

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 983 639**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/7048** (2006.01)  
**A61K 31/575** (2006.01)  
**A61K 47/28** (2006.01)  
**A61K 9/12** (2006.01)  
**C12P 19/62** (2006.01)  
**C07H 17/08** (2006.01)  
**A61P 11/10** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2017 PCT/US2017/026806**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017 WO17177228**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2017 E 17779973 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2024 EP 3439668**

---

(54) Título: **Restauración mediada por moléculas pequeñas de la fisiología de la superficie de las vías respiratorias en epitelios pulmonares humanos de fibrosis quística**

(30) Prioridad:

**08.04.2016 US 201662320111 P**  
**11.04.2016 US 201662320795 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.10.2024**

(73) Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE  
UNIVERSITY OF ILLINOIS (100.0%)  
352 Henry Administration Building, 506 South  
Wright Street  
Urbana, IL 61801, US**

(72) Inventor/es:

**BURKE, MARTIN, D. y  
MURAGLIA, KATRINA, A.**

(74) Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

ES 2 983 639 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

Restauración mediada por moléculas pequeñas de la fisiología de la superficie de las vías respiratorias en epitelios pulmonares humanos de fibrosis quística

5

Antecedentes de la invención

La fibrosis quística es una enfermedad genética autosómica recesiva que acorta sustancialmente la esperanza de vida en los individuos afectados. Ocurre en 1 de cada 3.000 nacidos vivos y está causada por mutaciones en el gen *CFTR* que codifica el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (*CFTR*), una proteína del canal aniónico expresada en la membrana de los vertebrados. La enfermedad se caracteriza con mayor frecuencia por infecciones respiratorias crónicas y potencialmente mortales, y para la mayoría de los pacientes con fibrosis quística sólo se encuentran disponibles tratamientos sintomáticos. La mediana de supervivencia de los pacientes es de sólo 33 años.

15

*CFTR* es un canal iónico de clase transportador ABC que conduce iones de cloruro a través de las membranas de las células epiteliales. Las mutaciones del gen *CFTR* que afectan la función del canal iónico de cloruro provocan una desregulación del transporte de líquido epitelial en el pulmón, el páncreas y otros órganos, lo que provoca fibrosis quística. Las complicaciones incluyen mucosidad espesa en los pulmones con frecuentes infecciones respiratorias e insuficiencia pancreática que da lugar a desnutrición y diabetes. Estas condiciones conducen a una discapacidad crónica y una esperanza de vida reducida. En pacientes masculinos, la obstrucción progresiva y la destrucción de los conductos deferentes y el epidídimo en desarrollo parecen ser el resultado de secreciones intraluminales anormales, lo que causa ausencia congénita de los conductos deferentes e infertilidad masculina.

25

El *CFTR* funciona como un canal aniónico regulado por ATP activado por AMPc, aumentando la conductancia de ciertos aniones (p. ej., Cl<sup>-</sup>) para fluir a favor de su gradiente electroquímico. Los cambios conformacionales impulsados por ATP en *CFTR* abren y cierran una puerta para permitir el flujo transmembrana de aniones a favor de su gradiente electroquímico. Esta función contrasta con otras proteínas ABC, en las que los cambios conformacionales impulsados por el ATP impulsan el transporte hacia arriba del sustrato a través de las membranas celulares. Esencialmente, *CFTR* es un canal iónico que evolucionó como un transportador ABC "roto" que tiene filtraciones cuando está en conformación abierta.

35

Las mutaciones del gen *CFTR* que afectan a la función del canal aniónico conducen a una desregulación del transporte de iones y líquidos epiteliales, moco espesado e infecciones respiratorias frecuentes en el pulmón, lo que causa principalmente la fisiopatología que acorta la vida asociada con la fibrosis quística. *CFTR* se encuentra en las células epiteliales de muchos órganos, incluidos el pulmón, el hígado, el páncreas, el tracto digestivo, el tracto reproductivo y la piel. En el pulmón, el canal iónico de proteína mueve los iones de bicarbonato y cloruro fuera de una célula epitelial al líquido de la superficie de las vías respiratorias apicales (ASL). Esto mantiene el pH, la viscosidad y la actividad adecuados del ASL de las proteínas antimicrobianas sensibles al pH. Los cambios en el ASL debido a la disfunción del *CFTR* perjudican la eliminación y destrucción de bacterias, dejando a los pacientes vulnerables a las infecciones crónicas de las vías respiratorias que son el principal factor de morbilidad y mortalidad.

45

Existe una necesidad imperiosa de tratamientos eficaces de la fibrosis quística.

El documento WO 2008/127358 A2 describe una composición que comprende anfotericina B y colesterol. El documento WO 2005/120497 A2 describe composiciones para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística. El documento EE. UU. 5.880.101 A se refiere al uso de al menos un macrólido de polieno para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades que están asociadas con un recambio energético alterado.

Compendio de la invención

55

Un aspecto de la invención es un complejo que comprende (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística. Este y otros complejos similares pueden formarse como se describe en la presente memoria y pueden ensayarse mediante diversos métodos, tales como el método descrito en los Ejemplos. Anderson TM et al. (2014) Nat Chem Biol 10(5):404-406.

60

Un aspecto de la invención es una composición, que comprende (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística, en donde la razón molar de AmB a colesterol es mayor que 1:2,4 (p. ej., 1:2 o 1:1) o en el intervalo de 1:2,6 a aproximadamente 1:50.

65

Un aspecto de la invención es una composición, que comprende (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato

farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística, en donde la razón molar de AmB a colesterol está en el intervalo de 1:2,6 a aproximadamente 1:50.

5 Un aspecto de la invención es una composición, que comprende (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística, en donde la razón molar de AmB a colesterol está en el intervalo de 1:3 a aproximadamente 1:15.

10 Un aspecto de la invención es una composición que comprende (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, para su uso en el aumento del pH del líquido de la superficie de las vías respiratorias en un ser humano que tiene fibrosis quística.

15 En cada uno de los aspectos anteriores de la invención, en ciertas realizaciones la AmB y el colesterol están presentes como un complejo.

15 Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** representa las estructuras de anfotericina B (AmB), C35-desoxianfotericina B (C35deOAmB) y C3-desoxianfotericina B (C3deOAmB).

20 La **Figura 2** representa representaciones esquemáticas de epitelios pulmonares normales, epitelios pulmonares de fibrosis quística y epitelios pulmonares de fibrosis quística más AmB. Los epitelios pulmonares de fibrosis quística tienen una secreción reducida de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  apical, lo que altera las propiedades del moco, así como una disminución del pH del líquido de la superficie de las vías respiratorias (ASL), lo que perjudica la actividad antimicrobiana.

25 La **Figura 3A** es un gráfico de barras que representa la capacidad de la AmB apical, pero no basolateral, para aumentar el pH del ASL en epitelios pulmonares humanos primarios de fibrosis quística (FQ). La figura también muestra la falta de efecto de la C35 de OAmB apical. \*\*\*, p < 0,001; NS, no estadísticamente significativo.

30 La **Figura 3B** es un gráfico de barras que representa la ausencia de efecto de AmB apical sobre el pH del ASL de epitelios pulmonares humanos primarios de control (sin FQ). NS, no estadísticamente significativo.

La **Figura 4** es un gráfico de barras que representa que el aumento mediado por AmB en el pH del ASL no se debe a la alteración de las membranas ni al aumento de la actividad de CFTR.

35 La **Figura 5A** es un gráfico que representa el efecto de AmB sobre el pH del ASL a lo largo del tiempo.

La **Figura 5B** es un gráfico que representa el efecto de AmB sobre el pH del ASL a lo largo del tiempo.

40 La **Figura 6** es un gráfico de barras que representa que AmB disminuye la viscosidad del ASL (↑) en epitelios humanos primarios con FQ independientemente del genotipo del paciente.

La **Figura 7** es un gráfico de barras que representa que AmB aumenta la destrucción bacteriana de ASL en epitelios humanos primarios con FQ independientemente del genotipo del paciente.

45 La **Figura 8** es un gráfico que representa la dependencia de la dosis del cambio en el pH del ASL en epitelios pulmonares de fibrosis quística con complejos preformados de AmB-colesterol o AmB sola.

50 La **Figura 9** es un gráfico de barras que representa la falta de efecto del colesterol solo sobre el pH del ASL.

La **Figura 10** es un par de gráficos que representan que la precomplejación de AmB con colesterol protege los glóbulos rojos (RBC) humanos contra la toxicidad pero preserva la permeabilización de los epitelios pulmonares humanos de FQ.

55 La **Figura 11** es un grupo de tres gráficos que representan espectros de RMN de complejos de anfotericina B-ergosterol (AmB-Erg) marcados con  $^{13}\text{C}$ .

La **Figura 12** representa representaciones esquemáticas de epitelios pulmonares normales, epitelios pulmonares de fibrosis quística y epitelios pulmonares de fibrosis quística más AmB.

60 La **Figura 13** representa trazas de Ussing de AmB 0,5  $\mu\text{M}$  (línea continua) y de C35deOAmB 0,5  $\mu\text{M}$  (línea discontinua).

65 La **Figura 14** representa el efecto de AmB sobre la liberación de bicarbonato de los liposomas a lo largo del tiempo.

La **Figura 15A** es un gráfico que representa el efecto de AmB sobre el bicarbonato intracelular en epitelios pulmonares humanos CuFi-1 con fibrosis quística. \*\*, p < 0,01.

5 La **Figura 15B** es un gráfico que representa la capacidad de AmB apical, pero no basolateral, para aumentar el bicarbonato en ASL en células CuFi-1 de fibrosis quística. La figura también muestra la falta de efecto de ivacaftor en células CuFi-1. \*\*\*\*, p < 0,0001.

10 La **Figura 15C** es un gráfico que representa la capacidad de AmB para aumentar el bicarbonato en ASL en células CuFi-1, pero no en combinación con ouabaína, que bloquea la importación de bicarbonato. \*, p < 0,05.

15 La **Figura 16** es un gráfico que representa la capacidad de AmB e ivacaftor para aumentar el bicarbonato en ASL en células CuFi-4 de fibrosis quística. \*\*\*\*, p < 0,0001.

15 La **Figura 17** es un gráfico que representa la capacidad de AmB apical, pero no basolateral, para aumentar el pH en ASL en células CuFi-1 de fibrosis quística. La figura también muestra que las células CuFi-1 tienen un pH reducido en comparación con las células NuLi. \*\*, p < 0,01; \*\*\*\*, p < 0,0001.

20 La **Figura 18** representa el efecto de AmB:lípido 1:100 (círculos) en comparación con DMSO (triángulos) sobre la liberación de protones.

20 La **Figura 19** es un gráfico que representa la capacidad de AmB para aumentar la alcalinización de la cámara apical de células CuFi-1 de fibrosis quística en presencia de bicarbonato basolateral. La figura también muestra que las células CuFi-1 tienen una alcalinización reducida de la cámara apical en comparación con las células NuLi en presencia de bicarbonato basolateral. No se observaron cambios en la alcalinización de la cámara apical en el tampón sin bicarbonato. \*\*\*, p < 0,001; \*\*\*\*, p < 0,0001; NS, no estadísticamente significativo.

30 La **Figura 20A** es un gráfico que representa la capacidad de AmB para aumentar el pH del ASL en células CuFi-1, pero no en combinación con ouabaína, que bloquea la importación de bicarbonato. \*\*\*, p < 0,001; NS, no estadísticamente significativo.

35 La **Figura 20B** es un gráfico que representa la capacidad de AmB para aumentar el pH del ASL en células CuFi-1 de fibrosis quística. La figura también muestra la falta de efecto de ivacaftor en células CuFi-1. \*, p < 0,05.

40 La **Figura 20C** es un gráfico que representa la capacidad de AmB e ivacaftor para aumentar el pH del ASL en células CuFi-4 de fibrosis quística. \*\*\*\*, p < 0,0001.

40 La **Figura 21** es un gráfico que representa la dependencia de la dosis del cambio en el pH del ASL en células CuFi-1 con complejos AmB-colesterol preformados o AmB sola. \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01.

45 La **Figura 22A** representa un rastro de Ussing de células NuLi que representa un aumento en la corriente de cortocircuito en respuesta a la activación de forskolina/IBMX de CFTR.

45 La **Figura 22B** representa un rastro de Ussing de células CuFi-1 que no muestra un aumento en la corriente de cortocircuito en respuesta a la activación de forskolina/IBMX de CFTR.

50 La **Figura 22C** representa un rastro de Ussing de células CuFi-1 con AmB que no muestra un aumento en la corriente de cortocircuito en respuesta a la activación de forskolina/IBMX de CFTR.

50 La **Figura 23A** es una tabla que resume el genotipo y las mutaciones de muestras de pacientes con fibrosis quística.

55 La **Figura 23B** es un gráfico que representa la capacidad de AmB para aumentar el pH del ASL en epitelios pulmonares humanos primarios de pacientes con FQ.

55 La **Figura 23C** es un gráfico que representa la capacidad de AmB apical, pero no basolateral, para aumentar el pH del ASL en epitelios pulmonares humanos primarios de pacientes con fibrosis quística (FQ). La figura también muestra la falta de efecto de la C35deOAmB apical. \*\*\*, p < 0,001; NS, no estadísticamente significativo.

60 La **Figura 24A** es un gráfico que representa el efecto de AmB sobre el pH del ASL en células primarias a lo largo del tiempo.

65 La **Figura 24B** es un gráfico que representa el efecto de AmB sobre el pH del ASL en células primarias a lo largo del tiempo.

La **Figura 25** es un gráfico que representa la ausencia de efecto de AmB apical sobre el pH del ASL de epitelios pulmonares humanos primarios de control (sin FQ). NS, no estadísticamente significativo.

5 La **Figura 26** es un gráfico que representa que AmB disminuye la viscosidad del ASL (†) en epitelios humanos primarios con FQ independientemente del genotipo del paciente. \*, p < 0,05.

10 La **Figura 27** es un gráfico que representa que AmB aumenta la destrucción bacteriana de ASL en epitelios humanos primarios con FQ independientemente del genotipo del paciente. La figura también muestra la falta de efecto de la C35deOAmB apical. \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,0001; NS, no estadísticamente significativo.

#### 10 Descripción detallada de la invención

La pérdida de CFTR funcional en la fibrosis quística da como resultado dos efectos principales en el pulmón. En primer lugar, la secreción reducida de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  en la superficie apical del epitelio pulmonar altera las propiedades del moco, haciéndolo más viscoso e impidiendo así los mecanismos normales de limpieza de las vías respiratorias. Además, en seres humanos y cerdos que carecen de CFTR, la secreción no controlada de  $\text{H}^+$  por la adenosina trifosfatasa no gástrica  $\text{H}^+/\text{K}^+$  (ATP12A) acidifica el líquido de la superficie de las vías respiratorias (ASL), lo que perjudica las defensas de las vías respiratorias del huésped. Por el contrario, las vías respiratorias de los ratones con FQ expresan poco ATP12A y secretan una cantidad mínima de  $\text{H}^+$ ; en consecuencia, el líquido de la superficie de las vías respiratorias en ratones con y sin FQ tiene un pH similar. Pezzulo AA et al. (2012) Nature 487: 109-113; Shah VS et al. (2016) Science 351: 503-507.

25 Los canales iónicos de molécula pequeña introducidos en el epitelio de la FQ pueden restaurar las características fisiológicas de ASL en el epitelio pulmonar de la FQ mediante la absorción de protones, la secreción de bicarbonato o ambas. Este enfoque de prótesis moleculares para la FQ es independiente del genotipo, es decir, independiente de la naturaleza exacta de la mutación genética subyacente a la expresión reducida de CFTR o a la función reducida de CFTR en la FQ.

30 Una capa fina de líquido de la superficie de las vías respiratorias (ASL) representa la única barrera entre el pulmón humano y el medio ambiente. En la fisiología normal del ASL, las bombas y canales basolaterales impulsan el flujo de bicarbonato hacia las células epiteliales polarizadas, y una función principal del CFTR es liberar pasivamente este bicarbonato a través de la membrana apical hacia el ASL (**Fig. 12**, izquierda). Un modelo líder de fisiopatología de la FQ predice que la pérdida de función de CFTR reduce la liberación de bicarbonato apical, lo que lleva a la acidificación del ASL y a una acumulación de iones de bicarbonato dentro 35 de las células epiteliales (**Fig. 12**, medio). Esto provoca la acidificación del líquido de la superficie de las vías respiratorias (ASL), aumenta la viscosidad del ASL y disminuye la actividad de las proteínas antimicrobianas sensibles al pH. Estos cambios en el ASL perjudican la eliminación y destrucción de bacterias, dejando a los pacientes vulnerables a las infecciones crónicas de las vías respiratorias que son el principal factor de morbilidad y mortalidad. Los modelos alternativos sugieren que CFTR también desempeña otras funciones 40 importantes, como modular la actividad de los canales iónicos vecinos, y descartar experimentalmente tales modelos alternativos ha demostrado ser un desafío. Si la función principal de CFTR es actuar como un conducto pasivo para el bicarbonato, entonces un canal permeable al bicarbonato basado en moléculas pequeñas en la membrana apical podría aprovechar los gradientes que se acumulan en las células epiteliales deficientes en CFTR para restaurar la secreción selectiva de bicarbonato y, por lo tanto, la fisiología de ASL es 45 independiente del genotipo (**Fig. 12**, derecha).

Una molécula pequeña o un complejo puede permeabilizar la membrana apical de epitelios pulmonares humanos diferenciados a bicarbonato. Se ensayó la capacidad de aumentar la corriente de cortocircuito a través de monocapas epiteliales de CuFi-1 utilizando una cámara de Ussing con una serie de moléculas 50 pequeñas naturales y sintéticas que, según se informó anteriormente, permeabilizan liposomas, células y/o epitelios nasales de ratones a aniones. El producto natural antifúngico clínicamente aprobado anfotericina B (AmB) (**Fig. 1**) destacó por ser excepcionalmente eficaz (**Fig. 13**). Se observó poca o ninguna permeabilización de estos mismos epitelios con todos los demás compuestos ensayados, incluido un derivado sintético de AmB 55 deficiente en un solo átomo, como C35deOAmB (**Fig. 12**). La capacidad de AmB para transportar bicarbonato se ensayó utilizando un ensayo adaptado basado en RMN de  $^{13}\text{C}$  en liposomas POPC que contienen colesterol. Se observó una liberación robusta y rápida de bicarbonato marcado con  $^{13}\text{C}$  en liposomas tratados con AmB (**Fig. 14**).

60 El tratamiento con AmB, AmB y colesterol, C3deOAmB y colesterol, AmB y ergosterol, o C3deOAmB y ergosterol puede rescatar uno o más de ASL pH, viscosidad y actividad antimicrobiana en epitelios pulmonares primarios derivados de FQ.

65 Se ha demostrado que las levaduras con deficiencia de canales iónicos de proteínas ( $\text{trk1}\Delta\text{trk2}\Delta$ ), que carecen de Trk funcional implicada en el transporte pasivo de  $\text{K}^+$  transmembrana, pueden restaurarse al fenotipo normal (crecimiento) tras el tratamiento con AmB formadora de canales. Cioffi AG et al. (2015) J Am Chem Soc 137: 10096-10099.

