



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 311 013**

51 Int. Cl.:
C07K 14/785 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01930896 .4**
96 Fecha de presentación : **26.04.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1278829**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.01.2003**

54 Título: **Proteína tensioactiva D para la prevención y el diagnóstico del enfisema pulmonar.**

30 Prioridad: **26.04.2000 US 558576**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2009

73 Titular/es: **Children's Hospital Medical Center
3333 Burnet Avenue
Cincinnati, Ohio 45229-3039, US**

72 Inventor/es: **Whitsett, Jeffrey, A.**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 311 013 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteína tensioactiva D para la prevención y el diagnóstico del enfisema pulmonar.

5 **Interés gubernamental en la invención**

Determinados aspectos de la presente invención dados a conocer en la presente memoria se realizaron con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos con las becas de National Institutes of Health HL41320, SCOR HL 56387, HL 28623, HL58795 y HL03905. El gobierno de los Estados Unidos ostenta determinados derechos sobre estos aspectos de la presente invención.

Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general al campo de las proteínas biológicamente activas. Más específicamente la presente invención se refiere a las proteínas SP-D implicadas en la homeóstasis y en la estructura del tensioactivo pulmonar y a la estructura alveolar en los pulmones y de los ratones nulos SP-D (-/-).

Antecedentes de la invención

El tensioactivo pulmonar es esencial para la mecánica normal del pulmón y para el intercambio de gas en el pulmón. El tensioactivo pulmonar se produce mediante las células epiteliales de tipo II y está compuesto de un componente de fosfolípido que confiere la capacidad al tensioactivo de disminuir la tensión superficial en el pulmón. Además, existen proteínas asociadas con el tensioactivo denominadas colectinas que son polipéptidos de colágeno que contienen dominios de lectina. Dos de éstas, designadas proteína tensioactiva A (SP-A) y proteína tensioactiva D (SP-D), es probable que se impliquen en la estructura y la función de tensioactivo y en la defensa de huésped. Tanto las deficiencias cuantitativas como cualitativas en el tensioactivo pulmonar se asocian con el síndrome de distrés respiratorio neonatal, síndrome de distrés respiratorio de adulto, deficiencias congénitas de la proteína B tensioactiva, y asma alérgico. Además, la deficiencia en el tensioactivo pulmonar puede contribuir a la propensión incrementada de algunos individuos al reto microbiano, especialmente en el establecimiento de una inmunidad específica inadecuada o dañada. Estos trastornos así como algunos trastornos asociados con el riesgo incrementado de neumonía (fibrosis quística, asma, premadurez, bronquitis crónica, daño alveolar difuso) se pueden asociar con defectos adquiridos o con la deficiencia de la función de la colectina. Los reservorios de tensioactivo alveolar se regulan a niveles múltiples incluyendo la síntesis intracelular, la secreción, la reabsorción y la degradación de estos componentes mediante macrófagos alveolares. La síntesis y la depuración de los fosfolípidos de tensioactivo y las proteínas resultan influidas además por los estímulos de desarrollo, mecánicos y humorales que sirven para mantener constantes las concentraciones de tensioactivo después del nacimiento.

Se investigado mucho sobre el papel de las colectinas en el tensioactivo y en la función de pulmón normal. La familia de la colectina de las lectinas de tipo C incluye un número de moléculas con funciones de defensa de huésped conocidas. Las lectinas de tipo SP-A y la SP-D, así como las de tipo C, unen los virus de la gripe y del herpes simple además de las bacterias gram positivas y gram negativas y diversos hongos. Mediante la unión ellas aumentan la absorción mediante los macrófagos y neutrófilos alveolares. Se han identificado diversos sitios de uniones celulares para SP-A y SP-D en los macrófagos alveolares, en el caso de la SP-A, en las células epiteliales del tipo II. El papel crítico de la defensa de huésped de SP-A se confirmó con la observación de que los ratones con deficiencia de SP-A son propensos a las infecciones por el estreptococo de grupo B, *Pseudomonas aeruginosa*, virus sincitial respiratorio, adenovirus, y micoplasma *in vivo*. De este modo, existe un papel claro para la SP-A y un papel probable para la SP-D en el mecanismo de defensa respiratorio. Las colectinas pueden participar asimismo en el reconocimiento de la depuración de otros materiales orgánicos complejos, tales como pólenes y alérgenos de ácaros del polvo. Sin embargo, hasta la fecha, no se han asociados enfermedades humanas con deficiencias específicas de SP-A o SP-D.

La SP-D es una proteína de 43 kilodalton que se ha propuesto que desempeña un papel en la defensa de huésped en el pulmón. Su ADNc y el gen se han secuenciado en diversos mamíferos incluyendo humanos. La SP-D comparte una homología estructural considerable con otras lectinas de tipo C, incluyendo la proteína A tensioactiva (SP-A), conglutinina, colectina 43 bovina y la proteína de unión a manosa. Los estudios *in vitro* y su relación estructural próxima a la familia de lectina dependiente de Ca^{2+} de mamífero (comparten elementos estructurales particularmente) apoyan su papel en la defensa de huésped. La SP-D se sintetiza de forma primaria y a unas concentraciones relativamente elevadas mediante las células epiteliales de tipo II y en las células epiteliales bronquiolares no ciliadas en el pulmón pero se pueden expresar asimismo en el tracto gastrointestinal, corazón, riñón, páncreas, tracto genitourinario y células mesentéricas. Los estudios *in vitro* demostraron que la SP-D se une a la superficie de organismos vía su dominio de lectina (o dominio de unión de azúcar) que lleva a la unión, agregación, opsonización y, en algunos casos, a la activación de la muerte mediante fagocitos *in vitro*. La proteína SP-D se une a un lipopolisacárido, a diversas bacterias, hongos y virus, incluyendo el virus de la gripe. Se une asimismo a tanto los macrófagos alveolares como a células polimorfonucleares. Puede desempeñar posiblemente un papel en la homeóstasis de fosfolípido de tensioactivo, incluyendo los efectos de SP-A en el metabolismo de fosfolípido de células de tipo II *in vitro*, sin embargo, esto es controvertido y el papel preciso de SP-D *in vitro* todavía no está claro.

Los estudios *in vitro* apoyan el concepto que las proteínas de tensioactivo pueden ser importantes en la regulación de la homeóstasis de tensioactivo. Aunque las proteínas de tensioactivo hidrofóbicas SP-B y SP-C poseen roles en

ES 2 311 013 T3

la producción de la monocapa de tensioactivo, los estudios *in vitro* indican que la proteína A de tensioactivo puede facilitar asimismo la absorción y/o la secreción de tensioactivo mediante las células epiteliales de tipo II. De hecho, fue una creencia extendida que la SP-A tenía un papel mayor en la homeóstasis de tensioactivo. Sin embargo, estudios recientes de ratones nulos SP-A no han apoyado el papel primario de la proteína A tensioactiva en la secreción o en la reabsorción de tensioactivo. La ausencia de SP-A no lleva a anomalías estructurales fisiológicas o morfológicas del pulmón. Los ratones mutantes nulos SP-A carecen de figuras de mielina tubulares pero producen tensioactivo elevadamente funcional que se absorbe rápidamente y produce monocapas. La síntesis de lípido de tensioactivo, secreción y reabsorción fueron esencialmente normales en los ratones nulos SP-A.

