR, fibronectina,  $\alpha 5\beta 1$ -integrina y glicolípidos, incluido asialo-GM1. Véase Pier et. al., "Role Of Mutant CFTR In Hypersusceptibility Of Cystic Fibrosis Subjects To Lung Infections", Science. 271, 64-67 (1996); Schroeder et. al., "CFTR Is A Pattern Recognition Molecule That Extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS From The Outer Membrane Into Epithelial Cells And Activates  
25 NF-kappa B Translocation", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, pp. 6907-6912 (2002); deBentzmann et. al., "Asialo GM1 Is A Receptor For *Pseudomonas aeruginosa* Adherence To Regenerating Respiratory Epithelial Cells", Infect. Immun. 64(5) pp. 1582-1588 (1996); de-Bentzmann et. al., "*Pseudomonas aeruginosa* Adherence To Remodeling Respiratory Epithelium", Eur. Respir. J. 9 pp. 2145- 2150 (1996); Roger et. al., "Fibronectin And  $\alpha 5\beta 1$ -integrin Mediate Binding Of *Pseudomonas aeruginosa* To Repairing Airway Epithelium", Eur. Respir. J. 13 pp. 1301-1309  
30 (1999); Saiman et. al., "*Pseudomonas aeruginosa* Pili Bind To AsialoGM1 Which Is Increased On The Surface Of Cystic Fibrosis Epithelial Cells", J. Clin. Invest. 92 pp. 1875-1880 (1993); y Davies et. al., "Reduction In The Adherence Of *Pseudomonas aeruginosa* To Native Cystic Fibrosis Epithelium With Anti-AsialoGMI Antibody And Neuraminidase Inhibition", Eur. Respir. J; 13 pp. 565-570 (1999).

35 Por lo tanto, la identificación de receptores epiteliales para *P. aeruginosa* que están específicamente alterados en la CF y están implicados en la alta susceptibilidad a la infección de estos sujetos a *P. aeruginosa*, es una consideración importante en el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento y la profilaxis de la infección patógena concomitante y CF. Tales moléculas serían objetivos ideales para prevenir el contacto inicial del patógeno con las células epiteliales bronquiales en sujetos con CF y, de este modo, para prevenir la infección muy temprano.

40 Los métodos actuales para tratar y prevenir la patogénesis de la enfermedad en sujetos afectados por una enfermedad o afección plantean problemas de toxicidad y eficacia.

La presente invención está dirigida a superar estas deficiencias en la técnica, por ejemplo, corrigiendo la expresión anormal de moléculas de unión primaria de patógenos bacterianos a células epiteliales bronquiales *in vivo* a través de un mecanismo único mediado por lípidos de membrana.

Resumen

45 La presente invención está dirigida a una ceramidasa ácida para su uso en un método de tratamiento o prevención de infecciones bacterianas en un sujeto que tiene fibrosis quística. El método implica selección de un sujeto que tiene fibrosis quística y administración al sujeto seleccionado de una ceramidasa ácida en condiciones eficaces para reducir la ceramida y para tratar o prevenir la infección bacteriana en el sujeto seleccionado.

50 Tales agentes pueden incluir, pero no se limitan a, antibióticos, reactivos para reducir la viscosidad del moco, agentes de chaperona para mejorar la función de la proteína transmembrana de fibrosis quística (CFTR) o inhibidores de la esfingomieliasa ácida.

La selección de dicho sujeto se puede basar en el nivel de ceramida en sus células, tejidos o fluidos, y/o el nivel de una enzima ceramidasa endógena.

En este documento también se describe un método de tratamiento o prevención de infecciones patógenas en un sujeto que tiene fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y/o una herida abierta, que implica selección de un sujeto que tiene fibrosis quística, COPD, y/o una herida abierta y administración al sujeto seleccionado de una ceramidasa en condiciones eficaces para reducir la ceramida y para tratar o prevenir la infección patógena en el sujeto seleccionado. Este método no es parte de la invención. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los dispositivos, compuestos, composiciones farmacéuticas o medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

#### Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B muestran secciones incrustadas en parafina de pulmones de ratón. La figura 1A es una sección representativa de pulmones de ratones de tipo salvaje, ratones con deficiencia de CerS2 y ratones con fibrosis quística teñidos con anticuerpos Cy3-anti-ceramida y luego analizados por microscopía confocal. La figura 1B es una sección representativa de pulmones de ratones de tipo salvaje, ratones con deficiencia de CerS2 y ratones con fibrosis quística teñidos con el mismo anticuerpo 2 horas después de que el ratón recibió una inhalación única de ceramidasa ácida ("AC"). Los resultados son representativos de al menos 6 ratones por grupo.

La figura 2 demuestra que la ceramidasa ácida recombinante previene la infección por *P. aeruginosa* en los pulmones de ratones que acumulan ceramida. Se usaron dos modelos de ratón. Uno (CerS2<sup>-/-</sup>) es una deficiencia genética para una enzima productora de ceramida, la ceramida sintasa 2. Otro (Cftr<sup>-/-</sup>) tiene una mutación en el gen de la proteína transmembrana de fibrosis quística y son un modelo de fibrosis quística. Los ratones de tipo salvaje, CerS2<sup>-/-</sup> o Cftr<sup>-/-</sup> recibieron una sola inhalación de solución salina (gris claro) o ceramidasa ácida (gris oscuro), y luego se infectaron con *P. aeruginosa*. Dos horas después se sacrificaron y se determinó el título de *P. aeruginosa* que quedaba en los pulmones del ratón.

La figura 3 muestra los resultados de ratones que inhalaban 100 µg de AC en 0.8 mL de NaCl al 0.9% 30 a 45 minutos antes de la infección intranasal con 1X10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias (CFU) de cepa 762 o ATCC 27853 de *P. aeruginosa*. Se extrajeron los pulmones 4 horas después de la infección, se homogeneizaron, se lisaron en saponina 5 mg/mL durante 10 minutos y se lavaron. Las alícuotas se sembraron en placas LB y se dejaron crecer durante la noche. Se contaron las CFU en las placas LB para determinar el número de bacterias *P. aeruginosa* en el pulmón. Se muestran las medias ± s.d. de cuatro experimentos independientes.

#### Descripción detallada

En la práctica de la presente invención, se usan muchas técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica de proteínas, biología celular, inmunología, microbiología y ADN recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y se explican, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)); DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I and II, Glover, Ed. (1985); Oligonucleotide Synthesis, Gait, Ed. (1984); Nucleic Acid Hybridization, Hames & Higgins, Eds. (1985); Transcription and Translation, Hames & Higgins, Eds. (1984); Animal Cell Culture, Freshney, Ed. (1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Meth. Enzymol., (Academic Press, Inc., 1984); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, Miller & Calos, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1987)); y Meth. Enzymol., Vols. 154 and 155, Wu & Grossman, and Wu, Eds., respectivamente. Los métodos para detectar y medir niveles de productos de expresión génica de polipéptidos, esto es, nivel de traducción génica, son bien conocidos en la técnica e incluyen el uso de métodos de detección de polipéptidos tales como técnicas de detección y cuantificación de anticuerpos. Véase también, Strachan & Read, Human Molecular Genetics, Second Edition. (John Wiley and Sons, Inc., New York (1999)).

Se debe apreciar que ciertos aspectos, modos, realizaciones, variaciones y características de la presente invención y divulgación se describen a continuación en diversos niveles de detalle para proporcionar una comprensión sustancial de la tecnología actual. Las definiciones de ciertos términos tal como se usan en esta especificación se proporcionan a continuación. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento generalmente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Las condiciones subyacentes de la enfermedad pueden predisponer a un sujeto a infecciones patógenas agudas y/o crónicas. Como se usa en este documento, una "afección" se refiere a una enfermedad o afección patológica de cualquier tipo u origen, que alberga un sujeto. De acuerdo con lo anterior, las afecciones de la enfermedad descritas en este documento incluyen el tema identificado por las siguientes enfermedades y/o términos que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, una enfermedad respiratoria, enfermedad pulmonar, fibrosis quística ("CF"), enfermedad pulmonar obstructiva crónica ("COPD"), enfisema, asma, fibrosis pulmonar, bronquitis crónica, neumonía, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, neumonía necrotizante, asbestosis, aspergiloma, aspergilosis, atelectasia invasiva aguda, neumonía eosinofílica, derrame pleural, neumoconiosis, neumocistosis, neumotórax, actinomicosis pulmonar, proteinosis alveolar pulmonar, antracis pulmonar, malformación arteriovenosa pulmonar, edema pulmonar, embolia pulmonar, histiocitosis pulmonar X (granuloma eosinofílico), nocardiosis

pulmonar, tuberculosis pulmonar, enfermedad venooclusiva pulmonar, enfermedad pulmonar reumatoide y/o una herida abierta. Tales enfermedades por lo general manifiestan una mayor susceptibilidad de un sujeto a una infección patógena, esto es, en comparación con los sujetos que no padecen una afección.

