(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 543 979**

(51) Int. CI.:

A61K 31/685 (2006.01)
A61K 31/683 (2006.01)
A61K 31/688 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2004 E 04768271 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 1667693**

(54) Título: **Composiciones y métodos para la utilización de cuerpos laminares con fines terapéuticos**

(30) Prioridad:

25.09.2003 GB 0322448
19.04.2004 US 827172

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.08.2015

(73) Titular/es:

LAMELLAR BIOMEDICAL LIMITED (100.0%)
STERLING HOUSE 20 RENFIELD STREET
GLASGOW G2 5AP, GB

(72) Inventor/es:

DOBBIE, JAMES

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Composiciones y métodos para la utilización de cuerpos laminares con fines terapéuticos

La presente invención se refiere a la identificación de cuerpos laminares que modifican macromoléculas biológicas lineales que pueden estar presentes en secreciones y exudados fisiológicos y patofisiológicos, tales como moco, DNA, actina y alginato de origen bacteriano, con respecto a sus propiedades físicas, viscosidad, adhesividad, liquidez y disposición tridimensional. La invención se refiere además a composiciones y métodos de tratamiento en que se utilizan estos cuerpos laminares.

Por el Documento WO 01/72277, en el que se describe que cuerpos laminares son incorporados por células del sistema inmune, particularmente por células dendríticas, se conocen cuerpos laminares capaces de proporcionar una modulación inmune.

Hay diversas ocasiones y lugares en que sería beneficioso modificar macromoléculas biológicas lineales, tal como en estados morbosos y durante una cirugía. Las otitis medias y sinusitis agudas y crónicas, los trastornos inflamatorios agudos y crónicos del tracto respiratorio (incluyendo la fibrosis quística), los trastornos de los tractos digestivo y genitourinario, y durante procedimientos quirúrgicos sobre conductos y superficies de cavidades corporales llenos de, o cubiertos por, secreciones o exudados espesados, son ejemplos en que las macromoléculas lineales son problemáticas. No hay sustancias ni métodos biológicamente eficaces típicamente empleados para la alteración o eliminación de estas especies de macromoléculas que, en situaciones patológicas, pueden dar lugar a morbilidades y mortalidades agudas y crónicas.

Sobre la simple base de la viscosidad o lubricidad observada, los textos de fisiología más antiguos clasificaban las secreciones en espesas y fluidas. Las secreciones espesas fueron descritas como "mucoides", mientras que las secreciones fluidas fueron consideradas de naturaleza "serosa". Estos vagos términos arcaicos están aún en uso y no han sido definidos ni categorizados con precisión. El término "seroso" se aplica a las secreciones fluidas y difusas halladas universalmente en las grandes cavidades corporales, la pleura, el pericardio, el peritoneo, las articulaciones y las vainas de los tendones. Esta secreción fluida se denomina "serosa" ya que, como el suero, no se coagula. Sin embargo, en el último decenio, el fluido seroso de las cavidades corporales fue definido por vez primera con precisión como una secreción del mesotelio en que microcuerpos fosfolipídicos eran el elemento predominante a la hora de conferir una elevada lubricidad y propiedades antiadherentes [J. W. Dobbie (1988), "Ultrastructural similarities between mesothelium and Type II pneumocytes and their relevance to phospholipid surfactant production by the peritoneum" en Advances in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis, redactado por R. Khanna, K. D. Nolph y B. Prowant, University of Toronto Press, Toronto, páginas 32-41; J. W. Dobbie, T. Pavlina, J. Lloyd y R. C. Johnson (1988), Am. J. Kid. Dis. 12: 31-36; J. W. Dobbie y J. K. Lloyd (1989), Perit. Dial. Int. 9: 215-221]. Se ha mostrado posteriormente que no sólo el mesotelio sino muchos otros tejidos de los tractos respiratorio, digestivo y reproductor contienen densidades variables de células "serosas", que secretan una sustancia similar.

Invisibles por microscopías óptica y electrónica durante tanto tiempo, estos hallazgos han sido recientemente responsables del concepto de que el sistema secretor para estos microcuerpos fosfolipídicos constituye en todo el reino animal un sistema biológico principal hasta ahora no reconocido [J. W. Dobbie (1996), Perit. Dial. Int. 16: 574-581].

Extendida por todo el reino animal, la secreción de moco por superficies corporales, en asociación con proyecciones móviles subyacentes de superficies celulares, los cilios, constituyen conjuntamente un importante sistema mecánico para la eliminación automática de sustancias potencialmente nocivas. En el pulmón, el sistema de aclaramiento mucociliar es la primera línea de defensa contra materiales corpusculares, aerosoles y agentes patógenos inhalados, en sus vías aéreas. Dichos materiales son adsorbidos de la corriente de aire por el gel mucoso contenido dentro del líquido de la superficie de las vías aéreas, que reviste el epitelio ciliado. A pesar del enfoque de una investigación intensiva en los últimos años, particularmente en relación con la patogénesis de la fibrosis quística, quedan problemas biofísicos sin resolver en la comprensión de la función del aclaramiento mucociliar en todas las superficies corporales. Es con respecto a la identificación de composiciones para el tratamiento de enfermedades y estados caracterizados por la preponderancia de secreciones mucosas espesas a lo que se dirige la presente solicitud.

La presente invención se refiere al descubrimiento de que las células secretoras de cuerpos laminares son una necesidad biológica en los sitios donde se producen secreciones espesas tales como moco, y en estados morbosos donde se podrían encontrar macromoléculas lineales que poseyeran unas significativas propiedades viscoelásticas y adhesivas inherentes.

Sería beneficioso proporcionar una sustancia o un método que permitiera modificar, con fines terapéuticos, macromoléculas lineales con respecto a sus propiedades físicas en relación con la viscosidad, la adhesividad y las características reológicas.

En consecuencia, un primer aspecto de la presente invención proporciona una composición según la Reivindicación 1. En una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica que comprende los cuerpos

laminares y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas se emplean para tratar a un sujeto mamífero que padece una enfermedad o estado caracterizado por una preponderancia de secreciones mucosas densas y que necesita dicha terapia, incluyendo fibrosis quística, sinusitis, bronquitis y congestión nasal. En otra realización preferida, el sujeto es un ser humano. En otra realización preferida, los cuerpos laminares comprenden aproximadamente 44-70% de fosfatidilcolina, aproximadamente 15-23% de esfingomielina, aproximadamente 6-10% de fosfatidiletanolamina, aproximadamente 2-6% de fosfatidilserina, aproximadamente 2-4% de fosfatidilinositol y aproximadamente 4-12% de colesterol en peso. En otra realización preferida, la composición comprende además aproximadamente 0-3% en peso de lisofosfatidilcolina. En una realización preferida más, los cuerpos laminares comprenden aproximadamente 54% de fosfatidilcolina, aproximadamente 19% de esfingomielina, aproximadamente 8% de fosfatidiletanolamina, aproximadamente 4% de fosfatidilserina, aproximadamente 3% de fosfatidilinositol y aproximadamente 10% de colesterol en peso. En otra realización preferida, la composición comprende además aproximadamente 2% en peso de lisofosfatidilcolina. En aún otra realización preferida, las macromoléculas lineales que necesitan modificación son seleccionadas del grupo que consiste en DNA, mucina, actina, y alginato de origen bacteriano. Estas sustancias pueden ser producidas por el huésped o por microorganismos invasores, es decir, son sustancias producidas o liberadas por procariontes o eucariontes.

En esta memoria se discute un método de tratamiento para las otitis medias aguda y crónica. El método de tratamiento comprende las operaciones de:

a) insertar una aguja a través de la membrana timpánica;

b) introducir una composición que incluye cuerpos laminares en el oído a través de la aguja; y

c) dejar que los cuerpos laminares modifiquen la viscosidad de la mucina en el oído para que sea capaz de drenar del oído.

Alternativamente, el método de tratamiento de la otitis media comprende las operaciones de:

a) insertar una aguja a través de la membrana timpánica;

b) introducir una composición que incluye cuerpos laminares en el oído a través de la aguja; y

c) dejar que los cuerpos laminares modifiquen la composición y las propiedades biológicas de los contenidos presentes en la secreción patológica, incluyendo macromoléculas lineales del tipo moco, DNA, actina y alginato, con el propósito de que se alteren las propiedades físicas de las secreciones, tales como la viscosidad y la adhesividad, para permitir el drenaje terapéutico del oído medio.

Alternativamente, el método de tratamiento de la otitis media, donde un tubo de timpanostomía (tubo de ventilación) está en su sitio y ha resultado bloqueado por moco o por una mezcla de moco y DNA, actina, alginato o cera, comprende la operación de introducir una composición que incluye cuerpos laminares en el canal auditivo externo.

Alternativamente, el método de tratamiento para la otitis media comprende las operaciones de:

a) insertar un catéter en la abertura faríngea de la trompa de Eustaquio; y

b) introducir una composición que incluye cuerpos laminares en el oído a través del catéter.

La composición puede ser introducida en el oído medio.

También se discute un método para llevar a cabo un procedimiento de cirugía endoscópica funcional de senos (FESS; del inglés, functional endoscopic sinus surgery) sobre el seno o los senos de un paciente, que comprende las operaciones de:

a) aplicar una composición que incluye cuerpos laminares al seno o los senos;

b) dejar que los cuerpos laminares de la composición modifiquen las propiedades físicas de viscosidad y adhesividad de macromoléculas lineales, incluyendo moco, DNA, actina y alginato, en la zona del seno o los senos para que las sustancias puedan ser extraídas; y

c) introducir un instrumento quirúrgico en el conducto nasal con objeto de extraer tejido del seno o los senos.

Se puede proporcionar una composición que incluye cuerpos laminares a los conductos respiratorios para modificar las propiedades físicas de macromoléculas lineales del tipo moco, DNA, actina y alginato en secreciones patológicamente alteradas. Los cuerpos laminares modifican la viscosidad y la adhesividad de las secreciones, aumentando la fluidez del fluido de la superficie de las vías aéreas y restableciendo el aclaramiento mucociliar de secreciones por todo el tracto respiratorio. La composición que contiene cuerpos laminares suspendidos puede ser introducida en los conductos respiratorios como un espray. El fluido que contiene cuerpos laminares suspendidos puede ser sometido a ultrasonicación durante la administración del aerosol inhalado. En aún otra realización

preferida, los componentes terapéuticos pueden ser incluidos sobre o dentro de las bicapas fosfolipídicas que constituyen los cuerpos laminares para un acceso más eficaz de los componentes terapéuticos a microorganismos aislados protegidos por macromoléculas lineales procedentes de procariontes y eucariontes.

Se puede aplicar una composición que incluye cuerpos laminares a diversas partes del cuerpo para el alivio sintomático de secreciones viscosas en pacientes con fibrosis quística, un trastorno autosómico recesivo debido a un defecto del gen responsable de la secreción de una proteína llamada "regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística" (CFTR; del inglés, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). En una realización preferida, el tratamiento sintomático de las secreciones patológicas en la fibrosis quística se lleva a cabo aplicando una composición que contiene cuerpos laminares suspendidos que se introducen en los conductos respiratorios como un espray. En otra realización preferida, el fluido que contiene cuerpos laminares suspendidos puede ser sometido a ultrasonicación durante la administración del aerosol inhalado. En aún otra realización preferida, se pueden incluir componentes terapéuticos adicionales sobre o dentro de las bicapas fosfolipídicas que constituyen los cuerpos laminares para un acceso más eficaz de los componentes terapéuticos a microorganismos aislados protegidos por macromoléculas lineales procedentes de procariontes y eucariontes. En otra realización preferida se proporciona el tratamiento sintomático de los efectos del bloqueo de los conductos secretores de órganos y glándulas vitales en pacientes con fibrosis quística aplicando una composición que incluye cuerpos laminares por medio de infusión intermitente o continua en el sistema de drenaje mediante agujas o mediante macrocatéteres o microcatéteres apropiados, o por introducción de cápsulas entéricamente revestidas, biodegradables o con matrices de liberación lenta, que contienen cuerpos laminares.

Otras ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la subsiguiente descripción detallada considerada junto con los dibujos ilustrativos siguientes.

Con objeto de proporcionar una mejor comprensión de la presente invención, se describirán ahora realizaciones y usos de la invención sólo a modo de ejemplo y con referencia a las figuras siguientes.

Figura 1. Efecto de concentraciones variables de cuerpos laminares sintéticos sobre la fluidez del moco en comparación con el uso de diluyente de disolución salina como testigo. Cada muestra examinada tenía exactamente un volumen de 30 µl. El ángulo de inclinación fue 90°.

Figura 2. Efecto, a 37 °C, de concentraciones variables de cuerpos laminares sintéticos sobre la fluidez de DNA en comparación con el uso de diluyente de disolución salina como testigo. Cada muestra examinada tenía un volumen de 100 µl. El ángulo de inclinación fue 90°.

Figura 3. Efecto, a 37 °C, de cuerpos laminares sintéticos sobre la fluidez de un gel de moco y DNA combinados en una relación de un tercio del volumen de cuerpos laminares sintéticos a dos tercios del volumen de gel de DNA y moco, en comparación con el testigo consistente en un tercio del volumen de disolución salina al 0,9%. Cada muestra examinada tenía un volumen de 40 µl. El ángulo de inclinación fue 90 °C.

Antes de que se describan los métodos y la metodología de tratamiento presentes, se ha de entender que esta invención no se limita a los métodos particulares y las condiciones experimentales descritos ya que tales métodos y condiciones pueden variar. Se ha de entender también que la terminología empleada en esta memoria tiene únicamente la finalidad de describir realizaciones particulares y no está destinada a ser restrictiva ya que el alcance de la presente invención sólo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Como se emplean en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. De este modo, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o operaciones del tipo descrito en esta memoria y/o que resultarán evidentes a las personas expertas en la técnica tras la lectura de esta descripción, y así sucesivamente.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen los mismos significados que los comúnmente entendidos por quien tiene una experiencia normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o el análisis de la invención se pueden emplear cualesquier métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria, se describen ahora los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en esta memoria se incorporan a ella por referencia en su totalidad.