LaAmB puede permeabilizar células eucariotas, tales como células de levadura, a potasio y otros iones. Ermishkin LN et al. (1977) Biochim Biophys Acta 470(3): 357-367. La AmB también es altamente tóxica para la levadura, y se pensaba que esta toxicidad estaba indisolublemente ligada a la permeabilización de su membrana. Sin embargo, se encontró que un derivado sintetizado de AmB que carece de un solo átomo de oxígeno en C35 (C35deOAmB) (**Fig. 1**) no forma canales iónicos y, aun así, mantiene una potente actividad fungicida. Gray KC et al. (2012) Proc Natl Acad Set USA 109(7): 2234-2239. Estudios adicionales revelaron que AmB destruye principalmente la levadura al unir y extraer esteroles de las membranas y solo es citotóxica cuando la cantidad de AmB excede la de ergosterol. Anderson TM et al. (2014) Nat Chem Biol 10(5): 400-406.

5 No se requiere la formación de canales. Esto permitió la separación de la actividad del canal iónico de AmB de sus efectos de destrucción celular mediante la administración en dosis bajas y/o la complejación previa con esteroles. La AmB puede restaurar el crecimiento en levaduras con deficiencia de canales iónicos de proteínas. El intervalo de dosis para las cuales se observa un rescate del crecimiento puede ampliarse en más de un orden de magnitud cuando la AmB forma un complejo previo con el esterol primario de la levadura, el ergosterol.

10 15 La variante C35deOAmB que no forma canales no logró rescatar el crecimiento de la levadura a ninguna de las concentraciones ensayadas.

La AmB puede ser eficaz para aumentar el pH del ASL en los pulmones de pacientes con FQ, mejorando así la actividad antimicrobiana de las vías respiratorias y la protección de las vías respiratorias en estos pacientes.

20 La precomplejación de AmB con ergosterol puede aumentar sustancialmente el índice terapéutico para el rescate del crecimiento de la levadura, es decir, preserva la formación de canales sin actividad fungicida potente. Cioffi AG et al. (2015) J Am Chem Soc 137: 10096-10099.

25 Sorprendentemente, AmB y colesterol juntos, por ejemplo complejos preformados entre AmB y colesterol, son eficaces para aumentar el pH del ASL en los pulmones de pacientes con FQ, mejorando así la actividad antimicrobiana de las vías respiratorias y la protección de las vías respiratorias en estos pacientes. En ciertas realizaciones, la razón molar de AmB:colesterol está en el intervalo de 1:2,6 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar de AmB:colesterol está en el intervalo de 1:3 a aproximadamente 1:15.

30 35 Sorprendentemente, C3deOAmB y colesterol juntos, por ejemplo complejos preformados entre C3deOAmB y colesterol, son eficaces para aumentar el pH del ASL en los pulmones de pacientes con FQ, mejorando así la actividad antimicrobiana de las vías respiratorias y la protección de las vías respiratorias en estos pacientes.

40 45 AMBIOSOME® para inyección (Astellas Pharma US, Inc., Northbrook, IL) es una preparación liofilizada estéril de AmB para infusión intravenosa. Cada vial contiene 50 mg de anfotericina B intercalados en una membrana liposomal que consiste en aproximadamente 213 mg de fosfatidilcolina de soja hidrogenada; 52 mg de colesterol, 84 mg de distearoilfosfatidil-glicerol; 0,64 mg de alfa tocopherol, junto con 900 mg de sacarosa y 27 mg de succinato disódico hexahidrato como tampón. La razón molar de AmB a colesterol para este producto es de aproximadamente 1:2,5.

Sorprendentemente, AmB y colesterol juntos, por ejemplo complejos preformados entre AmB y colesterol, son eficaces para aumentar el pH del ASL en los pulmones de pacientes con FQ, mejorando así la actividad antimicrobiana de las vías respiratorias y la protección de las vías respiratorias en estos pacientes.

50 55 Sorprendentemente, C3deOAmB y ergosterol juntos, por ejemplo complejos preformados entre C3deOAmB y ergosterol, son eficaces para aumentar el pH del ASL en los pulmones de pacientes con FQ, mejorando así la actividad antimicrobiana de las vías respiratorias y la protección de las vías respiratorias en estos pacientes.

#### 50 Composiciones de la invención

Un aspecto de la invención es un complejo formado entre (i) anfotericina B (AmB), una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística. Este y otros complejos similares pueden formarse como se describe en la presente memoria y pueden ensayarse por un método tal como el que se describe en los Ejemplos. Anderson TM et al. (2014) Nat Chem Biol 10(5):404-406.

60 Un "complejo" como se usa en la presente memoria se refiere a un conjugado formado entre dos o más restos componentes, en donde los diversos restos componentes están unidos covalentemente. En ciertas realizaciones, el complejo puede tener un resto componente único o central al que todos los demás restos componentes están unidos individualmente. En ciertas realizaciones, cada resto componente está unido a al menos otro resto componente, es decir, sin requerir un resto componente único o central al que todos los demás restos componentes están unidos individualmente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un complejo puede tener un resto componente AmB único o central al que están unidos individualmente todos los restos componentes de colesterol.

En ciertas realizaciones, el complejo consiste en (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol.

5 En ciertas realizaciones, el complejo consiste esencialmente en (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol.

Un aspecto de la invención es una composición, que comprende (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística, en donde la razón molar de AmB a colesterol es mayor que 1:2,4 (p. ej., aproximadamente 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 10 4:1 o 5:1) o en el intervalo de 1:2,6 a aproximadamente 1:50.

Un aspecto de la invención es una composición, que comprende (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística, en donde la razón molar de AmB a colesterol está en el intervalo de 1:2,6 a aproximadamente 1:50.

15 15 En ciertas realizaciones, la composición consiste en (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística, en donde la razón molar de AmB a colesterol está en el intervalo de 1:2,6 a aproximadamente 1:50.

20 20 En ciertas realizaciones, la composición consiste en (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística, en donde la razón molar de AmB a colesterol está en el intervalo de 1:2,6 a aproximadamente 1:50.

25 25 En ciertas realizaciones, la razón molar de AmB a colesterol está en el intervalo de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:15.

En ciertas realizaciones, la razón molar de AmB a colesterol está en el intervalo de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:12.

30 30 En ciertas realizaciones, la razón molar de AmB a colesterol está en el intervalo de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:10.

La AmB y el colesterol están presentes en una razón molar de AmB a colesterol. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de 35 35 aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:6 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:7 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:8 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de 40 40 aproximadamente 1:9 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:11 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:12 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de 45 45 aproximadamente 1:13 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:14 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de 50 50 aproximadamente 1:16 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:17 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:18 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de 55 55 aproximadamente 1:19 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:21 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de 60 60 aproximadamente 1:22 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:23 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:24 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de 65 65 aproximadamente 1:25 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:26 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:27 a aproximadamente 1:28. En ciertas realizaciones, la razón molar es de 70 70 aproximadamente 1:29 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:30 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de 75 75 aproximadamente 1:31 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:32 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de 80 80 aproximadamente 1:33 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:34 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de 85 85 aproximadamente 1:35 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de 90 90 aproximadamente 1:36 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de



un ejemplo de cómo preparar dicho complejo.

En ciertas realizaciones, la composición se formula para administración sistémica.

- 5 En ciertas realizaciones, la composición se formula para administración intravenosa.

En ciertas realizaciones, la composición se formula para administración pulmonar.

En ciertas realizaciones, la composición se formula para administración a las vías respiratorias.

- 10 En ciertas realizaciones, la composición se formula para administración como aerosol.

*Métodos de la invención*

- 15 Las referencias a los métodos de tratamiento mediante terapia en los párrafos siguientes deben interpretarse como referencias a composiciones de la presente invención para su uso en esos métodos.

Un aspecto de la invención es un método para tratar la fibrosis quística, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo que comprende (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, tratando así la fibrosis quística.

- 20 Un aspecto de la invención es un método para tratar la fibrosis quística, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, tratando así la fibrosis quística.

Como se usa en la presente memoria, los términos "tratar" y "que trata" se refieren a realizar una intervención que tiene como resultado (a) prevenir que ocurra una afección o enfermedad en un sujeto que puede estar en riesgo de desarrollar o predisponer a tener la afección o enfermedad pero aún no se le ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir una afección o enfermedad, p. ej., ralentizar o detener su desarrollo; o (c) aliviar o mejorar una afección o enfermedad, p. ej., provocando la regresión de la afección o enfermedad. En una realización, los términos "tratar" y "que trata" se refieren a realizar una intervención que tiene como resultado (a) inhibir una afección o enfermedad, p. ej., ralentizar o detener su desarrollo; o (b) aliviar o mejorar una afección o enfermedad, p. ej., provocando la regresión de la afección o enfermedad.

- 35 Como se usa en la presente memoria, un "sujeto" se refiere a un animal vivo. En diversas realizaciones, un sujeto es un mamífero. En varias realizaciones, un sujeto es un mamífero no humano, que incluye, pero sin que ello pretenda ser limitante, un ratón, rata, hámster, conejillo de Indias, conejo, oveja, cabra, gato, perro, cerdo, caballo, vaca o primate no humano. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

- 40 Como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a cualquier cantidad que sea suficiente para lograr un efecto biológico deseado.

- 45 Como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a cualquier cantidad que sea suficiente para lograr un efecto terapéutico deseado, p. ej., el tratamiento de la fibrosis quística.

- 50 En ciertas realizaciones, la composición consiste en (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, en donde la razón molar de AmB a colesterol está en el intervalo de 1:2,6 a aproximadamente 1:50.

En ciertas realizaciones, la composición consiste esencialmente en (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, en donde la razón molar de AmB a colesterol está en el intervalo de 1:2,6 a aproximadamente 1:50.

- 55 En ciertas realizaciones, la AmB y el colesterol están presentes en una razón molar en el intervalo de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:15.

- 60 En ciertas realizaciones, la AmB y el colesterol están presentes en una razón molar en el intervalo de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:12.

En ciertas realizaciones, la AmB y el colesterol están presentes en una razón molar en el intervalo de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:10.

- 65 La AmB y el colesterol están presentes en una razón molar de AmB a colesterol. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es

En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:30. En ciertas

realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:6 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:7 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:8 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:11 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:12 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:13 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:14 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:16 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:17 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:18 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:19 a aproximadamente 1:30. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:30.

En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:20. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:20. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:20. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:6 a aproximadamente 1:20. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:7 a aproximadamente 1:20. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:8 a aproximadamente 1:20. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 1:20. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:20.

En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:10. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:10. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:10.

En otras realizaciones más, la razón molar puede ser mayor, tan alta como aproximadamente 1:1 o incluso tan alta como 10:1.

35 En ciertas realizaciones, la AmB y el colesterol están presentes como un complejo.

En ciertas realizaciones, la composición se administra por vía sistémica.

En ciertas realizaciones, la composición se administra por vía intravenosa.

40 En ciertas realizaciones, la composición se administra a una vía respiratoria del sujeto. Por ejemplo, la composición se puede administrar a una vía respiratoria del sujeto mediante lavado broncoalveolar (BAL) o mediante aerosol. Como se usa en la presente memoria, una "vía respiratoria de un sujeto" se refiere a cualquiera o todas las siguientes estructuras pulmonares: tráquea, bronquios, bronquiolos, alvéolos. En ciertas realizaciones, una vía respiratoria de un sujeto se refiere a la denominada vía respiratoria de conducción, es decir, cualquiera o todas las siguientes estructuras pulmonares: tráquea, bronquios y bronquiolos.

En ciertas realizaciones, la composición se administra a una vía respiratoria del sujeto.

50 Un aspecto de la invención es un método para aumentar el pH del líquido de la superficie de las vías respiratorias en un sujeto que tiene fibrosis quística, que comprende administrar a un sujeto que tiene fibrosis quística una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo que comprende (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, aumentando así el pH del líquido de la superficie de las vías respiratorias en el sujeto que tiene fibrosis quística.

55 Un aspecto de la invención es un método para aumentar el pH del líquido de la superficie de las vías respiratorias en un sujeto que tiene fibrosis quística, que comprende administrar a un sujeto que tiene fibrosis quística una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, aumentando así el pH del líquido de la superficie de las vías respiratorias en el sujeto que tiene fibrosis quística.

En ciertas realizaciones, la composición consiste en (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, en donde la razón molar de AmB a colesterol está en el intervalo de 1:2,6 a aproximadamente 1:50.

65 En ciertas realizaciones, la composición consiste esencialmente en (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato

farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol, en donde la razón molar de AmB a colesterol está en el intervalo de 1:2,6 a aproximadamente 1:50.

5 El pH del líquido de la superficie de las vías respiratorias (ASL) en un sujeto se puede medir usando cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el pH de las vías respiratorias se puede medir colocando una sonda plana sensible al pH en la superficie traqueal. Pezzulo AA et al. (2012) Nature 487: 109-113.

10 Se dice que el pH del ASL en un sujeto aumenta cuando es mensurablemente mayor que el pH del ASL de un sujeto no tratado. En una realización, se dice que el pH del ASL en un sujeto está aumentado cuando es mensurablemente mayor que el pH del ASL del mismo sujeto medido antes o distante en el tiempo del tratamiento según un método de la invención.

15 En ciertas realizaciones, el aumento del pH puede ser de 0,01 unidades de pH a 2,0 unidades de pH. En ciertas realizaciones, el aumento del pH puede ser de 0,01 unidades de pH a 1,0 unidades de pH. En ciertas realizaciones, el aumento del pH puede ser de 0,01 unidades de pH a 0,5 unidades de pH. En ciertas realizaciones, el aumento del pH puede ser de 0,01 unidades de pH a 0,4 unidades de pH. En ciertas realizaciones, el aumento del pH puede ser de 0,01 unidades de pH a 0,3 unidades de pH. En ciertas realizaciones, el aumento del pH puede ser de 0,01 unidades de pH a 0,2 unidades de pH. En ciertas 20 realizaciones, el aumento del pH puede ser de 0,01 unidades de pH a 0,1 unidades de pH.

En algunas realizaciones, el aumento del pH se realiza mediante la adición apical de una cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria.

25 En algunas realizaciones, el aumento del pH del ASL está correlacionado con la alcalinización de la disolución apical. En algunas realizaciones, la alcalinización de la disolución apical depende del bicarbonato. En algunas realizaciones, el aumento de la alcalinización de la cámara apical se produce en presencia de bicarbonato basolateral.

30 En algunas realizaciones, el aumento en el pH del ASL no se debe al aumento de la actividad/tráfico de CFTR a la superficie o a la alteración de la integridad de la membrana.

En ciertas realizaciones, la AmB y el colesterol están presentes en una razón molar en el intervalo de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:15.

35 En ciertas realizaciones, la AmB y el colesterol están presentes en una razón molar en el intervalo de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:12.

40 En ciertas realizaciones, la AmB y el colesterol están presentes en una razón molar en el intervalo de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:10.

La AmB y el colesterol están presentes en una razón molar de AmB a colesterol. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

45 aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:6 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:7 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

50 aproximadamente 1:8 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

55 aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:11 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

aproximadamente 1:12 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

55 aproximadamente 1:13 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

aproximadamente 1:14 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

60 aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

aproximadamente 1:16 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

65 aproximadamente 1:17 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

aproximadamente 1:18 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

aproximadamente 1:19 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

aproximadamente 1:21 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

aproximadamente 1:22 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

aproximadamente 1:23 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

aproximadamente 1:24 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

aproximadamente 1:25 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de

aproximadamente 1:26 a aproximadamente 1:50. En ciertas realizaciones, la razón molar es de



aproximadamente 1:8 a aproximadamente 1:20. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 1:20. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:20.

5 En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:10. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:10. En ciertas realizaciones, la razón molar es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:10.

10 En otras realizaciones más, la razón molar puede ser mayor, tan alta como aproximadamente 1:1 o incluso tan alta como 10:1.

En ciertas realizaciones, la AmB y el colesterol están presentes como un complejo.

15 En ciertas realizaciones, la composición se administra por vía sistémica.

15 En ciertas realizaciones, la composición se administra por vía intravenosa.

En ciertas realizaciones, la composición se administra a una vía respiratoria del sujeto. Por ejemplo, la composición se puede administrar a una vía respiratoria del sujeto mediante lavado broncoalveolar (BAL) o

20 mediante aerosol. Como se usa en la presente memoria, una "vía respiratoria de un sujeto" se refiere a cualquiera o todas las siguientes estructuras pulmonares: tráquea, bronquios, bronquiolos, alvéolos. En ciertas realizaciones, una vía respiratoria de un sujeto se refiere a la denominada vía respiratoria de conducción, es decir, cualquiera o todas las siguientes estructuras pulmonares: tráquea, bronquios y bronquiolos.

25 En ciertas realizaciones, la composición se administra a una vía respiratoria del sujeto.

De acuerdo con cada una de las realizaciones anteriores, en ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

30 De acuerdo con cada una de las realizaciones anteriores, en ciertas realizaciones, el sujeto tiene menos de 12 años.

De acuerdo con cada una de las realizaciones anteriores, en ciertas realizaciones, el sujeto tiene al menos 12 años. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el sujeto tiene al menos entre 12 y aproximadamente 16 años. En ciertas otras realizaciones, el sujeto tiene entre aproximadamente 16 y aproximadamente 24 años. En ciertas

35 otras realizaciones, el sujeto tiene entre aproximadamente 24 y aproximadamente 30 años. En ciertas otras realizaciones, el sujeto tiene entre aproximadamente 30 y aproximadamente 40 años. En ciertas otras realizaciones, el sujeto tiene entre aproximadamente 40 y aproximadamente 50 años. En ciertas otras realizaciones, el sujeto tiene entre aproximadamente 50 y aproximadamente 60 años. En ciertas otras

40 realizaciones, el sujeto tiene entre aproximadamente 60 y aproximadamente 70 años. En ciertas otras realizaciones, el sujeto tiene entre aproximadamente 70 y aproximadamente 80 años.

En algunas realizaciones, cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria permeabiliza la membrana apical. En algunas realizaciones, cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria permeabiliza la membrana apical a protones. En algunas realizaciones, cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria permeabiliza la membrana apical a aniones bicarbonato.

45 Más de 1900 mutaciones diferentes de CFTR se encuentran en pacientes con FQ, y se ha confirmado que cientos de ellas causan enfermedades a través de al menos cinco mecanismos diferentes de pérdida funcional.

50 Ha habido importantes avances recientes en el desarrollo de fármacos de molécula pequeña específicos de genotipo que se unen a ciertas formas mutantes de CFTR y, por lo tanto, aumentan su actividad. Sin embargo, casi la mitad de todos los pacientes con FQ tienen genotipos CFTR que no responden a los tratamientos actuales con moléculas pequeñas. Estos incluyen truncamientos importantes que producen una falta total de proteína CFTR funcional y mutaciones muy raras para las cuales se desconocen los fundamentos mecanísticos de la deficiencia funcional.

55 En algunas realizaciones, cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria trata una clase de mutación de fibrosis quística seleccionada del grupo que consiste en I, II, III, IV, V, VI, U y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la clase de mutación se selecciona del grupo que consiste en 14, II/II, II/U y U/III.

60 En algunas realizaciones, cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria trata un genotipo específico de fibrosis quística. En algunas realizaciones, el genotipo se selecciona del grupo que consiste en ΔF508/ΔF508, R553X/E60X, ΔF508/1717-1G→A, ΔF508/c.2052dupA, D293G/V520F y G551D.