5 Por ejemplo, los sujetos que padecen CF, COPD, y/o una herida abierta, pueden poseer una alta susceptibilidad a contraer infecciones patógenas agudas y/o crónicas, tales como, por ejemplo, bacterias, virus, hongos, protozoos y/o infecciones priónicas patógenas. Los patógenos bacterianos incluyen, sin limitación, *Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *enterohemorrhagic E. coli*, *enterotoxigenic E. coli*, *Haemophilus influenzae* tipo B y no-tipificable, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium spp.*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus B*, Group A beta hemolytic *Streptococcus*, *Streptococcus mutans*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae*, y *Yersinia pestis*. En algunas realizaciones, la infección patogénica es una infección por *Pseudomonas*. En algunas realizaciones, la infección por *Pseudomonas* es una infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

10 Los patógenos virales incluyen, sin limitación, virus de ARN, virus de ADN, adenoviridae (por ejemplo, mastadenovirus y aviadenovirus), herpesviridae (por ejemplo, virus herpes simplex 1, virus herpes simplex 2, virus herpes simplex 5 y virus herpes simplex 6), leviviridae (por ejemplo, levivirus, enterobacterias fago MS2, allovirus), poxviridae (por ejemplo, chordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, molluscipox virus, y entomopoxvirinae), papovaviridae (por ejemplo, poliomavirus y papilomavirus), paramyxoviridae (por ejemplo, paramyxovirus, virus de la parainfluenza 1, morbillivirus como el virus del sarampión, rubulavirus (tal como el virus de las paperas), pneumonoviridae (por ejemplo, neumovirus, virus sincicial respiratorio humano), metapneumovirus (por ejemplo, neumovirus aviar y metapneumovirus humano), picornaviridae (por ejemplo, enterovirus, rinovirus, hepatovirus tales como el virus de la hepatitis A humana, cardiovirus y aphovirus), reoviridae (por ejemplo, ortoreovirus, orbivirus, rotavirus, cypovirus, fijivirus, phytoreo virus y oryzavirus), retroviridae (por ejemplo, retrovirus de mamífero tipo B, retrovirus de mamífero tipo C, retrovirus aviar tipo C, grupo de retrovirus tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus (tales como el virus de inmunodeficiencia humana 1 y el virus de inmunodeficiencia humana 2; y spuma virus), Flaviviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis C), hepadnaviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis B), togaviridae (por ejemplo, alfavirus, tal como el virus sindbis y rubivirus, por ejemplo, el virus de la rubéola), rhabdoviridae (por ejemplo, vesiculovirus, lyssavirus, ephemera virus, citorhabdovirus y necleorhabdovirus), arenaviridae (por ejemplo, arenavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, lppy virus y virus de lassa) y coronaviridae (por ejemplo, coronavirus y torovirus), citomegalovirus (mononucleosis), virus del dengue (fiebre del dengue, síndrome de choque), virus de Epstein-Barr (mononucleosis, linfoma de Burkitt), virus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (leucemia de células T), influenza A, B y C (enfermedad respiratoria), virus de encefalitis japonesa (neumonía, encefalopatía), poliovirus (parálisis), rinovirus (resfriado común), virus de la rubéola (malformaciones fetales), virus de la vacuna (infección generalizada), virus de la fiebre amarilla (ictericia, insuficiencia renal y hepática) y virus de la varicela zoster (varicela)

40 Entre los hongos patógenos se incluyen, sin limitación, los géneros *Aspergillus* (por ejemplo, *Aspergillus fumigates*), *Blastomyces*, *Candida* (por ejemplo, *Candida albicans*), *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Phycomyces*, *Tinea corporis*, *Tinea unguis*, *Sporothrix schenckii*, y *Pneumocystis carinii*. Los protozoos patógenos incluyen, sin limitación, *Trypanosome spp.*, *Leishmania spp.*, *Plasmodium spp.*, *Entamoeba spp.*, y *Giardia spp.* tales como *Giardia lamblia*.

45 Debido a que los mecanismos moleculares que precipitan una mayor susceptibilidad a una infección patógena en sujetos afectados por una afección no se conocen bien, es importante aclarar la patología de, por ejemplo, *P. aeruginosa*, con respecto a la unión celular y la internalización. consideraciones para prevenir y tratar sujetos propensos a adquirir tales infecciones.

50 Las integrinas son moléculas receptoras que funcionan para coordinar procedimientos celulares relacionados, por ejemplo, con la unión y la adhesión. Sin embargo, las integrinas no se expresan característicamente en la superficie luminal de las células epiteliales bronquiales sanas normales, y las uniones estrechas de la capa de células epiteliales evitan el contacto de los patógenos bronquiales con el polo basolateral de las células epiteliales, donde residen las integrinas.

55 El término "niveles elevados" o "niveles superiores" como se usa en este documento se refiere a niveles de un marcador, molécula o proteína medible, tal como, por ejemplo, ceramida, que son más altos de lo que normalmente se observaría en una muestra de control o sujetos normales, esto es, un valor de referencia o niveles de control o niveles normalizados. En algunas realizaciones, los "niveles de control", esto es, los niveles normales, se refieren a un intervalo que normalmente se esperaría observar en una muestra de un sujeto que no tiene una afección. Se puede usar un nivel de control como "nivel de referencia" para fines comparativos, como se detalla más adelante. Por lo tanto, "niveles elevados" se refieren a niveles que están por encima del intervalo de niveles de control. Los intervalos aceptados como "niveles elevados" o "niveles de control" dependen de una serie de factores. El experto en la técnica es capaz de considerar los factores relevantes y establecer intervalos de referencia apropiados para los

“valores de control” y los “valores elevados” de la presente invención. Por ejemplo, se puede usar una serie de muestras de sujetos de control y sujetos diagnosticados con CF para establecer intervalos que son niveles “normales” o “control” e intervalos que son “elevados” o “más altos” en comparación con el intervalo o nivel de control.

- 5 Las ceramidasa son enzimas capaces de hidrolizar la ceramida en ácidos grasos y una base esfingóide (esfingosina), que está implicada en la proliferación celular y la transducción de señales intracelulares. La ceramidasa, después de la activación enzimática, facilita la hidrólisis de ceramida en componentes individuales de ácido graso y esfingosina. Véase Gatt, “Enzymic Hydrolysis and Synthesis of Ceramide”, J. Biol. Chem. 238:3131-3 (1963); Gatt, “Enzymatic Hydrolysis of Sphingolipids. 1. Hydrolysis and Synthesis of Ceramides by an Enzyme from Rat Brain”, J. Biol. Chem. 241:3724-31 (1966); Hassler & Bell, “Ceramidase: Enzymology and Metabolic Roles”, Adv. Lip. Res. 26:49-57 (1993). No existe una vía de *novo* para que las células generen esfingosina y, por lo tanto, solo se genera por hidrólisis de ceramida según la acción enzimática de una ceramidasa.

15 La presente invención se dirige a una ceramidasa ácida para su uso en un método de tratamiento o prevención de infecciones bacterianas en un sujeto que tiene fibrosis quística. El método implica selección de un sujeto que tiene fibrosis quística y administración al sujeto seleccionado de una ceramidasa ácida en condiciones eficaces para reducir la ceramida y para tratar o prevenir la infección bacteriana en el sujeto seleccionado. También se describe en este documento (que no forma parte de la invención) un método de tratamiento o prevención de infecciones patogénicas en un sujeto que tiene fibrosis quística, COPD y/o una herida abierta. Este método de la presente invención implica selección de un sujeto que tiene fibrosis quística, COPD y/o una herida abierta y administración al sujeto seleccionado de una ceramidasa en condiciones eficaces para reducir la ceramida y para tratar o prevenir la infección patogénica en el sujeto seleccionado.