"Cuerpos o microcuerpos laminares", como se emplea a lo largo de este documento, se refiere a estructuras multilaminares fosfolipídicas de doble capa presentes en muchos tejidos por todo el cuerpo pero también se refiere a las estructuras fosfolipídicas sintéticas de múltiples capas que tienen la nueva composición descrita en la presente invención. De este modo, esta expresión se refiere a cuerpos laminares tanto de origen natural como sintéticos.

"Laminasomas", como se emplea en esta memoria, se refiere a cuerpos laminares sintéticamente preparados como los descritos mediante los métodos de la presente invención.

"Seroso", como se emplea en esta memoria, se refiere a un exudado o efusión que es fluido y tenue y que carece de

un componente celular significativo.

"Tratar" o "tratamiento" se refiere a terapia, prevención y profilaxis y se refiere particularmente a la administración de medicinas o la ejecución de procedimientos médicos con respecto a un paciente, sea para profilaxis (prevención) o sea para curar o reducir el grado de, o la probabilidad de aparición de, la dolencia o padecimiento o estado o suceso que afecta al paciente.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para disminuir o prevenir los síntomas asociados con los estados o deficiencias contemplados para una terapia con las composiciones de la presente invención.

"Formulación de liberación lenta" se refiere a una formulación ideada para liberar una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco u otro agente activo, tal como un polipéptido o un compuesto sintético, a lo largo de un periodo prolongado de tiempo, siendo el resultado una reducción del número de tratamientos necesarios para alcanzar el deseado efecto terapéutico. En lo relativo a la presente invención, una formulación de liberación lenta disminuiría el número de tratamientos necesarios para alcanzar el efecto deseado.

"Terapia de combinación" se refiere al uso de los agentes de la presente invención con otros agentes activos u otras modalidades de tratamiento para, en el caso de la presente invención, el tratamiento de la otitis media o la cirugía abdominal. Estos otros agentes o tratamientos pueden incluir fármacos tales como corticosteroides, compuestos antiinflamatorios no esteroides, y otros agentes útiles para tratar o aliviar el dolor. El uso combinado de los agentes de la presente invención con estas otras terapias o modalidades de tratamiento puede ser concurrente, o se pueden dividir los dos tratamientos de modo que se pueda administrar el agente de la presente invención antes o después de la otra terapia o modalidad de tratamiento.

"Administración local" significa la administración directa por una vía no sistémica en, o en los alrededores de, el sitio de una aflicción, un trastorno o un dolor percibido.

"Modificar" o "modificación de" significa alterar el estado físico de un material con respecto a su viscosidad, adhesividad y/o fluidez. En la presente invención, "modificación" se refiere a cambios en características físicas, quizás a causa de cambios en la hidratación del gel, aunque otros factores pueden desempeñar un papel en la modificación del estado físico.

"Otitis media aguda" es una inflamación de la zona situada detrás del tímpano (membrana timpánica) en la cámara llamada "oído medio". La otitis media aguda es una infección que produce pus, fluido e inflamación dentro del oído medio. La otitis media aguda aparece frecuentemente como un efecto secundario de infecciones respiratorias cuando las membranas nasales y la trompa de Eustaquio llegan a hincharse y congestionarse.

"Otitis media crónica" se refiere a una infección en el oído medio que se puede desarrollar cuando la infección en el oído medio persiste durante más de 2 semanas. El oído medio y el tímpano pueden empezar a soportar un daño progresivo que da a veces lugar a drenaje a través de un agujero no cicatrizante en el tímpano.

A lo largo de este documento, la expresión "macromolécula lineal" se refiere a moléculas que son lineales a nivel molecular y cuya estructura comprende esencialmente la repetición múltiple en secuencia lineal de unidades procedentes de moléculas de masa molecular relativamente pequeña. Las moléculas pueden poseer cadenas laterales, pero éstas no participarán típicamente en el entrecruzamiento químico. Los ejemplos de macromoléculas lineales de esta especie incluyen moco, DNA, actina y alginato.

"Componentes terapéuticos" se refiere a cualquier molécula terapéuticamente eficaz, sea un compuesto químico orgánico pequeño, o una proteína o un péptido, o un ácido nucleico, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o un carbohidrato, que se puede fijar a los cuerpos laminares y administrar a sujetos que padecen enfermedades o estados para los que puede ser beneficioso el tratamiento. Opcionalmente, los componentes terapéuticos pueden ser incluidos sobre o dentro de las bicapas fosfolipídicas que constituyen los cuerpos laminares.

No ha sido hasta el momento de la presente invención que se ha contemplado el tratamiento de enfermedades que presentan secreciones mucoides espesas con composiciones que contienen los cuerpos laminares de la presente invención. Es decir, un reciente avance esencial en biología molecular y fisiología ha sido la comprensión de que las secreciones "serosas" fluidas que tienen elevada lubricidad y no forman geles (coágulos) pueden existir solas en cavidades, conductos, glándulas, superficies, etcétera del cuerpo mientras que las secreciones "mucoides" espesas están en estados fisiológicos normales siempre acompañadas de células que secretan una disolución serosa que contiene microcuerpos fosfolipídicos.

La invención descrita en esta memoria ha proporcionado nuevas observaciones y conceptos explicativos que dan lugar a la conclusión de que un agente biológico que contrarresta la viscosidad de las secreciones mucosas espesas se proporciona siempre en forma de células secretoras "serosas" adjuntas. La función más probable de los microcuerpos fosfolipídicos sobre geles que consisten en polímeros lineales enmarañados sería la modificación de sus propiedades adhesivas y viscoelásticas.

Estudios sobre el efecto de cuerpos laminares sintéticos sobre las propiedades de adhesividad, viscosidad y fluidez

de las secreciones mucosas han proporcionado por vez primera observaciones relativas a que los componentes esenciales de las células secretoras "serosas" (cuerpos laminares) modifican significativamente las propiedades físicas del moco. Se ha mostrado además que los cuerpos laminares sintéticos ejercen también un efecto significativo sobre las propiedades físicas de secreciones espesas patofisiológicas, que contienen DNA polimérico, actina o alginato procedentes de bacterias y células muertas del huésped.

Usos y composiciones terapéuticos

Otitis media crónica con efusión (COME; del inglés, chronic otitis media with effusion)

La COME es un estado muy común, particularmente en niños. Después de unos ataques agudos o agudos y repetidos de otitis media, el oído medio puede llegar a estar lleno de una secreción viscosa a la que se hace referencia como "oído pegajoso". Esto puede llegar a ser un problema intratable con graves consecuencias para la audición y, en muchos casos, con un habla y un aprendizaje retrasados o deteriorados. La ventilación a través de tubos de timpanostomía es el pilar de la práctica en nuestros días. Hay un acuerdo generalizado entre los otorrinolaringólogos en cuanto a que los métodos actuales de tratamiento producen a menudo resultados subóptimos. Aunque se ha desplegado un esfuerzo muy reciente en investigación para hallar mejores modos de tratamiento, resulta desafortunado que sólo se haya prestado una mínima atención al pequeño hallazgo conocido de células secretoras serosas en la trompa de Eustaquio y el oído medio.

Naturaleza del revestimiento epitelial del oído medio y la trompa de Eustaquio

Se ha considerado durante mucho tiempo que la naturaleza del revestimiento de la trompa de Eustaquio y el oído medio es un epitelio respiratorio "modificado" que contiene células tanto ciliadas como caliciformes procedentes de las capas basales. Sin embargo, basándose en investigaciones sobre preparaciones histológicas montadas completas de fetos, bebés prematuros, infantes, niños normales y adultos, Tos concluyó que las células secretoras mucosas no son un componente normal sino patológico del epitelio del oído medio [M. Tos y P. Caye-Thomasen (2002), J. Oto-Rhino-Laryngology & Related Specialties 64: 86-94). En realidad, se acepta ahora cada vez más que el epitelio de revestimiento a lo largo de la trompa de Eustaquio y el oído medio en un estado de salud normal secreta, pero una disolución fluida y difusa que meramente confiere un aspecto brillante a la membrana. Las únicas células que probablemente son responsables se describen en términos generales en la bibliografía como células "serosas".

Etiopatogénesis de la otitis media crónica con efusión (COME)

Se acepta ahora que el factor clave en la etiopatogénesis de la COME es la transformación metaplásica del epitelio del oído medio en una capa de células predominantemente caliciformes implicada en la hipersecreción de moco a largo plazo. Una investigación reciente en la patofisiología de la COME ha demostrado una cadena continua de reacciones precipitadas por una infección bacteriana, donde la estimulación por endotoxinas junto con citocinas proinflamatorias (IL-1β, TNF-α, IL-8, PAF) y factores de crecimiento (erbB y HepGF) no son sólo potentes promotores de la hiperplasia de células caliciformes sino que también actúan como muy potentes agentes estimuladores de la secreción (secretagogos) de moco.

Funciones del sistema secretor de cuerpos laminares

La función primordial de los cuerpos laminares en los alveolos pulmonares es la provisión de fosfolípidos tensioactivos para promover el intercambio gaseoso en la interfase fluido-aire y para reducir la presión de apertura de las paredes alveolares durante la inspiración.

Hemos mostrado que la función de los cuerpos laminares en las cavidades mesotelialmente revestidas es la de lubricación y provisión de una superficie antiadherente. Esto se alcanza a través de la formación de rodamientos de bolas y rodillos multilaminares y microscópicos que se forman y reforman constantemente entre superficies deslizantes.

En conductos y superficies abiertos del cuerpo, los tractos respiratorio superior, gastrointestinal y reproductor, hemos hallado evidencia de que, además de conferir propiedades antiadherentes, una función clave de la secreción de cuerpos laminares en estos sitios es la modificación y/o desagregación de geles localmente producidos, tal como el moco. Esta propiedad sumamente importante es la garantía biológica de que las superficies, conductos y tubos vitales tienen un método muy conservado para prevenir la asfixia y el bloqueo por secreciones viscosas.

Secreción de cuerpos laminares en el oído medio

En 1984 se demostró por vez primera que el revestimiento epitelial de la trompa de Eustaquio de rata sintetizaba fosfatidilcolina, el componente principal del agente tensioactivo pulmonar, en cantidades comparables a las producidas por el epitelio alveolar pulmonar [S. L. Wheeler, G. L. Pool y R. H. Lumb (1984), Biochim. Biophys. Acta 794: 348-349]. Ésta fue la primera indicación de que el epitelio de la trompa de Eustaquio producía una secreción con propiedades tensioactivas. Aunque este artículo estimuló a Dobbie et al. [J. W. Dobbie, T. Pavlina, J. Lloyd y R. C. Johnson (1988), Am. J. Kid. Dis. 12: 31-36] a aplicar su metodología al mesotelio, las vanguardistas

observaciones de Wheeler no consiguieron provocar mucho interés ni investigación en la comunidad otorrinolaringológica. Sin embargo, en los últimos años, un pequeño número de artículos de investigación sobre la ultraestructura del epitelio del oído medio ha confirmado por microscopía electrónica la presencia de células secretoras de cuerpos laminares, las llamadas células "serosas" [E. Mira, M. Bonazzo, P. Galioto et al. (1988), J. Oto-Rhino-Laryngology & Related Specialties 50: 251-256].

Nuevos conceptos sobre la función de la secreción de fosfolípidos en el oído medio en estado normal y en estados patológicos

Una revisión de una reciente investigación llevada a cabo sobre el revestimiento epitelial del oído medio, considerada en relación con nuestra investigación ultraestructural y fisiológica comparativa sobre la secreción de cuerpos laminares en todos los demás sitios no pulmonares, indica que, en el estado normal, una secreción fluida constante de cuerpos laminares ejerce una función primordial en cuanto a proporcionar una superficie antiadherente en la trompa de Eustaquio, la cavidad timpánica y los sacos aéreos, como hemos demostrado en las cavidades mesotelialmente revestidas del cuerpo. En este sitio se debe evitar a toda costa la formación de adhesiones, sinequias o bloqueo absoluto de las porciones de conducción del sistema. Por lo tanto, habría sido ciertamente sorprendente el que el beneficio de las propiedades antiadherentes muy conservadas de los cuerpos laminares no hubiera estado presente en estas importantes cavidades.

Como el árbol respiratorio superior, el oído medio, bajo el estímulo de una inflamación, presenta la capacidad de producir células caliciformes de secreción mucosa. Sin embargo, el conocimiento actual de la fisiología y la patofisiología del oído medio no se ha dado aún cuenta del sistema equilibrado dual de la secreción de moco y cuerpos laminares.

La preparación de cuerpos laminares sintéticos da ahora por vez primera la oportunidad de examinar la interacción en un modelo *ex vivo* controlado, la posible interacción fisicoquímica entre microcuerpos fosfolipídicos y geles de origen natural que consisten en redes enmarañadas de polímeros glicoproteicos lineales.

"Agente tensioactivo" en el oído medio

En los últimos años ha habido un avivamiento del interés en el posible papel del "agente tensioactivo" en la fisiología y la patofisiología del oído medio. El tema de las investigaciones ha supuesto que los agentes tensioactivos están de algún modo implicados en la ventilación, la protección y el aclaramiento del oído medio a través de la trompa de Eustaquio. Estas funciones han sido examinadas mediante la administración de un agente tensioactivo exógeno y se ha demostrado exitosamente que el agente tensioactivo disminye las fuerzas de apertura de la trompa de Eustaquio, incluso en ratas otológicamente sanas [N. Van Heerbeek, E. L. G. M. Tonnaer, J. A. O. Koen et al. (2003), Otology & Neurotology 24: 6-10]. Sin embargo, en esta capacidad los cuerpos laminares suministrados en el agente tensioactivo no están actuando de por sí como un agente tensioactivo sino como un revestimiento que previene la adhesión de superficies opuestas. Sin embargo, no se observó efecto significativo alguno sobre el aclaramiento mucociliar. A este respecto, hay un fallo continuo en cuanto a reconocer que está ahora establecido que las propiedades lubricantes y antiadherentes de los cuerpos laminares constituyen la función principal de este sistema y que sus propiedades tensioactivas pulmonares son un desarrollo evolutivo muy especializado tardío. Similarmente, aún no se ha hecho caer a los trabajadores de este campo en la cuenta de que sería un experimento digno de atención el mezclar estos microcuerpos lubricantes con geles de macromoléculas lineales tales como moco y DNA, que son cruciales en la patología del oído medio.