65 En algunas realizaciones, cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria son tratamientos independientes del genotipo.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones "independiente del genotipo" o "con independencia del genotipo" se refieren a cualquier tratamiento que sea independiente de la naturaleza exacta de la mutación genética subyacente a la expresión reducida de CFTR o a la función reducida de CFTR en la FQ.

5

En algunas realizaciones, cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria trata la fibrosis quística refractaria o resistente. En algunas realizaciones, la fibrosis quística es refractaria o resistente a uno o más tratamientos de fibrosis quística (p. ej., ivacaftor).

10 *Formulaciones*

Las formulaciones de la invención se pueden administrar en disoluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener de forma rutinaria concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponantes, conservantes, portadores compatibles, adyuvantes y, opcionalmente, otros principios terapéuticos.

15

La anfotericina B está disponible comercialmente en varias formulaciones, incluidas formulaciones basadas en desoxicolato y formulaciones basadas en lípidos (incluidas liposomales). En la presente invención, AmB se formula con colesterol. En ciertas realizaciones, dicha formulación comprende un complejo formado entre AmB 20 y colesterol.

20

Para su uso en terapia, puede administrarse a un sujeto una cantidad eficaz del compuesto activo o de la composición de la invención por cualquier modo que haga llegar el compuesto o la composición al lugar o superficie deseados. La administración de una composición farmacéutica se puede realizar por cualquier medio conocido por el experto en la técnica. Las vías de administración incluyen, pero sin que ello pretenda ser limitante, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, inyección directa (por ejemplo, en un tumor o absceso), mucosa, inhalación y tópica.

30

En ciertas realizaciones preferidas, el compuesto o composición se administra por vía sistémica. En ciertas realizaciones preferidas, el compuesto o la composición se administra por vía intravenosa.

En ciertas realizaciones preferidas, el compuesto o composición se administra a una vía respiratoria. En ciertas realizaciones preferidas, el compuesto o composición se administra a una vía respiratoria como un aerosol.

35

Las formulaciones liofilizadas generalmente se reconstituyen en una disolución acuosa adecuada, p. ej., en agua estéril o disolución salina, poco antes de la administración.

Para la administración oral, los compuestos (es decir, los compuestos de la invención, y otros agentes terapéuticos) pueden formularse fácilmente combinando los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en esta especialidad. Tales portadores permiten que los compuestos de la invención se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas líquidas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por parte de un paciente a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener mediante un excipiente sólido, opcionalmente la mezcla resultante se muele y se procesa la mezcla de gránulos, después se añaden auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o centros de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo 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, hidroxipropilmetylcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desgregantes, tales como alginato de sodio. Opcionalmente, las formulaciones orales también pueden formularse en disolución salina o tampones, p. ej., EDTA para neutralizar las condiciones ácidas internas o pueden administrarse sin ningún portador.

55

También se contemplan específicamente las formas de dosificación oral del componente o componentes anteriores. El componente o componentes pueden modificarse químicamente para que la administración oral del derivado sea eficaz. En general, la modificación química contemplada es la unión de al menos un resto a la propia molécula componente, donde dicho resto permite (a) la inhibición de la hidrólisis ácida; y (b) la captación en el torrente sanguíneo desde el estómago o el intestino. También se desea el aumento de la estabilidad global del componente o componentes y el aumento del tiempo de circulación en el cuerpo. Los ejemplos de tales restos incluyen: polietenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y poliprolina. Abuchowski and Davis, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts", In: Enzymes as Drugs, Hocenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., pág. 367-383 (1981); Newmark et al., J Appl Biochem 4:185-9 (1982). Otros polímeros que podrían usarse son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano. Para uso farmacéutico, como se ha indicado anteriormente, son adecuados los restos de polietenglicol.

- Para el componente (o derivado), el lugar de liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno o el íleon) o el intestino grueso. Un experto en la técnica tiene formulaciones disponibles que no se disolverán en el estómago, pero que liberarán el material en el duodeno o en cualquier otra parte del intestino. Preferiblemente, la liberación evitara los efectos nocivos del entorno del estómago, ya sea mediante la protección del compuesto de la invención (o derivado) o mediante la liberación del material biológicamente activo más allá del entorno del estómago, tal como en el intestino.
- Para garantizar una resistencia gástrica completa, es esencial un revestimiento impermeable a al menos un pH de 5,0. Ejemplos de los principios inertes más comunes que se utilizan como revestimientos entéricos son acetato trimelítato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmelcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, acetato ftalato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, acetato ftalato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S y goma laca. Estos revestimientos pueden usarse como películas mixtas.
- También se puede usar un revestimiento o una mezcla de revestimientos en comprimidos, que no están destinadas a la protección contra el estómago. Esto puede incluir revestimientos de azúcar o revestimientos que hacen que el comprimido sea más fácil de tragar. Las cápsulas pueden consistir en una cubierta dura (tal como gelatina) para administrar productos terapéuticos secos (p. ej., polvo); para formas líquidas, se puede usar una cubierta de gelatina blanda. El material de la cubierta de los sellos podría ser almidón espeso u otro papel comestible. Para píldoras, pastillas, comprimidos moldeados o triturados de comprimidos, se pueden usar técnicas de masa húmeda.
- El agente terapéutico se puede incluir en la formulación comomultipartículas finas en forma de gránulos o pellas con un tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para la administración en cápsula también podría ser en forma de polvo, tapones ligeramente comprimidos o incluso comprimidos. El agente terapéutico podría prepararse por compresión.
- Se pueden incluir colorantes y agentes aromatizantes. Por ejemplo, el compuesto de la invención (o derivado) se puede formular (tal como por encapsulación en liposomas o microesferas) y después contenerlo dentro de un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes saborizantes.
- Se puede diluir o aumentar el volumen del agente terapéutico con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir carbohidratos, especialmente manitol, α-lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. ciertas sales inorgánicas también se pueden usar como cargas, incluidos trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro de sodio. Algunos diluyentes disponibles comercialmente son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.
- Los desgregantes pueden incluirse en la formulación del agente terapéutico en una forma de dosificación sólida. Los materiales usados como desgregantes incluyen, pero sin que ello pretenda ser limitante, almidón, incluyendo el desgregante comercial basado en almidón, Explotab. Se puede usar glicolato de almidón sódico, amberlita, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato sódico, gelatina, piel de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de desgregantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Las gomas en polvo se pueden usar como desgregantes y como aglutinantes y éstas pueden incluir gomas en polvo tales como agar, karaya o tragacanto. El ácido algínico y su sal de sodio también son útiles como desgregantes.
- Se pueden usar aglutinantes para mantener unido el agente terapéutico para formar un comprimido duro e incluir materiales de productos naturales tal como goma arábiga, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). La polivinilpirrolidona (PVP) y la hidroxipropilmelcelulosa (HPMC) podrían usarse en disoluciones alcohólicas para granular el agente terapéutico.
- Se puede incluir un agente antifricción en la formulación del agente terapéutico para evitar que se pegue durante el proceso de formulación. Los lubricantes se pueden usar como una capa entre el agente terapéutico y la pared del troquel, y estos pueden incluir pero sin que ello pretenda ser limitante; ácido esteárico incluyendo sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. También se pueden usar lubricantes solubles tales como laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de magnesio, polietilenglicol de varios pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.
- Se pueden añadir deslizantes que podrían mejorar las propiedades de flujo del fármaco durante la formulación y para ayudar a la reorganización durante la compresión. Los deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirógena y silicoaluminato hidratado.
- Para ayudar a la disolución del agente terapéutico en el entorno acuoso, se puede añadir un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como laurilsulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio y dioctil sulfonato de sodio. Los detergentes catiónicos que pueden usarse y pueden incluir cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los detergentes no iónicos potenciales que

podrían incluirse en la formulación como tensioactivos incluyen lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso de sacarosa, metil celulosa y carboximetilcelulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación del compuesto de la invención o derivado ya sea solos o como una mezcla en 5 diferentes razones.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas suaves, selladas hechas de gelatina y un plastificante tales como glicerol o sorbitol. Las 10 cápsulas duras pueden contener los principios activos mezclados con una 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 15 estabilizadores. También pueden usarse microesferas formuladas para administración oral. Tales microesferas se han descrito bien en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deben dosificarse adecuadamente para tal administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados de manera convencional.

20 Para administración por inhalación, los compuestos y composiciones para uso según la presente invención pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación en aerosol pulverizador de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., díclorodifluorometano, triclorofluorometano, díclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una 25 cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse de forma que contengan una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

30 También se contempla en la presente memoria la administración pulmonar de los compuestos descritos en la presente memoria (o sales de los mismos). El compuesto de la invención (o derivado) se administra a los pulmones de un mamífero mientras se inhala y atraviesa el revestimiento epitelial del pulmón hasta el torrente sanguíneo. Otros informes de moléculas inhaladas incluyen Adjei et al., Pharm Res 7:565-569 (1990); Adjei et al., Int J Pharmaceutics 63:135-144 (1990) (acetato de leuprolida); Braquet et al., J Cardiovasc Pharmacol 13(supl. 5): 143-146 (1989) (endotelina-1); Hubbard et al., Annal Int Med 3:206-212 (1989) ( $\alpha$ 1-antitripsina); Smith et al., 1989, J Clin Invest 84: 1145-1146 ( $\alpha$ -1-proteinasa); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March, (hormona de crecimiento humana recombinante); Debs et al., 1988, J Immunol 140:3482-3488 (interferón-gamma y factor de necrosis tumoral alfa) y Platz et al., patente de EE. UU. n.º 5.284.656 (factor estimulante de colonias de granulocitos). Un método y una composición para la administración pulmonar de 40 fármacos con efecto sistémico se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.451.569, expedida el 19 de septiembre de 1995 a Wong et al.

45 Se contempla para su uso en la práctica de esta invención una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, que incluyen, pero sin que ello pretenda ser limitante, nebulizadores, inhaladores de dosis medidas e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para los expertos en la técnica.

50 Algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles adecuados para la práctica de esta invención son el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Mo.; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador de dosis medida Ventolin, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte; y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

55 Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para la dispensación del compuesto de la invención (o derivado). 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 portadores habituales útiles en la terapia. También se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión u otro tipo de portadores. El compuesto modificado químicamente de la invención también se puede preparar en diferentes formulaciones que depende del tipo de modificación química o el tipo 60 de dispositivo empleado.

65 Las formulaciones adecuadas para usar con un nebulizador, ya sea de chorro o ultrasónico, normalmente comprenderán un compuesto de la invención (o derivado) disuelto en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de compuesto biológicamente activo de la invención por ml de disolución. La formulación también puede incluir un tampón y un azúcar simple (p. ej., para la estabilización del compuesto de la invención y la regulación de la presión osmótica). La formulación del nebulizador también puede contener

un tensioactivo, para reducir o prevenir la agregación inducida en la superficie del compuesto de la invención provocada por la atomización de la disolución al formar el aerosol.

- 5 Las formulaciones para usar con un dispositivo inhalador de dosis medida comprenderán generalmente un polvo finamente dividido que contiene el compuesto de la invención (o derivado) suspendido en un propulsor con la ayuda de un tensioactivo. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para este propósito, tal como un clorofluorocarbono, un hidroclorofluorocarbono, un hidrofluorocarbono o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico también puede ser útil como tensioactivo.
- 10 Las formulaciones para dispensar desde un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un compuesto que contiene polvo seco finamente dividido de la invención (o derivado) y también pueden incluir un agente de voluminosidad, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa o manitol en cantidades que faciliten la dispersión del polvo del dispositivo, p. ej., del 50 al 90% en peso de la formulación. El compuesto de la invención (o derivado) debe prepararse ventajosamente en forma de partículas con un tamaño promedio de partículas de menos de 10 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), lo más preferiblemente de 0,5 a 5  $\mu\text{m}$ , para una administración más eficaz en el pulmón profundo.
- 15 20 También se contempla la administración nasal de una composición farmacéutica de la presente invención. La administración nasal permite el paso de una composición farmacéutica de la presente invención al torrente sanguíneo directamente después de administrar el producto terapéutico en la nariz, sin necesidad de depósito del producto en el pulmón. Las formulaciones para administración nasal incluyen aquellas con dextrano o ciclodextrano.
- 25 30 Para la administración nasal, un dispositivo útil es una botella pequeña y dura a la que se une un rociador de dosis medida. En una realización, la dosis medida se administra extrayendo la composición farmacéutica de la disolución de la presente invención en una cámara de volumen definido, cuya cámara tiene una abertura dimensionada para aerosolizar y formular aerosol formando un aerosol 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 una disposición de pistón. Tales dispositivos están disponibles comercialmente.
- 35 40 Alternativamente, se usa una botella que se puede apretar de plástico con una apertura o abertura dimensionada para aerosolizar una formulación de aerosol formando un aerosol cuando se aprieta. La abertura generalmente se encuentra en la parte superior de la botella, y la parte superior generalmente se estrecha para encajar parcialmente en los conductos nasales para una administración eficaz de la formulación en aerosol. Preferiblemente, el inhalador nasal proporcionará una cantidad medida de la formulación en aerosol, para la administración de una dosis medida del fármaco.
- 45 50 Los compuestos, cuando se desea administrarlos por vía sistémica, pueden formularse para administración parenteral por inyección, p. ej., mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en formas de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar muchas formas como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.
- 55 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 de inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo o ésteres de ácido graso sintético, tales como oleato de etilo o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.
- 60 Alternativamente, los compuestos activos pueden encontrarse en forma de polvo para constituirse con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril y libre de pirógenos, antes de su uso.
- 65 60 Los compuestos también se pueden formular en composiciones para vía rectal o vagina tal como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.
- 65 Además de las formulaciones que se han descrito anteriormente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de depósito. Estas formulaciones de acción prolongada pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o

resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender portadores o excipientes en fase sólida o gel adecuados. Los ejemplos de tales portadores o excipientes incluyen, pero sin que ello pretenda ser limitante,

5 carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

Son formas de preparación farmacéuticas líquidas o sólidas adecuadas, por ejemplo, disoluciones acuosas o salinas para inhalación, microencapsuladas, encocleadas, revestidas sobre partículas microscópicas de oro,

10 contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, pellas para implantación en la piel o secadas sobre un objeto puntiagudo para rasarse en la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de principios activos, en cuya preparación

15 excipientes y aditivos y/o auxiliares tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes de hinchamiento, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes o solubilizantes se utilizan habitualmente como se ha descrito anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Se puede encontrar una breve reseña de los métodos para administración de fármacos en Langer R, Science 249:1527-33 (1990).

20 Los compuestos de la invención y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos pueden administrarse *por sí mismos* (puros) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales no farmacéuticamente aceptables pueden usarse convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Tales sales incluyen, pero sin que ello pretenda ser limitante, aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno sulfónico, tartárico, cítrico, metano sulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. Además, tales sales se pueden preparar como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo de los ácidos carboxílicos.

30 Los agentes tamponantes adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2 % p/v); ácido cítrico y una sal (1-3% p/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5 % p/v); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2% p/v). Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03 % p/v); clorobutanol (0,3-0,9 % p/v); parabenos (0,01-0,25 % p/v) y timerosal (0,004-0,02 % p/v).

35 Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen una cantidad eficaz de un compuesto de la invención y, opcionalmente, agentes terapéuticos incluidos en un portador farmacéuticamente aceptable. La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" designa una o más cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes que son adecuadas para la administración a un ser humano u otro animal vertebrado. El término "portador" designa un ingrediente 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 mezclarse con los compuestos de la presente invención, y entre sí, de manera que no haya interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

45 El(es) agente(s) terapéutico(s), que incluyen específicamente, pero sin que ello pretenda ser limitante, un compuesto de la invención, se pueden proporcionar en partículas. Las partículas, como se usa en la presente memoria, se refieren a nanopartículas o micropartículas (o en algunos casos partículas más grandes) que pueden consistir en todo o en parte en el compuesto de la invención u otro(s) agente(s) terapéutico(s) como se describe en la presente memoria. Las partículas pueden contener el(es) agente(s) terapéutico(s) en un núcleo rodeado por un revestimiento, que incluye, pero sin que ello pretenda ser limitante, un revestimiento entérico. El(es) agente(s) terapéutico(s) también se puede(n) dispersar por todas las partículas. El(es) agente(s) terapéutico(s) también se puede(n) adsorber en las partículas. Las partículas pueden tener una cinética de liberación de cualquier orden, incluyendo 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 de el(es) agente(s) terapéutico(s), 55 cualquiera de los materiales usados rutinariamente en la técnica farmacéutica y la medicina, que incluyen, pero sin que ello pretenda ser limitante, materiales erosionables, no erosionables, biodegradables o no biodegradables o combinaciones de los mismos. Las partículas pueden ser microcápsulas que contienen el compuesto de la invención en disolución o en estado semisólido. Las partículas pueden tener virtualmente cualquier forma.

60 Se pueden usar materiales poliméricos tanto no biodegradables como biodegradables en la fabricación de partículas para administrar el(es) agente(s) terapéutico(s). Tales 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 en Sawhney H 65 Set al. (1993) Macromolecules 26:581-7. Estos incluyen ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo),

poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo).

- 5 Los agente(s) terapéutico(s) pueden estar contenidos en sistemas de liberación controlada. La expresión "liberación controlada" pretende hacer referencia a cualquier formulación que contenga fármaco en la que se controlen la forma y el perfil de liberación del fármaco desde la formulación. Esto se refiere tanto a formulaciones de liberación inmediata como no inmediata, incluyendo las formulaciones de liberación no inmediata, pero sin que ello pretenda ser limitante, formulaciones de liberación sostenida y de liberación 10 retardada. La expresión "liberación sostenida" (a la que también se hace referencia como "liberación prolongada") se utiliza en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación gradual de un fármaco durante un periodo de tiempo prolongado, y que preferiblemente, aunque no necesariamente, da lugar a niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco durante un periodo de tiempo prolongado. La expresión "liberación retardada" se usa en su sentido convencional para 15 referirse a una formulación de fármaco en la que existe un retraso de tiempo entre la administración de la formulación y la liberación del fármaco desde allí. La "liberación retardada" puede implicar o no la liberación gradual del fármaco durante un periodo de tiempo prolongado y, por lo tanto, puede ser o no una "liberación sostenida".
- 20 El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento de afecciones crónicas. Una liberación "a largo plazo", como se usa en la presente memoria, significa que el implante está construido y dispuesto para administrar niveles terapéuticos del principio activo durante al menos 7 días, y preferiblemente 30-60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos 25 anteriormente.