20 Como se describe en este documento, una “herida abierta” se refiere a un tipo de lesión en la que una capa epitelial, esto es, piel, se rasga, corta y/o perfora. En algunas realizaciones, una herida abierta se refiere a una lesión aguda que daña la dermis de la piel y aumenta concomitantemente la posibilidad de contraer una infección. El término “herida abierta” también abarca quemaduras.

25 Los métodos asociados con la presente invención y divulgación implican además seleccionar al sujeto en base a niveles elevados de ceramida en comparación con un nivel de referencia para un sujeto que no tiene fibrosis quística, COPD y/o una herida abierta. Como se usa en este documento, el término “nivel de referencia” se refiere a un nivel de una sustancia, por ejemplo, ceramida, que puede ser de interés para fines comparativos. En algunas realizaciones, un nivel de referencia puede ser el nivel o concentración de una proteína expresada como un promedio del nivel o concentración de muestras de una población de control de sujetos sanos (libres de enfermedades y/o libres de patógenos). En otras realizaciones, el nivel de referencia puede ser el nivel en el mismo sujeto en un momento diferente, por ejemplo, antes de que se emplee la presente invención, tal como el nivel determinado antes de que el sujeto desarrolle una enfermedad, afección y/o infección patógena, antes de iniciar la terapia, tales como, por ejemplo, la terapia con ceramidasa, o antes en la terapia.

30 Los métodos de ejemplo para comparar los niveles de ceramida entre un sujeto y un nivel de referencia incluyen, pero no se limitan a, comparar diferencias en los niveles de ceramida detectados, en base a los resultados de uno o más ensayos de proteínas como se describe más adelante, más adelante. En algunas realizaciones, los niveles de ceramida son más altos en presencia de una afección como se describe en este documento. Un sujeto con, o una muestra que posee, un nivel de ceramida detectado más bajo en comparación con un nivel de referencia indicaría que el sujeto puede no requerir terapia con ceramidasa y/o el sujeto puede no tener una afección como se describe en este documento.

35 Los métodos de la presente invención y divulgación se refieren además a selección de un sujeto en base al nivel de ceramida en el epitelio pulmonar, epitelio nasal, moco y/o células aisladas de un sitio abierto de la herida. En algunas realizaciones, la administración se lleva a cabo en condiciones eficaces para normalizar los niveles de ceramida en los epitelios respiratorios, moco o células de los sujetos en un sitio abierto de la herida. La ceramidasa de la presente invención es una ceramidasa ácida (“AC”), tal como, pero no se limita a, las AC enumeradas en la tabla 1 a continuación.

40 La ceramidasa ácida (N-acilesfingosina desacilasa, I.U.B.M.B. Enzima No. EC 3.5.1.23) es una ceramidasa particular responsable del catabolismo de la ceramida. Debido a su participación en el trastorno genético humano de la lipogranulomatosis Farber, AC es uno de los miembros más estudiados de la familia de la enzima ceramidasa. La proteína se ha purificado de varias fuentes, y se han obtenido los ADNc y genes humanos y de ratón. Véanse Bernardo et al., “Purification, Characterization, and Biosynthesis of Human Acid Ceramidase”, J. Biol. Chem. 270:11098-102 (1995); Koch et al., “Molecular Cloning and Characterization of a Full-length Complementary DNA Encoding Human Acid Ceramidase. Identification of the First Molecular Lesion Causing Farber Disease”, J. Biol. Chem. 271:33110-5 (1996); Li et al., “Cloning and Characterization of the Full-length cDNA and Genomic Sequences Encoding Murine Acid Ceramidase”, Genomics 50:267-74 (1998); Li et al., “The Human Acid Ceramidase Gene (ASAH): Chromosomal Location, Mutation Analysis, and Expression”, Genomics 62:223-31 (1999).

Como se describe anteriormente, AC es una ceramidasa que cataliza la hidrólisis de ceramida a esfingosina y ácido graso libre. Véase Bernardo et al., "Purification, Characterization, and Biosynthesis of Human Acid Ceramidase", J. Biol. Chem. 270(19):11098-102 (1995). La AC madura es una proteína de ~50kDa compuesta de una subunidad  $\alpha$  (~13kDa) y una subunidad  $\beta$  (~40kDa). Véase Bernardo et al., "Purification, Characterization, and Biosynthesis of Human Acid Ceramidase", J. Biol. Chem. 270(19):11098-102 (1995). Se produce a través de la escisión de la proteína precursora de AC (véase Ferlinz et al., "Human Acid Ceramidase: Processing, Glycosylation, and Lysosomal Targeting", J. Biol. Chem. 276(38):35352-60 (2001)), que es el producto del gen *Asah1* (NCBI UniGene GenElD No. 427).

La función y/o actividad de AC, además, está directamente relacionada con el pH circundante. De hecho, normalmente se encuentra dentro de los lisosomas con un pH ácido de -4.5, y en ausencia de actividad de AC en pacientes con Farber Lipogranulomatosis ceramidas se acumulan en los lisosomas.

Además, estudios recientes han demostrado que un aumento en el pH del compartimento intracelular reduce la actividad/función de AC en hasta un 90%. Véase Teichgräber et al., "Ceramide Accumulation Mediate Inflammation, Cell Death And Infection Susceptibility In Cystic Fibrosis", Nat Med. 14(4), pp. 382-391 (2008). En algunos aspectos, estos resultados imitan la enfermedad de Farber, que es causada por una deficiencia de AC y provoca una acumulación de ceramida. Véase He et al., "Purification And Characterization Of Recombinant, Human Acid Ceramidase", J. Biol. Chem. 278, 32978-32986 (2003). Además, a un pH de 5.9, se ha demostrado que AC posee una ceramida que produce actividad inversa en lugar de consumirla. Véase *id.* Esta actividad en concierto con la función Asm alterada, al aumentar los niveles de pH vesicular, puede dar como resultado una acumulación neta de ceramida. Véase Teichgräber et al., "Ceramide Accumulation Mediate Inflammation, Cell Death And Infection Susceptibility In Cystic Fibrosis", Nat Med. 14(4), pp. 382-391 (2008).

Otros estudios han demostrado que la deficiencia de CFTR en los macrófagos alveolares da como resultado un cambio de pH lisosómico de pH 4.5 a al menos pH 5.9. Véase Di et al. "CFTR Regulates Phagosome Acidification In Macrophages And Alters Bactericidal Activity", Nat. Cell Biol. 8, 933-944 (2006). Como tal, la presente invención sorprendentemente funciona para prevenir y/o tratar infecciones bacterianas en sujetos con CF al menos porque no se esperaría que AC disminuya los niveles elevados de ceramida en sujetos con CF que poseen un pH lisosómico aumentado. Además, no se esperaría que la AC funcione en la ceramida acumulada en la membrana de las células epiteliales del pulmón.

Las AC que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, las establecidos en la tabla 1 a continuación. En todos los aspectos de la presente invención, la AC puede ser homóloga (esto es, derivada de la misma especie) o heteróloga (esto es, derivada de una especie diferente) al tejido, células y/o sujeto que se va a tratar.