Esto no es negar la importancia del papel de los cuerpos laminares como un agente tensioactivo en el intercambio gaseoso que se produce a través del oído medio y las células aéreas asociadas, y deben desempeñar cierta parte significativa en la ventilación. Sin embargo, esta función bien conocida de agente tensioactivo ha cegado a los investigadores en cuanto a investigar el papel más corriente de los cuerpos laminares como un "lubricante y un limpiador biológicos" de secreciones espesas.

Secreción de cuerpos laminares por células serosas en la mucosa de los senos y las cavidades nasales

Se ha mostrado recientemente que dispersas por todas estas cavidades hay células serosas de las que se ha mostrado por microscopía electrónica que secretan cuerpos laminares típicos. En una infección crónica, bajo el estímulo de endotoxinas, exotoxinas, y citocinas proinflamatorias, hay una hiperplasia de células caliciformes que conduce a una excesiva secreción mucosa. Estas cavidades son luego susceptibles al bloqueo y la interrupción del drenaje debidos a las secreciones espesas de moco, DNA, actina y alginato de origen bacteriano viscosos.

La aplicación terapéutica de cuerpos laminares mediante un espray de aerosoles se empleará típicamente en trastornos de los conductos respiratorios en que los cambios patofisiológicos en la consistencia de las secreciones a causa de alteraciones en la concentración y/o el estado físico de macromoléculas lineales son las inflamaciones agudas y crónicas de los conductos respiratorios inducidas por el organismo (bronquitis agudas y crónicas, bronquiectasia, etcétera), y las inflamaciones agudas y crónicas inducidas por alérgenos (orgánicos e inorgánicos) como en todos los tipos de asma. Viscosidad aumentada de las secreciones causada por inhalación de un compuesto corpuscular irritante o tóxico que induce alteración en el espesor de las secreciones de las vías aéreas,

como en, por ejemplo, la bisinosis debida a la inhalación de polvo de algodón y la bagazosis por inhalación de bagazo (residuo seco de caña de azúcar). La aplicación de cuerpos laminares también se realizará en los conductos respiratorios para dispersar la sustancia polimérica extracelular (EPS; del inglés, extracellular polymeric substance), una biopelícula protectora secretada por diversos microorganismos patógenos, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, en trastornos respiratorios crónicos.

Uso de cuerpos laminares para tratar la fibrosis quística

En la presente invención también se discute aplicar una composición, que incluye cuerpos laminares, a diversas partes del cuerpo para el alivio sintomático de secreciones viscosas en pacientes con fibrosis quística, un trastorno autosómico recesivo debido a un defecto del gen responsable de la secreción de una proteína llamada "regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística" (CFTR). Éste vuelve a la membrana celular permeable al cloruro y otros aniones orgánicos más grandes. El estado se caracteriza por grandes aumentos de la concentración y la viscosidad del moco en los tractos respiratorio, digestivo, gastrointestinal y reproductor. La colonización crónica de alta densidad de las secreciones por bacterias conduce al secuestro de altas concentraciones de DNA polimérico y actina de bacterias y leucocitos muertos del huésped que espesan más las secreciones, paralizando el aclaramiento mucociliar. Además, la colonización por organismos que secretan activamente biopelículas protectoras, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* que produce una macromolécula lineal viscosa (alginato), espesa más las secreciones patológicas y crea barreras físicas que hacen al organismo inaccesible al ataque quimioterapéutico. En la fibrosis quística, la enfermedad respiratoria es la causa principal de mortalidad.

No hay sustancias ni métodos biológicamente eficaces típicamente empleados para modificar las propiedades físicas de estas especies de macromoléculas lineales que son conjuntamente responsables de las secreciones disfuncionales en la fibrosis quística.

La presente invención proporciona un tratamiento sintomático de las secreciones patológicas en la fibrosis quística al aplicar una composición que contiene cuerpos laminares suspendidos que se introducen en los conductos respiratorios como un aerosol. Opcionalmente, el fluido que contiene cuerpos laminares suspendidos puede ser sometido a ultrasonicación durante la administración del aerosol inhalado.

Opcionalmente, los componentes terapéuticos pueden ser incluidos sobre o dentro de las bicapas fosfolipídicas que constituyen los cuerpos laminares para un acceso más eficaz de los componentes terapéuticos para atacar a microorganismos aislados protegidos por macromoléculas lineales procedentes de procariontes y eucariontes.

Aunque las secreciones patológicas en el tracto respiratorio son la causa principal de morbilidad y mortalidad, su efecto sobre otras superficies, pasos y conductos da lugar a lesiones significativas debidas al bloqueo y la formación de quistes, particularmente en los tractos digestivo y genitourinario en pacientes con fibrosis quística (CF; del inglés, cystic fibrosis). En cuanto al tracto respiratorio, no hay sustancias ni métodos biológicamente eficaces típicamente empleados en la fibrosis quística para modificar los efectos de las macromoléculas lineales en sitios extrapulmonares.

La presente invención también proporciona el tratamiento sintomático de los efectos del bloqueo de los conductos secretores de órganos y glándulas vitales en pacientes con fibrosis quística al aplicar una composición que incluye cuerpos laminares por medio de infusión intermitente o continua en el sistema de drenaje mediante agujas o mediante macrocatéteres o microcatéteres apropiados, o por introducción de cápsulas entéricamente revestidas, biodegradables o con matrices de liberación lenta, que contienen cuerpos laminares.

Este tratamiento sintomático es apropiado para estructuras y pasos de conducción a lo largo de todo el cuerpo, incluyendo las superficies del tracto gastrointestinal con particular relevancia en la membrana espesada que cubre la mucosa del intestino delgado, la red de drenaje pancreática y hepatobiliar, el sistema genitourinario, incluyendo los túbulos intrarrenales, el sistema de drenaje medular, la pelvis renal, los uréteres, la vejiga, los divertículos de la vejiga, la uretra, la fístula colovesical, la fístula ileovesical, el conducto deferente, las vesículas seminales, la próstata, el cuello uterino, el endometrio, la mucosa de la trompa de Falopio, y las glándulas salivales y lacrimales.

Opcionalmente, los componentes terapéuticos pueden ser incluidos sobre o dentro de las bicapas fosfolipídicas que constituyen los cuerpos laminares para un acceso más eficaz de los componentes terapéuticos a microorganismos aislados protegidos por macromoléculas lineales procedentes de procariontes y eucariontes.

Un ensayo básico de laboratorio sobre el efecto de los cuerpos laminares (llevándose a cabo el ensayo usando cuerpos laminares sintéticos) sobre las propiedades de adhesividad, viscosidad y fluidez de las secreciones ha mostrado por vez primera que los cuerpos laminares modifican significativamente las propiedades físicas del moco. Se ha mostrado además que los cuerpos laminares sintéticos también ejercen un efecto significativo sobre el DNA polimérico y la actina que pueden proceder de bacterias y células muertas del huésped. Asimismo, se ha mostrado que los cuerpos laminares sintéticos modifican las propiedades físicas, incluyendo la viscosidad y la adhesividad, del alginato del tipo secretado por agentes patógenos responsables de una diversidad de trastornos que amenazan la vida.

Propiedades físicas y biológicas de las secreciones mucosas

El moco es la sustancia espesa arquetípica que reviste muchas superficies epiteliales y es secretada en fluidos tales como el fluido de la superficie de las vías aéreas, la saliva y los jugos gastrointestinales. El moco forma una capa que se adhiere a las superficies epiteliales de los tractos respiratorio, digestivo y genitourinario. Allí actúa para atrapar microorganismos, proporcionar una barrera de difusión contra el contacto con sustancias nocivas (por ejemplo, humo inhalado y ácido gástrico) y supuestamente servir como lubricante para minimizar el daño por esfuerzo cortante a las membranas delicadas.

El moco está compuesto de glicoproteínas poliméricas suspendidas en agua que contiene electrolitos. Tiene una cadena principal polipeptídica extendida (apomucina), con numerosas cadenas laterales de oligosacárido. Cubierto por abundantes cargas polianiónicas, el moco, tras la liberación de las células caliciformes por exocitosis, llega a estar muy hidratado. Resistente a la deshidratación, posee propiedades reológicas únicas de elevada elasticidad, adhesividad y baja solubilidad. Los monómeros de mucina se polimerizan a través de enlaces disulfuro de extremo a extremo para formar polímeros lineales que tienen una longitud de al menos 30 µm en el moco respiratorio. El moco forma un gel cuya estructura tridimensional comprende una red enmarañada de polímeros lineales de mucina desprovistos de puentes cruzados intermoleculares. En el líquido de la superficie de las vías aéreas de los individuos normales la concentración de mucina es 1% en peso. En la fibrosis quística, un trastorno respiratorio heredado, la concentración de mucina es 3-4%.

Extendida por todo el reino animal, la secreción de moco por superficies corporales, en asociación con proyecciones móviles subyacentes de superficies celulares, los cilios, constituyen conjuntamente un importante sistema mecánico para la eliminación automática de sustancias potencialmente nocivas. En el pulmón, el sistema de aclaramiento mucociliar es la primera línea de defensa contra materiales corpusculares, aerosoles y agentes patógenos inhalados, en sus vías aéreas. Dichos materiales son adsorbidos de la corriente de aire por el gel mucoso contenido dentro del líquido de la superficie de las vías aéreas que reviste el epitelio ciliado. A pesar del enfoque de una investigación intensiva en los últimos años, particularmente en relación con la patogénesis de la fibrosis quística, quedan problemas biofísicos sin resolver en la comprensión de la función del aclaramiento mucociliar en todas las superficies corporales.

Un trabajo de investigación sobre el moco llevado a cabo por el inventor ha revelado percepciones totalmente nuevas en la actuación del moco por todo el cuerpo. Datos proporcionados por estos estudios sustentan la hipótesis de que, donde está presente el sistema mucociliar, va invariablemente acompañado de un sistema paralelo integrado cuyo producto secretor modifica y controla las propiedades fisicoquímicas y biológicas del moco. A través del desenmascaramiento de la naturaleza y la importancia hasta ahora no reconocidas de las secreciones serosas respiratorias como una parte esencial del sistema secretor de cuerpos laminares, se han hallado explicaciones satisfactorias para las observaciones anómalas y los problemas no resueltos de la física, la biología molecular y la patofisiología del aclaramiento mucociliar.

Hasta ahora, la secreción mucosa ha sido vista como un sistema secretor autocontenido y coherente cuya principal función es proporcionar una sustancia que sirve como protector principal de las superficies epiteliales por todo el cuerpo. Aunque una investigación reciente ha demostrado que la secreción de moco por células caliciformes es sensible a una grandísima variedad de factores procedentes de productos del organismo, desde citocinas hasta estímulos neurales y hormonales, no ha habido reconocimiento alguno de que un sistema paralelo de células secretoras libere sobre las superficies epiteliales microcuerpos que ejerzan un intenso efecto modificador de la consistencia, las propiedades y la supresión de moco. Ésta es la muy abandonada y mal entendida secreción de las células serosas que se hallan siempre en asociación con las células caliciformes.

Se ha reconocido durante mucho tiempo que a lo largo de las vías aéreas respiratorias hay dos poblaciones celulares en el epitelio superficial, siendo el tipo predominante las células secretoras mucosas llamadas células caliciformes y siendo el tipo menos conocido las células secretoras serosas. Mientras que las células caliciformes liberan una secreción espesa o viscosa, a las células serosas se les atribuyó la producción de una disolución tenue y fluida. La secreción mucosa ha recibido con mucho la mayor atención de los investigadores biológicos en comparación con las células serosas cuya secreción ha sido en gran medida ignorada. La razón de la indiferencia radica en la desafortunada incapacidad para identificar con precisión la naturaleza de la secreción. Esto fue debido al hecho de que el tejido de los conductos respiratorios, fijado y procesado usando técnicas estándares para el examen por microscopía electrónica, no conservaba los contenidos de las vesículas secretoras dentro de las células serosas, que parecían estar vacías. Sin embargo, cuando las células fueron fijadas con ácido tánico y glutaraldehído, se mostró que las vesículas contienen bicapas fosfolipídicas osmiófilas dispuestas en complejos modelos geométricos. Estos son los cuerpos laminares.

En las pocas investigaciones llevadas a cabo sobre células serosas, se observó que las del árbol respiratorio, a veces llamadas células de Clara, producían microcuerpos fosfolipídicos. Sin embargo, los trabajadores en investigación en este campo no han considerado la posibilidad de que el fluido de la superficie de las vías aéreas contenga una mezcla equilibrada de polímero viscoelástico espeso y un microcuerpo lubricante muy eficaz. De hecho, el inventor ha demostrado que esta asociación dual de moco y cuerpos laminares produce localmente una solución combinada y equilibrada con dos ingredientes con propiedades fisicoquímicas opuestas. Las superficies corporales de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario contienen células que secretan moco y células que secretan cuerpos laminares. La proporción relativa de cada tipo de célula varía de sitio a sitio de acuerdo con la

proximidad a importantes cambios locales en anatomía, por ejemplo, en esfínteres, y en el momento y la velocidad de secreción en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos.