#### *Dosificación*

- 30 Como se ha indicado anteriormente, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para producir un efecto biológico deseado. En combinación con las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, al elegir entre los diversos compuestos activos y factores de ponderación tales como la potencia, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la gravedad de los efectos secundarios adversos y el modo de administración preferido, se puede planificar un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no provoca una toxicidad no deseada sustancial y, sin embargo, es eficaz para tratar el sujeto 35 particular. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se está tratando, el compuesto particular de la invención que se administra, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un compuesto particular de la invención y/u otro agente terapéutico sin necesidad de una experimentación excesiva. Por lo general, se prefiere utilizar una dosis máxima, es decir, la 40 dosis segura más alta según algún criterio médico. Se pueden contemplar múltiples dosis por día para lograr niveles sistémicos apropiados de compuestos. Los niveles sistémicos apropiados pueden determinarse, por ejemplo, mediante la medición del nivel plasmático máximo o sostenido del fármaco en el paciente. Los términos "dosis" y "dosificación" se usan de manera intercambiable en la presente memoria.
- 45 En general, las dosis diarias medidas en términos de AmB serán, para sujetos humanos, de aproximadamente 0,01 miligramos/kg por día a 1000 miligramos/kg por día. Se espera que dosis orales en el intervalo de 0,5 a 50 miligramos/kg, en una o varias administraciones por día, produzcan los resultados deseados. La dosificación se puede ajustar apropiadamente para alcanzar los niveles de fármaco deseados, locales o sistémicos, dependiendo del modo de administración. Por ejemplo, se espera que la administración intravenosa sea de 50 una dosis más baja de un orden a varios órdenes de magnitud por día. En el caso de que la respuesta en un sujeto sea insuficiente a tales dosis, pueden emplearse incluso dosis más altas (o dosis más altas efectivas por una vía de administración diferente y más localizada) en la medida en que lo permita la tolerancia del paciente. Se pueden contemplar múltiples dosis por día para lograr niveles sistémicos apropiados del compuesto.
- 55 En una realización, la administración intravenosa de una composición de la invención puede ser normalmente de 0,1 mg/kg/día a 20 mg/kg/día, medida en términos de AmB. Por lo tanto, la dosificación intravenosa puede ser similar o, ventajosamente, puede exceder las dosis máximas toleradas de AmB.
- 60 Para cualquier compuesto o composición descritos en la presente memoria, la cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse inicialmente a partir de modelos animales. Una dosis terapéuticamente eficaz también puede determinarse a partir de datos humanos para compuestos de la invención que se han ensayado en seres humanos y para compuestos que se sabe que presentan actividades farmacológicas similares, tales como otros agentes activos relacionados. Pueden requerirse dosis más altas para la administración parenteral.
- 65 La dosis aplicada puede ajustarse en función de la biodisponibilidad relativa y la potencia del compuesto administrado. Ajustar la dosis para lograr la eficacia máxima en seres humanos en función de los métodos

que se han descrito anteriormente y otros métodos que se conocen en la técnica se encuentra dentro de las capacidades del experto en la técnica.

5 Un experto en las técnicas habituales entenderá que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas a las composiciones y métodos descritos en la presente memoria son fácilmente evidentes a partir de la descripción de la invención contenida en la presente memoria en vista de la información conocida por el artesano ordinariamente capacitado, y puede fabricarse sin alejarse del alcance de la invención o cualquier realización de la misma.

10 Ejemplos

Habiendo descrito ahora la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen en la presente con fines de ilustración solamente y no pretender ser limitantes de la invención.

15 **Ejemplo 1 (Comparativo).** *AmB aumenta el pH del ASL en epitelios pulmonares humanos con FQ*

Anteriormente se ha propuesto el uso de anfotericina B (AmB) como un tratamiento potencial para la fibrosis quística y se ha demostrado su capacidad para permeabilizar los epitelios pulmonares humanos y aumentar la altura del ASL. A continuación, se ensayó si el tratamiento con AmB podría aumentar el pH del ASL en cultivos de epitelios pulmonares de FQ humana con diversos genotipos de enfermedades, utilizando un indicador de pH fluorescente.

25 *Ensayo de pH del líquido de la superficie de las vías respiratorias (ASL).* El pH del ASL se estudió utilizando un ensayo de tinte fluorescente establecido utilizando el tinte ratiométrico Dextran, SNARF®-1, 70.000 MW (Thermo Fisher D3304). Se cultivaron monocapas epiteliales maduras y diferenciadas de CuFi-1 (ATCC CRL-4013) en insertos de cultivo celular de membrana de poliéster transparente Transwell Corning Costar de 0,4 µm (Corning 3470). Los epitelios de CuFi se trataron con vehículo de hidrocarburo perfluorado (PFC), AmB, AmB: Chol o Chol y se incubaron durante el transcurso del experimento a 37°C. El día de la obtención de imágenes, se añadieron 100 µl de una suspensión de SNARF-dextrano en PFC al lado apical de las monocapas. Se tomaron imágenes de las monocapas 2 horas después de la adición del tinte. Las monocapas se colocaron en 100 µl de medio Ultroser G en una placa Fluorodish con fondo de vidrio de 10 mm para obtener imágenes (World Precision Instruments). Se tomaron cinco imágenes por membrana en un microscopio confocal Zeiss LSM 880 con inmersión en agua a 40x. Estas imágenes se analizaron utilizando ImageJ para determinar la razón de verde a rojo de cada imagen. Se usaron disoluciones de pH conocido para calibrar la detección de pH usando este sistema.

40 *Resultados.* AmB aumentó el pH del ASL en el epitelio pulmonar de FQ humana en aproximadamente 0,2 unidades de pH después de 48 horas de incubación apical (**Fig. 3A**). Este resultado fue completamente independiente del genotipo del donante del paciente.

**Ejemplo 2 (Comparativo).** *C35deOAmB no aumenta el pH del ASL en el epitelio pulmonar humano con FQ*

45 El aumento sostenido observado en la conductancia transepitelial por el canal de AmB es la primera línea de evidencia de que AmB está formando canales iónicos en el epitelio pulmonar humano. Para ensayar más a fondo esta hipótesis, se utilizó una variante de AmB modificada con un solo átomo, C35deOAmB, que previamente se había demostrado que no puede permeabilizar las membranas lípidicas. Debido a que no puede formar canales iónicos, C35deOAmB es una sonda importante para determinar si el efecto observado de AmB en el epitelio pulmonar humano está mediado específicamente por su actividad de canal iónico.

50 *Resultados.* A diferencia de AmB, C35deOAmB en cualquier concentración ensayada no pudo aumentar el pH del ASL en comparación con un control no tratado (**Fig. 3A**). Al demostrar que la permeabilización de la membrana apical mediada por AmB causa específicamente esta restauración, no se observó ningún aumento en el pH del ASL al añadir AmB a la superficie basolateral (**Fig. 3A**). Además, el tratamiento con AmB no tuvo ningún efecto sobre el pH de los epitelios sin FQ (**Fig. 3B**), lo que respalda la hipótesis de que es necesario un desequilibrio iónico causado por la ausencia de CFTR para que el canal de AmB tenga un impacto en el transporte de iones transepiteliales.

60 **Ejemplo 3 (Comparativo).** *El aumento mediado por AmB en el pH del ASL no se debe a la alteración de las membranas ni al aumento de la actividad del CFTR*

65 Se prepararon epitelios pulmonares humanos primarios sin FQ (control) y con FQ y se mantuvieron *in vitro* como se ha descrito anteriormente. Pezzulo AA et al. (2012) Nature 487: 109-113. Por ejemplo, se aislaron células epiteliales de la tráquea y los bronquios mediante digestión enzimática, se sembraron en membranas semipermeables revestidas de colágeno (0,6 cm<sup>2</sup> Millicell-PCF; Millipore, Bedford, MA) y se cultivaron en la interfaz aire-líquido como se ha descrito anteriormente en Karp PH et al. (2002) En Wise C., Epithelial Cell

Culture Protocols, Humana Press, Inc. 188: 115-137. El medio de cultivo, una mezcla 1:1 de medio Eagle modificado por Dulbecco y medio Ham's F12 (DMEM/F12), se complementó con Ultroser G al 2 % (PALL France SAS; Saint Germain-en-Laye, Francia). Se utilizaron epitelios diferenciados al menos 14 días después de la siembra.

5

Estas células se trataron con AmB a una concentración final de 2  $\mu\text{M}$  durante 48 h, y luego se midió el cambio en la corriente de cortocircuito. Los resultados representativos se muestran en la Fig. 4.

10

Como se muestra en la figura, los epitelios pulmonares humanos primarios sin FQ no tratados presentaron un cambio significativamente mayor en la corriente de cortocircuito en comparación con los epitelios pulmonares humanos primarios con FQ no tratados. También como se muestra en la figura, los epitelios pulmonares humanos primarios con FQ tratados con AmB no presentaron diferencias significativas en el cambio de la corriente de cortocircuito en comparación con los epitelios pulmonares humanos primarios con FQ no tratados. Estos resultados indican que el aumento mediado por AmB en el pH del ASL no se debe a la alteración de las membranas ni al aumento de la actividad del CFTR.

15

**Ejemplo 4 (Comparativo).** *AmB aumenta el pH del ASL de manera dependiente del tiempo*

20

La evolución temporal del efecto de AmB se ensayó tanto a corto plazo después de la adición aguda (hasta 6 horas) como a largo plazo (hasta 48 horas). Se encontró que AmB aumenta el pH del ASL de manera dependiente del tiempo, con un efecto sostenido durante al menos 48 h (Fig. 5A, Fig. 5B).

**Ejemplo 5 (Comparativo).** *AmB disminuye la viscosidad del ASL en los epitelios pulmonares humanos primarios con FQ*

25

Se prepararon epitelios pulmonares humanos primarios sin FQ (control) y con FQ y se mantuvieron *in vitro* como se ha descrito anteriormente. Pezzulo AA et al. (2012) Nature 487: 109-113. Estas células se trataron con AmB a una concentración final de 2  $\mu\text{M}$  durante 48 h y luego se midió la viscosidad del ASL. Los resultados representativos se muestran en la Fig. 6.

30

Como se muestra en la figura, los epitelios pulmonares humanos primarios con FQ no tratados presentaron un aumento significativo de la viscosidad del ASL en comparación con los epitelios pulmonares humanos primarios sin FQ no tratados. También como se muestra en la figura, los epitelios pulmonares primarios humanos con FQ tratados con AmB tenían una viscosidad del ASL significativamente menor en comparación con los epitelios pulmonares humanos primarios con FQ no tratados, y casi la misma que para los epitelios pulmonares humanos primarios sin FQ no tratados. Estos resultados fueron independientes del genotipo de la muestra del paciente.

35

**Ejemplo 6 (Comparativo).** *AmB aumenta la destrucción bacteriana de ASL en el epitelio pulmonar humano primario con FQ*

40

Se prepararon epitelios pulmonares humanos primarios con FQ y se mantuvieron *in vitro* como se ha descrito anteriormente. Pezzulo AA et al. (2012) Nature 487: 109-113. Estas células se trataron con AmB o C35deOAmB a una concentración final de 2  $\mu\text{M}$  durante 1 minuto, luego se lavaron y se mantuvieron en cultivo durante 48 h y luego se midió la destrucción bacteriana. Los resultados representativos se muestran en la Fig. 7.

45

Como se muestra en la figura, el porcentaje de muertes aumentó de aproximadamente el 25 por ciento a aproximadamente el 40 por ciento con la exposición a AmB ( $p < 0,0001$ ). También como se muestra en la figura, el porcentaje de muertes no cambió significativamente con respecto al control con la exposición a C35deOAmB. Estos resultados fueron independientes del genotipo de la muestra del paciente.

**Ejemplo 7 (Comparativo).** *AmB aumenta el pH del ASL de una manera dependiente de la concentración*

50

Se ensayó un intervalo de dosis de AmB, hasta el límite de solubilidad, suspensión 100  $\mu\text{M}$  en PFC. Se encontró que AmB aumenta el pH del ASL de una manera dependiente de la dosis. El pH aumentó con la dosis hasta 2  $\mu\text{M}$  de suspensión en PFC. Sin embargo, este efecto comenzó a disminuir a partir de entonces y cayó a aproximadamente 0,05 unidades de pH por debajo del pH inicial en 25  $\mu\text{M}$  y más (Fig. 8). Esta rápida caída de la eficacia en concentraciones más altas representa una limitación potencial para la aplicación clínica de esta estrategia, ya que puede resultar muy difícil controlar estrictamente las concentraciones del fármaco en el tejido objetivo.

55

**Ejemplo 8.** *Los complejos preformados de AmB:colesterol amplían el intervalo de concentraciones en el que AmB restaura el pH del ASL*

60

A continuación se preguntó si la precomplejación de AmB con colesterol podría mitigar algún tipo de

extracción/secuestro de colesterol mediado por AmB que puede estar impulsando la reducción en la restauración del pH a concentraciones más altas de AmB. Específicamente, se ensayó la actividad de un complejo AmB:colesterol preformado.

- 5     *Preparación de un complejo de anfotericina B:colesterol.* Para preparar un agregado precomplejado de AmB y colesterol (Chol) para los estudios de la presente memoria, primero se preparó Chol como una disolución madre de 4 mg/ml en CHCl<sub>3</sub>. Se añadieron 965 µl de esta disolución a un vial de vidrio de 7 ml y el disolvente se eliminó bajo una suave corriente de gas nitrógeno. A continuación, se añadió 1 ml de una solución DMSO de 2 mM de AmB al Chol sólido para obtener una concentración final de Chol de 10 mM, una relación molar 1:5 de Chol: AmB. Se añadió una pequeña barra agitadora a esta suspensión, se tapó el vial y se calentó a 80°C durante una hora en un bloque calentador de aluminio para permitir que el Chol se disolviera completamente, agitando a 300 rpm. Después se dejó enfriar la disolución de AmB:Chol resultante hasta temperatura ambiente. Esta solución se dejó complejear a temperatura ambiente durante otros 30 minutos antes de dividirla en alícuotas de 100 µg y liofilizarlas durante la noche. También se preparó AmB sola en disolución de DMSO y se liofilizó en alícuotas de 100 µg para estos estudios.

**Resultados.** El complejo preformado de AmB:colesterol en una razón estequiométrica de 1:5 retuvo la permeabilización en la cámara de Ussing. Sorprendentemente, este complejo pudo ampliar el intervalo de concentraciones sobre las cuales AmB restaura el pH del ASL hasta el límite de solubilidad, 100 µM (**Fig. 8**).

- 20    El colesterol por sí solo no pudo aumentar el pH del ASL (**Fig. 9**). Por lo tanto, un complejo AmB:colesterol es superior a AmB solo como sustituto funcional de la proteína CFTR faltante en los epitelios pulmonares con fibrosis quística.

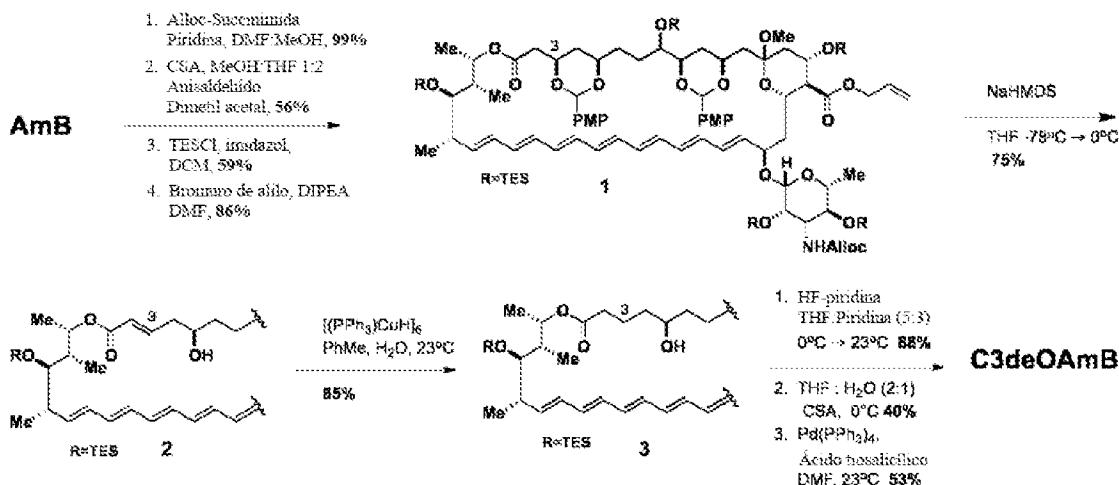
**Ejemplo 9. La precomplejación de AmB con colesterol protege a los glóbulos rojos humanos contra la toxicidad pero preserva la permeabilización de los epitelios pulmonares humanos con fibrosis quística**

- 25    Se separaron glóbulos rojos (RBC) humanos de la sangre completa mediante centrifugación y luego se expusieron a AmB o complejos AmB:Chol preformados (1:5) (Ejemplo 8) en un intervalo de concentraciones de hasta 20 µM. Luego se midió la hemólisis. Los resultados representativos se muestran en la **Fig. 10**. Como se muestra en la figura, mientras que la AmB no complejada tenía un 50 por ciento de hemólisis a aproximadamente 7 µM y un 100 por ciento de hemólisis a aproximadamente 10 µM, los complejos AmB:Chol preformados esencialmente no tenían hemólisis incluso a 20 µM.

- 30    En un conjunto separado de experimentos, las células CuFi-1 en cultivo se trataron con AmB en DMSO, complejos AmB:Chol preformados (1:5), o DMSO solo, y luego la corriente de cortocircuito se midió a lo largo del tiempo hasta aproximadamente 70 minutos. Los resultados se muestran en la **Fig. 10**. Como se muestra en la figura, los complejos AmB:Chol preformados indujeron un aumento menor a corto plazo en la corriente de cortocircuito en comparación con AmB no complejada.

35    **Ejemplo 10 (Comparativo). Síntesis de C3deOAmB**

- 40    Se generó el derivado de AmB C3deOAmB en una síntesis eficiente de 9 etapas como se muestra en el Esquema 1. Partiendo del producto natural, una serie de protecciones de grupos funcionales proporcionaron el intermedio 1 (Esquema 1). Afortunadamente, la exposición de 1 a NaHMDS a bajas temperaturas eliminó quimioselectivamente el *p*-metoxifenilacetal C3, presumiblemente a través de un mecanismo tipo E1cB, produciendo enona 2 intermedia. La posterior reducción de Stryker selectiva del sitio del doble enlace C3, C4 conjugado con carbonilo proporciona un intermedio desoxigenado 3. Una serie final de desprotecciones proporcionó la variante modificada de un solo átomo, C3deOAmB.



Esquema 1: Síntesis de C3deOAmB

**Ejemplo 11 (Comparativo). Análisis de RMN de complejos AmB-Erg**

5 Se realizaron experimentos SSNMR (<sup>1</sup>H)-<sup>13</sup>C-(<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H)-<sup>13</sup>C a 10 °C, a una velocidad MAS de 11,628 kHz, con el tiempo de contacto heteronuclear (*t<sub>HC</sub>*) ajustado a 400 μs, y un tiempo de mezcla <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H de 400 μs. Estas condiciones revelaron picos cruzados para distancias internucleares <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C de ~4-6 Å. Para identificar adecuadamente nuevos picos cruzados intermoleculares de AmB-Erg, los espectros (<sup>1</sup>H)-<sup>13</sup>C-(<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H)-<sup>13</sup>C se adquirieron consecutivamente en condiciones idénticas, incluido un promedio de señal, ajustando el tiempo total de medición en función de la cantidad de material. Los rotores de POPC:U-<sup>13</sup>C-AmB:Erg (razón molar 10:1:1) y POPC:U-<sup>13</sup>C-AmB:<sup>13</sup>C-Erg (razón molar 10:1:1) estaban llenos de ~25 mg y la señal del espectro promediaron durante 7,8 días cada uno. La muestra de POPC:AmB:<sup>13</sup>C-Erg 10:1:1 fue de ~16 mg y, por lo tanto, la señal promedió durante 13,6 días. Los tres espectros se procesaron todos de manera idéntica, con un ensanchamiento de línea de <sup>13</sup>C de 40 y 75 Hz aplicado en las dimensiones directa e indirecta, respectivamente. Los resultados se muestran en la Fig. 11.