Tabla 1. Miembros de ejemplo de la familia de ceramidasa ácida

	<i>Homo sapiens</i>		<i>Caenorhabditis elegans</i>
	UniProt	Q13510, Q9H715, Q96AS2	UniProt 045686
	OMIM	228000	IntAct 045686
25	NCBI Gene	427	NCBI Gene 173120
	NCBI RefSeq	NP_808592, NP_004306	NCBI RefSeq NP_493173
	NCBI RefSeq	NM_177924, NM_004315	NCBI RefSeq NM_060772
	NCBI UniGene	427	NCBI UniGene 173120
	NCBI Accession	Q13510, AAC73009	NCBI Accession O45686, CAB05556
	<i>Mus musculus</i>		<i>Danio rerio</i>
	UniProt	Q9WV54, Q3U8A7, Q78P93	UniProt Q5XJR7
	NCBI Gene	11886	NCBI Gene 450068
	NCBI RefSeq	NP_062708	NCBI RefSeq NP_001006088
	NCBI RefSeq	NM_019734	NCBI RefSeq NM_001006088

	NCBI UniGene	11886	NCBI UniGene	450068
	NCBI Accession	AK151208 AK034204	NCBI Accession	AAH83231 CB360968
	<i>Gallus gallus</i>		<i>Rattus norvegicus</i>	
40	UniProt	Q5ZK58	UniProt	Q6P7S1, Q9EQJ6
	NCBI Gene	422727	NCBI Gene	84431
	NCBI RefSeq	NP_001006453	NCBI RefSeq	NP_445859
	NCBI RefSeq	NM_001006453	NCBI RefSeq	NM_053407
45	NCBI UniGene	422727	NCBI UniGene	84431
	NCBI Accession	CAG31885, AJ720226	NCBI Accession	AAH61540, AF214647
	<i>Pan troglodytes</i>			
	NCBI Gene	464022		
50	NCBI RefSeq	XP_519629		
	NCBI RefSeq	XM_519629		
	NCBI UniGene	464022		

En algunas realizaciones, la determinación del nivel de ceramida y/o de concentración y/o actividad de AC se lleva a cabo antes del tratamiento. Los ensayos apropiados para determinar las concentraciones de ceramida y/o los niveles o actividad de ceramidasa son fácilmente evidentes para el experto en la técnica. Los métodos apropiados incluyen, por ejemplo, ensayos de actividad (véase Eliyahu et al., "Acid Ceramidase is a Novel Factor Required for Early Embryo Survival", FASEB J. 21(7): 1403-9 (2007), y técnicas bien conocidas, tales como la transferencia Western para determinar la cantidad relativa de proteína y/o actividad de ceramidasa presente en la muestra (donde una mayor cantidad de proteína de ceramidasa se correlaciona con un mayor nivel de actividad de ceramidasa). Véase Eliyahu et al., "Acid Ceramidase is a Novel Factor Required for Early Embryo Survival", FASEB J. 21(7): 1403-9 (2007).

Como se usa en este documento, el término "ensayo" se refiere a un ensayo para detectar la presencia o ausencia de ceramida y/o ceramidasa, en una muestra dada de un fluido corporal. También se incluyen ensayos cuantitativos, que miden la cantidad de una sustancia en una muestra. Como se usa en este documento, el término "muestra" se usa en su sentido más amplio. En cierto sentido, está destinado a incluir una muestra o cultivo obtenido de muestras biológicas. La muestra de líquido corporal se selecciona del grupo que consiste en suero, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo y líquido peritoneal. De particular interés son las muestras que son suero. Los expertos en la materia reconocerán que también se puede usar plasma o sangre completa o una subfracción de sangre completa. Se pueden obtener muestras de fluidos biológicos de animales (incluidos humanos) e incluir productos sanguíneos, tales como plasma, suero y similares. En algunas realizaciones, la muestra contiene un nivel de ceramida o ceramidasa, que se puede determinar fácilmente mediante los métodos descritos en este documento y los bien conocidos en la técnica.

Los inmunoensayos, en su sentido más simple y directo, son ensayos de unión que implican la unión entre anticuerpos y antígeno. Se conocen muchos tipos y formatos de inmunoensayos y todos son apropiados para detectar, por ejemplo, niveles de ceramida. Ejemplos de inmunoensayos son los ensayos de inmunosorción ligada a enzimas ("ELISA"), el ensayo de inmunospot ligado a enzimas ("ELISPOT"), los radioinmunoensayos ("RIA") (véase Ferlinz et al., "Human Acid Ceramidase: Processing, Glycosylation, and Lysosomal Targeting", J. Biol. Chem. 276(38):35352-60 (2001), ensayos de precipitación radioinmune ("RIPA"), ensayos de captura de inmunobead, transferencia de puntos, ensayos de cambio de gel, citometría de flujo, inmunohistoquímica, microscopía de fluorescencia, matrices de proteínas, matrices de cuentas multiplexadas, captura magnética, imágenes *in vivo*, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia ("FRET") y recuperación/localización de fluorescencia después del fotoblanqueo ("FRAP/FLAP"). Las etapas de diversos métodos útiles de inmunodetección se han descrito en la literatura científica, tales como, por ejemplo, Maggio et al., Enzima-Immunoassay (1987) and Nakamura, et al., "Enzima Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems, Handbook of Experimental Immunology", Vol. 1: Immunochemistry, 27.1-27.20 (1986).

En general, los inmunoensayos implican poner en contacto una muestra sospechosa de contener una molécula o proteína de interés (tales como, ceramida y/o ceramidasa) con un anticuerpo contra la molécula o proteína de

interés, en condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos. A este respecto, el experto en la técnica podrá evaluar la presencia y/o nivel de moléculas o proteínas específicas de interés en una muestra dada.

Los inmunoensayos pueden incluir métodos para detectar o cuantificar la cantidad de una molécula o proteína de interés en una muestra, métodos que generalmente implican la detección o cuantificación de cualquier complejo inmune formado durante el proceso de unión. En general, la detección de la formación de inmunocomplejos es bien conocida en la técnica y se puede lograr mediante la aplicación de numerosos enfoques. Estos métodos generalmente se basan en la detección de una etiqueta o marcador, tales como etiquetas radiactivas, fluorescentes, biológicas o enzimáticas o cualquier otra etiqueta conocida. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 y 4,366,241.

5 Un ensayo no específico particularmente eficaz usado para detectar proteínas totales es el ensayo de proteínas Bradford. Véase Bradford, M. M., "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Anal. Biochem.* 72:248-254 (1976).

15 El ensayo de proteínas Bradford usa un stock de colorante de Coomassie Blue G (C.I. # 42655) (100 mg), que se disuelve en 50 mL de metanol. La solución se agrega a 100 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85% y se diluye a 200 mL con agua, dando como resultado un rojo oscuro. Las concentraciones finales de reactivo del ensayo son 0.5 mg/mL de Coomassie Blue G, 25% de metanol y 42.5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. El reactivo de ensayo del ensayo de Bradford se prepara diluyendo 1 parte de colorante con 4 partes de H<sub>2</sub>O destilada. El color resultante debe ser marrón con un pH de 1.1. Se prepara una serie de patrones de proteínas en la misma solución reguladora que las muestras a analizar, usando albúmina de suero bovino ("BSA") con concentraciones de 0, 250, 500, 750 y 1500 µg/mL para un ensayo estándar. La absorbancia se lee a 595 nm para el procedimiento de ensayo estándar y 450 nm para un microensayo (Dynex Technologies, Chantilly, VA), y la proporción de absorbancias, 595 nm sobre 450 nm, se usó para los cálculos de curva estándar. Véase Zor, et al., "Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies", *Anal. Biochem.* 236:302-308 (1996).

20 En algunas realizaciones de referencia, los métodos asociados con la presente divulgación se llevan a cabo administrando una proteína precursora de AC, que luego es convertida en una proteína ceramidasa ácida activa por la célula. En particular, la proteína precursora AC sufre una escisión autoproteolítica en la forma activa (compuesta de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ). Esto es promovido por el entorno intracelular y, según las secuencias altamente conservadas en el sitio de escisión de las proteínas precursoras de AC en todas las especies, se espera que ocurra en la mayoría, si no en todos, los tipos de células. Las proteínas precursoras de ceramidasa ácida apropiadas incluyen las expuestas en la tabla 1, *supra*. Como será evidente para el experto en la técnica, la proteína precursora podría estar contenida opcionalmente en un medio de cultivo al que está expuesta la célula. De este modo, se contemplan realizaciones de referencia en las que la proteína precursora es absorbida por el sujeto huésped o la célula de interés y convertida en ceramidasa ácida activa.

25 Aún otro enfoque para administrar proteínas o agentes polipeptídicos de la presente invención, esto es, AC, implica la preparación de proteínas quiméricas según la Patente de los Estados Unidos No. 5,817,789 de Heartlein et al. La proteína quimérica puede incluir un dominio ligando y el agente polipeptídico (esto es, AC, proteína precursora de AC). El dominio del ligando es específico para los receptores ubicados en una célula diana. De este modo, cuando la proteína quimérica se administra al sujeto, la célula y/o el medio de cultivo, la proteína quimérica se internalizará.