En conclusión, los recientes descubrimientos del inventor, usando microscopía electrónica, sobre la ubicuidad de las células que secretan cuerpos laminares y especialmente la demostración de que se encuentran en tándem con células de secreción mucosa han proporcionado nuevas percepciones en cuanto a la existencia de un sistema equilibrado que ejerce control sobre el microentorno de las superficies y los conductos. Como pronosticaba la investigación ultraestructural sobre este sistema secretor recientemente descubierto, la creación de cuerpos laminares sintéticos ha proporcionado por vez primera la confirmación *in vitro* del efecto modificador de los cuerpos laminares sobre las propiedades físicas de secreciones y exudados que contienen macromoléculas lineales.

DNA, actina y alginato en secreciones y exudados patológicos

Todas estas sustancias son reconocidas como moléculas viscosas liberadas en cantidades considerables en una diversidad de procesos patológicos asociados principal, aunque no exclusivamente, con la inflamación inducida por el organismo. Pueden estar relacionadas normalmente con el moco, individual o conjuntamente, en un espesamiento conglomerado de secreciones o exudados en una diversidad de trastornos que da lugar a una grave disfunción de órganos y tejidos a través del bloqueo de los conductos y pasos, incluyendo la trompa de Eustaquio y el oído medio en la otitis media crónica, y a la formación de capas impenetrables sobre las superficies operativas.

Parecería que por todo el reino animal hay una provisión para la modificación de las propiedades físicas de estas macromoléculas biológicas lineales.

DNA y actina

El DNA liberado de los núcleos de las células muertas forma una sustancia muy pegajosa. En una concentración de sólo 1%, el DNA polimérico forma *in vitro* un gel sólido. El volumen de DNA liberado por los leucocitos muertos en un proceso inflamatorio es considerable. De este modo, en la fibrosis quística un esputo puede contener hasta 10% de DNA en peso. La macromolécula lineal actina, el principal componente del citoesqueleto filamentoso, constituye el 20% de la proteína total presente en la célula media. Esta sustancia es también una molécula viscosa que es liberada en cantidades significativas por los leucocitos muertos, contribuyendo más a la viscosidad de las secreciones y exudados inflamatorios. Además, cuando están presentes en procesos infectivos, las bacterias muertas liberan tanto DNA como actina en cantidades no despreciables.

Alginato de origen bacteriano

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* causa graves infecciones crónicas por todo el cuerpo, incluyendo otitis media crónica y sinusitis crónica, y especialmente en el tracto respiratorio de los pacientes con fibrosis quística. Las colonias mucoides de estos organismos secretan una sustancia polimérica extracelular (EPS) conocida como exopolisacárido alginato, que potencia significativamente su patogenicidad. El alginato es un poli(ácido urónico) coloidal, hidrófilo y de cadena lineal compuesto esencialmente de restos de ácido anhidro-beta-D-manurónico con enlace 1-4. Este alginato, una macromolécula lineal viscosa, no sólo contribuye significativamente al espesamiento de las secreciones colonizadas por las bacterias sino que forma una biopelícula que las protege de la fagocitosis por macrófagos.

Estas macromoléculas lineales constituyen un grave riesgo para el drenaje y la eliminación de secreciones y exudados.

Procedimientos quirúrgicos donde el moco, el DNA, la actina y el alginato son un problema

En muchos estados morbosos se presenta a menudo la sobreproducción de moco, y ésta es particularmente problemática cuando se van a llevar a cabo procedimientos quirúrgicos. En la mayoría de sitios y estados la sobreproducción de moco va acompañada de una producción y liberación patológicas de macromoléculas lineales (DNA, actina, alginato). Incluso en los casos en que la producción de moco es normal, todavía puede ser obstructora en procedimientos quirúrgicos.

Cirugía endoscópica funcional de senos (FESS)

La FESS es un procedimiento mínimamente invasivo para el tratamiento de la sinusitis crónica. Se diseña para eliminar el bloqueo y proporcionar el drenaje libre del seno. La FESS causa poco daño tisular y no queda cicatrización visible alguna que se asocie con una cirugía abierta. La FESS se recomienda a menudo en casos de sinusitis crónica que no responden bien a la medicación ni a otras formas de tratamiento. Esto ocurre cuando los senos están bloqueados y son incapaces de drenar el moco. Cuando sucede esto, los senos pueden llegar a infectarse.

En el procedimiento de FESS se emplea un endoscopio, que permite al cirujano identificar y corregir causas anatómicas de obstrucción del drenaje de los senos. Junto con el endoscopio se pueden insertar otros instrumentos quirúrgicos para tratar problemas dentro de los senos. El tipo de cirugía dependerá del grado del problema de los

senos. A veces se pueden llevar a cabo otros procedimientos nasales con la cirugía de senos para mejorar el acceso y el drenaje de los senos. En el caso presente estamos sugiriendo que se pueden emplear cuerpos laminares o cuerpos laminares sintéticos para modificar el moco antes de, o durante, el procedimiento.

Típicamente, el procedimiento incluirá las operaciones de:

- aplicar al seno una composición que incluye cuerpos laminares;
- dejar que los cuerpos laminares de la composición modifiquen la viscosidad del moco y de cualesquier macromoléculas lineales mezcladas, tales como DNA, actina y alginato, en la zona del seno para que puedan ser eliminados; y
- introducir un instrumento quirúrgico en el conducto nasal para extraer tejidos del seno.

La cantidad de cuerpos laminares en la composición es variable pero, típicamente, la concentración de dosificación de cuerpos laminares en la composición será 10×10^9 por mililitro. La composición puede tener la forma de un espray (nebulizado, con y sin ultrasonicación), una inyección o una preparación de liberación lenta.

Otras áreas quirúrgicas

Además de ser útiles en procedimientos en el oído, la nariz y la garganta, tales como la FESS y el tratamiento quirúrgico de la otitis media, los cuerpos laminares pueden ser también utilizados en cirugía de tractos y conductos donde la secreción de moco con o sin mezclas de macromoléculas lineales tales como DNA, actina y alginato puede hacer más difícil el procedimiento. Muy comúnmente, esto será aplicable en cirugía de los conductos hepatobiliares y la vesícula biliar, cirugía pancreática, cirugía del hígado, cirugía traqueal, cirugía del tracto reproductor, cirugía de las glándulas salivales y lacrimales, incluyendo la irrigación de conductos, y cirugía o desincrustación del tracto gastrointestinal (en los casos en que el término "cirugía" se refiere a procedimientos que serán típicamente llevados a cabo por un cirujano).

Fístula y senos patológicos

"Fístula" es un término que describe la formación de un paso anormal que se desarrolla a causa de un proceso patológico. Una fístula es normalmente un tubo estrecho revestido no con una superficie epitelial sino con tejido de granulación, que conecta dos superficies corporales, ya sea entre dos vísceras huecas o ya sea entre una víscera hueca y una superficie corporal. Son ejemplos de esto las fístulas que se desarrollan entre el colon y la vejiga urinaria (fístula colovesical) y entre la vagina y el colon (fístula colovaginal). Dichas lesiones tienen fama de ser difíciles de erradicar y dan lugar a una inflamación persistente, focal, crónica, y crónica con brotes agudos). El bloqueo y/o la compartimentación intermitentes de la luz de la fístula por secreciones espesadas de mezclas variables de moco, DNA, actina y alginato son los actores clave en su mantenimiento y crean importantes obstáculos a su extirpación y cierre quirúrgicos. La instilación de antibióticos tópicos ejerce un efecto mínimo a causa del bloqueo y el revestimiento de la pared de la fístula por secreciones espesadas impenetrables. De lo que no disponen actualmente los cirujanos es de una sustancia biológicamente eficaz que limpie la fístula de las secreciones que contienen bacterias, endotoxina y citocinas proinflamatorias y proporcione un periodo de drenaje continuo que permita la supresión de la inflamación en la pared de la fístula y la eliminación de bacterias patógenas para permitir la extirpación quirúrgica exitosa del tracto de fístula. Las fístulas se encuentran típicamente en trastornos intestinales inflamatorios crónicos, incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

En el caso presente se sugiere que se pueden utilizar cuerpos laminares o cuerpos laminares sintéticos como un tratamiento preparatorio, como un sistema adjunto a un tratamiento o una erradicación quirúrgicos exitosos de senos y fístulas patológicos. Típicamente, el procedimiento incluirá la endoscopia de la víscera u órgano afectado para posibilitar la inserción de un catéter en el tracto del seno para aplicar una composición que incluye cuerpos laminares, introduciéndose de este modo una disolución de irrigación que contiene cuerpos laminares, o la introducción de cápsulas entéricamente revestidas, biodegradables o con matrices de liberación lenta que contienen cuerpos laminares.

Otras áreas de tratamiento en que la modificación del moco es terapéutica

En una gran variedad de trastornos, las secreciones pueden llegar a ser tan espesas que, en lugar de proteger las superficies o conductos, su viscosidad causa un grave desarreglo funcional local. La patofisiología responsable de la alteración de las propiedades físicas de las secreciones es sólo parcialmente entendida. Una causa primordial de una secreción mucosa espesada es la estimulación por endotoxinas y citocinas que da lugar a una proliferación de células que secretan moco. También se reconoce que el grado de hidratación del moco ejerce un efecto significativo sobre su viscosidad (particularmente en casos tales como la fibrosis quística).

Mucositis inducida por radiación

Después de una terapia de la cabeza y el cuello por radiación, zonas de la nasofaringe, la faringe, la laringe y la tráquea pueden presentar una problemática inflamación de las superficies epiteliales, que da lugar a exudados y

secreciones espesas. Estas membranas adhesivas viscosas contienen bacterias, endotoxinas y citocinas proinflamatorias que promueven y prolongan la inflamación crónica en estos sitios, evitando la curación. Se ha proporcionado un método para aplicar una composición que incluye cuerpos laminares, en una diversidad de formas que incluyen un espray con o sin ultrasonicación, una suspensión o un gel, a las zonas afectadas por mucositis para la dispersión de la membrana adhesiva, promoviendo la curación de las zonas inflamadas.

Sinusitis

Los senos son aberturas revestidas con membrana en los huesos que rodean la nariz. Cuatro pares de senos están conectados con la cavidad nasal por pequeñas aberturas, y estas cavidades de senos descansan al lado de la nariz, encima de las cejas y detrás de los pómulos.

Normalmente, el aire entra y sale de los senos, y el moco drena de los senos en la nariz. Cuando hay una obstrucción, el fluido es incapaz de atravesar los senos libremente. Cuando los senos están infectados, las membranas llegan a hincharse conforme la sangre se precipita a la zona infectada. Esta hinchazón causa congestión, dolor facial y producción aumentada de moco. Como resultado, la nariz puede llegar a moquear y gotear. Las secreciones mucosas pueden espesarse a lo largo del tiempo creando un terreno abonado para infecciones.

La sinusitis aguda aparece típicamente después de un resfriado y dura unas pocas semanas. En el caso de la sinusitis crónica, la sinusitis puede recurrir un número de veces a lo largo del año. Típicamente, se emplean antibióticos y agentes descongestivos para tratar el estado aunque, en el caso de la sinusitis crónica, también se emplean a menudo métodos de tratamiento adicionales.

En el presente invento se sugiere que, para tratar la sinusitis, se puede utilizar una composición que contiene cuerpos laminares. La composición podría tener cualquier forma pero estaría típicamente en forma de un espray o una formulación nebulizada. Puesto que los cuerpos laminares modulan la viscosidad del moco, esto ayudaría a aliviar los síntomas de la sinusitis. También se puede ver que se podría utilizar una formulación similar o igual para tratar los síntomas del resfriado o la gripe comunes. Aquélla sería particularmente útil en forma de un espray nasal.

Fibrosis quística

La fibrosis quística (CF) es el trastorno autosómico recesivo letal más común en la gente de extracción europea, afectando a uno de cada cuatro mil niños nacidos al año en Estados Unidos y Canadá. Los pacientes con CF muere en a una edad precoz por insuficiencia respiratoria debida a un grave daño pulmonar secundario a la colonización por agentes patógenos y a la inflamación crónica de los tejidos pulmonares. La edad media de supervivencia en América del Norte para los pacientes con CF había alcanzado en 1996 los treinta años, mientras que en América del Sur era nueve años. De esta manera, las condiciones socioeconómicas y la disponibilidad de recursos determinan si los pacientes reciben una atención óptima o no. Estos factores desempeñan un papel importante en la morbilidad y la longevidad de los individuos con este trastorno.

La genética de la CF es ahora relativamente bien entendida. Como un trastorno autosómico recesivo, ambos padres de un niño afectado deben llevar el gen, y cada embarazo acarrea una probabilidad de uno a cuatro en cuanto a producir un niño con CF. El índice de portadores en los europeos y sus descendientes es aproximadamente de uno a veintiocho, siendo generalmente menor el índice en otros grupos étnicos. En 1989 se localizó el gen responsable de la CF en el brazo largo del cromosoma 7. Las mutaciones causan la deficiencia o ausencia de una glicoproteína que atraviesa la membrana, responsable del mantenimiento del canal iónico que permite el flujo hacia fuera de aniones a través de la membrana celular en el epitelio de todo el cuerpo. La proteína es llamada "regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR). Este canal hace a la membrana celular permeable al cloruro y otros aniones orgánicos más grandes tales como el glutatión reducido (GSH). Sin embargo, a pesar de este conocimiento, en la CF hay un vínculo perdido entre la genética y la patología resultante.

El gen CFTR se encuentra en las células epiteliales de los tractos respiratorio, intestinal, hepatobiliar y reproductor. También se encuentra en glándulas exocrinas tales como las glándulas serosas del pulmón y del páncreas. La ausencia o disfunción de la proteína CFTR da lugar a secreciones mucosas espesas y viscosas en los senos, los pulmones, los canalículos biliares, los intestinos y el epidídimo, dando lugar a bronquiectasia, enfermedad hepática crónica, obstrucciones biliares e intestinales, infertilidad, insuficiencia pancreática y diabetes.