10 Por lo tanto, no se ha identificado todavía la proteína tensioactiva adicional que actúa en la regulación del tensioactivo. Además, el papel preciso de SP-D en la función pulmonar normal no se ha definido claramente en este punto y su papel en la enfermedad o en la propensión a la enfermedad no está claro.

15 El documento WO 00/023569 A, publicado después de la fecha de prioridad de la presente solicitud, da a conocer un ratón SP-D (-/-) que se puede utilizar como un modelo para el enfisema.

Hickling *et al.*, (Eur. J. Immunol., 1999 Nov; 29(11): 3478-84) da a conocer la inhibición de la infección del virus sincitial respiratorio mediante la SP-D trimérica recombinante.

20 El documento WO 00/12078 A da a conocer el tratamiento de enfermedades pulmonares mediante la administración de un inhibidor 4 fosfodiesterasa en combinación con broncodilatadores beta adrenérgicos.

El documento WO 86/06959 A da a conocer un sistema para la administración de fármacos mediante inhalación basado en formulaciones de liposoma.

25 Hartshom *et al.*, (J. Clin. Invest. 1994, 94(1): 311-319) investiga la hipótesis que SP-A y SP-D contribuyan a los mecanismos protectores iniciales contra la gripe.

El documento WO91/00871A da a conocer la preparación de composiciones de tensioactivo pulmonares estables.

30

Sumario de la invención

La presente solicitud describe un ratón SP-D (-/-) que se puede utilizar como modelo para el enfisema. Anteriormente, no se conocía que la proteína SP-D estuviese implicada en la homeóstasis lipídica pulmonar. Ni se conocía un ratón nulo SP-D que presentara los síntomas del enfisema.

La presente invención proporciona la utilización de una formulación de aerosol que comprende una proteína SP-D de mamífero aislada en la preparación de un medicamento para aumentar la depuración de partículas víricas causadas por un adenovirus pulmonar.

40

En una forma de realización dicho medicamento puede reducir los síntomas o la enfermedad vírica.

En otra forma de realización dicho medicamento puede reducir el título vírico.

45

En otra forma de realización dicha enfermedad vírica es una enfermedad pulmonar vírica.

En otra forma de realización dicho medicamento puede reducir la inflamación pulmonar.

En otra forma de realización dicho medicamento puede reducir el título vírico pulmonar.

50

En otra forma de realización dicho medicamento se suministra mediante administración pulmonar.

En otra forma de realización dicha administración pulmonar es mediante inhalación.

55

En otra forma de realización dicho medicamento comprende adicionalmente por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por: un broncodilatador, una antihistamina, epinefrina, un antibiótico y pentamidina.

En otra forma de realización, dicho medicamento se administra en una dosis única.

60

En otra forma de realización, dicho medicamento se administra en dosis múltiples.

En otra forma de realización, dicho medicamento se prepara en una formulación de liposoma.

En otra forma de realización, dicha SP-D se expresa a partir de un vector.

65

En otro aspecto de la presente invención se proporciona una formulación de aerosol que comprende una proteína SP-D de mamífero aislada para aumentar la depuración de partículas víricas causadas por un adenovirus pulmonar.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: comparación de los cambios en las áreas de fracción (% de Área Fx) de espacio aéreo (a) y parénquima respiratorio (b) con la edad en ratones SP-D (-/-) y en ratones de control que encajan por edad SP-D (+/+). Análisis de cambios en estos parámetros con la edad para cada genotipo individual (c y d). Los datos se expresan como % de área de fracción y representan la media \pm SE.

Figura 2: desinflamiento de los segmentos de las curvas presión-volumen de ratones SP-D (+/+) y SP-D (-/-). Los datos se expresan como ml/kg y representan la media \pm SE.

Figura 3: citocinas proinflamatorias en los homogenizados de pulmón de ratones SP-D (-/-). Se evaluaron las concentraciones de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y MIP-2 en los homogeneizados de pulmón de ratones SP-D (-/-) (barra sólida) y SP-D (+/+) (barra sombreada). Los datos se expresan como pg/ml y representan la media \pm SE con n=5 ratones por grupo; *p<0,05 comparada con la de los ratones SP-D (+/+).

Figura 4: se evaluó la producción de peróxido de hidrógeno en los macrófagos alveolares de SP-D (-/-) (barra sólida) a partir de 1×10^6 macrófagos aislados del fluido de lavado broncoalveolar (BALF) según se comparó con ratones SP-D (+/+) (barra sombreada) con y sin estimulación de PMA. Los datos se expresan como M de H₂O₂ y representan la media \pm SE con n = 4 ratones por grupo; *p<0,05 comparada con la de los ratones SP-D (+/+)

Figura 5: conteo de colonias pulmonares en ratones SP-D (-/-) y SP-D (+/+) después de la infección con *Streptococcus GpB* (GBS).

Figura 6: conteo de colonias pulmonares en ratones SP-D (-/-) y SP-D (+/+) después de la infección con *Haemophilus influenzae* (H. flu)

Figura 7: Contaje celular total en el fluido de lavado broncoalveolar (BAL) después de la infección con GBS y H. flu

Figura 8: niveles de citocina en los homogenizados de pulmón después de la infección con GBS y H. flu.

Figura 9: niveles de nitrito BAL después de la infección con GBS y H. flu.

Figura 10: fagocitosis analizada mediante microscopía óptica y análisis FACS después de la infección con GBS y H. flu.

Figura 11: niveles de peróxido y superóxido de hidrógeno en los macrófagos aislados de BAL después de la infección con GBS y H. flu.

Figura 12: efectos del tratamiento de la proteína SP-D en ratones SP-D (-/-).

Figura 13: cinética de depuración de lavado alveolar de la proteína SP-D y de todo el pulmón en ratones.

Figura 14: vector adenovirico Ad-rSPD que contiene ADNc de ratones SP-D.

Figura 15: cuantificación de análisis de transferencia de SP-A y SP-D en lavados alveolares a partir de ratones CCSP-IL-4 de tipo salvaje (ratones IL-4). p<0,01.