30 Dependiendo del nivel o actividad de una sustancia, por ejemplo, ceramida y/o ceramidasa, se pueden administrar uno o más agentes adicionales en combinación con la ceramidasa, esto es, AC, de acuerdo con los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, el uno o más agentes adicionales se seleccionan del grupo que consiste en uno o más agentes reductores de ceramida adicionales, uno o más inhibidores de la esfingomielinasa ácida, uno o más agentes para reducir la infección y combinaciones de los mismos. Los agentes apropiados para reducir la infección incluyen antibióticos (por ejemplo, tobramicina inhalada, TOBI), reactivos que bloquean la unión de los patógenos al epitelio pulmonar, reactivos para reducir la viscosidad del moco (por ejemplo, Dornase alfa, Pulmozyme), reactivos de chaperona para mejorar la función de las proteínas faltantes (por ejemplo, Ivacaftor, Kalydeco), y las combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la ceramidasa, esto es, AC, se administra simultáneamente, por separado o secuencialmente con el uno o más agentes adicionales.

35 Como se usa en este documento, el término uso terapéutico "simultáneo" se refiere a la administración de al menos dos ingredientes activos por la misma ruta y al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo. Como se usa en este documento, el término uso terapéutico "separado" se refiere a una administración de al menos dos ingredientes activos al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo por diferentes rutas. Como se usa en este documento, el término uso terapéutico "secuencial" se refiere a la administración de al menos dos ingredientes activos en momentos diferentes, siendo la ruta de administración idéntica o diferente. Más particularmente, el uso secuencial se refiere a la administración completa de uno de los ingredientes activos antes de que comience la administración del otro u otros. De este modo, es posible administrar uno de los ingredientes activos durante varios minutos, horas o días antes de administrar el otro ingrediente o ingredientes activos. No hay tratamiento simultáneo en este caso.

40 La administración se puede llevar a cabo mediante administración sistémica al sujeto o mediante administración dirigida a tejidos, órganos y/o células afectados. El agente terapéutico (esto es, AC, proteína precursora de AC,



ácido nucleico que codifica la proteína precursora de AC/AC) se puede administrar a un área no diana junto con uno o más agentes que facilitan la migración del agente terapéutico a (y/o la absorción por) un tejido, órgano o célula diana. Además y/o alternativamente, el agente terapéutico en sí mismo se puede modificar para facilitar su transporte (y captación por) el tejido, órgano o célula deseado, como será evidente para un experto en la técnica.

5 Se puede usar cualquier enfoque apropiado para la administración de los agentes para practicar la presente invención. Por lo general, el agente terapéutico se administrará a un paciente en un vehículo que administra el (los) agente (s) terapéutico (s) a la célula, tejido u órgano diana. Las vías de administración de ejemplo incluyen, sin limitación, mediante inoculación intratraqueal, aspiración, instilación de vía aérea, aerosolización, nebulización, instilación intranasal, instilación oral o nasogástrica, inyección intraperitoneal, inyección intravascular, tópica, transdérmica, parenteral, subcutánea, inyección intravenosa, inyección intraarterial (tal como a través de la arteria pulmonar), inyección intramuscular, instilación intrapleural, intraventricular, intralesional, mediante la aplicación a las membranas mucosas (tal como la de la nariz, la garganta, los bronquios, los genitales y/o el ano) o la implantación de un vehículo de liberación sostenida.

10 En algunas realizaciones, la ceramidasa, esto es, AC, se administra por vía oral, tópica, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea o por inhalación de aerosol. En algunas realizaciones, la ceramidasa, esto es, AC, se administra por inhalación de aerosol. En algunas realizaciones, la ceramidasa y/o agentes adicionales se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas apropiadas para administración, como se describe en este documento.

15 Los agentes de la presente invención, esto es, AC, se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte, o con un portador comestible asimilable, o pueden estar encerrados en cápsulas de cubierta dura o blanda, o pueden estar comprimidos en forma de comprimidos, o se pueden incorporar directamente con los alimentos de la dieta. Para la administración terapéutica oral, estos compuestos activos se pueden incorporar con excipientes y se usan en la forma de comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0.1% del agente. El porcentaje del agente en estas composiciones puede, por supuesto, variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente 2% y aproximadamente 60% del peso de la unidad. La cantidad del agente en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación apropiada.

20 Los comprimidos, cápsulas y similares también pueden contener un aglutinante tal como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata o ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando la forma de la unidad de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite graso.

25 Los agentes, esto es, AC, también se pueden administrar por vía parenteral. Las soluciones o suspensiones del agente se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. Los aceites ilustrativos son los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja o aceite mineral. En general, el agua, la solución salina, la dextrosa acuosa y las soluciones de azúcar relacionadas, y los glicoles tales como el propilenglicol o el polietilenglicol, se prefieren los portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

30 Las formas farmacéuticas apropiadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas apropiadas de los mismos y aceites vegetales.

35 Los agentes, esto es, AC, según la presente invención también se pueden administrar directamente a las vías respiratorias en forma de aerosol. Para su uso como aerosoles, los compuestos de la presente invención en solución o suspensión se pueden envasar en un recipiente de aerosol presurizado junto con propulsores apropiados, por ejemplo, propulsores de hidrocarburos como propano, butano o isobutano con adyuvantes convencionales. Los materiales de la presente invención también se pueden administrar en una forma no presurizada.

40 Los dispositivos de administración de ejemplo incluyen, sin limitación, nebulizadores, atomizadores, liposomas (que incluyen técnicas de administración de fármacos tanto activas como pasivas) (Wang & Huang, "pH-Sensitive Immunoliposomes Mediate Target-cell-specific Delivery and Controlled Expression of a Foreign Gene in Mouse", Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:7851-5 (1987); Bangham et al., "Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids", J. Mol. Biol. 13:238-52 (1965); la Patente de los Estados Unidos No. 5,653,996 de Hsu; la Patente de los Estados Unidos No. 5,643,599 de Lee et al.; la Patente de los Estados Unidos No. 5,885,613 de Holland et al.; la Patente de los Estados Unidos No. 5,631,237 de Dzau & Kaneda; y la Patente de los Estados Unidos No. 5,059,421 de Loughrey et al.; Wolff et al., "The Use of Monoclonal Anti-Thyl IgG1 for the Targeting of

Liposomes to AKR-A Cells in Vitro and in Vivo", Biochim. Biophys. Acta 802:259-73 (1984)), parches transdérmicos, implantes, composiciones de depósito de proteínas implantables o inyectables y jeringas. También se pueden emplear otros sistemas de suministro que son conocidos para los expertos en el arte para lograr el suministro deseado del agente terapéutico al órgano, tejido o células deseados.

- 5 La administración se puede llevar a cabo tan frecuentemente como se requiera y durante un tiempo que sea apropiado para proporcionar una profilaxis eficaz o eficacia contra un patógeno. Por ejemplo, la administración se puede llevar a cabo con una sola formulación de dosificación de liberación sostenida o con múltiples dosis diarias.

10 La cantidad que se va a administrar variará, por supuesto, dependiendo del régimen de tratamiento. Generalmente, se administra un agente para lograr una cantidad eficaz para mejorar el aclaramiento bacteriano. De este modo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad que sea capaz de prevenir y/o tratar al menos parcialmente una infección bacteriana. Esto incluye, sin limitación, retrasar el inicio de la infección. La dosis requerida para obtener una cantidad eficaz puede variar según el agente, la formulación y el individuo al que se administra el agente.

15 La dosificación, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes o composiciones de la presente invención se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) y ED<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos pueden ser deseables. Si bien se pueden usar composiciones que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de administración que dirija tales composiciones al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

20 Como tal, la ceramidasa ácida se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz, en algunas realizaciones. Como se usa en este documento, los términos "cantidad terapéuticamente eficaz", "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" de un agente, proteína, compuesto y/o composición, es una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, por ejemplo, una cantidad que resulta en la prevención, o una disminución de los síntomas asociados con una enfermedad que se está tratando.