Las características patológicas esenciales de la CF pueden ser explicadas mediante el bloqueo, por secreciones viscosas, de los canalículos, conductos y pasos en tejidos y órganos cuyos epitelios de revestimiento están afectados por la deficiencia genética. Esto da lugar a una formación progresiva de quistes, una inflamación crónica y una infección que debilita y luego destruye las paredes de los conductos y pasos, como se encuentra típicamente en la bronquiectasia y la fibrosis pulmonar, que son responsables de la mayor amenaza para la vida. No obstante, la investigación actual reconoce la existencia de un vínculo perdido entre la genética, su expresión molecular y la patogénesis de las lesiones en los diferentes tejidos que caracterice a la CF como un trastorno definido.

Cuando se descubrió que el gen de la CF era responsable de la proteína CFTR que controlaba un canal de cloruro, se estableció su papel en el control del volumen y la composición de electrolitos del sudor. De este modo, se supuso

naturalmente que una disfunción similar en el pulmón podría explicar la viscosidad aumentada del moco a través de la hipótesis de una concentración anormal de sal y un bajo volumen de fluido de la superficie de las vías aéreas. Desafortunadamente, la mayoría de la evidencia hasta la fecha indica que el fluido de la superficie de las vías aéreas es isotónico y de volumen normal. Puesto que los electrolitos junto con los coloides son los determinantes esenciales de la distribución de agua en los espacios tisulares, se cayó en la cuenta de que el efecto de la proteína CFTR debe ser responsable de deficiencias distintas a las de electrolitos en el microentorno situado dentro de los conductos y sobre las superficies epiteliales circundantes. Por lo tanto, en una búsqueda continua de un vínculo molecular entre el defecto génico y la patología resultante, se han buscado deficiencias de otros aniones. De entre estos, el glutatión reducido (GSH), un tripéptido ubicuo y uno de los antioxidantes solubles en agua más importantes del cuerpo, ha sido considerado un candidato para el vínculo perdido. El GSH está presente en fluidos epiteliales extracelulares tales como el fluido de la superficie de las vías aéreas, los jugos gastrointestinales, el semen, etcétera. En el medio extracelular, el GSH proporciona una potente protección antioxidante a superficies muy expuestas a especies oxigenadas reactivas, como en las vías aéreas pulmonares, donde su concentración es 140 veces el nivel normal en el plasma sanguíneo. Sin embargo, a pesar de estas acciones del GSH, la mayoría de los trabajadores en este campo son de la opinión de que sólo proporcionan una explicación parcial de la patología resultante.

En conclusión, los trabajadores en investigación reconocen abiertamente que la verdadera naturaleza de la patofisiología de la CF es desconocida y que la investigación debería extenderse a un factor o unos factores perdidos.

No hay un solo procedimiento terapéutico que evite satisfactoriamente la progresión última de las patologías que dan lugar a muerte. El principal esfuerzo en el tratamiento de la CF está dedicado a combatir la bronconeumonía. El objetivo es minimizar el daño tisular facilitando la eliminación bronquial del moco infectado viscoso (fisioterapia torácica, broncodilatadores, mucolíticos) y reduciendo la carga bacteriana (antibióticos).

Aunque la patofisiología no está aún entendida, se admite que el moco viscoso de los pulmones de pacientes con CF es un factor importante en la patogénesis de las lesiones. Se ha caído recientemente en la cuenta de que el DNA, la actina y el alginato procedente de *P. aeruginosa* desempeñan un papel agravante significativo en el espesamiento de las secreciones y exudados en la CF. Por lo tanto, hay una estrategia en curso para investigar el papel de dichas sustancias en las secreciones patológicas en la CF y, basándose en esta premisa, desarrollar por ello agentes para aliviar algunas de las características de la obstrucción de las vías aéreas.

El primer producto para alcanzar el mercado como resultado de esta estrategia es la DNasa humana recombinante (rhDNasa). Está bien establecido que las secreciones infectadas en los pulmones de pacientes con CF contienen tanto como 10% de DNA como resultado de la descomposición continua de bacterias y neutrófilos en los pulmones crónicamente infectados. El DNA extracelular forma cadenas moleculares largas que aumentan la viscoelasticidad de las secreciones. La rhDNasa altera las propiedades físicas de las secreciones de pacientes con CF tanto *in vitro* como *in vivo*. Actualmente, cerca del 50% de los pacientes con CF de EE.UU. reciben rhDNasa, y se ha demostrado que los pacientes tosen menos y tienen esputos menos espesos. Sin embargo, su impacto sobre la función pulmonar es pequeño. Los pacientes jóvenes con enfermedad pulmonar benigna que habían recibido un ciclo de seis meses de rhDNasa sólo obtuvieron un beneficio del 3% en el FEV1, pero disminuyó en un 34% la frecuencia de ciclos de antibióticos intravenosos.

Otro compuesto del que se cree que tiene potencial para disminuir la viscosidad de los esputos es la gelsolina, que descompone la actina filamentosa (actina F) polimérica, otro componente de las secreciones espesas que contribuye de forma importante a su viscosidad. Aunque la actina F polimérica constituye aproximadamente el 10% de los esputos en los pacientes con CF, los estudios clínicos sobre la eficacia de la gelsolina han resultado hasta ahora decepcionantes.

Con respecto a la tolerancia de los pacientes a ambos agentes, estudios han mostrado que la gelsolina y la DNasa pueden activar mediadores inflamatorios tales como la interleucina 8, y pueden explicar el decepcionante impacto de estos compuestos sobre la función pulmonar.

Un nuevo planteamiento más para aclarar la secreción espesada en pacientes con CF es el uso de antibióticos macrólidos en dosis bajas, que interfieren en la capacidad de las bacterias *Pseudomonas* para fabricar alginato, un componente fundamental del revestimiento protector de estas bacterias. Cuando estas bacterias alcanzan una densidad crítica, producen grandes cantidades de alginato, creándose una biopelícula que interfiere en la penetración de los antibióticos y en el acceso de las células inflamatorias agudas a las bacterias y dificulta la eliminación de las secreciones espesadas de las vías aéreas de los pacientes con CF.

Por lo tanto, se han desarrollado individualmente distintos productos con vistas a facilitar la eliminación del moco, el DNA, la actina y el alginato de origen bacteriano de las secreciones muy espesadas de los pacientes con CF, con un éxito sólo relativo.

Una vez sabido que los cuerpos laminares son secretados por células serosas en las vías aéreas y a la luz del hecho de que el solicitante ha mostrado que la secreción de cuerpos laminares en zonas extrapulmonares es

responsable de la lubricación de cavidades serosas por todo el reino animal, se llevó a cabo una investigación *ex vivo* sobre el efecto de los cuerpos laminares sintéticos sobre el moco, el DNA, la actina y el alginato de origen bacteriano. Como se demuestra en esta memoria, los resultados confirmaron que los cuerpos laminares sintéticos disminuyen significativamente la viscosidad del moco, el DNA polimérico, la actina y el alginato en estudios *in vitro*.

Por lo tanto, los cuerpos laminares sintéticos poseen la capacidad, como se muestra *in vitro*, para alterar la viscosidad, la adhesividad y la fluidez de los componentes individuales y combinados de la secreción espesada en pacientes con CF, por contraste con los esfuerzos terapéuticos actuales que han sido dirigidos a formular agentes específicos para cada componente implicado en el proceso patológico.

En consecuencia, el inventor sostiene que se puede tratar la CF por exposición de las secreciones compuestas y patológicamente espesadas a cuerpos laminares sintéticos. Esto se llevará a cabo mediante el restablecimiento de los niveles locales adecuados de cuerpos laminares, suficientes para la disminución de la viscosidad y la adhesividad, mientras se aumenta la fluidez y la eliminación de secreciones patológicas.

Además, el inventor sostiene que, en la CF, un factor esencial en la patogénesis del trastorno es la insuficiencia relativa del sistema de cuerpos laminares para secretar volúmenes adecuados de microcuerpos fosfolipídicos que equilibren las propiedades físicas del moco y los residuos patológicos producidos por una inflamación local concomitante (DNA, actina y alginato). De esta manera, se alcanza el efecto terapéutico mediante la aplicación intermitente regular de cuerpos laminares a los sistemas y superficies de conductos afectados, donde los microcuerpos lubricantes, como ha sido demostrado *in vitro*, penetran con facilidad en los intersticios de la estructura de tipo gel de las secreciones espesadas.

Otros estados morbosos

Hay un número de estados morbosos distintos en que macromoléculas lineales son fundamentales para la patogénesis y progresión del estado de un modo explicado con detalle en la fibrosis quística, donde se podrían utilizar cuerpos laminares o una composición de cuerpos laminares para lograr un efecto beneficioso. Estos estados incluyen trastornos respiratorios tales como bronquitis y bronquitis crónica, asma, bronquiectasia y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Además, trastornos que afectan a los tractos gastrointestinal, hepatobiliar, pancreático y reproductor están sometidos a secreciones espesadas inducidas por el organismo y procesos autoinmunes. Una diversidad de heridas que afectan a la piel, tales como quemaduras térmicas y por radiación, úlceras crónicas y lesiones por desolladura con amplia pérdida de epidermis, dermis y piel de espesor completo, comparten una característica patológica común de exudados adhesivos y viscosos. Asimismo, estas situaciones constituyen estados en que se podrían utilizar cuerpos laminares o una composición de cuerpos laminares para lograr un efecto beneficioso.

La piel: Cuerpos laminares en el tratamiento de quemaduras térmicas y por radiación, úlceras crónicas y heridas que acarrean una amplia pérdida de epidermis, dermis y piel de espesor completo.

En lesiones en la piel por quemadura, zonas de pérdida de epidermis y dermis, hasta la piel de espesor completo, presentan una herida en carne viva que está típicamente cubierta por exudados viscosos y muy adhesivos que consisten en DNA y actina liberados de los núcleos de células epidérmicas y dérmicas muertas procedentes del huésped, leucocitos y células de pus, junto con DNA y actina liberados por bacterias colonizadoras muertas. En muchos casos, la viscosidad y la adhesividad de los exudados resultan más aumentadas con el inicio de una infección significativa por organismos que secretan alginato, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, una infección frecuente y molesta en lesiones por quemaduras.

Las propiedades viscosas y adhesivas de los exudados de quemaduras dan lugar a varios efectos patológicos esenciales que comprometen gravemente la cicatrización de las heridas. El efecto más nocivo de los exudados es su tenaz adherencia a los vendajes de todos los tipos y texturas para heridas. Cada vez que se retiran los vendajes la superficie de la herida resulta traumatizada, lo que da lugar al vertimiento de fibrina fresca. Esta agresión no sólo causa un dolor extremo al paciente sino que también, regularmente repetida, crea capas estratificadas de fibrina densa que retrasan gravemente el proceso de cicatrización y son patogenéticamente responsables de la sobreproducción de colágeno y de la escarificación y la deformidad consiguientes.

El exudado viscoso y adhesivo de las quemaduras también impide y restringe el acceso y movimiento de células esenciales para la supresión de restos, la fagocitosis de bacterias y células implicadas en la reparación y la reepitelización estructurales.

Los exudados viscosos, DNA y actina, proporcionan zonas de refugio que promueven la infección, mientras que la colonización por organismos que secretan activamente biopelículas (alginato) aumentan luego más el efecto patológico de la viscosidad y la adhesividad. Este proceso secuencial protege progresivamente a los organismos colonizadores del ataque por células fagocíticas y restringe gravemente la penetración de antibióticos en el exudado constantemente espesativo.

Se debería advertir que los cuerpos laminares son normalmente producidos en la piel humana por los queratinocitos. Hemos mostrado que, en cultivo celular, los queratinocitos humanos inmaduros en replicación secretan

enérgicamente cuerpos laminares. Aunque la comunidad científica no ha considerado aún el papel de los cuerpos laminares en la promoción de la cicatrización de heridas, nuestra detección de su presencia en las heridas cutáneas y peritoneales por microscopía electrónica indica claramente la idoneidad de la administración tópica de cuerpos laminares a las heridas, particularmente en quemaduras, donde la presencia patológica de macromoléculas lineales viscosas y adhesivas compromete gravemente la cicatrización y la reparación.

Úlceras cutáneas crónicas

En la piel se encuentra una gran variedad de úlceras crónicas. Esto ocurre muy comúnmente en el miembro inferior y el pie, particularmente en la diabetes mellitus, estasis venosa y enfermedad vascular periférica. Como con las lesiones por quemaduras, los exudados viscosos y adhesivos que consisten en DNA, actina y alginatos de origen bacteriano, cuando están presentes como una película sobre la superficie de la base de la úlcera, pueden deteriorar gravemente la cicatrización de las heridas. Éste es un factor importante en el mantenimiento de la cronicidad en úlceras de este tipo. Como en el tratamiento estándar de quemaduras, la adhesión de los vendajes oclusivos a la base de la úlcera da lugar a un microtrauma continuo en la delicada membrana cada vez que se retiran. Por lo tanto, este proceso causa la exudación episódica repetida de fibrina fresca sobre la base de la úlcera. Puesto que la fibrina es el principal estímulo para la producción de tejido de granulación, los episodios frecuentes de exudación de fibrina crean un estado permanente de reparación de heridas de fase temprana en la base de la úlcera, lo que bloquea eficazmente el progreso natural hacia la resolución y la reepitelización.

Formación de heridas que implica una amplia denudación de epidermis, dermis y hasta piel de espesor completo (lesión por desolladura)

La pérdida de piel en lesiones de esta naturaleza crea una forma de herida no distinta de la causada por una quemadura. Asimismo, los vendajes oclusivos se adhieren tenazmente a la diversidad de moléculas viscosas presentes en el exudado de la superficie. El desprendimiento frecuente o diario de vendas oclusivas provoca la exudación episódica de fibrina, lo que da lugar a secuelas patológicas similares a las encontradas en quemaduras y úlceras crónicas.