Figura 16: se determinaron los títulos de RSV y IAV mediante ensayos de placa cuantitativos de homogeneizados de pulmón. Los títulos virales de RSV fueron significativamente superiores 3 y 5 días después de la administración de 10^7 pfu de RSV (gráfico A) en ratones SP-D (-/-) (barra sin relleno) comparados con los de los ratones de tipo salvaje (barra sombreada). Los títulos de homogeneizado de pulmón de IAV fueron significativamente superiores para ratones SP-D (-/-) (barra sin relleno) comparadas con los de los ratones de tipo salvaje (barra sombreada) 3 y 5 días después de la infección (gráfico B). Los datos son media \pm SEM con n=15 ratones por grupo (gráfico A) y n=10 ratones por grupo (gráfico B). *p<0,05 comparada con la de los ratones de tipo salvaje.

Figura 17: células pulmonares se recubrieron mediante lavado broncoalveolar, se tiñeron de azul tripano y se contaron con microscopía óptica. Los ratones SP-D (-/-) (barra sin relleno) habían incrementado su conteo celular en el fluido BAL 3 y 5 días después de la infección RSV (gráfico A) comparado con el de los ratones de tipo salvaje (barra sombreada). La SP-D (-/-) (barra abierta) había incrementado los conteos celulares totales en el fluido BAL 3 y 5 días después de la infección IAV (gráfico B). Los datos son la media \pm SEM con n = 8 ratones por grupo, *p<0,05 comparada con la de los ratones de tipo salvaje.

Figura 18: se tiñeron las preparaciones de citospina de fluido de lavado broncoalveolar con DIFF-QUIK para identificar macrófagos, linfocitos y leucocitos polimorfonucleares. El porcentaje de neutrófilos en el fluido BAL fue significativamente superior 3 y 5 días después de la administración de 10^7 pfu de RSV a ratones SP-D (-/-) (barra sin relleno) comparado con el de los ratones de tipo salvaje (barra sombreada) (gráfico A). De manera similar, el porcentaje de neutrófilos en el fluido BAL fue significativamente superior 3 y 5 días después de la administración de

ES 2 311 013 T3

10⁵ pfu de IAV a ratones SP-D (-/-) (barra sin relleno) comparado con el del tipo salvaje (gráfico B). Los datos son la media ± SEM con n=8 ratones por grupo, *p<0,05 comparada con la de los ratones de tipo salvaje.

Descripción detallada de la invención

La solicitud describe un modelo de ratón de enfisema que es SP-D (-/-), un procedimiento para la prevención y tratamiento del enfisema con la proteína SP-D o ácido nucleico y procedimientos para la identificación de productos farmacéuticos útiles para el tratamiento del enfisema y de otras enfermedades pulmonares utilizando el modelo de ratón SP-D (-/-).

Se produjo un ratón inactivación génica SP-D (-/-) para identificar el papel de la SP-D en la función y el desarrollo pulmonar normal y para demostrar la progresión temporal del alargamiento del espacio aéreo postnatal y de los cambios inflamatorios espontáneos en los pulmones de estos ratones. Los ratones SP-D (-/-) desarrollan enfisema pulmonar progresivo, asociado con la inflamación crónica y una producción oxidante incrementada por los macrófagos alveolares. Las anomalías de pulmón hacen que este ratón sea un modelo excelente para el enfisema. Debido a que existen muy pocas terapias para el tratamiento del enfisema, siendo la más común la cirugía de reducción de volumen de pulmón, el modelo se necesita urgentemente. Basándose en el modelo de ratón para el enfisema, se describen un número de maneras para ensayar la proteína SP-D y los vectores de expresión, y los fármacos potenciales en el modelo de ratón para la eficacia en el tratamiento del enfisema o de otras formas de daño pulmonar crónico. Se describen asimismo la utilización de la proteína SP-D y los vectores de expresión para tratar diversas enfermedades de producción de tensioactivo aberrante, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, daño pulmonar, exposición tóxica/oxígeno, infección, exposición oxidante incrementada. Por último, se describen los procedimientos para utilizar el ADNc de SP-D, los anticuerpos SP-D, PCR y las técnicas de hibridación diferenciales para identificar los pacientes con riesgo de enfisema, síndromes de distrés pulmonar y otros tipos de enfermedades respiratorias.

Aunque otros materiales y procedimientos similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se pueden utilizar en la práctica o en el ensayo de la presente invención, se describen a continuación los procedimientos y materiales preferidos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “administración pulmonar” se refiere a la administración de una formulación de la presente invención a través de los pulmones mediante inhalación.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “inhalación” se refiere a la toma de aire en los alvéolos. En los ejemplos específicos, la toma puede realizarse mediante la autoadministración de una formulación de la presente invención mientras se inhala, o mediante la administración vía un respirador, por ejemplo, en un paciente en un respirador. El término “inhalador” utilizado con respecto a la formulación de la presente invención es sinónimo de “administración pulmonar”.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “parenteral” se refiere a la introducción de una SP-D en el cuerpo mediante otra ruta que no sea por el intestino y en particular, intravenosa (i.v.), intraarterial (i.a.), intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.), intraventricular y subcutánea (s.c.).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “aerosol” se refiere a una suspensión en el aire. En particular, el aerosol se refiere a la particulización de una formulación de la presente invención y a su suspensión en el aire. Según la presente invención, una formulación de aerosol es una formulación que comprende una SP-D que es adecuada para la aerosolización, es decir, la particulización y suspensión en el aire, para la inhalación o administración pulmonar.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “sistémico” se refiere a una enfermedad o trastorno, o el sitio original del daño distante del pulmón o implica el cuerpo entero del organismo. El término “local” por lo tanto se utiliza en la presente memoria con respecto al pulmón.

Para mayor claridad, la presente invención se describe en detalle en las secciones que se refieren a la SP-D, a las formulaciones de aerosol y a procedimientos para el tratamiento y profilaxis.

Administración pulmonar de la proteína SP-D o ácido nucleico

La presente invención considera las formulaciones que comprenden la proteína SP-D o ácido nucleico para su utilización en una amplia variedad de dispositivos son concebidos para la administración de composiciones farmacéuticas y formulaciones terapéuticas en el tracto respiratorio. La ruta de administración de la presente invención está en forma de aerosol o en forma inhalada. La SP-D de la presente invención, combinada con un agente dispersante, o dispersante, se puede administrar en una formulación de aerosol como polvo seco o en una solución o suspensión con un diluyente.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “dispersante” se refiere a un agente que ayuda a la aerosolización de la proteína o a la absorción de la proteína en el tejido del pulmón, o a ambas. Preferentemente, el dispersante es aceptable farmacéuticamente. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “aceptable farmacéuticamente” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o del estado como incluida en la US Pharmacopeia o en otra farmacopea reconocida de manera general para utilizar en animales, y más particularmente en humanos. Los agentes dispersantes adecuados son bien conocidos en la técnica, e incluyen pero no se limitan a tensioactivos

ES 2 311 013 T3

y similares. Por ejemplo, se pueden utilizar por lo general tensioactivos utilizados en la técnica para reducir la agregación inducida superficial de la proteína causada por la atomización de la solución que forma el aerosol líquido. Los ejemplos no limitativos de tales tensioactivos son tensioactivos tales como ésteres y alcoholes de ácidos grasos polioxietilenados y ésteres de ácidos grasos de sorbitano polioxietilenados. Las cantidades de tensioactivos utilizados variarán, estando por lo general dentro del intervalo de 0,001 a 4% en peso de la formulación. En un aspecto específico, el tensioactivo es monooleato de sorbitano polioxietilenado o trioleato de sorbitano. Los tensioactivos adecuados son bien conocidos en la materia y se pueden seleccionar sobre la base de las propiedades deseadas, dependiendo de la formulación específica, la concentración de SP-D, diluyente (en una formulación líquida) o en forma de polvo (en una formulación de polvo seca), etc.