**Ejemplo 12 (Comparativo). AmB aumenta el bicarbonato de ASL en el epitelio pulmonar humano primario con FQ**

20 Se administró bicarbonato de <sup>14</sup>C al lado basolateral de las monocapas para rastrear el movimiento de los iones a través de las células a lo largo del tiempo. También se estudiaron monocapas epiteliales cultivadas a partir de la línea celular epitelial de pulmón CuFi-1 (ΔF508/ΔF508) derivada del paciente. El genotipo ΔF508/ΔF508 representa aproximadamente el 46,5% de todos los pacientes con FQ y se considera una deficiencia relativamente grave. La permeabilización de la membrana apical a aniones bicarbonato con AmB podría corregir la anomalía del flujo resultante de la pérdida de CFTR. Tras el tratamiento con AmB 2 μM durante 48 horas, se observó una disminución del bicarbonato <sup>14</sup>C intracelular y un aumento del bicarbonato <sup>14</sup>C de ASL en comparación con CuFi-1 solo (Figs. 15A y 15B). El tratamiento basolateral de AmB tampoco pudo aumentar el transporte apical de bicarbonato, lo que demuestra que la actividad permeabilizante de membrana de AmB es específica del lado de la adición (Fig. 15B). La inhibición de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa basolateral con ouabaína anuló el aumento mediado por AmB en el transporte de bicarbonato al ASL, consistente con el bloqueo de la importación de bicarbonato (Fig. 15C).

Ivacaftor, un potenciador de molécula pequeña que aumenta la probabilidad de apertura de canales CFTR con un tipo específico de defecto de activación, representa un avance importante para el pequeño subconjunto de pacientes con FQ (2-4%) con un alelo G551D u otros en esta clase de mutaciones menos graves. Sorprendentemente, aunque solo restablece parcialmente la actividad del CFTR, este fármaco ha demostrado aumentos sustanciales en la función pulmonar y la calidad de vida general en esta selecta población de pacientes. B. W. Ramsey et al. (2011) New England Journal of Medicine 365, 1663-1672. Algunos pacientes con mutaciones de activación similares también han observado beneficios, pero otras mutaciones de activación, tales como V520F, no parecen responder. F. Van Goor, et al., (2014) J. Cystic Fibrosis 13, 29-36. Utilizando los cambios de pH del ASL y sus efectos posteriores como marcadores para el rescate de la FQ en un cultivo primario de células epiteliales sinonasales de un paciente con una mutación de activación G551D, se encontró que ivacaftor aumentaba el pH del ASL en aproximadamente 0,2 unidades de pH y disminuía la viscosidad en aproximadamente dos unidades con respecto al control. E. H. Chang et al., Int Forum Allergy Rhinol 5, 178-181 (2015). No se pudieron ensayar los cambios en la actividad antimicrobiana debido a las propiedades bactericidas inherentes del fármaco. Este fármaco también mejoró sustancialmente la función

pulmonar en pacientes con FQ que tenían una mutación G551D, como lo demuestra un aumento del 10% en el FEV<sub>1</sub> previsto y un aumento de más del 20% en sujetos sin eventos en pacientes con esta mutación durante 48 semanas de tratamiento. Esta nueva comprensión de la fisiopatología de la FQ y los cambios cuantificables *in vitro* en la fisiología del ASL causados por ivacaftor pueden servir como puntos de referencia para la evaluación de enfoques alternativos para abordar la pérdida de función de CFTR. Es importante señalar que, si bien ivacaftor es capaz de restaurar toda la función de la proteína CFTR, AmB estaría imitando solo una función de CFTR en el transporte de bicarbonato, y esta distinción también puede permitirnos investigar qué papel de CFTR podría tener el impacto más inmediato en la fisiología.

- 5 Elivacaftor es un fármaco eficaz y clínicamente aprobado para tratar la fibrosis quística y se utilizó como control en algunos de los experimentos. Siguiendo el precedente de la literatura para la administración de ivacaftor *in vitro*, los epitelios de CuFi-4 ( $\Delta$ F508/G551D) se trataron con forskolina (Fsk) para promover la fosforilación de CFTR e ivacaftor (Iva) para potenciar la conductancia a través del canal. E. H. Chang et al., Int Forum Allergy Rhinol 5, 178-181 (2015); F. Van Goor et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 18825-18830. Como se esperaba para esta molécula pequeña específica de genotipo, ivacaftor pudo aumentar el bicarbonato de  $^{14}\text{C}$  de ASL en monocapas de CuFi-4 pero no en monocapas de CuFi-1 (**Figs. 15B y 16**). Por el contrario, AmB fue capaz de aumentar significativamente el bicarbonato de  $^{14}\text{C}$  de ASL en ambas líneas celulares (**Figs. 15B y 16**). Esto proporciona evidencia de que, si bien tanto ivacaftor como AmB aumentan el transporte de bicarbonato, AmB opera a través de un mecanismo independiente del genotipo.

20 **Ejemplo 13 (Comparativo).** *AmB aumenta el pH del ASL en epitelios pulmonares humanos con FQ de una manera dependiente del bicarbonato*

Utilizando un tinte de pH fluorescente ratiométrico, CuFi-1 ha reducido el pH en comparación con las monocapas epiteliales NuLi (**Fig. 17**). Pezzullo AA et al. (2012) Nature 487: 109-113; Shah VS et al. (2016) Science 351: 503-507. Se descubrió que AmB aumenta el pH del ASL en CuFi-1 (**Fig. 17**). La adición basolateral de AmB no pudo aumentar el pH del ASL, de acuerdo con los estudios de bicarbonato de  $^{14}\text{C}$  (**Fig. 17**).

30 AmB también es capaz de transportar protones, por lo que esto presentó un mecanismo alternativo mediante el cual la molécula pequeña podría influir en el pH del ASL (**Fig. 18**). Para explorar directamente si el transporte de bicarbonato mediado por AmB causa el aumento del pH del ASL, se realizaron experimentos de pH-stat en grandes monocapas epiteliales de NuLi y CuFi-1, ya sea en presencia de bicarbonato o en una disolución libre de bicarbonato. Cho, DY, et al., (2009) Am J Rhinol Allergy 23, e10-13; Cho, DY, et al., (2011) Int Forum Allergy Rhinol 1, 123-127. La adición de AmB aumentó la alcalinización de la cámara apical de las monocapas epiteliales de CuFi-1 de una manera dependiente de la dosis en presencia de bicarbonato basolateral (**Fig. 19**). Para abordar el papel potencial de la absorción de protones en la alcalinización del ASL, estos experimentos se repitieron en un tampón sin bicarbonato. AmB no aumentó la alcalinización de la cámara apical en ausencia de bicarbonato, lo que proporciona evidencia de que la alcalinización de la disolución apical mediada por AmB depende del bicarbonato (**Fig. 19**).

45 Conectando además la retención intracelular de bicarbonato y los cambios de pH y de acuerdo con los hallazgos del transporte de bicarbonato, el tratamiento con ouabaína basolateral inhibió el aumento mediado por AmB en el pH del ASL (**Fig. 20A**). El tratamiento con ivacaftor/forskolina específico para el genotipo no pudo aumentar el pH del ASL en las monocapas de monocapas de CuFi-1, y AmB sola fue eficaz en esta línea celular (**Fig. 20B**). Es importante destacar que tanto el tratamiento con ivacaftor/forskolina como con AmB aumentaron el pH del ASL en los epitelios de CuFi-4 (**Fig. 20C**). Esto es una recapitulación del hallazgo anterior de que el ivacaftor inducía un aumento de ~0,2 unidades de pH en los cultivos G551D (E. H. Chang et al., Int Forum Allergy Rhinol 5, 178-181 (2015)), y proporciona pruebas de que el mismo aumento de unidades de pH mediado por AmB puede ser clínicamente significativo. En particular, aunque AmB replica solo la función de transporte de bicarbonato de CFTR, es capaz de aumentar el pH del ASL con tanta eficacia como la proteína CFTR funcional potenciada con ivacaftor. Esto implica que el transporte apical simple de bicarbonato puede ser la función más importante de la CFTR en la fisiología pulmonar.

55 **Ejemplo 14.** *Los complejos preformados de AmB: colesterol amplían el intervalo de concentraciones sobre las cuales AmB restaura el pH del ASL de una manera dependiente del bicarbonato*

60 Se ensayó un intervalo de dosis, hasta 100  $\mu\text{M}$  de suspensión en PFC, y se encontró que AmB aumenta el pH del ASL con la dosis, alcanzando un máximo de 5  $\mu\text{M}$  de suspensión en PFC y luego disminuyendo nuevamente hasta el pH inicial en 25  $\mu\text{M}$ . (**Fig. 21**). Después de observar esta disminución de la eficacia al aumentar la dosis, la AmB se precomplejó con colesterol para mitigar su actividad potencialmente disruptiva de unión a esteroides, siguiendo el modelo mecanicista establecido en estudios previos. Gray KC et al. (2012) Proc Natl Acad Sci USA 109(7): 2234-2239; Anderson TM et al. (2014) Nat Chem Biol 10(5): 400-406. Se ensayó la actividad de un complejo AmB:colesterol, y este complejo fue capaz de ampliar la dosis efectiva de rescate de pH de ASL hasta 100  $\mu\text{M}$  (**Fig. 21**). Después de 48 horas de tratamiento con AmB, se evaluaron monocapas de CuFi-1 en una cámara Ussing. En comparación con NuLi, ni las monocapas de CuFi-1 no tratadas ni las

tratadas con AmB tuvieron un aumento en la corriente de cortocircuito en respuesta a la activación de forskolina/IBMX de CFTR, lo que coincide con la conclusión de que el aumento mediado por AmB en el pH del ASL no se debe al aumento de la actividad/tráfico de CFTR hacia la superficie ni a una alteración de la integridad de la membrana (**Fig. 22A-22C**).

5

**Ejemplo 15 (Comparativo).** *Los efectos de AmB sobre el pH del ASL en muestras de pacientes con FQ son independientes del genotipo*

Se obtuvieron muestras de donantes de pacientes con FQ y se generaron cultivos primarios de células humanas a partir de ellas para determinar si las observaciones en líneas celulares podrían tener potencialmente relevancia clínica. Para ensayar el pH del ASL, las monocapas epiteliales primarias con FQ se trataron con vehículo o AmB. El tratamiento con AmB aumentó el pH del ASL en cultivos primarios de epitelio pulmonar humano de 9 pacientes con FQ con 5 genotipos de enfermedad diferentes (**Figs. 23A y 23B**). Los pacientes 1 a 5 tenían la mutación común ΔF508/ΔF508. Tanto los pacientes 8 como 9 tienen alelos de mutación raros y no categorizados; el segundo alelo de mutación conocido del último paciente está en la misma categoría que el objetivo de ivacaftor G551D, pero se encontró que era refractario al tratamiento. AmB pudo promover un aumento en el pH del ASL incluso en el caso de un genotipo de mutación doble nula (paciente 6) o un alelo de mutación en el sitio de empalme poco común (paciente 7), dando ambos como resultado que prácticamente no se produzca proteína CFTR, lo que proporciona evidencia adicional de que AmB actúa independientemente de CFTR (**Fig. 23B**).

Se encontró que AmB aumenta el pH del ASL en epitelios humanos primarios independientemente del genotipo del donante del paciente en un promedio de aproximadamente 0,2 unidades de pH después de 48 horas de incubación apical, mientras que el derivado inactivado del canal C35deOAmB y la adición basolateral de AmB fueron incapaces de hacerlo, de acuerdo con los hallazgos en la línea celular (**Fig. 23C**). AmB aumentó el pH en células primarias de una manera dependiente de la dosis y el tiempo (**Figs. 24A y 24B**). Curiosamente, el tratamiento con AmB no tuvo ningún efecto sobre el pH de los epitelios sin FQ, lo que proporciona evidencia adicional de la necesidad del bicarbonato intracelular combinado para aumentar la secreción apical (**Fig. 25**).

30 **Ejemplo 16 (Comparativo).** *AmB aumenta la destrucción bacteriana de ASL en muestras de pacientes con FQ*

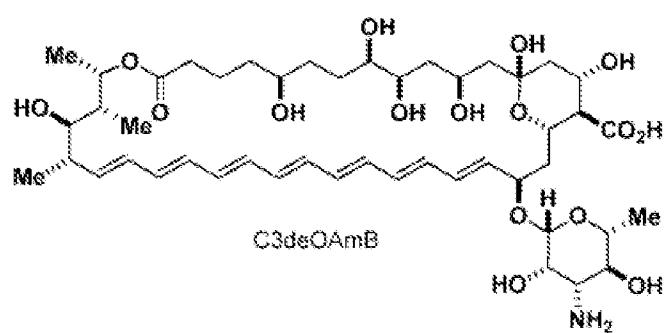
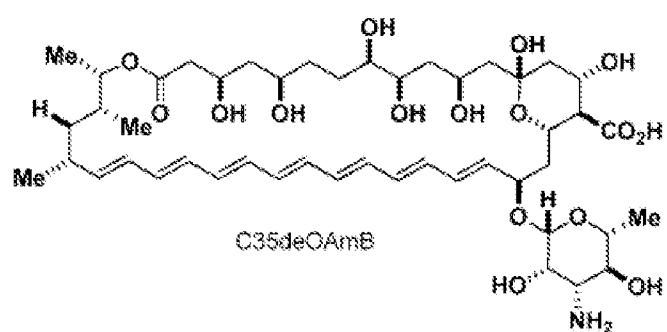
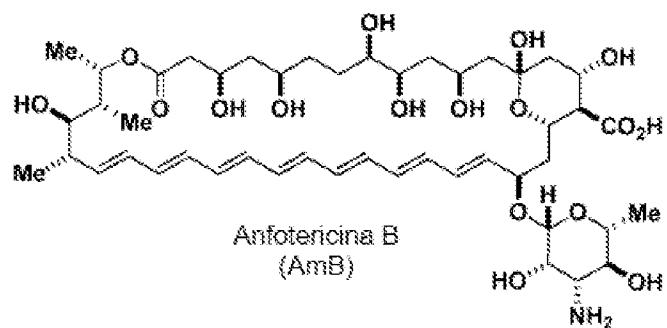
El aumento de la viscosidad del ASL, un efecto posterior de la acidificación del pH del ASL, contribuye a la incapacidad de eliminar la mucosidad y las bacterias del pulmón. De manera consistente con el cambio de pH, 35 AmB disminuyó la viscosidad del ASL en epitelios humanos primarios independientemente del genotipo del paciente (**Fig. 26**). El pH del ASL también está estrechamente relacionado con la capacidad de las proteínas antimicrobianas del ASL para provocar la destrucción de bacterias. Para conectar el aumento observado mediado por AmB en el pH del ASL con un aumento significativo en la destrucción bacteriana del ASL, se ensayaron los epitelios tratados con AmB frente a una cepa humana de *S. aureus*. Pezzulo AA et al. (2012) Nature 487: 109-113. AmB aumentó la destrucción bacteriana de ASL en epitelios humanos primarios independientemente del genotipo del paciente (**Fig. 27**). Además, C35deOAmB no pudo aumentar la actividad antibacteriana de ASL en epitelios humanos primarios, lo que coincide con su incapacidad para aumentar el pH del ASL (**Fig. 27**). Estos resultados representan importantes efectos secundarios del aumento del pH ASL mediado por AmB que se ha observado que mejoran con el ivacaftor, que ha tenido éxito clínico, lo que puede ser un buen augurio para el potencial de AmB como terapéutica de la FQ.

Cabe señalar que AmB actúa completamente independientemente de la proteína faltante y, a diferencia de enfoques más específicos, no es necesario conocer el mecanismo subyacente del defecto porque un enfoque completamente autónomo funcionaría independientemente de la mutación. Los grandes esfuerzos para desarrollar enfoques de terapia génica, que en teoría son generalizables, se han topado con importantes desafíos científicos y aún no han producido un impacto clínico sustancial. Más recientemente, la combinación de ivacaftor y lumacaftor, un corrector del plegamiento incorrecto de las proteínas, ha mostrado un impacto clínico modesto en pacientes con FQ ΔF508/ΔF508, mostrando específicamente solo una mejora del 2 al 4% en la función pulmonar. Wainwright CE et al. (2015) New Engl. J. Med. 373, 220-231. Además, han surgido preocupaciones sobre la naturaleza potencialmente competitiva de los mecanismos de acción de los fármacos. Cholon DM et al. (2014) Sci Transl Med 6, 246ra296. Este enfoque también está fundamentalmente limitado en su capacidad para abordar mutaciones que causan poca o ninguna producción de proteína CFTR, y en el caso de mutaciones raras donde la población de pacientes es pequeña y se desconoce el mecanismo de pérdida de función, se espera que sea difícil lograr el desarrollo personalizado de un fármaco único para cada genotipo. Se ha presentado una línea de evidencia sobre el papel del pH del ASL y los efectos posteriores en la fisiopatología de la FQ, que señalan la simple pérdida de la secreción de bicarbonato como un factor importante de la enfermedad.

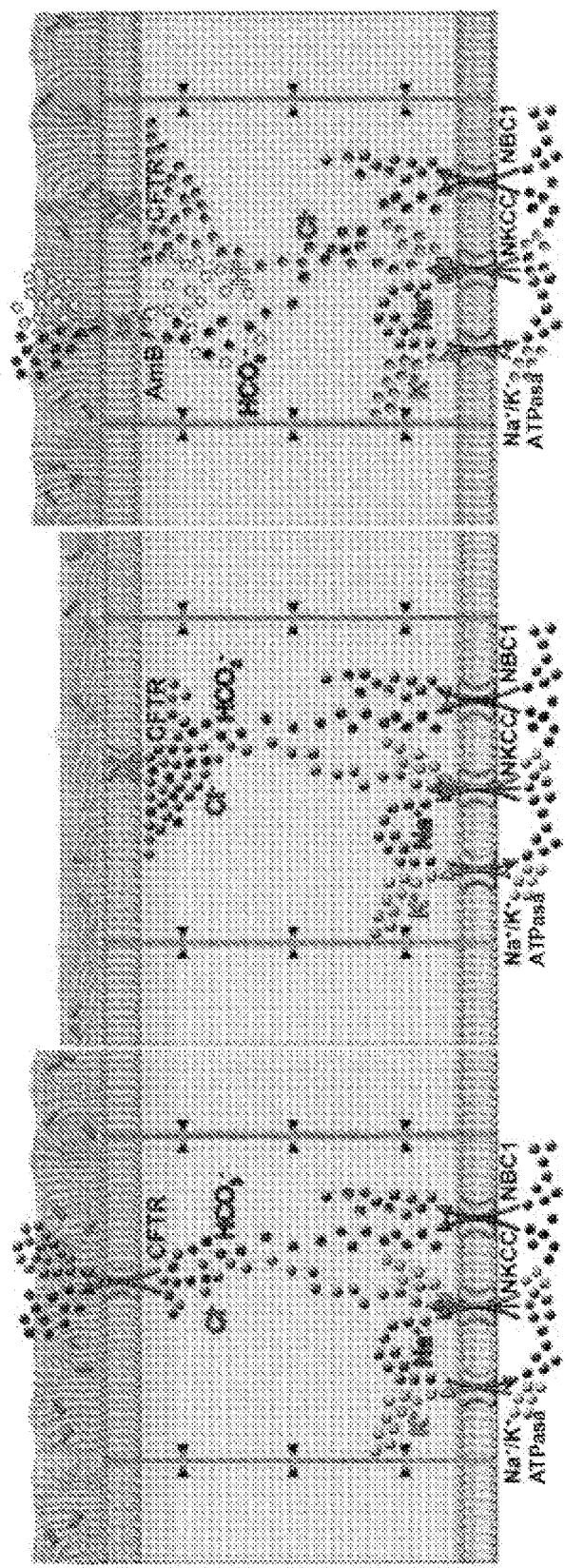
**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende
  - 5 (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística.
  - 10 2. Una composición que comprende
    - (i) anfotericina B (AmB), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) colesterol para su uso para aumentar el pH del líquido de la superficie de las vías respiratorias en un ser humano que tiene fibrosis quística.
  - 15 3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la AmB y el colesterol están presentes en una razón molar en el intervalo de 1:3 a 1:15.
  - 20 4. La composición para el uso de la reivindicación 3, en donde la AmB y el colesterol están presentes en una razón molar en el intervalo de 1:4 a 1:12.
  5. La composición para el uso de la reivindicación 3, en donde la AmB y el colesterol están presentes en una razón molar en el intervalo de 1:5 a 1:10.
  - 25 6. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la AmB y el colesterol están presentes como un complejo.
  - 30 7. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el genotipo de fibrosis quística se selecciona del grupo que consiste en ΔF508/ΔF508, R553X/E60X, ΔF508/1717-1G→A, ΔF508/c.2052dupA, D293G/V520F y G551D.
  8. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la fibrosis quística es refractaria.