Métodos de aplicación terapéutica

Los métodos siguientes son aplicables a diversos tipos de heridas, quemaduras, úlceras crónicas y lesiones por desolladura. Se pulveriza una suspensión de cuerpos laminares o una composición de cuerpos laminares sobre las heridas antes de que se apliquen los vendajes. Preferiblemente, los vendajes deberían tener microperforaciones de un diámetro suficiente para permitir el paso de cuerpos laminares a través de ellos hasta la herida subyacente. Asimismo, la densidad de los poros por unidad de área deberá ser apropiada para un suministro adecuado de cuerpos laminares a la interfase subyacente entre el vendaje y la herida cuando se pulveriza una suspensión de cuerpos laminares sobre la superficie externa del vendaje. Las perforaciones de los vendajes deberían tener preferiblemente una densidad que no comprometiera las propiedades oclusivas del vendaje con respecto al acceso de bacterias. En un intervalo de tiempo apropiado antes de su retirada, dependiente de la velocidad de suministro de cuerpos laminares a la superficie de la herida, se pulverizará sobre el vendaje una suspensión de cuerpos laminares que atraviesa las perforaciones hasta el espacio entre el vendaje y la superficie de la herida.

Vendajes que llevan cuerpos laminares incorporados

Otro método de aplicación es la provisión de vendajes que llevan incorporados cuerpos laminares que son liberados gradualmente desde la superficie inferior del vendaje sobre la superficie de la herida. Esto se puede llevar a cabo mediante su contención en una envoltura delgada dentro del vendaje, que actúa como un depósito para la liberación lenta de cuerpos laminares a través de perforaciones microscópicas al incorporar una membrana porosa sobre la superficie interna.

También se pueden incorporar cuerpos laminares a un vendaje cuya superficie inferior está revestida con una matriz o un gel de los cuales se liberan aquellos. Los geles biocompatibles incluirían hialuronano y/o sulfato de condroitina. Estos geles son de menor viscosidad en comparación con los exudados patológicos presentes en las heridas contra las cuales se dirigen los cuerpos laminares, y la presencia de cuerpos laminares conferiría una superficie fluida y antiadherente a la interfase entre la herida y el vendaje.

Uso de cuerpos laminares en trastornos de las membranas mucosas (mucositis)

La inflamación de superficies mucosas, particularmente aquellas próximas a las aberturas corporales (cavidad bucal, orofaringe, laringe, tractos genitourinarios masculino y femenino, y canal anal), implica inflamación, erosión y ulceración dolorosas. Un término genérico, mucositis, significa una aflicción no poco común causada por un amplio espectro de factores etiológicos que van desde radiación, agentes quimioterapéuticos, fármacos y autoinmunidad hasta alergias e infecciones. Un rasgo característico de estos estados es la sequedad de las superficies que llegan a cubrirse de exudados pegajosos que consisten en moco viscoso, DNA viscoso y actina de bacterias y células muertas. En casos extremos, las superficies opuestas se adhieren entre sí para formar sinequias, como en la orofaringe, el prepucio, los labios vulvares y la vagina. El acto de tragar o ligeros movimientos que afectan a las superficies son muy dolorosos. La separación de las superficies opuestas causa microtraumas repetidos a la

membrana mucosa hasta el punto de promover la ulceración y evitar la curación. Los trastornos dermatológicos específicos que dan lugar a estos problemas incluyen el síndrome de Stevens-Johnson, el pénfigo, la enfermedad de Behcet, el lupus sistémico eritematoso y otros trastornos vesiculares. Una suspensión de cuerpos laminares en disolución salina fisiológica aplicada mediante pulverización regular sobre las zonas afectadas, o la aplicación de geles o matrices que contienen cuerpos laminares, restablecerán la lubricidad y las propiedades antiadherentes de las superficies secas y adherentes. La aplicación de cuerpos laminares a superficies mucosas afectadas disminuirá la viscosidad de las secreciones y exudados patológicos, solubilizará las encostraduras y evitará la formación de sinequias.

Uso de cuerpos laminares en estados inflamatorios del ojo

Se encuentran cuerpos laminares en las lágrimas. Hemos mostrado por inmunocitoquímica usando anticuerpos monoclonales que los epitelios lacrimales se tiñen positivamente para la proteína A tensioactiva. Esto indica que la secreción de cuerpos laminares es una función constitutiva de las glándulas lacrimales en el hombre. La membrana mucosa de los párpados y las conjuntivas están normalmente humedecidas por un fluido tenue. En estados patológicos, las superficies externas del ojo pueden llegar a secarse y/o cubrirse de secreciones o exudados viscosos espesados. Estos exudados pueden formar costras cuyo efecto abrasivo excoria y traumatiza más las superficies inflamadas. Una gran variedad de trastornos da lugar a lesiones de esta naturaleza. En los trastornos autoinmunes comunes, el síndrome reumatoide y de Sjögren, una sequedad irritante de los ojos llamada queratoconjuntivitis seca es un caso frecuente. Una gran variedad de otros trastornos, trastornos inflamatorios debidos a una infección vírica o bacteriana, alergias y reacciones negativas a fármacos dan lugar a blefaritis y conjuntivitis con secreciones y exudados viscosos concomitantes. La administración regular de suspensiones de cuerpos laminares como gotas oculares sería una estrategia terapéutica apropiada cuya utilidad y biocompatibilidad se atribuirían al efecto restaurativo de las lágrimas naturales. Los cuerpos laminares pueden ser también aplicados en forma de geles, matrices o dispositivos o excipientes de liberación lenta.

Producción de cuerpos laminares sintéticos

El foco de la presente invención es el uso terapéutico de cuerpos laminares. La información siguiente proporciona detalles de su producción y de las características clave y la composición, que les caracteriza como un nuevo microcuerpo. A diferencia de los liposomas, cuya invención no se basó desde el principio en un concepto de algún modo relacionado con un microcuerpo de origen natural, los cuerpos laminares sintéticos se diseñan para remedar una variedad de actividades biológicas atribuidas a cuerpos laminares de origen natural en tejidos y cavidades corporales. Las principales características diferenciadoras de los cuerpos laminares de origen natural son:

1) Tras el contacto, los cuerpos laminares se dividen fácilmente y se fusionan enseguida entre sí en las cavidades y tejidos del cuerpo cuando son sometidos a movimiento y esfuerzo cortante.

2) La provisión de lubricidad.

3) La adsorción superficial automática de residuos moleculares planctónicos que surgen de procesos inflamatorios, etc.

4) La endocitosis no mediada por receptores automática de cuerpos laminares por el sistema de monocitos/fagocitos (y muy especialmente por células presentadoras de antígeno, células dendríticas y macrófagos).

Estas propiedades son crucialmente dependientes de la naturaleza de la mezcla de las diferentes especies de fosfolípidos (fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol), y la naturaleza de sus cadenas de ácido graso, cuya heterogeneidad, longitud y grado de saturación e insaturación conducen a la fluidez laminar, es de importancia clave para su sorprendente variedad de actividades biológicas.

A diferencia de los cuerpos laminares, los liposomas no deben dividirse ni fusionarse bajo ningún concepto. Esto se alcanza por su diferente composición, que les confiere una rigidez necesaria por medio de elevadas proporciones de colesterol y el uso de fosfolípidos más rígidos que conjuntamente reducen mucho la fluidez de la membrana. Los liposomas no se diseñan para conferir lubricidad. La composición de los liposomas no se escoge para conferir propiedades de adsorción a superficies, una característica que sería totalmente incompatible con las utilizaciones liposómicas. Los liposomas no son específicamente diseñados para ser fagocitados por el sistema de monocitos/fagocitos, lo que excluiría cualquier forma de suministro farmacológico dirigido a órganos que ha sido su uso primordial relativamente insatisfactorio. De aquí el desarrollo de liposomas sigilosos en un intento de obviar la inherente paradoja biológicamente incompatible en la actual formulación de liposomas.

Los principales componentes fosfolipídicos de los cuerpos laminares son la fosfatidilcolina (PC), la esfingomielina (SPH), la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilserina (PS), el fosfatidilinositol (PI) y la lisolecitina (LPC). La composición de fosfolípidos de los cuerpos laminares muestra una ligera variación de acuerdo con la célula de origen.

La PC es el principal fosfolípido de los cuerpos laminares, independientemente del sitio de origen. La concentración

porcentual de PC varía de aproximadamente el 70% en los lavados pulmonares al 45% en el fluido sinovial (Refs). El siguiente fosfolípido en el orden de concentraciones es la SPH (15-23%). Luego están presentes PE, PS, PI, PG y LPC en concentraciones porcentuales variables de un solo dígito en los cuerpos laminares de acuerdo con el sitio de origen.

La composición preferida de fosfolípidos y colesterol para los microcuerpos multilaminares fosfolipídicos comprende: PC al 54%, SPH al 19%, PE al 8%, PS al 4%, PI al 3% y colesterol al 10%. Estos valores son valores medianos y se ha hallado el intervalo siguiente de composiciones en los cuerpos laminares naturales (investigación privada): PC al 44-70%, SPH al 15-23%, PE al 6-10%, PS al 2-6%, PI al 2-4% y colesterol al 4-12%. Estas cifras son porcentajes en peso.

También se puede incorporar LPC a los microcuerpos multilaminares en un 2% en peso, lo que se corresponde con el intervalo hallado en los cuerpos laminares naturales de 0-3%.

Los liposomas son preparados por los expertos en la técnica con elevadas concentraciones de colesterol para mejorar su rigidez. Los liposomas que contienen colesterol al 20% o menos serían considerados de escaso colesterol. De este modo, los liposomas que llevan incorporada una elevada proporción (50%) de colesterol, que es equimolar con la de los fosfolípidos, tienen una estructura muy estable y son el concepto esencial para la creación de liposomas. Hasta esta invención, que nosotros sepamos no ha sido obvio el intentar utilizar microcuerpos multilaminares de bajo colesterol ya que el último descubrimiento de cuerpos laminares como un fenómeno biológico ubicuo permanece desconocido y no es citado por nadie que trabaje en el campo de los liposomas. Se ha hallado que el contenido de colesterol de los cuerpos laminares procedentes de alveolos pulmonares contiene aproximadamente 10% de colesterol.

La presencia de esfingomielina en los cuerpos laminares naturales y en los cuerpos laminares sintéticos reivindicados en la presente invención es importante. La esfingomielina no se emplea generalmente en los liposomas y sirve para proporcionar flexibilidad y suavidad a los cuerpos laminares. La tecnología convencional de liposomas enseña que la rigidez es preceptiva para el suministro de productos químicos; sin embargo, hemos hallado que los cuerpos laminares sintéticos de bajo colesterol y flexibles que contienen esfingomielina son ideales para el suministro de antígenos a células presentadoras de antígeno y, como ha sido demostrado por una enérgica endocitosis, no mediada por receptores, de cuerpos laminares sintéticos por células dendríticas, han sido descritos por vez primera por el inventor.

Los microcuerpos multilaminares fosfolipídicos (cuerpos laminares sintéticos) se preparan mediante una técnica similar a la empleada para producir vesículas multilaminares sacudidas a mano. La mezcla de fosfolípidos, junto con colesterol en los porcentajes proporcionados en peso, se disuelve en una mezcla disolvente de cloroformo/metanol (2:1, volumen/volumen). La disolución lipídica se introduce en un matraz de fondo redondo que se fija a un rotavapor. Se hace el vacío en el matraz y se hace girar éste a 60 rpm en un baño de agua termostáticamente controlado a una temperatura de 30 °C hasta que se deposita una película lipídica seca. Se introducen nitrógeno en el matraz y se elimina el disolvente residual antes de la conexión del matraz a un liofilizador, donde es sometido a un elevado vacío a temperatura ambiental durante una hora. Tras la eliminación del vacío y el siguiente llenado con nitrógeno, se añade disolución salina que contiene solutos (antígeno seleccionado) para su inclusión. El lípido es hidratado dentro del matraz y éste es llenado de nitrógeno, fijado al rotavapor y hecho girar a 60 rpm y temperatura ambiental durante 30 minutos. La suspensión es dejada reposar durante dos horas a temperatura ambiental para completar el proceso de hinchamiento.

Se debería advertir que las realizaciones anteriormente descritas son meramente ejemplares de la invención, que puede ser materializado de muchas formas diferentes. Por lo tanto, los detalles descritos en esta memoria no han de ser interpretados como restrictivos sino meramente como una base para las Reivindicaciones y para enseñar a un experto en la técnica los diversos usos de la presente invención de cualquier forma apropiada.

Composiciones farmacéuticas y métodos de suministro

Otro aspecto de la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cuerpos laminares purificados para la modificación de macromoléculas lineales. Estos cuerpos laminares pueden ser sintéticos o de origen natural y pueden actuar como cuerpos laminares sustitutos en cavidades, vasos sanguíneos, conductos, senos y tejidos del cuerpo para modificar la viscosidad del moco con fines terapéuticos.

Una realización presenta el tratamiento de una gran variedad de enfermedades y estados con composiciones farmacéuticas que contienen cuerpos o microcuerpos laminares sintéticos o de origen natural y vehículos y excipientes aceptables. Además, otra realización puede incluir una composición farmacéutica diseñada para uso en el tratamiento local de estados que tienen una preponderancia de secreciones mucosas espesas. Otra realización puede incluir una composición farmacéutica diseñada para uso sistémico solo o con otras modalidades de tratamiento estándares conocidas por los expertos en la técnica.

Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica se puede presentar en formas de

dosificación unitarias para facilitar una dosificación precisa. La expresión "formas de dosificación unitarias" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el deseado efecto terapéutico, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. Las formas de dosificación unitarias típicas incluyen ampollas o jeringas precargadas y premedidas de las composiciones líquidas, o píldoras, tabletas, cápsulas o similares en el caso de composiciones sólidas. La unidad puede ser, por ejemplo, un vial de un solo uso, una jeringa precargada, un único parche transdérmico y similares. La forma de dosificación unitaria puede estar en envases de dosis unitaria o de unidad de uso. Como es sabido por los expertos en la técnica, un envase de dosis unitaria es una unidad conveniente lista para el paciente. "Una forma de dosificación unitaria sería una suspensión de 5 ml de cuerpos laminares en que habría 54 mg de fosfatidilcolina, 19 mg de esfingomielina, 8 mg de fosfatidiletanolamina, 4 mg de fosfatidilserina, 3 mg de fosfatidilinositol y 10 mg de colesterol". En una realización particular, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por un organismo regulador de un gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, agente adyuvante o excipiente con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Un tampón acuoso isotónico estéril es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. También se pueden emplear disoluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada secada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Si se desea, la composición puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsivos o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tener la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación ininterrumpida y similares. La composición puede ser formulada como un supositorio, con agentes aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Una formulación oral puede incluir vehículos estándares tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. En "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo con objeto de proporcionar la forma para la administración apropiada al sujeto. La formulación debería ajustarse al modo de administración.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada a la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en un tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran separadamente o se mezclan juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede ser suministrada con una botella de infusión que contiene agua o disolución salina estériles de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o disolución salina para que los ingredientes puedan ser mezclados antes de la administración.