Además, dependiendo de la elección de la proteína SP-D, péptido, o ácido nucleico, el efecto terapéutico deseado, la calidad del tejido del pulmón (por ejemplo, pulmones enfermos o sanos) y numerosos otros factores, las formulaciones líquidas o secas pueden comprender componentes adicionales, según se describe a continuación.

Las formulaciones de aerosol líquidas contienen la proteína SP-D o ácido nucleico y un agente dispersante en un diluyente aceptable fisiológicamente. Las formulaciones de aerosol en polvo seco de la presente invención consisten en una forma sólida dividida finamente de la proteína SP-D o ácido nucleico y un agente dispersante. Con la formulación de aerosol en polvo seca o líquida, se debe aerosolizar la formulación. Esto es, se debe romper en partículas líquidas o sólidas para asegurar que la dosis aerosolizada alcanza de hecho los alvéolos. En general el diámetro dinámico medio de masa serán 5 micrómetros o menos para asegurar que las partículas de fármaco alcanzan los alvéolos pulmonares (Wearley, L.L., 1991, 1991, Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems 8:333). El término "partícula de aerosol" se utiliza en la presente memoria para describir la partícula líquida o sólida adecuada para la administración pulmonar, es decir, que alcanzará los alvéolos. Son importantes otras consideraciones tales como la construcción del dispositivo de administración, componentes adicionales en la formulación y características de la partícula. Estos aspectos de la administración pulmonar de un fármaco son bien conocidos en la técnica, y en la manipulación de formulaciones, medios de aerosolización y construcción de un dispositivo de administración que requiere como mucho experimentación de rutina por un experto en la materia.

Otros vehículos ventajosos incluyen partículas ópticas aerodinámicas compuestas de un material biodegradable y que poseen una densidad aparente inferior a $0,4 \text{ g/cm}^3$ y un diámetro medio de masa entre 5 y $30 \mu\text{m}$. Ejemplos de tales partículas se presentan en Hanes, *et al.*, patente US nº 6.136.295, publicada el 24 de octubre de 2.000. Típicamente, las partículas están formadas por polímeros biodegradables, por ejemplo, las partículas se pueden formar a partir de un copolímero de injerto de poliéster funcionalizado que consiste en una esqueleto de poliéster alfa-hidroxiácido lineal que posee por lo menos un grupo aminoácido incorporado en él mismo y por lo menos, una cadena secundaria de poli (aminoácido) que se extiende a partir de un grupo aminoácido en el esqueleto de poliéster.

Con respecto a la construcción de un dispositivo de administración, cualquier forma de aerosolización conocida en la técnica, se puede utilizar en la práctica de la presente invención incluyendo pero no limitándose a la nebulización, la atomización, la aerosolización por bomba de una formulación líquida, y la aerosolización de una formulación en polvo seco. Está previsto un dispositivo de administración concebido únicamente para la administración de formulaciones sólidas. A menudo, la aerosolización de una formulación líquida o en polvo seca requerirá un propelente. El propelente puede ser cualquier propelente por lo general utilizado en la técnica. Los ejemplos no limitativos específicos de tales propelentes útiles son clorofluorocarbono, un hidrofurocarbono, un hidrocloreofluorocarbono, o un hidrocarburo, incluyendo trifluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano o combinaciones de las mismas.

En una forma de realización preferida, el dispositivo para la aerosolización es un inhalador de dosificación medidor. Un inhalador de dosificación medidor proporciona una dosificación específica cuando se administra, más que una dosis variable dependiendo de la administración. Tal inhalador de dosificación medidor se puede utilizar con una formulación de aerosol líquida o en polvo seca. Los inhaladores de dosificación medidores son bien conocidos en la técnica.

Una vez que la proteína SP-D o ácido nucleico alcanza el pulmón, un número de factores dependientes de la formulación efectúan la absorción del fármaco. Se apreciará que en el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con SP-D que requiere niveles circulatorios de SP-D, tales factores como tamaño de partícula del aerosol, forma de la partícula del aerosol, presencia o ausencia de infección, enfermedad o embolia pulmonar pueden afectar la absorción de la proteína. Para cada una de las formulaciones descritas en la presente memoria, pueden ser adecuados ciertos lubricantes, incrementadores de absorción, estabilizadores de proteína o agentes de suspensión. La elección de estos agentes adicionales variará dependiendo del objetivo. Se apreciará que en casos en los que se desea o se busca la administración local de la proteína SP-D o ácido nucleico, tales variables como aumentador de absorción serán menos críticas.

En una forma de realización específica, una formulación de aerosol puede incluir otros ingredientes activos además de la proteína SP-D o ácido nucleico. Preferentemente, tales ingredientes activos son los que se utilizan para el tratamiento de trastornos de pulmón. Por ejemplo, tales ingredientes activos adicionales incluyen, pero no se limitan a, broncodilatadores, antihistaminas, epinefrina y similares, que son útiles en el tratamiento de asma. En otra forma de realización, el ingrediente activo adicional puede ser un antibiótico, por ejemplo, para el tratamiento de la neumonía. En una forma de realización preferida, el antibiótico es pentamidina.

ES 2 311 013 T3

Por lo general, la proteína SP-D o ácido nucleico, o el fragmento, análogo o derivado del mismo se introduce en el sujeto en forma de aerosol en una cantidad entre 0,01 mg por kg de peso corporal del mamífero hasta aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal de dicho mamífero. En una forma de realización específica, la dosificación es dosificación por día. Un experto en la materia puede determinar fácilmente un volumen o peso de aerosol que corresponde a esta dosificación basándose en la concentración de la proteína SP-D o ácido nucleico de una formulación de aerosol de la presente invención; de forma alternativa, uno puede preparar una formulación de aerosol con la dosificación adecuada de proteína SP-D o ácido nucleico en el volumen que se va a administrar, ya que es fácilmente apreciado por un experto en la materia. Está claro asimismo que la dosificación será más elevada en el caso de terapia de inhalación para una enfermedad o trastorno sistémicos que impliquen la SP-D y una disminución de la enfermedad o trastorno pulmonar que implica la SP-D, ya que la concentración local de la proteína SP-D o ácido nucleico en el pulmón será mayor si la proteína se administra al pulmón. Es una ventaja que la administración de la proteína SP-D o ácido nucleico directamente al pulmón permita la utilización de menos proteína SP-D o ácido nucleico, limitando de este modo tanto el coste como los efectos secundarios no deseados.