Fig. 1



182



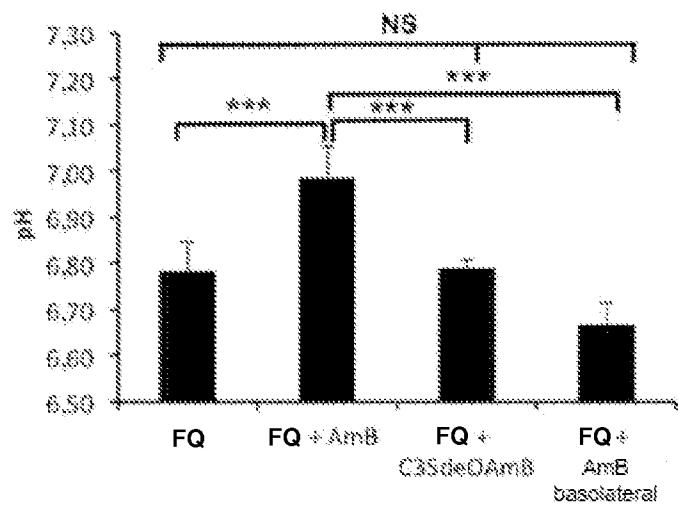
## Epitelios pulmonares normales

Epitelios pulmonares da FCO

## **Epitelios pulmonares de FQ + Amb**

# ES 2 983 639 T3

**Fig. 3A**



**Fig. 3B**

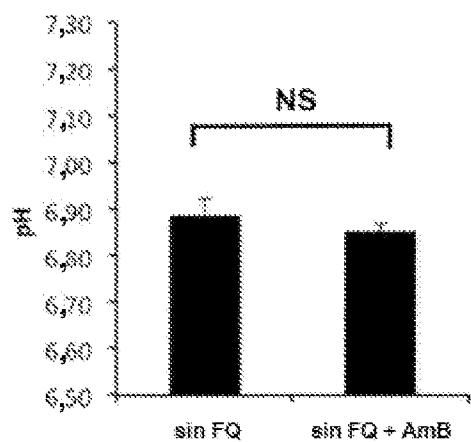
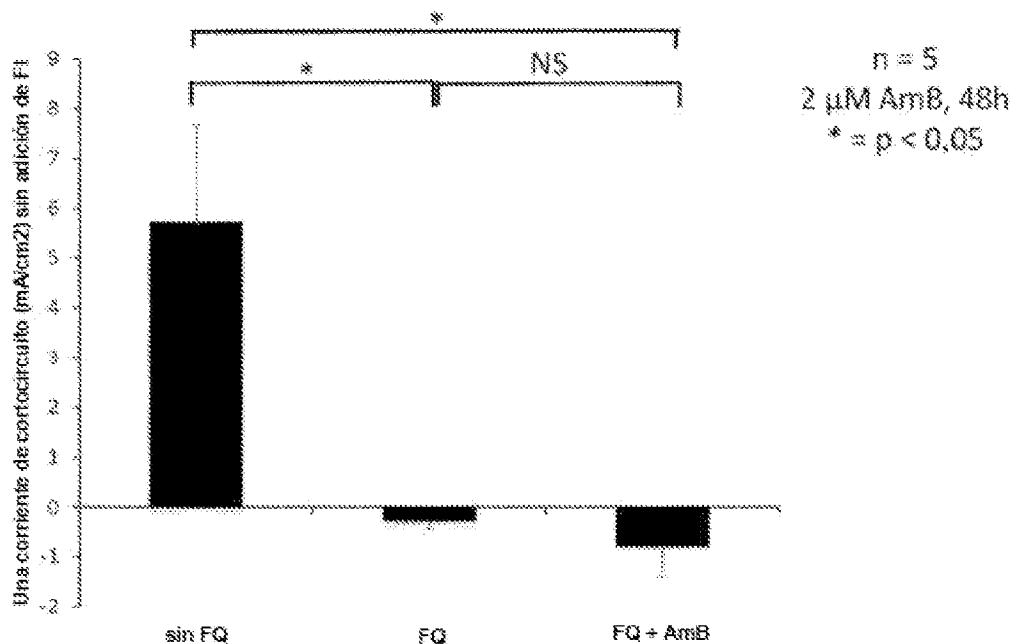
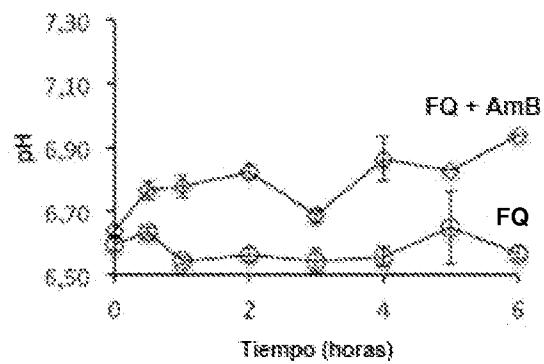


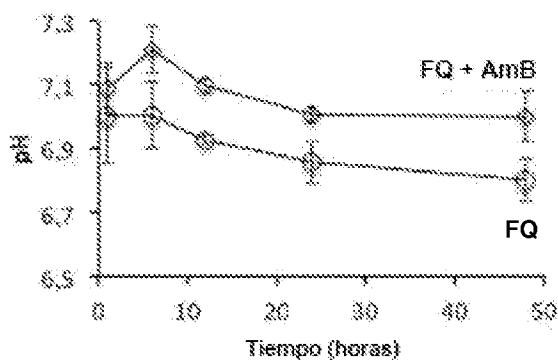
Fig. 4



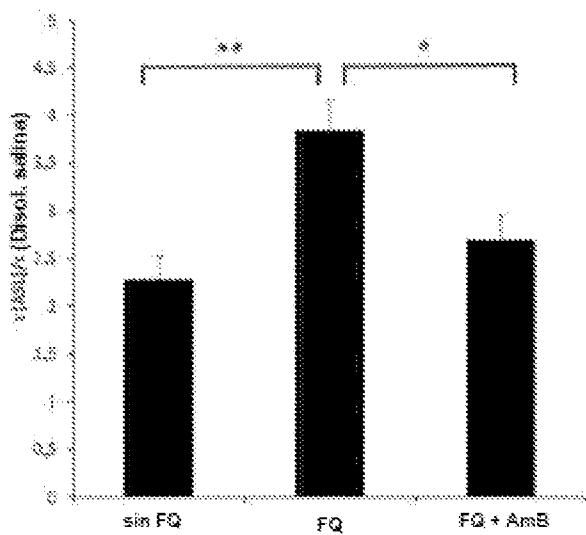
**Fig. 5A**



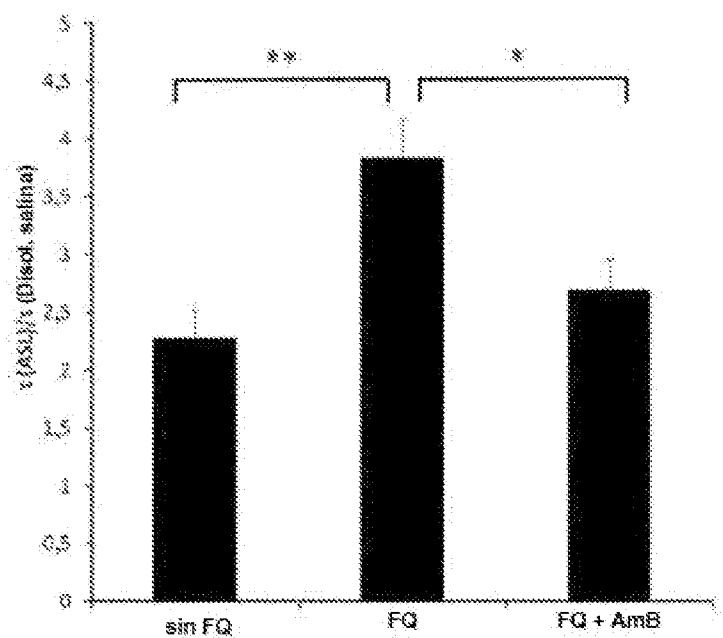
**Fig. 5B**



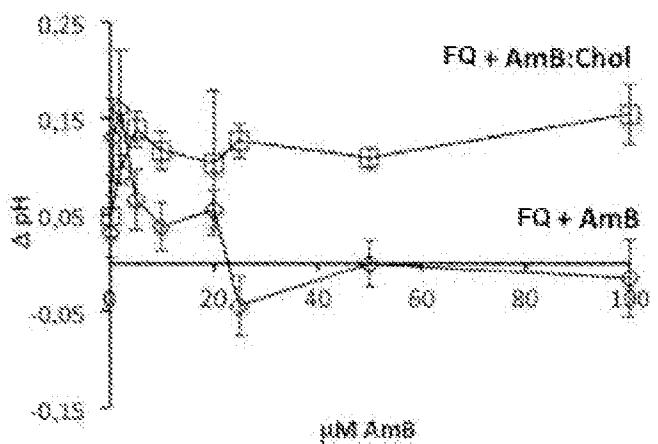
**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**



# ES 2 983 639 T3

Fig. 9

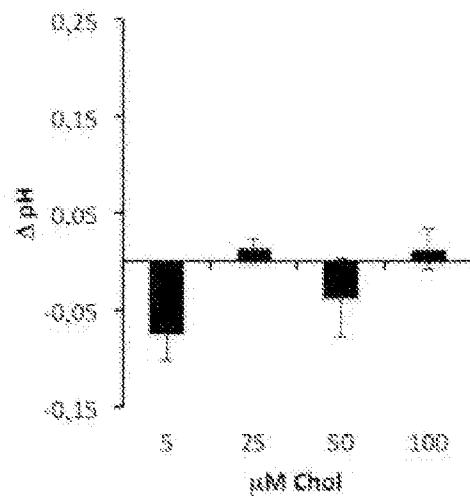


Fig. 10A

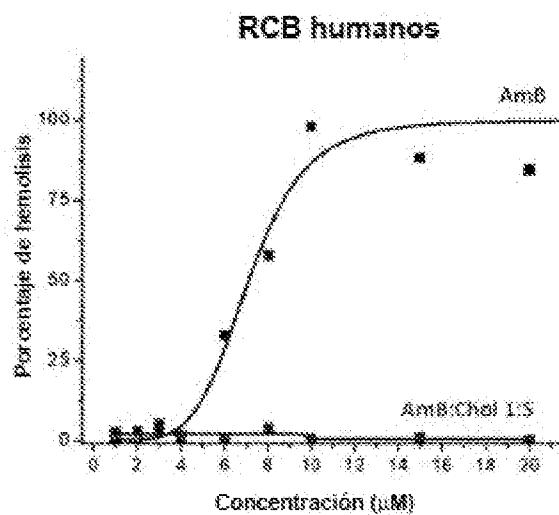


Fig. 10B

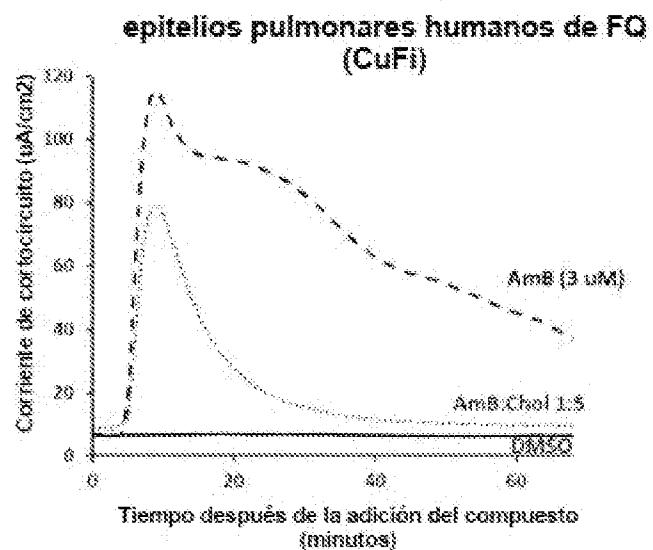


Fig. 11

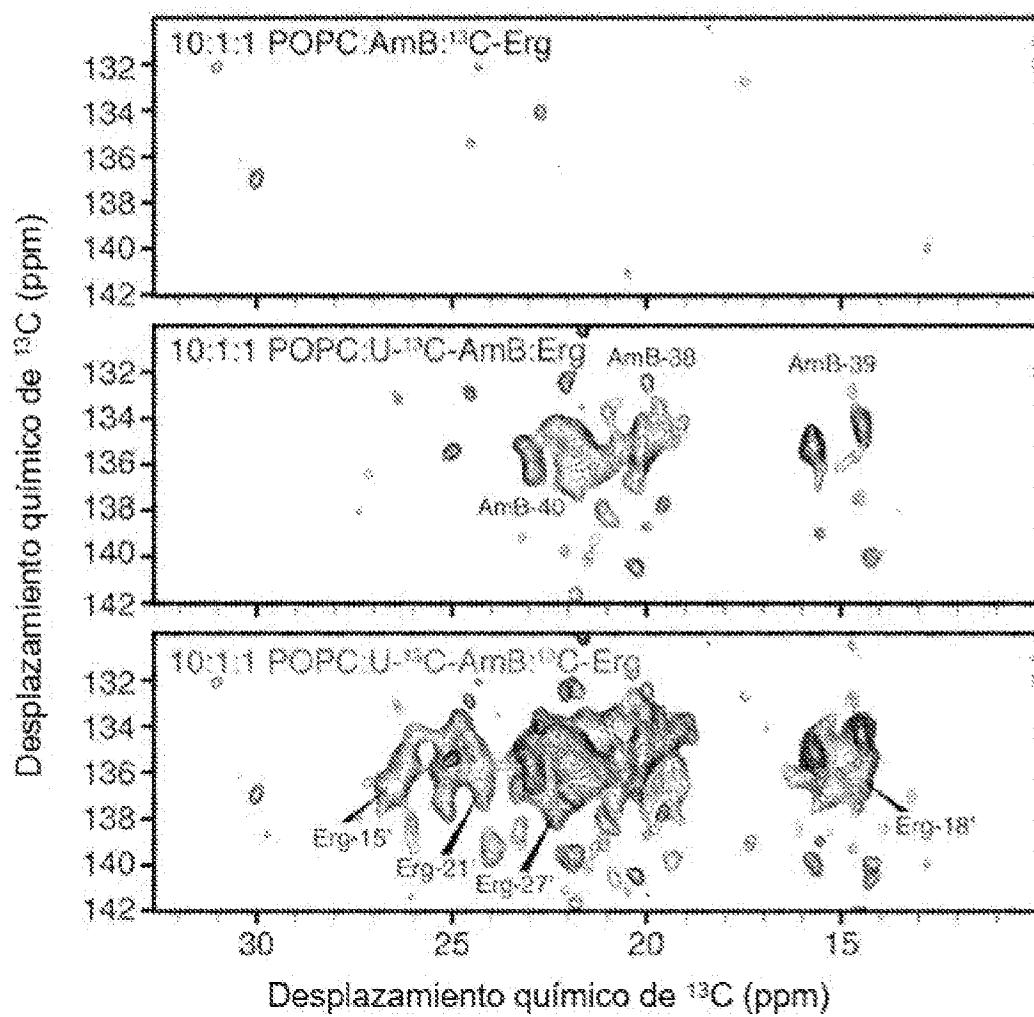
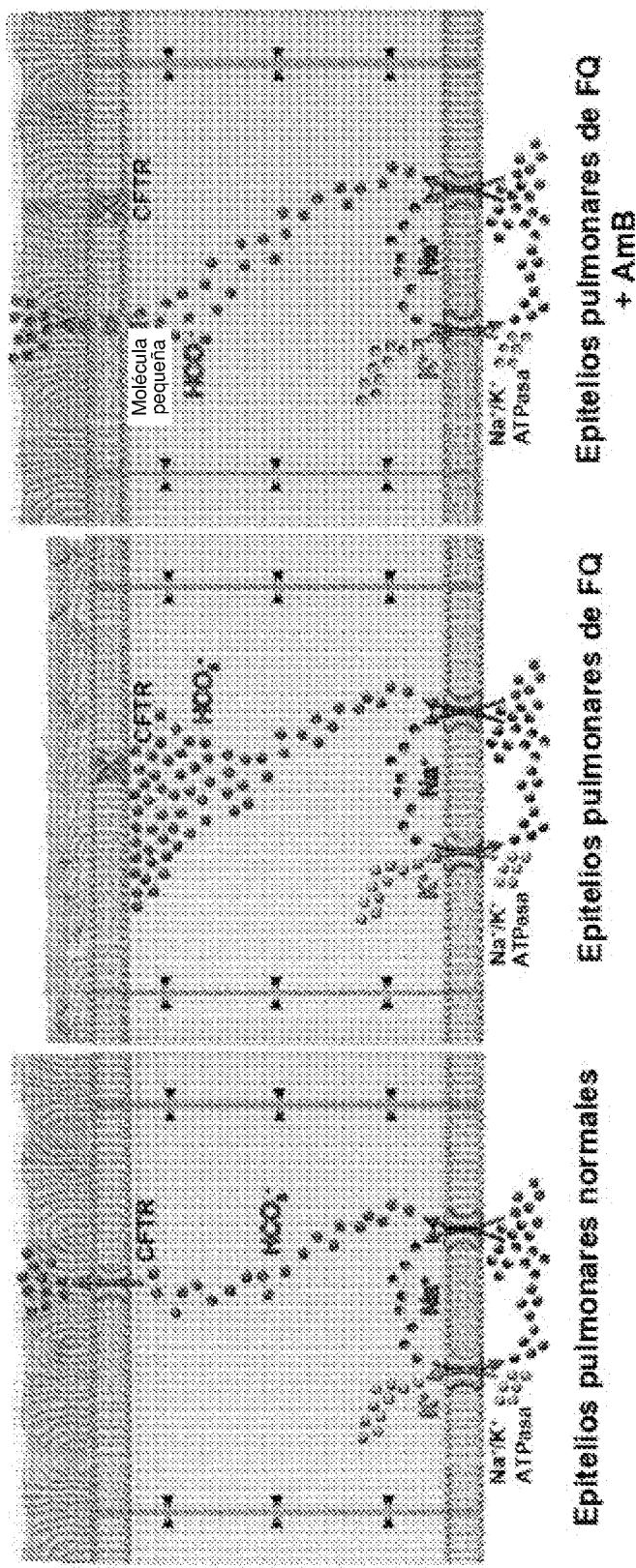