La cantidad del compuesto de la invención que será eficaz en el tratamiento de los estados descritos en esta memoria puede ser determinada mediante técnicas clínicas estándares basadas en la presente descripción. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis concreta que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debería ser decidida según el juicio del facultativo y las circunstancias de cada sujeto. Sin embargo, en general, los intervalos de dosificación adecuados para administración intravenosa son aproximadamente 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. En general, los intervalos de dosificación adecuados para administración intranasal son de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis eficaces pueden ser extrapoladas de curvas de dosis-respuesta procedentes de sistemas de ensayo *in vitro* o con modelos animales.

La invención también proporciona un conjunto o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociada con dicho(s) recipiente(s) puede haber una nota en la forma prescrita por un organismo gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, nota que refleja (a) la aprobación del organismo para la fabricación, el uso o la venta para administración a seres humanos, (b) las instrucciones de uso, o ambas cosas.

En una realización específica, puede ser deseable administrar localmente las composiciones farmacéuticas de la invención a la zona que necesita tratamiento; esto puede ser llevado a cabo, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante una cirugía o por pulverización de la disolución que contiene los cuerpos laminares sobre

el tejido expuesto después de una cirugía, mediante aplicación tópica, mediante inyección, por medio de un catéter o por medio de un implante, implante que es de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras o copolímeros tales como Elvax (véase Ruan et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10.872-10.876). En una realización, la administración puede ser por inyección directa mediante un inhalador de aerosoles.

En aún otra realización, los cuerpos laminares pueden ser suministrados en un sistema de liberación controlada. En una realización se puede emplear una bomba [véanse Langer, *supra*; Sefton (1987), CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201; Buchwald et al. (1980), Surgery 88: 507; y Saudek et al. (1989), N. Engl. J. Med. 321: 574]. En otra realización se pueden usar materiales poliméricos [véanse Medical Applications of Controlled Release, redactado por Langer y Wise, CRC Press, Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, redactado por Smolen y Ball, Wiley, New York (1984); y Ranger y Peppas (1983), J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61; véanse también Levy et al. (1985), Science 228: 190; During et al. (1989), Ann. Neurol. 25: 351; y Howard et al. (1989), J. Neurosurg. 71: 105]. En aún otra realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana terapéutica, lo que requeriría sólo una fracción de la dosis sistémica [véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release (1984), *supra*, vol. 2, páginas 115-138]. En la revisión de Langer (1990), Science 249: 1527-1533, se discuten otros sistemas de liberación controlada adecuados.

Ejemplos

Ejemplo 1: Investigación *ex vivo* del efecto de cuerpos laminares sintéticos sobre geles de moco, DNA, actina y alginato y sobre cera de los oídos

Se han llevado a cabo ensayos básicos a escala de laboratorio sobre el efecto sobre las propiedades físicas de las macromoléculas lineales del tipo implicado en la patofisiología de las secreciones y exudados cuando se mezclan con microcuerpos fosfolipídicos (cuerpos laminares sintéticos).

Materiales

Los materiales examinados se escogieron conociendo el probable estado molecular de los polímeros de origen natural en estados fisiológicos y patológicos. Sin embargo, la variedad de materiales comercialmente asequibles para la selección estaba restringida. No obstante, nuestra experiencia acumulada en este campo apuntó a que el principal objetivo de los experimentos sobre estos polímeros que forman geles se centrara en demostrar una interacción de especies moleculares entre microcuerpos y polímeros. A este respecto, una premisa básica de los experimentos fue que los comportamientos de los geles eran previsiblemente similares a causa de una estructura tridimensional compartida de esta clase de sustancias. De esta manera, la selección de las preparaciones de moco, DNA, actina y alginato se ajustó al probable estado físico de los polímeros *in vivo*.

La preparación de los geles, su intervalo de concentraciones y la hidratación se calcularon para remedar lo más estrechamente posible el supuesto intervalo que abarca las condiciones normales y patológicas en los seres humanos.

Características del moco experimental examinado

El moco examinado procedía de glándulas submaxilares bovinas, como es suministrado por Sigma (A70030). Éste es uno de los pocos productos comercialmente asequibles cuya composición está caracterizada. Este agente particular ha sido ensayado y examinado en la investigación de las características físicas del estado de gel del moco en la investigación sobre su viscosidad en trastornos respiratorios inflamatorios, incluyendo la CF.

En las secreciones normales, por ejemplo, el fluido de la superficie del tracto respiratorio superior, el moco está presente en bajas concentraciones de entre 0,5% y 1% en peso. El 99% de las secreciones consisten en agua que contiene electrolitos. El moco tiene una cadena principal polipeptídica extendida (apomucina) con numerosas cadenas laterales de oligosacárido. Cubierto por abundantes cargas polianiónicas, el moco, tras la liberación exocitótica de las células caliciformes, llega a hidratarse en gran medida. El moco forma entonces un gel cuya estructura tridimensional comprende una red enmarañada de polímeros lineales de mucina, desprovista de puentes cruzados intermoleculares. En ciertas situaciones de hipersecreción e inflamación, la concentración de mucina puede ascender a 3%-5% en peso.

El moco presenta una baja solubilidad. En el ensayo de laboratorio sobre las propiedades físicas del moco submaxilar bovino, fueron posibles disoluciones con una concentración de hasta 5% usando disolución salina. Para el ensayo con cuerpos laminares se emplearon concentraciones de 2,5% y 3,5% para remedar las encontradas en situaciones patológicas. Se utilizó disolución salina (0,9%) como diluyente para todas las muestras mucosas examinadas.

Los monómeros de mucina se polimerizan a través de enlaces disulfuro de extremo a extremo para formar polímeros lineales que tienen una longitud de al menos 30 µm en el moco respiratorio. Estas dimensiones deberían ser consideradas en el contexto del tamaño de los cuerpos laminares, que varía entre 0,5 µm y 2,0 µm. Por lo tanto, los

cuerpos laminares tienen una dimensión que les permite atravesar fácilmente una red enmarañada de "fibras" mucosas, como se observa por microscopía óptica.

Características del DNA experimental examinado

El DNA escogido era de forma polimérica y procedía de testículos de salmón (Sigma D1626). Como en el caso del moco, la preparación de DNA seleccionada consiste en polímeros lineales que forman un gel "fibroso" enmarañado. Es poco soluble en agua, y en concentraciones por encima de 5% en peso produce un gel muy rígido. En los ensayos llevados a cabo con cuerpos laminares se emplearon regularmente concentraciones de 1% y el disolvente utilizado fue siempre disolución salina al 0,9%. Esta concentración de 1% fue seleccionada por ser probablemente representativa del DNA procedente de leucocitos (células de pus) y del organismo, presente en las secreciones patológicas espesas en varios trastornos que van de la CF a la otitis media crónica.

Una disolución de DNA polimérico al 1% en disolución salina fisiológica es un líquido claro parecido al jarabe cuyo estado de gel posee una viscosidad y una adhesividad elevadas.

Características de los geles experimentales de moco y DNA combinados

Se prepararon separadamente disoluciones de moco al 2,5% en disolución salina al 0,9% y de DNA al 1% en disolución salina al 0,9%. Luego fueron cuidadosamente mezcladas y agitadas, evitándose la creación de burbujas. Los geles se mezclaron bien sin que se produjeran cambios de turbiedad. Es digno de atención que, en estudios publicados, muestras de moco respiratorio infectado, viscoso y espeso de pacientes, cuando se teñían para DNA y moco, mostraban, en preparaciones en estado húmedo examinadas por microscopía confocal, que los diferentes polímeros estaban íntimamente mezclados en la estructura tridimensional del gel. Por lo tanto, estábamos seguros de que las muestras de gel de moco y DNA combinados preparadas para el ensayo con cuerpos laminares eran muy probablemente representativas de efusiones viscosas en situaciones patológicas en una diversidad de trastornos *in vivo* que van de la CF a la otitis media crónica.

Características de los cuerpos laminares sintéticos

Los cuerpos laminares examinados fueron producidos mediante el mezclamiento de dos disolventes orgánicos que contenían los componentes de fosfolípidos y colesterol. Basándose en el análisis de cuerpos laminares producidos por células mesoteliales humanas, se emplean seis componentes (cinco fosfolípidos y colesterol) para preparar microcuerpos que consisten en bicapas fosfolipídicas densamente empaquetadas con una geometría y una periodicidad (distancia entre bicapas) ultraestructurales confirmadas por microscopía electrónica como idénticas a las de los cuerpos laminares de origen natural. El intervalo de tamaños de los cuerpos laminares sintéticos (0,2 – 3,5 µm) era muy similar al hallado en tejidos y cavidades corporales del hombre.

Los cuerpos laminares se preparan en una disolución salina fisiológica hasta una disolución estándar que contiene 10×10^9 microcuerpos por mililitro. Las estimaciones de densidad de cuerpos laminares se comprueban mediante métodos de comparación de turbiedades, mientras que la distribución de tamaños se obtiene usando citometría de flujo.

Métodos

Considerando la generalizada presencia de moco por todo el cuerpo, la bibliografía sobre trabajo experimental sobre su biología molecular es sorprendentemente escasa. En la bibliografía actual sobre la patogénesis de la fibrosis quística se admite la ignorancia de los mecanismos patogenéticos básicos relativos al moco en diferentes trastornos. Los que trabajan en este campo están de acuerdo en que la investigación de las propiedades viscoelásticas de los fluidos y geles biológicos plantea muchas dificultades técnicas e instrumentales.

Se ha desarrollado exclusivamente con fines industriales una viscosimetría aplicada, y todos los instrumentos se diseñan para grandes volúmenes de fluido. Los polímeros biológicos puros son muy caros, y la medición llevada a cabo sobre múltiples muestras, donde los volúmenes mínimos de ensayo por muestra en los instrumentos disponibles son 10-20 ml, puede ser prohibitiva.

En los viscosímetros industriales estándares se emplean técnicas mecánicas, induciendo cizalladuras, causando la alineación de los polímeros lineales y desenmarañando así el gel. Por lo tanto, la medición llevada a cabo sobre geles biológicos en viscosímetros estándares (por ejemplo, disco giratorio y cono) puede alterar significativamente la viscosidad de la muestra durante el ensayo. Por otro lado, la reología de fluidos biológicos ha evolucionado usando instrumentos para la investigación de la sangre, que es un fluido no newtoniano. Asimismo, la viscosidad del plasma es muy dependiente de proteínas globulares, no lineales, como la albúmina a 45 g/l y la globulina a 35 g/l. Sólo una compañía (recientemente disuelta) ha diseñado instrumentos para la medición de la viscosidad en fluidos biológicos.

Para obviar las dificultades en el empleo de instrumentos no modificados para examinar la viscosidad en muestras biológicas, se llevó a cabo una serie de estudios piloto empleando dispositivos sencillos para identificar el método más adecuado para obtener mediciones fiables de cambio de viscosidad en geles mezclados en disolución salina con y sin cuerpos laminares añadidos.

Se desarrolló un método que permitía medir la distancia recorrida en unidad de tiempo por volúmenes fijos de muestras de ensayo y testigo al descender por una pendiente fija bajo gravedad (técnica de Galileo), donde la densidad y el contenido de agua de las muestras eran comparables y la superficie escogida era de composición, textura superficial y carga homogéneas. La pendiente más apropiada examinada fue la superficie de una placa Petri de plástico.

Todo el material de laboratorio empleado (es decir, recipientes, pipetas, etc.) era de plástico que no contenía plastificantes del tipo DEHP ya que los cuerpos laminares se filtran y son alterados por este plastificante.

Los geles se prepararon al momento hasta las concentraciones apropiadas con un mezclamiento adecuado y cuidadoso, asegurando la solubilización e hidratación completas de los polímeros.

Luego se añadió un volumen medido de disolución salina al 0,9% que contenía cuerpos laminares a las muestras de ensayo y sólo se añadió un volumen idéntico de disolución salina al 0,9% a las muestras testigo. Después de un mezclamiento cuidadoso pero completo, se incubaron las muestras a 37 °C durante 1 hora.

Después de la incubación y otro mezclamiento cuidadoso, se pipetearon con precisión gotitas (que variaban de 30 µl a 100 µl) sobre una línea de salida marcada en la parte posterior de la placa Petri, que también tenía una línea de "llegada" paralela dibujada a una distancia de 5 cm. Cuando la placa Petri hubo sido elevada con un ángulo de 90°, se puso en marcha un cronómetro electrónico que se empleó para registrar por observación el tiempo que le llevaba a la gotita bajar hasta la marca de 5 cm.

Resultados

En las tablas de las Figuras 1-3 se resumen los elementos clave de los hallazgos.

Efecto de concentraciones variables de cuerpos laminares sobre geles de moco

El experimento más representativo de las alteraciones observadas en la viscosidad del moco fue el ilustrado en la Tabla 1, en que moco al 3,5% en disolución salina fue diluido secuencialmente con volúmenes crecientes de disolución salina al 0,9% (testigos) y disolución salina al 0,9% que contenía 10 x 10^9 cuerpos laminares. Las relaciones de gel a diluyente examinadas tanto para las muestras de ensayo como para las muestras testigo fueron 19:1, 9:1, 8:2, 7:3 y 6:4.