La formulación se puede administrar en una dosificación única o en dosificaciones múltiples dependiendo de la indicación de la enfermedad. Un experto en la materia apreciará que la cantidad exacta de formulación profiláctica o terapéutica que se va a utilizar dependerá del estado y gravedad de la enfermedad, la condición física del sujeto y un número de otros factores.

Los sistemas de administración de aerosol, tales como el inhalador de dosificación medidor presurizado y el inhalador de polvo seco se describen en Newman, S.P., Aerosols and the Lung, Clarke, S. W. and Davia, D. editores, págs. 197-22 y se puede utilizar en conexión con la presente invención.

Se contempla particularmente que una formulación de liposoma puede ser especialmente eficaz para la administración de la proteína SP-D o ácido nucleico mediante inhalación. Esto es particularmente así cuando se desea la administración a largo plazo (ver Wearley, 1991, Crit. Rev. In Ther. Drug Carrier Systems 8:333).

Formulaciones de aerosol líquidas

La presente solicitud describe formulaciones de aerosol y formas de dosificación para utilizar en el tratamiento de sujetos que padecen una enfermedad o trastorno relacionado con la SP-D. Por lo general, tales formas de dosificación contienen uno o más proteínas SP-D o ácidos nucleicos, fragmentos, derivados o análogos de los mismos en un diluyente aceptable farmacéuticamente. Los diluyentes aceptables farmacéuticamente incluyen pero no se limitan a agua estéril, salino, salino regulado, solución de dextrosa y similares. En una forma de realización específica, un diluyente que se puede utilizar en la presente invención o en una formulación farmacéutica de la presente invención es salino regulado de fosfato o una solución salina regulada por lo general entre el intervalo de pH 7,0-8,0 o agua.

La formulación de aerosol líquida puede incluir, como ingredientes opcionales, vehículos aceptables farmacéuticamente, diluyentes, agentes solubilizadores o emulsionantes, tensioactivos y excipientes. Tales vehículos pueden servir simplemente como agentes de carga cuando se desea reducir la concentración de proteína SP-D o de ácido nucleico en el polvo o líquido que se va a administrar a un paciente, pero puede servir asimismo para aumentar la estabilidad de la composición de proteína SP-D o de ácido nucleico y para mejorar la dispersibilidad del polvo o líquido dentro un dispositivo de dispersión para proporcionar una administración más eficaz y reproducible de la proteína SP-D o ácido nucleico y para mejorar las características de manipulación de la proteína o ácido nucleico tales como la fluidez y consistencia para facilitar la preparación y el relleno de polvo o líquido.

Los materiales vehículos adecuados pueden estar en forma de un polvo amorfo, un polvo cristalino, una combinación de polvos amorfo y cristalino o un líquido. Tales materiales incluyen carbohidratos, por ejemplo, monosacáridos tales como fructosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, trehalosa, celobiosa y similares; ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; y polisacáridos, tales como rafinosa, maltodextrina, dextranos y similares; (b) aminoácidos tales como glicina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, lisina y similares; (c) sales orgánicas preparadas a partir de ácidos y bases orgánicos, tales como citrato de sodio, ascorbato de sodio, gluconato de magnesio, gluconato de sodio, hidrocloreuro de trometamina y similares; (d) péptidos y proteínas, tales como aspartamo, albúmina de suero humana, gelatina y similares; (e) alditoles, tales como manitol, xilitol y similares. Un grupo preferido de vehículos incluye lactosa, trehalosa, rafinosa, maltodextrinas, glicina, citrato de sodio, hidrocloreuro de trometamina, albúmina de suero humana y manitol.

Tales materiales de vehículo se pueden combinar con la proteína SP-D o ácido nucleico antes de la administración, es decir, añadiendo el material de vehículo a la solución reguladora. De esa forma, el material de vehículo se formará simultáneamente con y como parte de las partículas SP-D. De manera alternativa, los vehículos se pueden preparar de forma separada en una forma de polvo seco o líquida y se combinan con la proteína SP-D o ácido nucleico mediante mezcla. El tamaño de las partículas del vehículo se puede seleccionar para mejorar la fluidez del polvo o líquido, estando comprendida típicamente en el intervalo de 25 μ m a 100 μ m. Las partículas de vehículo en este intervalo de tamaño no penetrarán por lo general en la región alveolar del pulmón y a menudo se separarán de la proteína SP-D o ácido nucleico en el dispositivo de administración antes de la inhalación. De este modo, las partículas que penetran en la región alveolar del pulmón consistirán esencialmente en proteína SP-D o ácido nucleico y regulador. Un material de vehículo preferido es manitol cristalino que posee un tamaño en el intervalo mencionado anteriormente.

ES 2 311 013 T3

Las formulaciones de aerosol líquidas o secas se aerosolizan preferentemente mediante dispersión en un flujo de aire o en otra corriente de gas aceptable fisiológicamente de una manera convencional. Las formulaciones de aerosol líquidas se utilizarán típicamente con un nebulizador. El nebulizador se puede accionar por aire comprimido o ser ultrasónico. Cualquier nebulizador conocido en la técnica se puede utilizar junto con la presente invención como tal pero no está limitada a: Ultravent, Mallinckrodt, Inc. (St. Louis, Mo); el nebulizador Acorn II (Marquest Medical Products, Engelwood Colo.). Otros nebulizadores útiles junto con la presente invención se describen en la patente US nº 4.624.251 publicada el 25 de noviembre de 1986; 3.703.173 publicada el 21 de noviembre de 1972; 3.561.444 publicada el 9 de febrero de 1971 y 4.635.627 publicada el 13 de enero de 1971.

La formulación puede incluir un vehículo. El vehículo es una macromolécula que es soluble en el sistema circulatorio y que es fisiológicamente aceptable en el que la aceptación fisiológica significa que los expertos en la materia aceptarían la inyección de dicho vehículo en el paciente como parte de un régimen terapéutico. El vehículo preferentemente es relativamente estable en el sistema circulatorio con una vida media de plasma aceptable para la depuración. Tales macromoléculas incluyen pero no se limitan a la lecitina de soja, ácido oleico y trioleato de sorbitano con el trioleato de sorbitano preferido.