Fig. 12



# ES 2 983 639 T3

Fig. 13

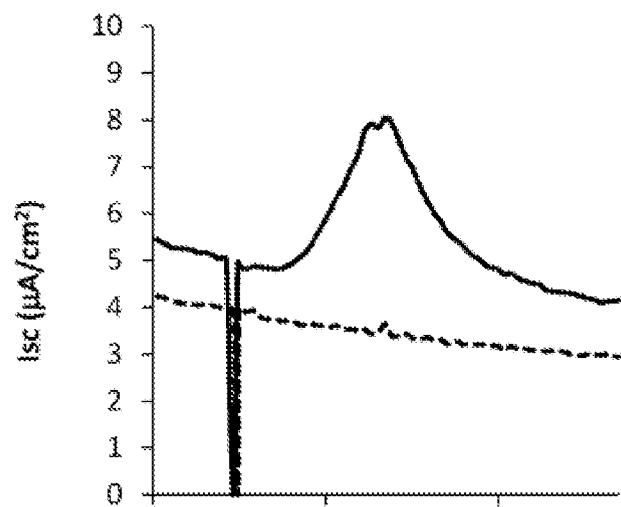


Fig. 14

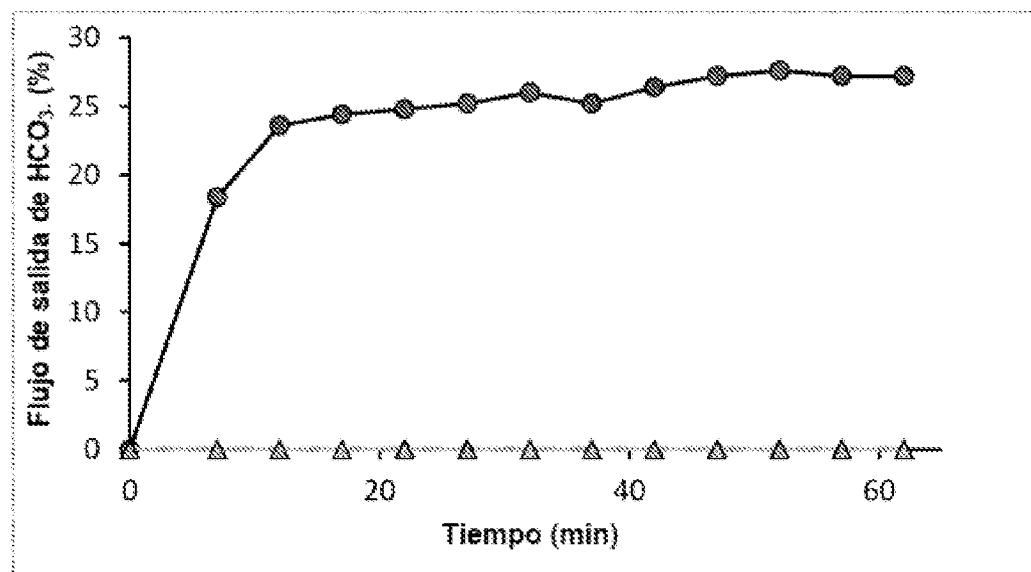


Fig. 15A

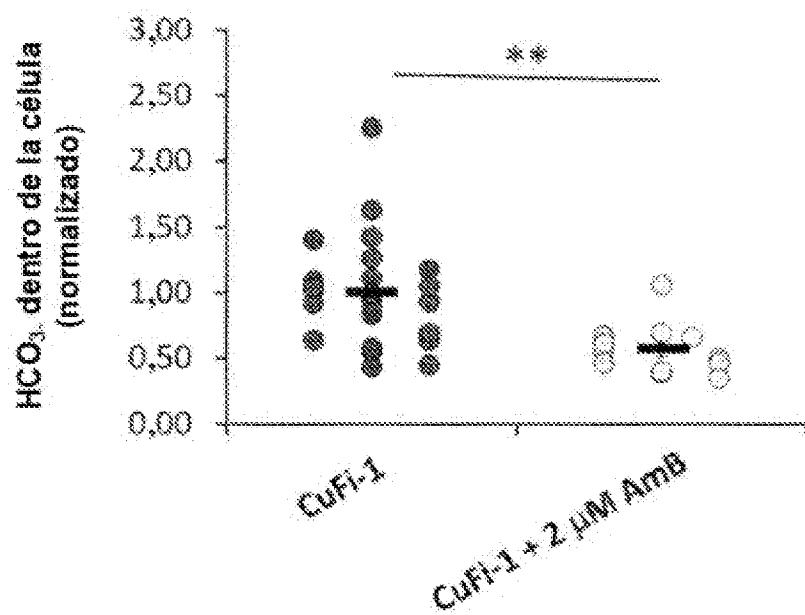


Fig. 15B

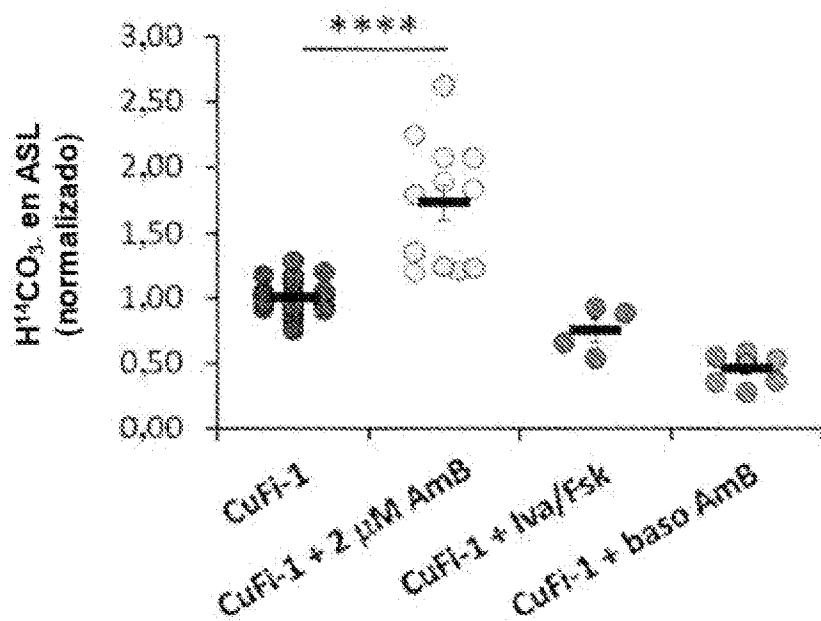


Fig. 15C

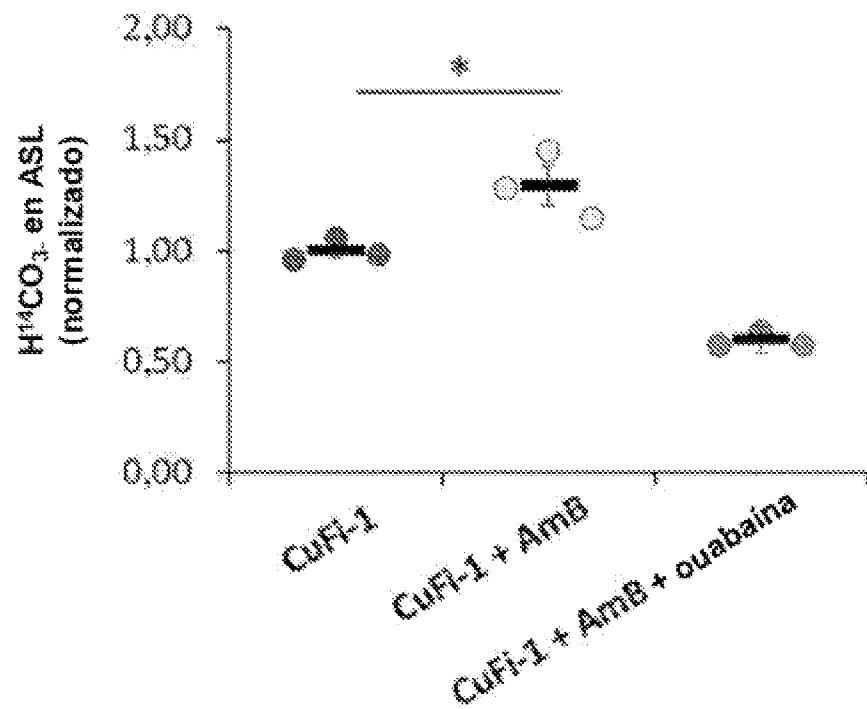


Fig. 16

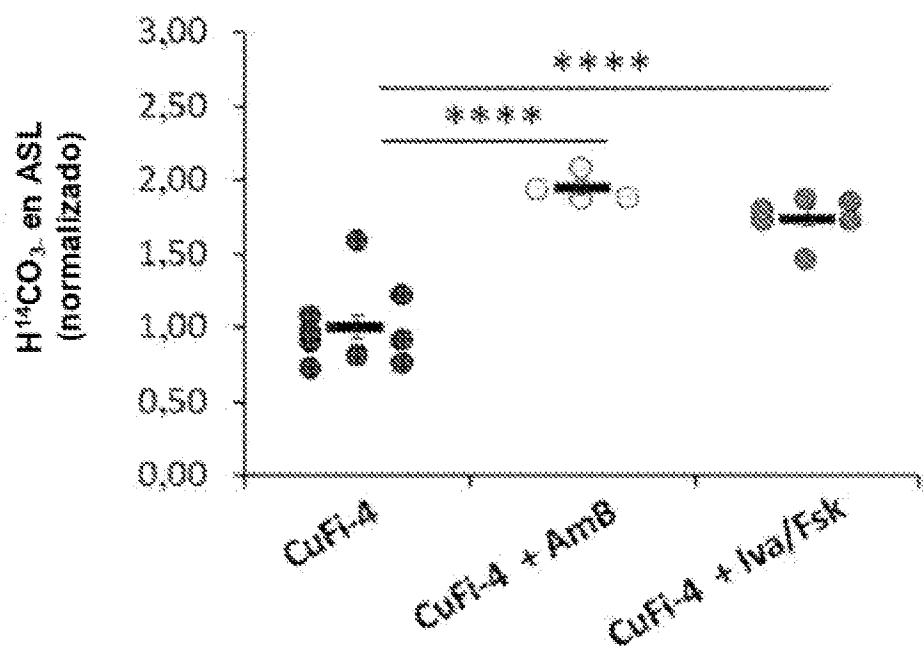


Fig. 17

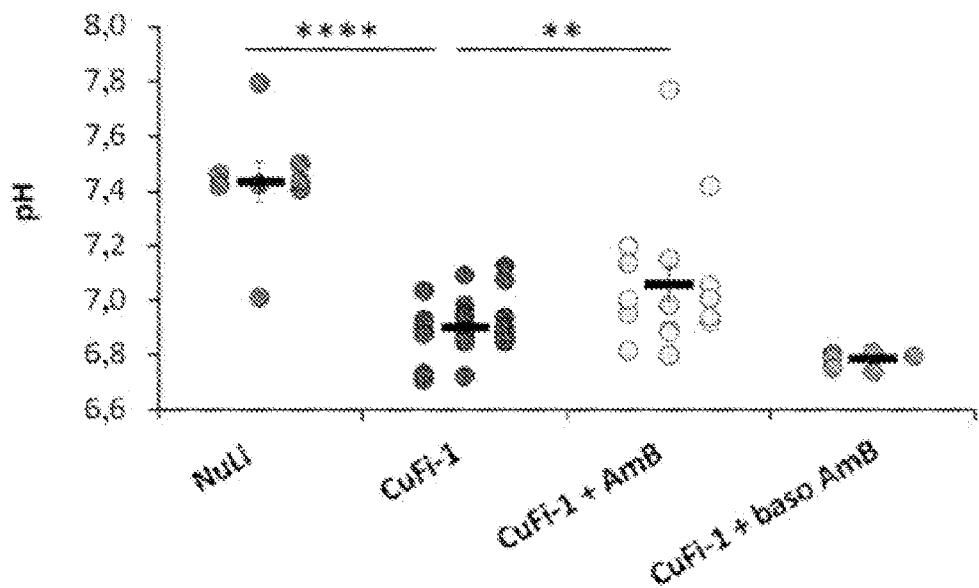


Fig. 18

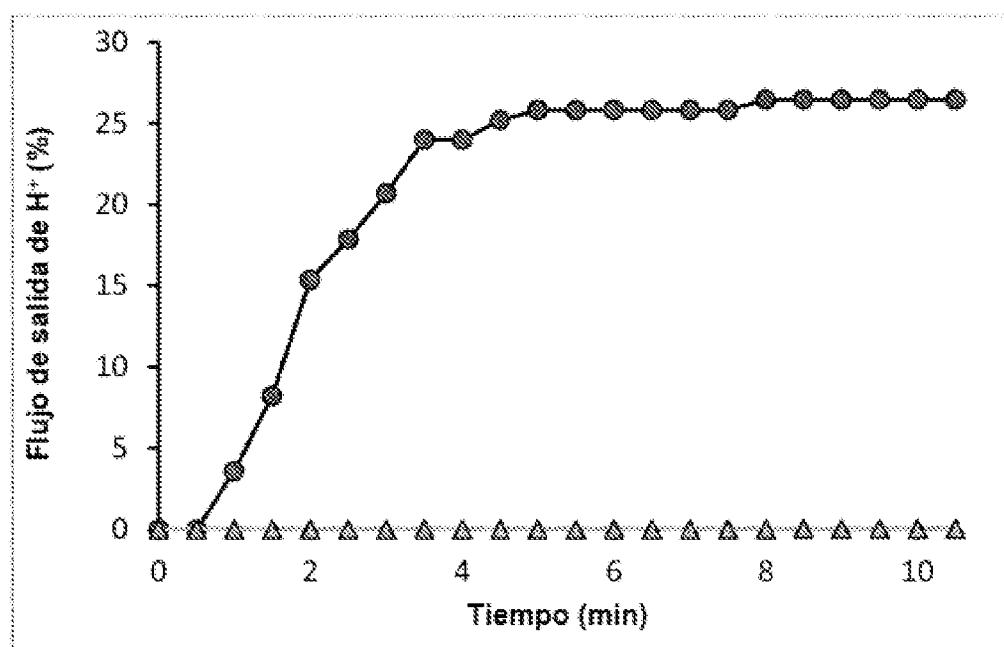


Fig. 19

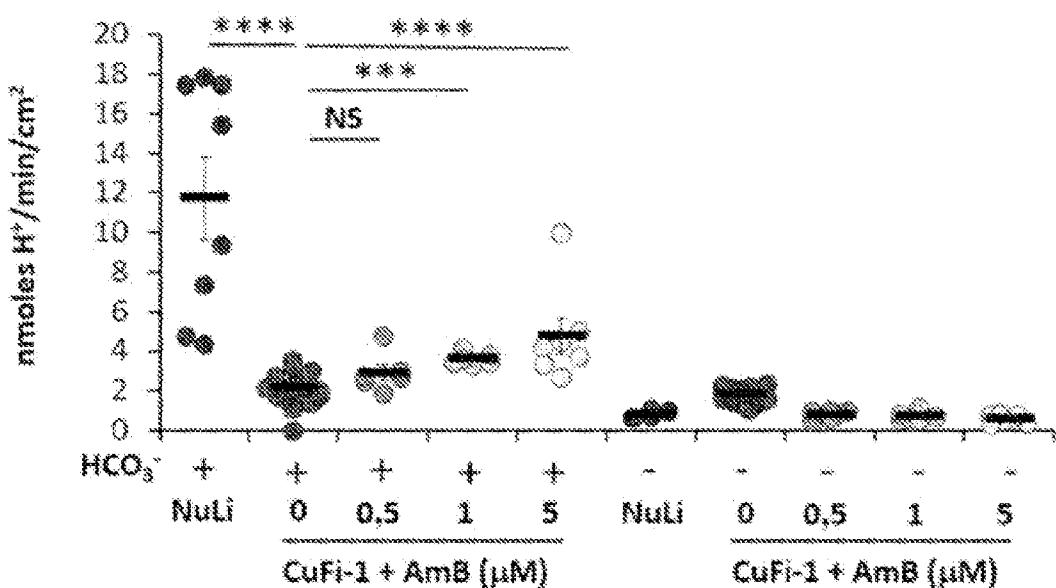


Fig. 20A

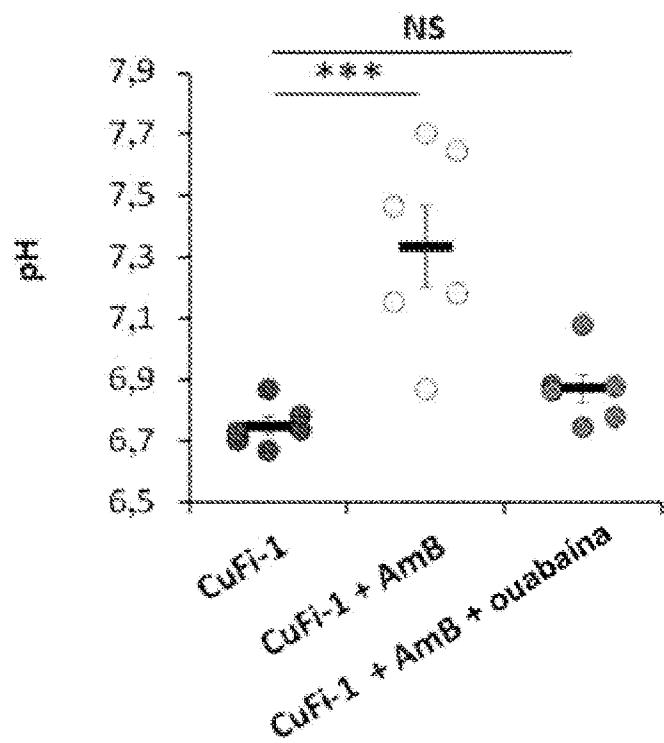


Fig. 20B

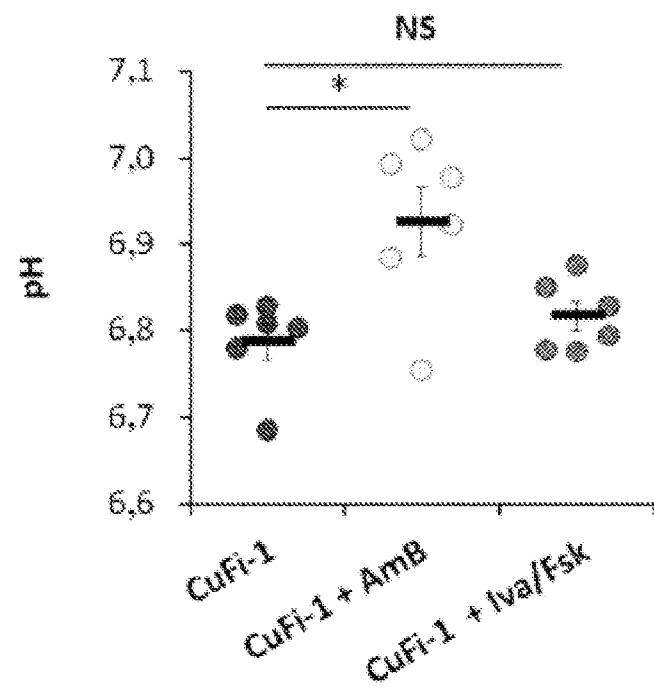
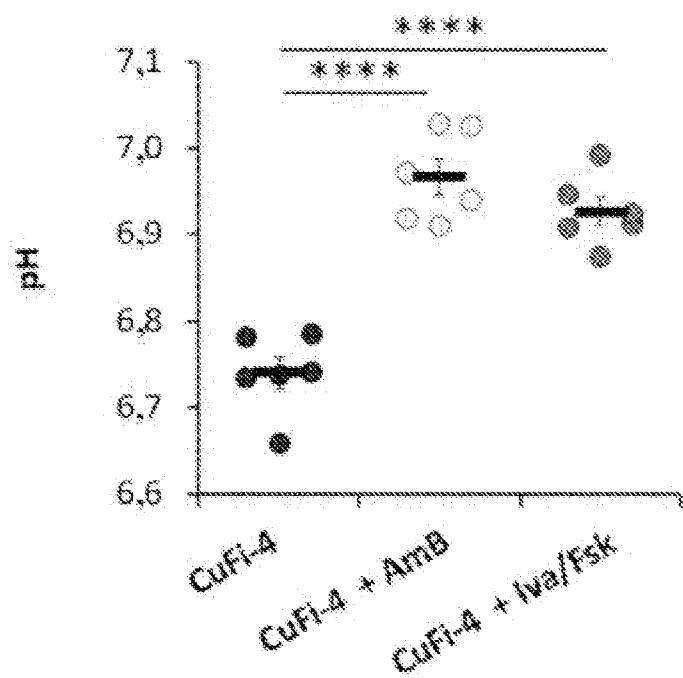