25 La cantidad eficaz de un agente o composición de la presente invención administrada al sujeto dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad y de las características del individuo, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a las drogas. También dependerá del grado, la gravedad y el tipo de enfermedad. El experto en la técnica podrá determinar las dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Las composiciones de la presente invención también se pueden administrar en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales.

30 Por lo general, el agente terapéutico se administrará como una formulación farmacéutica que incluye el agente terapéutico y cualquier adyuvante, portador, excipiente y/o estabilizante farmacéuticamente aceptable, y puede estar en forma sólida o líquida, tal como comprimidos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones. Las composiciones contienen preferiblemente desde aproximadamente 0.01 a aproximadamente 99 por ciento en peso, más preferiblemente desde aproximadamente 2 a aproximadamente 60 por ciento en peso, de agente terapéutico junto con los adyuvantes, portadores y/o excipientes. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz varía desde aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del agente varía desde aproximadamente 0.05 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, o desde aproximadamente 1 o 2 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg.

35 Los agentes, esto es, AC, de la presente invención se pueden administrar en diversos momentos. La ceramidasa, esto es, AC, se administra antes del inicio de la infección en algunas realizaciones. En otras realizaciones, la ceramidasa, esto es, AC, se administra después del inicio de la infección. Aún más, la ceramidasa, esto es, AC, se puede administrar antes y después del inicio de la infección según algunas realizaciones de la presente invención.

40 También se describe en este documento (no según la invención) un método para controlar la eficacia de una terapia en un sujeto que tiene una infección patogénica y una afección subyacente. El método incluye selección de un sujeto, proporcionar un nivel basal de ceramida en una muestra de fluido corporal del sujeto seleccionado antes de la terapia y tratar la infección patógena con la terapia, que, por ejemplo, puede ser la administración terapéutica de una ceramidasa tal como, por ejemplo, por ejemplo, AC. El método incluye además detectar un nivel de ceramida posterior a la terapia en una muestra de fluido corporal del sujeto seleccionado después de la terapia, comparar el nivel de ceramida de referencia con el nivel de ceramidasa posterior a la terapia e identificar si la terapia ha sido eficaz en función de la comparación y/o la patología de la infección patogénica.

45 Se describe adicionalmente en este documento (no según la invención) un kit o sistema reactivo para su uso o administrar los agentes de la presente invención. Tales kits contendrán una combinación de reactivos que incluirá

los elementos particulares necesarios para realizar un ensayo según los métodos descritos en este documento. El sistema de reactivos se presenta en una forma comercialmente empaquetada, como una composición o mezcla donde la compatibilidad de los reactivos permitirá, en una configuración de dispositivo de prueba, o más por lo general como un kit de prueba, esto es, una combinación empaquetada de uno o más recipientes, dispositivos, o similares que contienen los reactivos necesarios, y que preferiblemente incluyen instrucciones escritas para la realización de ensayos. El kit se puede adaptar para cualquier configuración de un ensayo y puede incluir composiciones para realizar cualquiera de los diversos formatos de ensayo descritos en este documento.

Los reactivos útiles para los métodos descritos se pueden almacenar en solución o se pueden liofilizar. Cuando se liofiliza, algunos o todos los reactivos se pueden almacenar fácilmente en los pocillos de la placa de microtitulación para facilitar su uso después de la reconstitución. Se contempla que cualquier método para liofilizar reactivos conocidos en la técnica sería apropiado para preparar reactivos desecados útiles para los métodos descritos.

Después de haber descrito generalmente la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitantes de la presente invención, a menos que se especifique.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Ratones.

Se produjeron ratones congénicos B6.129P2(CF/3)-*Cftr*<sup>TgH(neoim)Hgu</sup> ("CF<sup>MHH</sup>") a través de la endogamia del ratón mutante *Cftr*<sup>TgH(neoim)Hgu</sup> original, que se generó por mutagénesis de inserción en el exón 10 del gen *Cftr*. Véase Charizopoulou et. al., "Instability Of The Insertional Mutation In *Cftr*TgH(neoim)Hgu Cystic Fibrosis Mouse Model", BMC Genet. 5 p. 6 (2004). Esta cepa congénita de *Cftr*<sup>MHH</sup> se retrocruzó en el fondo de B6. Estos ratones aún expresan bajos niveles de CFTR y, de este modo, se pueden alimentar con una dieta estándar para ratones. Exhiben un desarrollo normal, pero también muestran una patología pulmonar típica de la CF. En este documento se denominan ratones "CF". Véase Teichgräber et. al., "Ceramide Accumulation Mediate Inflammation, Cell Death And Infection Susceptibility In Cystic Fibrosis", Nat Med. 14(4), pp. 382-391 (2008); Wolbeling et. al., "Head-out Spirometry Accurately Monitors the Course of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection in Mice", Respiration 80:340-6 (2010). Se usaron ratones singénicos B6 como controles.

Para algunos experimentos, los ratones *Cftr*<sup>tm1Unc-TG(FABPCFTR)</sup> ("Cftr<sup>-/-</sup>", comprados en The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) se retrocruzaron durante más de 10 generaciones con ratones C57BL/6. Los ratones son completamente deficientes en *Cftr* en todos los órganos excepto el intestino, donde expresan CFTR humano que está bajo el control de un promotor de la proteína de unión a ácidos grasos ("FABP"). El transgen proviene de la obstrucción intestinal y permite alimentarse con una dieta normal. Nuevamente, se usaron ratones B6 como controles. No se observaron diferencias importantes en los experimentos que emplearon tanto las cepas *Cftr*<sup>-/-</sup> como *Cftr*<sup>MHH</sup>.

Para otros experimentos, se usaron ratones deficientes en la enzima ceramida sintasa 2. Estos ratones (CerS2<sup>-/-</sup>) fueron generados por la interrupción del primer intrón del gen del ratón CerS2. No viven más allá de -16 meses y acumulan ceramida C16 en la mayoría de los tejidos (Pewzner-Jung et al., "A Critical Role of Ceramide Synthase 2 in Liver Homeostasis I. Alterations in The Lipid Metabolic Pathway", J Biol. Chem. 285:10902 (2010)).

Los ratones fueron alojados y criados dentro de jaulas aisladas en el vivero del University Hospital, University of Duisburg-Essen, Alemania. Fueron evaluados repetidamente por un panel de patógenos murinos comunes según las recomendaciones de 2002 de Federation of European Laboratory Animal Science Associations. Los ratones estaban libres de todos los patógenos. Los procedimientos realizados en los animales fueron aprobados por the Bezirksregierung Duesseldorf, Duesseldorf, Alemania.

### Ejemplo 2 - Anticuerpos y reactivos.

Todas las tinciones de ceramida se realizaron usando el clon de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ceramida S58-9 (Glycobiotech) que se visualizó con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> IgM Cy3-burro-anti-ratón (Jackson # 715-166-020) o anticuerpo de IgM de burro-anti-ratón acoplado a Cy5 (Jackson # 715-176-020). La ceramidasa ácida humana recombinante se produjo en células de ovario de hámster chino ("CHO") y se purificó a partir de los medios como se describió previamente. He et al., J Biol. Chem. 278:32978-86 (2003).

### Ejemplo 3 - Bacterias.

Se usaron The laboratory strain American Type Culture Collection 27853 de *P. aeruginosa* y el aislado clínico de *P. aeruginosa* descrito anteriormente ("762"). Las bacterias se sembraron en placas de congelados en placas de agar de soja tréptico fresco (TSA; Becton Dickinson), se cultivaron a 37 °C, durante 14-16 horas y se resuspendieron en 40 mL de caldo de soja tréptico calentado a 37 °C (Becton Dickinson) a una densidad óptica de 0.225 a 550 nm. La suspensión bacteriana se incubó luego a 37 °C, durante 1 hora con agitación de 125 rpm para obtener bacterias en la fase de crecimiento logarítmico temprano. Véase Grassmé et. al., "Host Defense Against *Pseudomonas aeruginosa* Requires Ceramide-Rich Membrane Rafts", Nat Med. 9(3):322-330 (2003). Luego se lavaron las

bacterias dos veces y se resuspendieron en medio RPMI-1640 calentado (Invitrogen) suplementado con HEPES 10 mM (RPMI + HEPES). La concentración final de bacterias se cuantificó por fotospectrometría.

Ejemplo 4 - Inmunohistoquímica *in vivo*.