Las formulaciones pueden incluir asimismo otros agentes útiles para la estabilización de la proteína o para la regulación de la presión osmótica. Los ejemplos de los agentes incluyen pero no se limitan a sales, tales como cloruro de sodio, o cloruro de potasio y carbohidratos, tales como glucosa, galactosa o manosa y similares.

Formulaciones en polvo secas de aerosol

Se contempla asimismo que la formulación farmacéutica presente se utilizará como una formulación de inhalador en polvo seco que comprende una forma de polvo dividida finamente de la proteína SP-D o ácido nucleico y un dispersante. La forma de la SP-D por lo general será un polvo liofilizado. Las formas liofilizadas de la proteína SP-D o ácido nucleico se pueden obtener a través de técnicas estándares.

En otra forma de realización, la formulación de polvo seco comprenderá un polvo seco finamente dividido que contiene la proteína SP-D o ácido nucleico, un agente dispersante y un agente de carga también. Los agentes de carga útiles junto con la presente formulación incluyen agentes tales como lactosa, sorbitol, sacarosa o manitol en cantidades que facilitan la dispersión del polvo a partir del dispositivo.

Terapia pulmonar con la proteína SP-D o ácido nucleico

La proteína SP-D o ácido nucleico de la presente invención es útil en el tratamiento profiláctico o terapéutico mediados por la SP-D o de enfermedades o trastornos o relacionados con la SP-D en los que la administración pulmonar se desea o en la que están implicados los pulmones. La presente invención contempla la administración pulmonar de tales cantidades de la proteína que son suficientes para conseguir la administración sistémica de una cantidad de proteína terapéutica o biológica, o tales cantidades que consiguen solo la administración local de una cantidad terapéutica o biológica de la proteína en el pulmón. La presente invención contempla además la administración parenteral o la administración pulmonar de la proteína SP-D o ácido nucleico para el tratamiento del enfisema. Un experto en la materia apreciará que el objetivo de la administración sistémica o local dependerá de la indicación que se va a tratar.

Lo que constituye una cantidad eficaz terapéuticamente en un caso particular dependerá de una variedad de factores que resultarán evidentes para el experto en la materia. Dichos factores incluyen la condición física del sujeto que se va a tratar, la gravedad de la condición que se va a tratar, el trastorno o enfermedad que se va a tratar y así sucesivamente. En general, cualquier atenuación significativa estadísticamente de uno o más síntomas asociados con la actividad o la expresión de SP-D inadecuadas constituye el tratamiento dentro del alcance de la presente invención.

Se contempla que la proteína SP-D o ácido nucleico, o más preferentemente las formulaciones de la presente invención, se pueden administrar a un sujeto en la necesidad de un tratamiento profiláctico o terapéutico. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a un animal, más preferentemente a un mamífero y más preferentemente a un ser humano.

La administración pulmonar de la proteína SP-D o ácido nucleico se puede utilizar para obtener en efectos sistémicos o locales. Se prevé que la proteína SP-D o ácido nucleico se administrará para conseguir la elevación de los niveles de plasma de la proteína para tratar las enfermedades o trastornos que implican la actividad o expresión de la SP-D inadecuada, es decir, indicaciones extrapulmonares. En otra forma de realización de la presente invención la SP-D se administra vía las vías aéreas para el tratamiento de enfermedades o trastornos que impliquen la SP-D cuando tales enfermedades o trastornos se manifiestan mediante daño local al pulmón. Tal como se ha indicado anteriormente, la administración pulmonar de la SP-D se prefiere para el tratamiento de los trastornos o enfermedades de pulmón a causa de la concentración local elevada de la SP-D que se puede administrar, la localización de cantidades significativas de la SP-D en el espacio extravascular y la capacidad de limitar o minimizar los efectos sistémicos de la SP-D.

ES 2 311 013 T3

Vectores para la administración del ácido nucleico SP-D

La presente solicitud describe el ácido nucleico SP-D, que se administra a una célula huésped vía cualquiera de los protocolos de aerosolización mencionados anteriormente. Sin embargo, el ácido nucleico se puede administrar en un número de formas diferentes. Los ácidos nucleicos se pueden administrar como ADN solo o dentro de vectores, incluyendo los vectores, pero no limitándose a vírico, plásmido, cósmido, liposoma y micropartículas.

Aislamiento de moléculas de ácido nucleico de la presente invención

Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido SP-D se puede identificar y aislar utilizando procedimientos estándares, según ha descrito Sambrook *et al.*, (1989). Por ejemplo, la reacción de cadena de polimerasa se puede utilizar para aislar y clonar los genes de la SP-D según se ha descrito en la patente US nº 4.683.195. Por lo general, la información de la secuencia del final de la región de interés o más allá se utiliza para diseñar los cebadores de oligonucleótidos. Estos cebadores serán idénticos o similares en la secuencia a cintas opuestas o complementarias de la plantilla que se va a amplificar. El PCR se puede utilizar para amplificar las secuencias de ARN específicos, secuencias de ADN específicas del ADN genómico total y ADNc transcrito a partir del ARN celular total, secuencias de bacteriófago o plásmido y similares, para proporcionar un producto de amplificación. Ver asimismo, Mullis *et al.*, Cold Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology (Stockton Press, N.Y., 1989). De forma alternativa, el gen SP-D se puede aislar a partir de una biblioteca de un humano o mamífero adecuados, utilizando una sonda SP-D.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencia de aminoácido de un polipéptido SP-D activo se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de las variantes de secuencia de aminoácido que existen de forma natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigidos al sitio), mutagénesis de PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante de un polipéptido SP-D.

Para preparar los casetes de expresión y vectores para la transformación de la presente memoria, la secuencia o segmento de ácido nucleico recombinante o seleccionado previamente puede ser circular o lineal, doble hélice o de hélice única. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "vector", "vector de expresión" o "casete de expresión" es una replicón o un elemento genético que funciona como una unidad autónoma de la replicación de ADN *in vivo* y adecuado para la replicación bajo su propio control, tal como un plásmido, un cromosoma, un virus, fago o cósmido. Otro segmento de ADN se puede fijar al replicón o al elemento genético de forma que provoca la replicación del segmento fijado.

Los casetes de expresión o los vectores de expresión para las células huésped incluyen ordinariamente un origen de replicación, un promotor localizado corriente arriba a partir de la secuencia de codificación SP-D, junto con un sitio de unión de ribosoma, un sitio de poliadenilación y una secuencia de terminación transcripcional. Los expertos en la materia apreciarán que algunas de las secuencias mencionadas anteriormente no se requieren para la expresión en ciertos huéspedes. Por ejemplo, un vector de expresión para utilizar con microbios necesita contener solo un origen de replicación reconocido por el huésped, un promotor que funcionará en el huésped y un gen de selección.