Fig. 20C



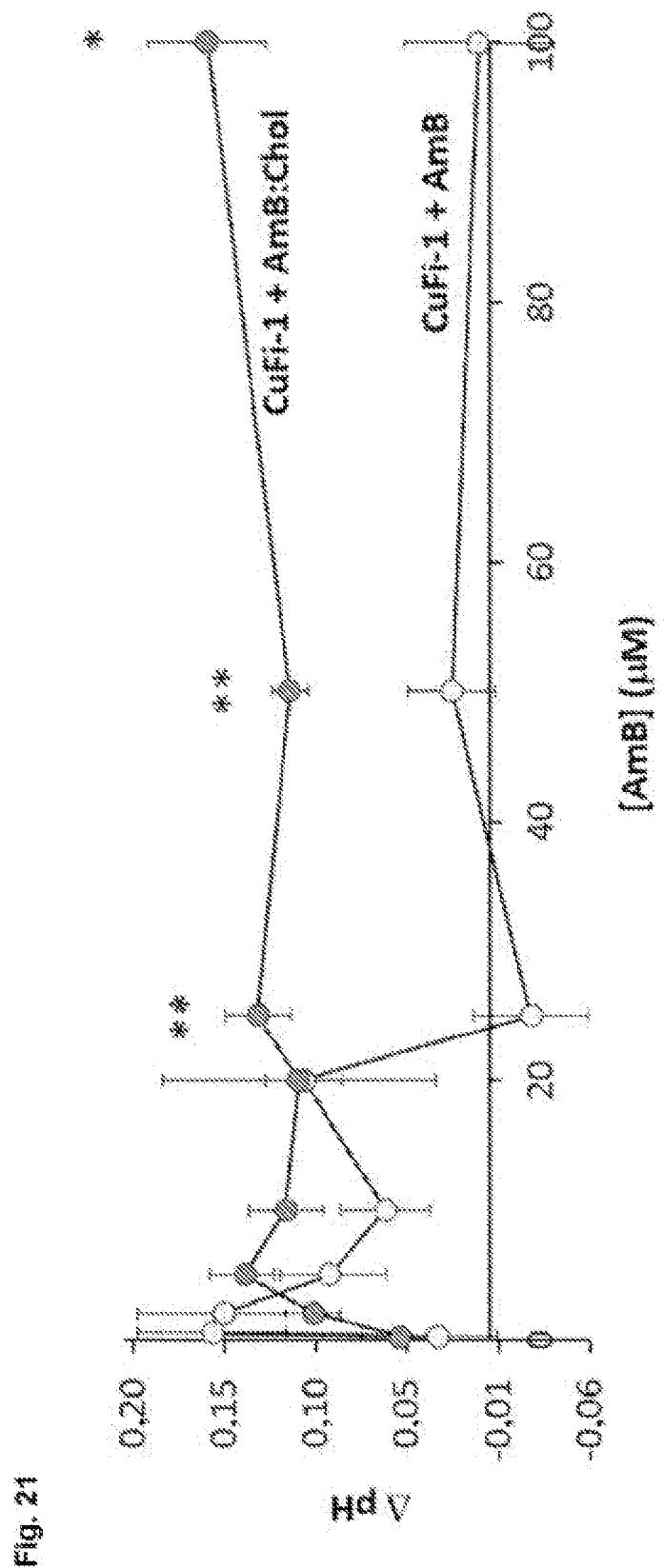


Fig. 21

Fig. 22A

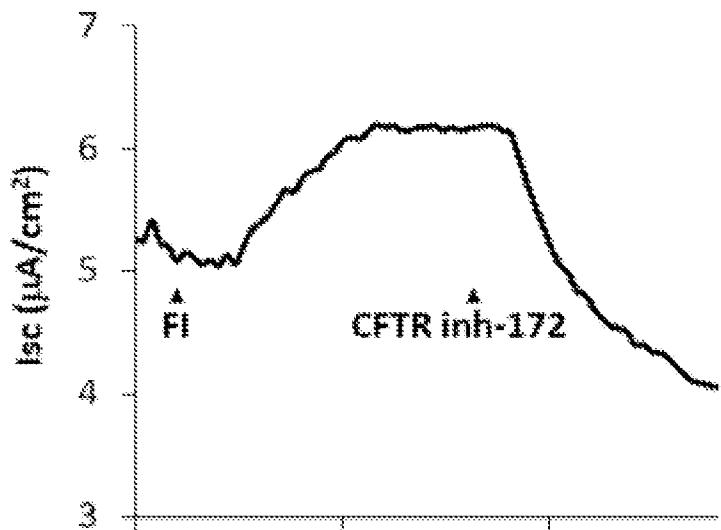


Fig. 22B

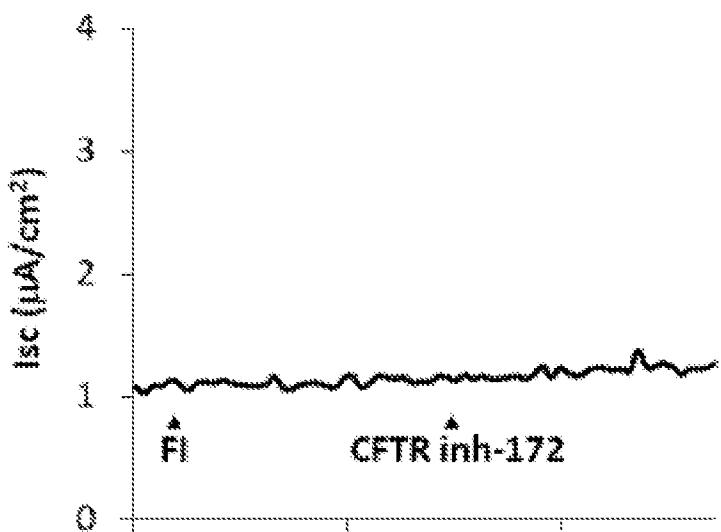


Fig. 22C

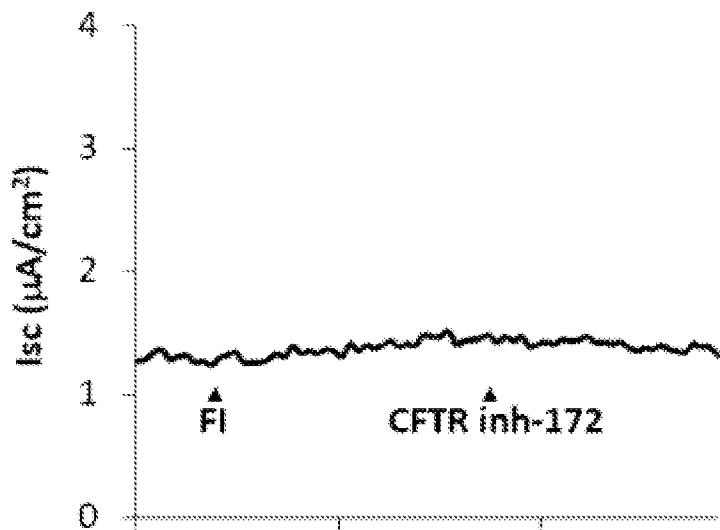


Fig. 23A

N.º de paciente	Genotipo	Clase de mutación
1	$\Delta F508/\Delta F508$	II/III
2	$\Delta F508/\Delta F508$	II/III
3	$\Delta F508/\Delta F508$	II/III
4	$\Delta F508/\Delta F508$	II/II
5	$\Delta F508/\Delta F508$	II/II
6	R553X/E60X	I/I
7	$\Delta F508/1717-1G \rightarrow A$	II/I
8	$\Delta F508/c.2052dupA$	II/U
9	D239G/V520F	U/III

Fig. 23B

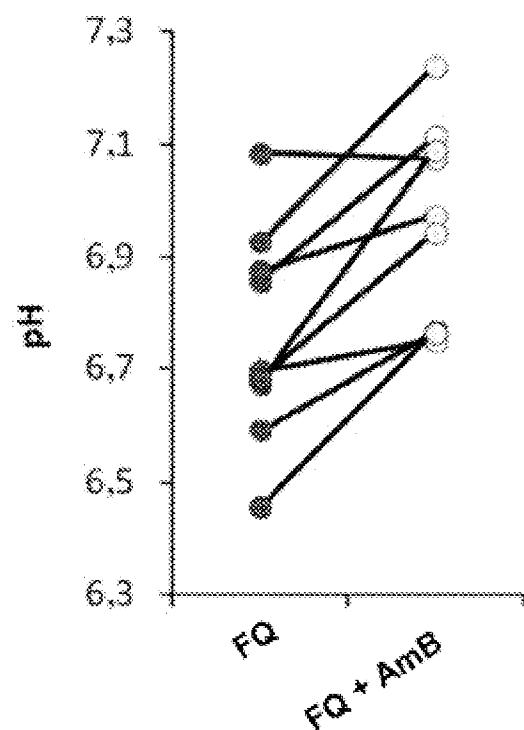


Fig. 23C

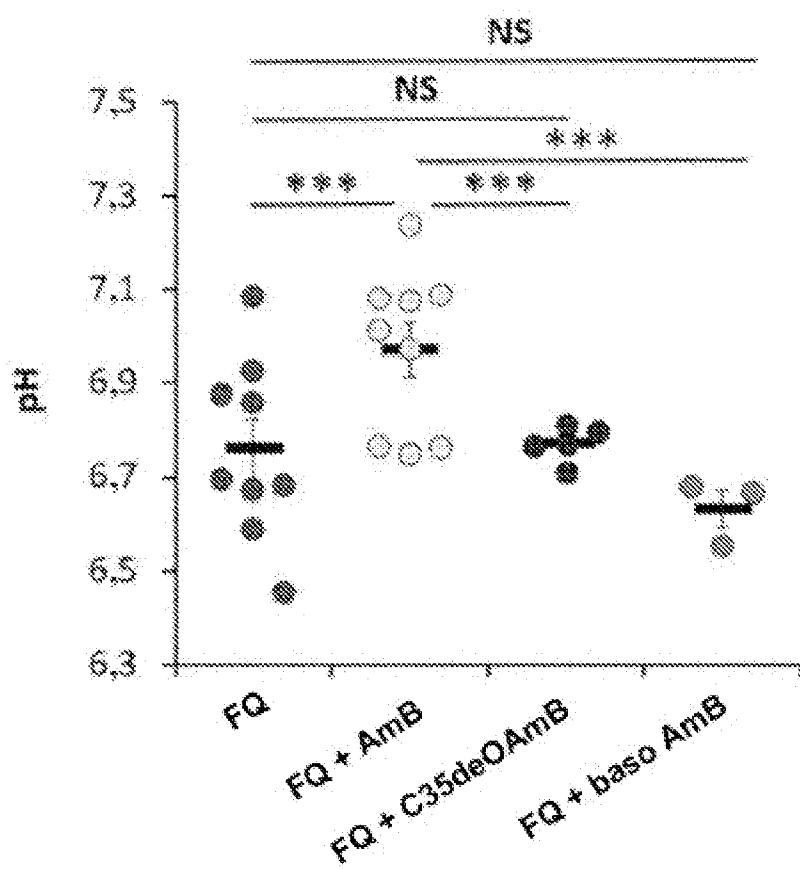


Fig. 24A

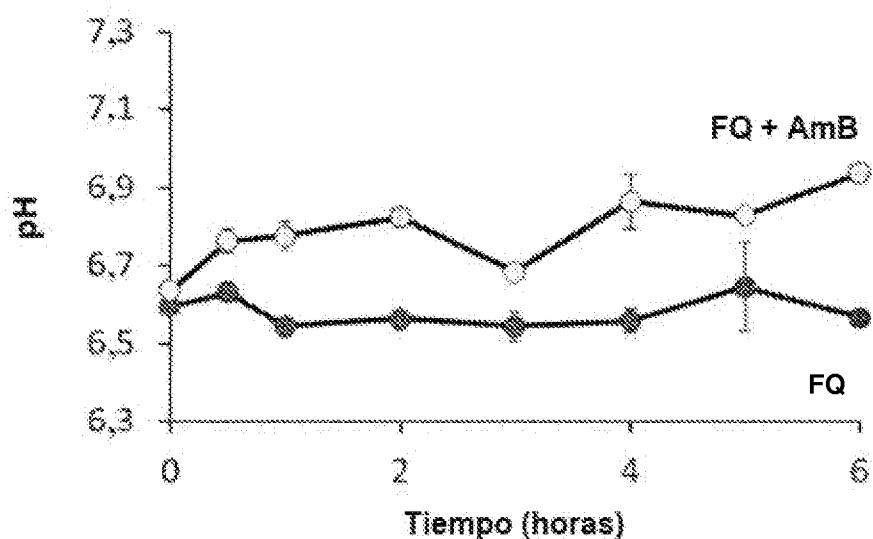
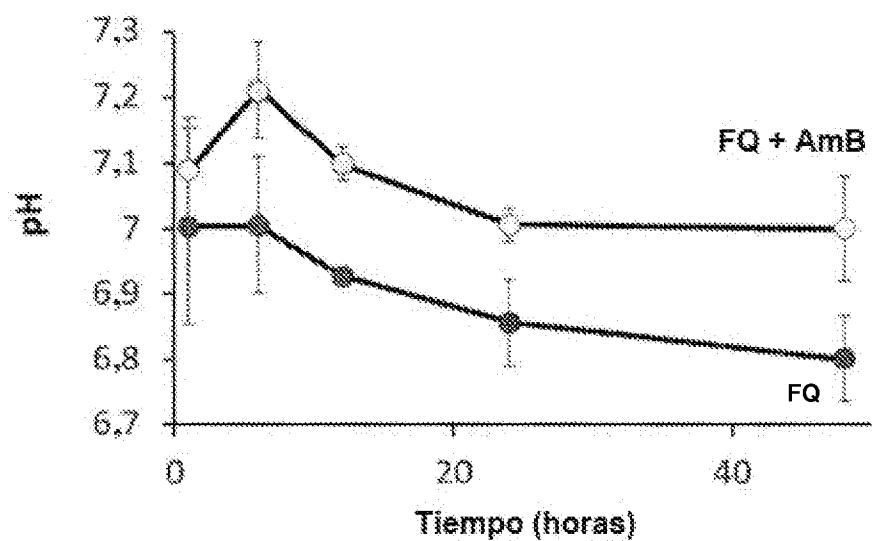


Fig. 24B



ES 2 983 639 T3

Fig. 25

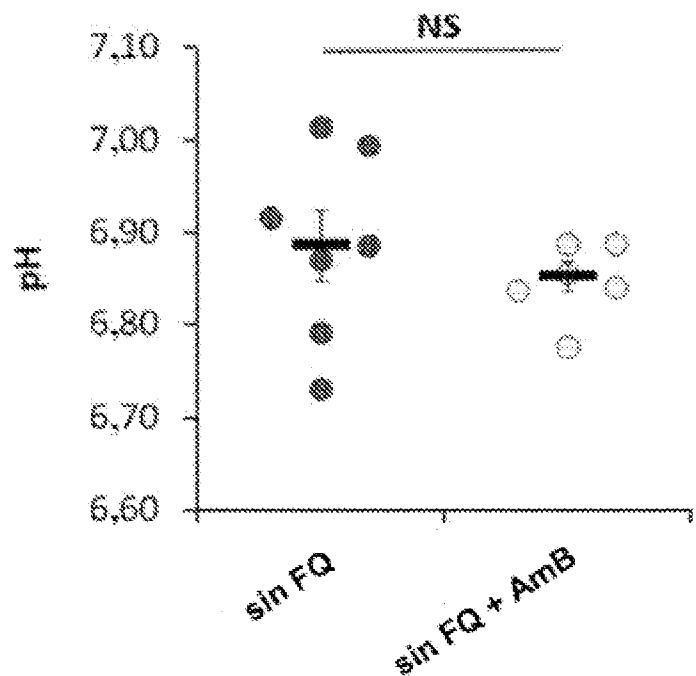


Fig. 26

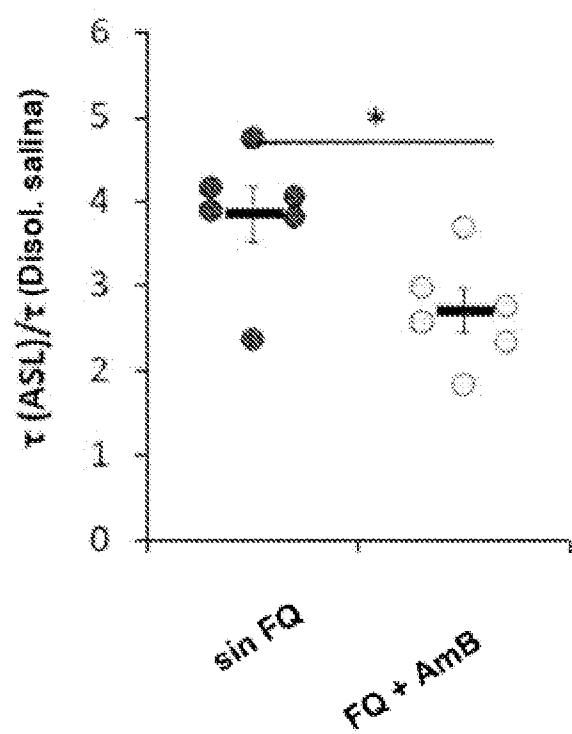


Fig. 27