5 Para la evaluación inmunohistoquímica de células epiteliales bronquiales murinas, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se perfundieron inmediatamente a través del corazón derecho con solución salina normal helada durante dos minutos a baja presión. Esto fue seguido por perfusión cardíaca con PFA regulado con PBS al 4% durante 10-15 minutos. Después de este aclaramiento inicial de sangre y fijación, se extrajeron los pulmones y se fijaron adicionalmente en PFA al 4% durante 24-36 h. El tejido se deshidrató en serie usando un gradiente de etanol a xilol y luego se incrustó en parafina.

10 Las muestras luego se seccionaron a 7  $\mu$ m, se desparafinaron, se rehidrataron y se trataron con Pepsina (Invitrogen) durante 15 minutos a 37 °C. Luego se lavaron con agua y PBS y se bloquearon durante 10 minutos a temperatura ambiente con PBS y Tween 20 al 0.05% (Sigma) y FCS al 1%. Luego las muestras se tiñeron consecutivamente con anticuerpos primarios en H/S + FCS al 1% a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las muestras se lavaron entre las tinciones dos veces con PBS + Tween 20 al 0.05% y una vez con PBS. El tejido se marcó de forma  
15 secundaria con anticuerpos secundarios acoplados con fluorescencia en H/S + FCS al 1% en la oscuridad durante 30 minutos. El tejido se lavó nuevamente dos veces con PBS + Tween 20 al 0.05%, una vez con PBS y finalmente se incrustó en Mowiol. Las muestras se evaluaron usando un microscopio confocal como se describe a continuación.

Ejemplo 5 - Inhalación e infección *in vivo*.

20 Se preparó *P. aeruginosa* como se describió anteriormente y se resuspendió en RPMI-1640 más HEPES 10 mM a una concentración final de  $1 \times 10^8$  CFU en 20  $\mu$ L de medio. Luego se inocularon con una aguja de calibre 30 recubierta de plástico, que se insertó 2 mm en la nariz. Los números bacterianos se cuantificaron en pulmones de ratón 2 horas después de la infección. Se sacrificaron los ratones y se extrajeron los pulmones, se homogeneizaron y se lisaron en 5 mg/mL de saponina para liberar bacterias intracelulares. Las muestras se lavaron luego en PBS  
25 estéril, se diluyeron y se sembraron en placas por duplicado en placas TSA durante 12 horas. Se contaron los números de bacterias y representan el número de bacterias en muestras de pulmón completo. Este modo de infección evalúa con mayor precisión el aclaramiento mucociliar que otros modelos de infección pulmonar, tales como la infección intratraqueal. Véase Teichgräber et. al., "Ceramide Accumulation Mediate Inflammation, Cell Death And Infection Susceptibility In Cystic Fibrosis", Nat Med. 14(4):382-391 (2008); Zhang et. al., "Kinase Suppressor Of Ras-1 Protects Against Pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* Infections", Nat Med. 17(3):341-346 (2011).

30 Ejemplo 6 - Estadísticas.

Los datos se expresan como medios aritméticos  $\pm$  SD y se realizan análisis estadísticos como se indica. Como todos los valores se distribuían normalmente, se aplicó ANOVA unidireccional. Las significaciones se indican en las figuras con asteriscos.

Ejemplo 7 - Microscopía confocal y discusión.

35 Las muestras se examinaron con un microscopio confocal Leica TCS-SP5 equipado con una lente de inmersión en aceite 100x, y las imágenes se analizaron con el software Leica LCS (Leica Microsystems). Todas las muestras comparativas se midieron con configuraciones idénticas.

40 La ceramida aumenta en los pulmones de los sujetos y ratones con CF (Figura 1A), y es un factor importante en la susceptibilidad de los ratones con CF a la infección por *P. aeruginosa*. Véase Grassmé et. al., "CFTR-dependent Susceptibility Of The Cystic Fibrosis-Host To *Pseudomonas aeruginosa*", Int J Med Microbiol. 300(8):578-83 (2010). Estudios previos demostraron que la inhibición farmacológica de la esfingomielinasa ácida o la heterocigosidad genética del gen de la esfingomielinasa ácida son suficientes para normalizar los niveles de ceramida en los pulmones con CF de ratón. Véase Becker et. al., "Acid Sphingomyelinase Inhibitors Normalize Pulmonary Ceramide And Inflammation In Cystic Fibrosis", Am J Respir Cell Mol Biol. 42(6):716-24 (2010).

45 Además, los ratones con deficiencia de *Cftr* <sup>CF<sup>MHH</sup></sup> inhalaron ceramidasa ácida, que hidroliza la ceramida. Esta inhalación corrigió los niveles de ceramida en las células epiteliales bronquiales de ratones con CF (Figura 1B). La inhalación del disolvente, esto es, 0.9% de NaCl no afectó los niveles de ceramida.

50 En otro ejemplo, se inhalaron *Cftr*<sup>-/-</sup>, CerS2 o ratones normales con solución salina o ceramidasa ácida y luego se infectaron con *P. aeruginosa* (Figura 2). Los ratones con deficiencia de *Cftr* <sup>CF<sup>MHH</sup></sup> y CerS2 acumulan ceramida en sus pulmones en relación con los ratones normales. Dos horas después de la inhalación se sacrificaron y se cuantificó la bacteria restante en los pulmones. Los ratones de tipo salvaje eliminaron la *P. aeruginosa* de manera eficaz, mientras que los ratones *Cftr*<sup>-/-</sup> o CerS2<sup>-/-</sup> inhalados con solución salina no pudieron y tenían un gran número de bacterias restantes. En contraste, los ratones *Cftr*<sup>-/-</sup> o CerS2<sup>-/-</sup> inhalados con ceramidasa ácida tenían títulos bacterianos muy bajos como los ratones normales.

La identificación de irregularidades en las vías respiratorias de CF naive proporciona un concepto novedoso para la prevención de infección en sujetos con CF. Los ejemplos actuales proporcionan varios enfoques para frustrar la infección y tratar la causa principal de muerte en sujetos con CF.

Ejemplo 8 - La inhalación de AC protege contra las infecciones por *Pseudomonas*.

- 5 Se inhalaron los ratones con 100 microgramos de ceramidasa ácida recombinante (AC) en 0.8 mL de NaCl al 0.9% 30 a 45 minutos antes de la infección intranasal con  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (CFU) de la cepa 762 o ATCC 27853 de *P. aeruginosa*. Se extrajeron los pulmones 4 horas después de la infección, se homogeneizaron, se lisaron en 5 mg/mL de saponina durante 10 minutos y se lavaron. Las alícuotas se sembraron en placas LB y se dejaron crecer durante la noche. Se contaron las CFU en las placas LB para determinar el número de bacterias *P. aeruginosa* en el pulmón. Se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar de cuatro experimentos independientes.

Una inhalación única de AC previno la infección de ratones con CF con dos cepas diferentes de *P. aeruginosa* (Figura 3). La cepa clínica 762 se obtuvo originalmente de una infección del tracto urinario, mientras que la cepa ATCC 27853 es una cepa de laboratorio. La inhalación de solución salina sola se usó como control.