Un casete de expresión se construye según la presente invención de forma que una secuencia de codificación de SP-D humana (u otra SP-D adecuada) se localiza en el casete con las secuencias reguladoras adecuadas, el posicionamiento y la orientación de la secuencia de codificación con respecto a las secuencias de control siendo tales que la secuencia de codificación se transcribe bajo el "control" de las secuencias de control (por ejemplo, la polimerasa ARN que se une a la molécula de ADN como las secuencias de control transcriben el código de secuencia). Tal como se utiliza en la presente memoria, una "secuencia de codificación" de ADN es la porción de una secuencia de ADN, cuya transcripción se traduce en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de las secuencias reguladoras adecuadas. Los límites de la secuencia de codificación se determinan mediante un codon de inicio en 5' (extremo amino) y un codon de paro de la traducción en 3' (extremo carboxi). Un código de secuencia puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, secuencias de ADN genómico a partir de ADN eucariota, ADNc a partir de ARNm eucariota e incluso secuencias de ADN sintético. Se localizará en 3' por lo general una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de transcripción para la secuencia de codificación.

Las secuencias de control se pueden ligar a la secuencia de codificación antes de la inserción en un casete. Tal como se utiliza en la presente memoria, una secuencia de codificación está "bajo control" de la secuencia promotora en una célula cuando la polimerasa ARN que une la secuencia de promotor transcribe la secuencia de codificación de ARNm que es a continuación traducida a su vez a la proteína codificada por la secuencia de codificación. De manera alternativa, la secuencia de codificación se puede clonar directamente en un casete de expresión que contiene ya las secuencias de control y un sitio de restricción adecuado. La transformación puede ser mediante cualquier procedimiento conocido para la introducción de polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo, empaquetar el polinucleótido en un virus y transducir una célula huésped con el virus y mediante absorción directa del polinucleótido. Los términos "transformado" o "transformación" o "transformados de forma estable", tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, independientemente del procedimiento utilizado para la inserción, por ejemplo, absorción directa, transducción, f-acoplamiento o electroporación. El polinucleótido exógeno se puede mantener como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o

de forma alternativa se puede integrar en un genoma de huésped. Una célula se ha “transformado” mediante ADN exógeno cuando tal ADN exógeno se ha introducido en la membrana celular. El ADN exógeno puede o no integrarse (unido covalentemente) al ADN cromosómico completando el genoma celular. En los procariotas y en la levadura, por ejemplo, el ADN exógeno se puede mantener en un elemento episomal tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula transformada estable es una en la que el ADN exógeno se ha integrado en un cromosoma de forma que se hereda por las células hijas mediante la replicación cromosomal. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer las líneas celulares o clones que comprenden una población de células hijas que contienen el ADN exógeno. El procedimiento de transformación utilizado depende del huésped que se va a transformar. La transformación bacteriana mediante la absorción directa utiliza por lo general el tratamiento con cloruro de calcio o de rubidio (Cohen Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:2110 (1972)). La transformación de la levadura mediante absorción directa se puede llevar a cabo utilizando el procedimiento de Hinnen *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci., 75:1929 (1978). Las transformaciones de mamífero mediante la absorción directa se pueden llevar a cabo utilizando el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio de Graham y Van der Eb Virology, 52:546 (1978) o las diversas modificaciones conocidas de las mismas. Otros procedimientos para la introducción de polinucleótidos recombinantes en células, particularmente en las células de mamífero, que se conocen en la materia incluyen la transfección mediada por dextrano, la transfección mediada por fosfato de calcio, la transfección mediada por polybrene, la fusión de protoplasto, electroporación, encapsulación del polinucleótido(s) en liposomas y la microinyección directa de los polinucleótidos en los núcleos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “ácido nucleico recombinante”, se refiere a un ácido nucleico que se ha derivado o aislado a partir de una fuente adecuada, que se puede alterar químicamente posteriormente *in vitro*, e introducir posteriormente en las células huésped objetivo. Un ejemplo del ADN recombinante “derivado” de una fuente, sería una secuencia de ADN que se identifica como un fragmento útil que codifica SP-D o un fragmento o una variante de la misma, y que se sintetiza químicamente a continuación en una forma pura esencialmente. Un ejemplo de tal ADN “aislado” a partir de una fuente sería una secuencia de ADN útil que se extirpase o se eliminase a partir de dicha fuente mediante medios químicos, por ejemplo, mediante la utilización de las endonucleasas de restricción. La secuencia aislada se puede manipular a continuación, tal como, amplificarse mediante la utilización de la presente invención, mediante la metodología de la ingeniería genética.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el adenovirus es particularmente adecuado como vector para la transformación de las células pulmonares para expresar la SP-D. El adenovirus infecta de forma natural las células del tracto respiratorio y el adenovirus se puede aerosolizar eficazmente para ser administrado en los pulmones.

Las formas de realización preferidas de la presente invención se describirán ahora asimismo con referencia a los ejemplos siguientes. El ejemplo 1 describe las etapas que resultaron en la producción de la SP-D (-/-) de ratón.

Ejemplo 1

Construcción de ratón con inactivación génica SP-D (-/-)

Los ratones SP-D (-/-) se generaron mediante la inactivación de gen objetivo. La integración de un vector objetivo pGKneo que contiene las secuencias de exon 2 del gen SP-D generó una delección del segundo exón del gen SP-D, que incluye la eliminación de la metionina iniciadora y las secuencias de iniciación de traducción. La secuencia de gen SP-D de ratón de exones 1 y 2 se puede encontrar bajo el número de registro de Genbank nº AF047741. El vector objetivo se diseñó utilizando en primer lugar la subclonación de un fragmento genómico HindIII con KpnI agregado de extremo romo de 5,1-kb que codifica el intrón 2 a través del exón 6 en un sitio KpnI entre el casete resistente a la neomicina y el casete de cinasa timidina. Posteriormente, se agregó un fragmento PstI genómico 1,5-kb que contiene una porción de intrón I con ligadores XhoI y se clonó en un sitio 5' XhoI a partir del casete resistente a la neomicina. Ocho de cada 104 clones ES sobrevivientes al procedimiento de selección doble fueron objetivos correctos según se determina mediante análisis PCR tanto en 5' como en 3'. El clon 93, un clon proliferativo y elevadamente no diferenciado, se expandió y se inyectó en blastocistos C57/BI6 generando los machos quiméricos. Los machos quiméricos se reprodujeron con hembras negras suizas NIH. Se obtuvo una hembra portadora del gen objetivo y se reprodujo con machos negros suizos NIH para generar ratones SP-D (-/-) y SP-D (\pm). La distribución de genotipos de acoplamiento heterocigóticos siguió un modelo mendeliano con 30 (+/+), 45 (+/-) y 25% (-/-) de 115 descendientes indicando que no existían anomalías obvias en la supervivencia relacionada con los alelos SP-D.