No se observó movimiento alguno en ninguna de las muestras en que el diluyente mezclado con el gel de moco era sólo disolución salina fisiológica; por contraste, en las muestras de ensayo en que el diluyente de disolución salina contenía cuerpos laminares, incluso en una relación de 19:1 hubo un movimiento significativo de la disolución hacia abajo del plano inclinado. Más adelante, la velocidad de recorrido aumentó abruptamente y, en la relación de nueve partes de moco a una parte de disolución de cuerpos laminares, el fluido recorrió cinco centímetros en seis segundos. En la relación de siete partes a tres, se alcanzó una velocidad máxima de recorrido de cinco centímetros por segundo. En estas concentraciones los ensayos demostraron diferencias muy significativas en el comportamiento entre los geles de moco mezclados con volúmenes equivalentes de disolución salina sola y las muestras de ensayo en que la disolución salina contenía cuerpos laminares. Estos resultados obtenidos dentro de los intervalos y concentraciones indicados demuestran que la presencia de los microcuerpos fosfolipídicos confiere una notable lubricidad al gel, independientemente del contenido de fluido del diluyente.

Efecto de concentraciones variables de cuerpos laminares sobre geles de DNA

El experimento más representativo de las alteraciones observadas en la viscosidad del DNA fue el ilustrado en la Tabla 2, uno en que DNA al 1% en disolución salina era secuencialmente diluido con volúmenes crecientes de disolución salina al 0,9% (testigos) y disolución salina al 0,9% que contenía 10 x 10^9 cuerpos laminares. Las relaciones de gel a diluyente examinadas tanto para las muestras de ensayo como para las muestras testigo fueron 19:1, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 y 5:5. Se observó un movimiento mínimo tanto en las muestras de ensayo como en las muestras testigo en las diluciones desde 19:1 hasta 8:2. Más adelante, las muestras de ensayo en que el diluyente contenía cuerpos laminares en relaciones de 7:3, 6:4 y 5:5 presentaron un aumento brusco de la velocidad de recorrido hasta 2,5 cm por segundo, en comparación con los testigos en que la velocidad máxima fue 5 cm en 4 minutos y 20 segundos.

Efecto de concentraciones variables de cuerpos laminares sobre geles de DNA y moco combinados

El experimento más representativo de las alteraciones observadas en la viscosidad de los geles de DNA y moco combinados fue el ilustrado en la Tabla 3. El gel combinado consistía en 333 µl de moco al 2,5% en disolución salina al 0,9%, junto con 333 µl de DNA al 1% en disolución salina al 0,9%. En la muestra testigo se añadieron 333 µl de disolución salina al 0,9% como diluyente, mientras que en la muestra de ensayo se añadieron 333 µl de disolución salina que contenía 10 x 10^9 cuerpos laminares al gel combinado. No se obtuvo movimiento alguno en la muestra testigo, mientras que la muestra de ensayo que contenía cuerpos laminares recorrió 5 cm en 2 segundos a una velocidad de 2,5 cm por segundo. Por lo tanto, en la relación de un tercio de diluyente que contenía cuerpos laminares añadido a dos tercios de gel de moco y DNA combinados, hubo un contraste completo entre la fluidez de

la muestra testigo y la de la muestra de ensayo.

Geles de alginato y actina

Los resultados hallados en el análisis del efecto de los cuerpos laminares sobre geles de alginato y actina fueron en general similares a los hallados en el análisis sobre moco y DNA. Los agentes examinados fueron actina G porcina de origen muscular (Sigma A0541), preparada como una disolución al 0,5% en disolución salina al 0,9%. Se preparó ácido algínico, un poli(ácido urónico) compuesto esencialmente de restos de ácido anhidro-beta-D-manurónico con enlace 1-4 (Sigma A70030), como una disolución al 2,5% en disolución salina al 0,9%. Las observaciones por microscopía óptica mostraron un mezclamiento íntimo de los cuerpos laminares entre las "fibras" de los geles.

Efecto de los cuerpos laminares sobre tapones de moco que bloquean los tubos de timpanostomía (tubos de ventilación)

Se llevaron a cabo experimentos de laboratorio *in vitro* en que se llenaron tubos de ventilación con gel de moco al 5% y se dejó secar éste durante la noche. Los tubos se insertaron en la cánula de una jeringa especialmente elegida de 2 ml de capacidad cuyo perfil cónico se ajustaba exactamente al diámetro externo del tubo de ventilación, para conseguir una oclusión completa. Se pipetearon 0,5 ml de suspensión de cuerpos laminares en el tubo de la jeringa y se observó su efecto. Los tubos de ventilación se desatascaron a temperatura ambiental en un periodo que variaba de 30 a 60 minutos. Los testigos de disolución salina no ejercieron efecto alguno después de 6 horas.

Efecto de los cuerpos laminares sobre cera de los oídos

La cera de los oídos humana es una mezcla de sustancias. Los dos componentes principales son células escamosas descamadas y cerumen. El epitelio escamoso que reviste el canal auditivo externo ocupa una posición inusual para la piel. Por el resto del cuerpo la epidermis se renueva mediante una pérdida constante de células y queratina superficiales por abrasión. La pérdida por abrasión no es posible en el canal auditivo. Para superar esta dificultad, el epitelio superficial continuamente migra centrífugamente desde el tímpano hacia fuera. El cerumen es una sustancia cérea secretada por glándulas sudoríparas modificadas. Éstas están situadas en el tejido subepidérmico, desde donde descargan su secreción a través de conductos sobre la superficie del canal auditivo externo.

Hemos llevado a cabo ensayos en el laboratorio sobre el efecto de los cuerpos laminares sobre muestras de cera obtenidas de pacientes y hemos mostrado que la cera se desintegra a lo largo de un periodo que varía de 12 a 24 horas. Observaciones microscópicas del proceso muestran la penetración de los cuerpos laminares entre las placas de escamas, lubricando y separando las capas adhesivas de células muertas, lo que conduce a la desintegración de la cera.

Conclusiones

El mezclamiento de una disolución salina que contiene cuerpos laminares con un gel de moco da lugar a una reducción significativa de la adhesividad y la viscosidad de la mezcla en comparación con un gel de moco testigo que ha sido mezclado con un volumen igual de disolución salina sola, cuando se mide mediante la velocidad de movimiento hacia abajo de un plano inclinado de composición, textura superficial y carga idénticas. Se obtuvieron resultados similares cuando se añadieron cuerpos laminares a geles de DNA, actina y alginato y también a geles de moco y DNA combinados. Se encontraron cambios significativos en la velocidad de flujo, y por lo tanto en la fluidez, cuando la relación del volumen de disolución estándar que contenía cuerpos laminares añadida al gel era aproximadamente de 3 a 7.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cuerpos laminares para uso en el tratamiento de una enfermedad o estado caracterizado por una preponderancia de secreciones mucosas espesas, enfermedad o estado que es seleccionado del grupo que consiste en: fibrosis quística, bronquitis, sinusitis, congestión nasal, asma, bronquiectasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, trastornos hepatobiliares, trastornos de los tractos pancreático y reproductor, mucositis, trastornos del tracto genitourinario, bloqueo y/o compartimentación de la luz de fístulas, quemaduras térmicas y por radiación, úlceras cutáneas crónicas, lesiones por desolladura y estados patológicos en donde la superficie del ojo se vuelve seca y/o resulta cubierta por secreciones o exudados viscosos espesados.

2. La composición para uso en el tratamiento de una enfermedad o estado según la Reivindicación 1, para modificar las propiedades físicas de macromoléculas lineales del tipo mucinas, DNA, actina y alginato de origen bacteriano en secreciones patológicamente alteradas, en donde los cuerpos laminares modifican la viscosidad y la adhesividad de las secreciones, aumentando la fluidez del fluido de la superficie de las vías aéreas y restableciendo el aclaramiento mucociliar de secreciones por todo el tracto respiratorio.

3. Las composiciones para uso en el tratamiento de una enfermedad o estado según la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, en donde la enfermedad es una seleccionada de entre enfermedad pulmonar obstructiva crónica y fibrosis quística.

4. La composición para uso en el tratamiento de una enfermedad o estado según la Reivindicación 1 o 2, en donde dicha enfermedad es fibrosis quística.

5. La composición para uso en el tratamiento de una enfermedad o estado según cualquier reivindicación precedente, en donde dichos cuerpos laminares comprenden fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y colesterol.

6. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichos cuerpos laminares comprenden aproximadamente 44-70% de fosfatidilcolina, aproximadamente 15-23% de esfingomielina, aproximadamente 6-10% de fosfatidiletanolamina, aproximadamente 2-6% de fosfatidilserina, aproximadamente 2-4% de fosfatidilinositol y aproximadamente 4-12% de colesterol en peso.

7. La composición para uso de la Reivindicación 6, en donde dicha composición comprende además aproximadamente 0-3% en peso de lisofosfatidilcolina.

8. La composición para uso de las Reivindicaciones 1 a 6, en donde dichos cuerpos laminares comprenden aproximadamente 54% de fosfatidilcolina, aproximadamente 19% de esfingomielina, aproximadamente 8% de fosfatidiletanolamina, aproximadamente 4% de fosfatidilserina, aproximadamente 3% de fosfatidilinositol y aproximadamente 10% de colesterol en peso.

9. La composición para uso de la Reivindicación 8, en donde dicha composición comprende además aproximadamente 2% en peso de lisofosfatidilcolina.

10. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además componentes terapéuticos en combinación con los cuerpos laminares.

11. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición contiene cuerpos laminares suspendidos y está en forma de un espray.

12. La composición para uso de la Reivindicación 11, en donde los cuerpos laminares suspendidos son sometidos a ultrasonicación durante la administración del aerosol inhalado.

13. La composición para uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 10, en donde los cuerpos laminares se suministran en un sistema de liberación controlada.

14. La composición para uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, que comprende cuerpos laminares sintéticos preparados en una disolución salina fisiológica que contiene 10×10^9 microcuerpos por mililitro.

TESTIGO Moco al 3,5% en disolución salina al 0,9% : diluyente de disolución salina al 0,9%			ENSAYO Moco al 3,5% en disolución salina al 0,9% : cuerpos laminares sintéticos en disolución salina al 0,9%		
Volumen y concentración	**Dilución**	**Tiempo para recorrer 5 cm**		**Dilución**	**Volumen y concentración**
950 µl de moco + 50 µl de NaCl	19:1	Sin movimiento en 5 min	3 min y 50 s	19:1	950 µl de moco + 50 µl de LMS
900 µl de moco + 100 µl de NaCl	9:1	Sin movimiento en 5 min	6 s	9:1	900 µl de moco + 100 µl de LMS
800 µl de moco + 200 µl de NaCl	8:2	Sin movimiento en 5 min	2 s	8:2	800 µl de moco + 200 µl de LMS
700 µl de moco + 300 µl de NaCl	7:3	Sin movimiento en 5 min	1 s	7:3	700 µl de moco + 300 µl de LMS
600 µl de moco + 400 µl de NaCl	6:4	Sin movimiento en 5 min	1 s	6:4	600 µl de moco + 400 µl de LMS

Tabla 1: Efecto de concentraciones variables de cuerpos laminares sintéticos sobre la fluidez del moco en comparación con el uso de diluyente de disolución salina como testigo. Cada muestra examinada tenía exactamente un volumen de 30 µl. El ángulo de inclinación fue 90°.

Figura 1

TESTIGO DNA al 1% en disolución salina al 0,9% : diluyente de disolución salina al 0,9%			ENSAYO DNA al 1% en disolución salina al 0,9% : cuerpos laminares sintéticos en disolución salina al 0,9%		
Volumen y concentración	**Dilución**	**Tiempo para recorrer 5 cm**		**Dilución**	**Volumen y concentración**
950 µl de DNA + 50 µl de NaCl	19:1	10 mm en 5 min	11 mm en 5 min	19:1	950 µl de DNA + 50 µl de LMS
900 µl de DNA + 100 µl de NaCl	9:1	10 mm en 5 min	11 mm en 5 min	9:1	900 µl de DNA + 100 µl de LMS
800 µl de DNA + 200 µl de NaCl	8:2	25 mm en 5 min	31 mm en 5 min	8:2	800 µl de DNA + 200 µl de LMS
700 µl de DNA + 300 µl de NaCl	7:3	45 mm en 5 min	22 s	7:3	700 µl de DNA + 300 µl de LMS
600 µl de DNA + 400 µl de NaCl	6:4	4 min y 20 s	2 s	6:4	600 µl de DNA + 400 µl de LMS
500 µl de DNA + 500 µl de NaCl	5:5	2 min y 32 s	2 s	5:5	500 µl de DNA + 500 µl de LMS

Tabla 2: Efecto, a 37 °C, de concentraciones variables de cuerpos laminares sintéticos sobre la fluidez del DNA en comparación con el uso de diluyente de disolución salina como testigo. Cada muestra examinada tenía un volumen de 100 µl. El ángulo de inclinación fue 90°.

Figura 2

TESTIGO	TIEMPO PARA RECORRER 5 cm		ENSAYO
333 µl de moco al 2,5% en disolución salina al 0,9%	2 s	Sin movimiento	333 µl de moco al 2,5% en disolución salina al 0,9%
333 µl de DNA al 1% en disolución salina al 0,9%		En 5 min	333 µl de DNA al 1% en disolución salina al 0,9%
333 µl de disolución salina al 0,9% como diluyente			333 µl de LMS en disolución salina al 0,9%

Tabla 3: Efecto, a 37 °C, de cuerpos laminares sintéticos sobre la fluidez de un gel de moco y DNA combinados en una relación de un tercio del volumen de cuerpos laminares sintéticos a dos tercios de gel de DNA y moco, en comparación con el testigo en que se usaba un tercio del volumen de disolución salina al 0,9%. Cada muestra examinada tenía un volumen de 40 µl. El ángulo de inclinación fue 90°.

Figura 3