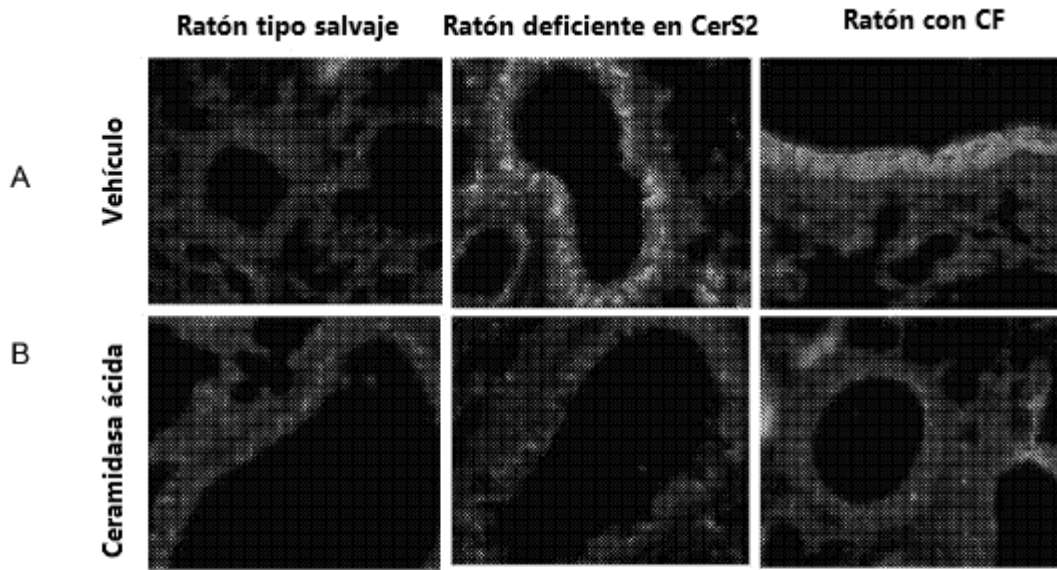
- 15 Se inhalaron ratones CF con ceramidasa ácida recombinante (100 microgramos en 0.8 mL de NaCl al 0.9%). Se usó solución salina como control. En todos los casos, los ratones se inhalaban 30-45 minutos antes de la inhalación con la cepa clínica 762 de *Pseudomonas aeruginosa*, y luego se sacrificaron 4 horas después. Se extrajeron los pulmones 4 horas después de la infección, se homogeneizaron, se lisaron en 5 mg/mL de saponina durante 10 minutos y se lavaron. Las alícuotas se sembraron en placas LB y se dejaron crecer durante la noche.

Se contaron las CFU en las placas LB para determinar el número de bacterias *P. aeruginosa* en el pulmón.

- 20 La inhalación de ratones con CF con ceramidasa ácida recombinante previno la infección con la cepa clínica 762 de *P. aeruginosa* en un grado similar (Figura 3).

**REIVINDICACIONES**

1. Una ceramidasa ácida para su uso en un método de tratamiento o prevención de infecciones bacterianas en un sujeto que tiene fibrosis quística, dicho método comprende:
- selección de un sujeto con fibrosis quística y
- 5 administración a dicho sujeto seleccionado de la ceramidasa ácida en condiciones eficaces para reducir la ceramida y para tratar o prevenir dicha infección bacteriana en dicho sujeto seleccionado.
2. La ceramidasa ácida para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto se selecciona en base a niveles elevados de ceramida en comparación con un nivel de referencia para un sujeto que no tiene dicha fibrosis quística.
3. La ceramidasa ácida para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha selección se basa en el nivel de ceramida en el epitelio pulmonar, epitelio nasal, moco y/o células aisladas de un sitio abierto de la herida.
- 10 4. La ceramidasa ácida para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha administración se lleva a cabo bajo condiciones eficaces para normalizar los niveles de ceramida en los epitelios respiratorios, moco o células del sujeto en un sitio abierto de la herida.
5. La ceramidasa ácida para su uso según la reivindicación 1, en la que uno o más agentes adicionales que reducen los niveles de ceramida se administran en combinación con dicha ceramidasa ácida.
- 15 6. La ceramidasa ácida para su uso según la reivindicación 5, en la que dicho uno o más agentes adicionales se seleccionan del grupo que consiste en uno o más agentes reductores de ceramida adicionales, uno o más inhibidores de la esfingomielinasa ácida, uno o más agentes para reducir la infección, y combinaciones de los mismos.
- 20 7. La ceramidasa ácida para su uso según la reivindicación 6, en la que dicho uno o más agentes adicionales es uno o más agentes para reducir la infección y se selecciona del grupo que consiste en antibióticos, reactivos que bloquean la unión de los patógenos al epitelio pulmonar, reactivos para reducir viscosidad mucosa, reactivos de chaperona para mejorar la función de proteína que falta y combinaciones de los mismos.
8. La ceramidasa ácida para su uso según la reivindicación 6, en la que dicha ceramidasa ácida se administra simultáneamente, por separado o secuencialmente con dicho uno o más agentes adicionales.
- 25 9. La ceramidasa ácida para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha administración es oral, tópica, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea o por inhalación de aerosol.
10. La ceramidasa ácida para su uso según la reivindicación 9, en la que dicha administración es por inhalación de aerosol.
- 30 11. La ceramidasa ácida para su uso según la reivindicación 1, en la que la ceramidasa ácida se administra en una cantidad desde 0.001 mg/kg a 500 mg/kg.
12. La ceramidasa ácida para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha ceramidasa ácida se administra antes del inicio de la infección.
- 35 13. La ceramidasa ácida para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha ceramidasa ácida se administra después del inicio de la infección.



FIGURAS 1A-1B

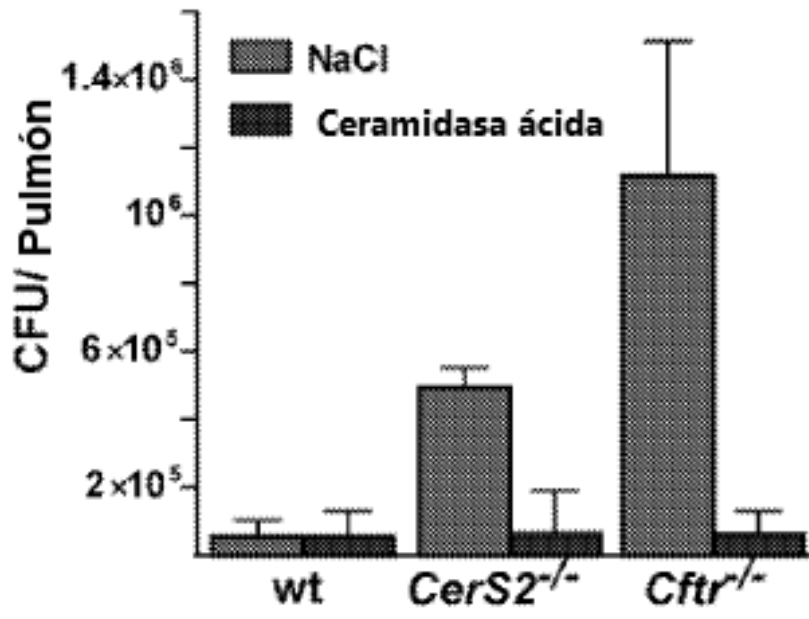


FIGURA 2



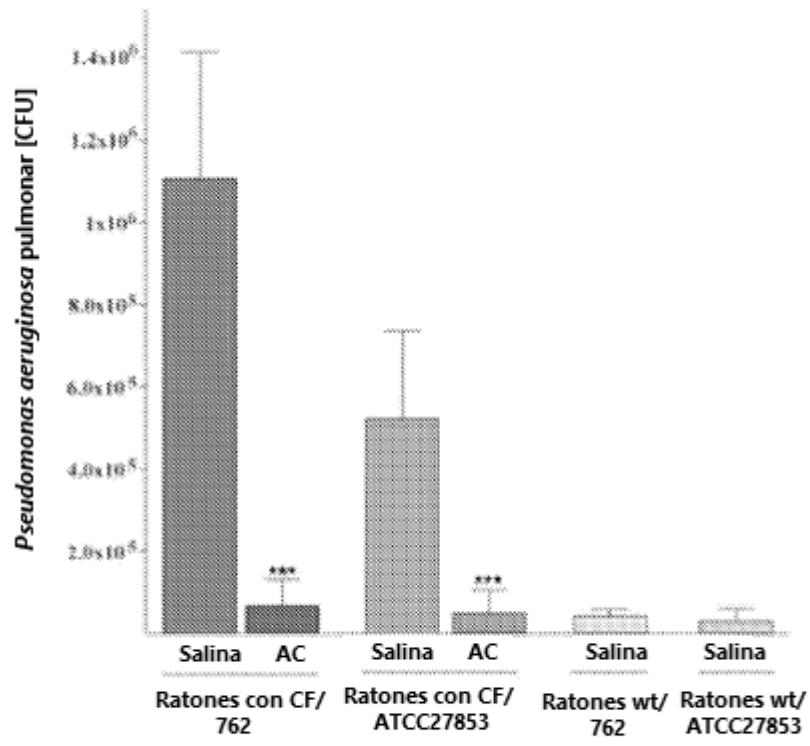


FIGURA 3