Los ratones SP-D (-/-) sobreviven y se reproducen normalmente en el vivario bajo unos servicios de contención de barrera en el Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio. Los ratones han estado libres de virus según se ha evaluado mediante serología. No se detectó ninguna evidencia serológica de infección vírica en los ratones SP-D (-/-) en la necropsia.

Para determinar el genotipo, el ADN de los clips de la cola se digirió con *Bam*HI y se sondó con un derivado del producto de PCR de ADN de ratón genómico que contenía exón 2 y parte de intrón 2 y con el clon de ADNc resistente al G418. Esto demostró una pérdida simultánea de exón 2 con la aparición de las secuencias que codifican G418 resistente en los ratones SP-D (\pm) y SP-D (-/-).

Para demostrar que el SP-D no se expresó en animales nulos, el análisis de transferencia de ARN se llevó a cabo con el ARN pulmonar total de animales nulos, normales y heterocigotos. Los resultados mostraron que aproximadamente

ES 2 311 013 T3

el 50% de la reducción en la intensidad de la banda de hibridización SP-D en animales heterocigotos con una ausencia total de ARNm SP-D de tamaño normal en animales nulos. Después de una exposición prolongada, se detectó una banda de ARNm difusa de aproximadamente 150 nucleótidos más pequeña que el ARNm SP-D normal. Mediante la densitometría por barrido, esta banda representa menos del 5% de la intensidad de la transcripción SP-D normal de animales heterocigotos.

Los análisis de transferencia Western de homogeneizados pulmonares utilizando un antisuero SP-D antirrata de conejo reveló que la SP-D se reducía aproximadamente 50% en ratones SP-D (+/-) heterocigotos y estaba ausente en los ratones SP-D (-/-).

Tanto la SP-D (-/-) como la SP-D (+/-) sobrevivieron normalmente en los periodos perinatales y postnatales. En las edades seleccionadas, se obtuvieron los pesos corporales, pulmón y corazón se obtuvieron mediante medición directa; y los volúmenes de pulmón y corazón mediante desplazamiento de fluido. La proteína de pulmón y el contenido de ADN se evaluaron utilizando albúmina de suero bovino y ADN de espermatozoos de salmón, respectivamente, como estándares. Los pesos corporales de los ratones SP-D (-/-) fueron ligeramente inferiores antes del destete, pero no fueron significativamente diferentes de los ratones SP-D (+/+) después de 3 semanas de edad, tabla 1. Mientras los volúmenes pulmonares no fueron significativamente diferentes, se incrementaron las proporciones volumen de pulmón a peso corporal en los ratones SP-D (-/-) a 3 y 6 semanas de edad, tabla 1. No se observaron diferencias significativas en los volúmenes de corazón o en las proporciones de volumen de corazón a peso corporal. En la madurez (5 meses) no se observaron cambios en el peso pulmonar húmedo, ADN o proteína pulmonar total.

TABLA 1

Comparación de pesos corporales, volúmenes de pulmón y proporciones de volumen a peso corporal
(media \pm SE)

EDAD	PESOS CORPORALES		VOLÚMENES PULMONARES		LV:BW	
	(g)		(ml)		(ml/g $\times 10^{-2}$)	
	SP-D (-/-)	SP-D (+/+)	SP-D (-/-)	SP-D (+/+)	SP-D (-/-)	SP-D (+/+)
2 días	1,8 \pm 0,1*	3,4 \pm 0,1	ND	ND	ND	ND
5 días	3,7 \pm 0,3	4,6 \pm 0,2	ND	ND	ND	ND
7 días	3,9 \pm 0,2*	5,3 \pm 0,2	ND	ND	ND	ND
14 días	6,6 \pm 0,2*	7,7 \pm 0,2	ND	ND	ND	ND
17 días	10,9 \pm 0,5	10,6 \pm 0,7	0,36 \pm 0,02	0,36 \pm 0,03	3,25 \pm 0,05	3,36 \pm 0,03
3 sem	10,9 \pm 0,5*	14,1 \pm 1,2	0,36 \pm 0,01	0,37 \pm 0,03	3,43 \pm 0,21**	2,50 \pm 0,18
6 sem	23,2 \pm 0,6	24,7 \pm 0,5	0,63 \pm 0,03	0,58 \pm 0,02	2,71 \pm 0,13*	2,25 \pm 0,18
9 sem	25,2 \pm 1,2	27,8 \pm 1,3	0,55 \pm 0,03	0,61 \pm 0,02	2,10 \pm 0,16	2,20 \pm 0,09
28 sem	36,9 \pm 4,3	31,2 \pm 1,6	0,67 \pm 0,09	0,58 \pm 0,06	2,03 \pm 0,51	1,86 \pm 0,1

*Se observaron diferencias estadísticas significativas en los pesos corporales en el día 2, $p = 0,00001$; día 7, $p = 0,0002$; 2 sem, $p = 0,007$ y 3 sem, $p = 0,04$. ** Se observaron diferencias estadísticas significativas en las proporciones LV:BW a la sem 3 ($p = 0,02$), debido a diferencias en el peso corporal y a la sem 6 ($p = 0,03$), aunque los pesos corporales y los volúmenes pulmonares no fueron diferentes estadísticamente en este último punto de tiempo. $N = 3-71$ animales por grupo. LV:BW, proporción de volumen pulmonar a peso corporal; ND, no determinado.

Sin embargo, mientras no se observaron anomalías en el peso corporal; los ejemplos 2 a 5 describen las otras anomalías o cambios encontrados en ratones SP-D (-/-).

El ejemplo 2 demuestra el efecto en los niveles de fosfolípidos. Los niveles de fosfolípidos alveolares y de tejido, específicamente los niveles de reserva de fosfatidilcolina, aumentaron notablemente mientras los niveles de proteína de lavado broncoalveolar total (BAL) permanecieron invariables.

Ejemplo 2

Niveles de fosfolípidos en el ratón SP-D (-/-)

La fosfatidilcolina alveolar, de tejido y saturada total (Sat-PC) ($p < 0,001$) aumentó aproximadamente 3 veces en los ratones SP-D (-/-). Los niveles de Sat-PC no se alteraron en los ratones SP-D (+/-). Para los análisis de composición de fosfolípido de lavado alveolar, se evaluaron dos de las cuatro muestras que consistían en el lavado de reserva de dos a tres ratones para la abundancia relativa de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol,

ES 2 311 013 T3

esfingomielina y ácido liso-bis-fosfatídico. La composición de fosfolípido no difirió entre genotipos. La incorporación de (³H)colina en la Sat-PC pulmonar total aumentó ligeramente 8 h después de la inyección, siendo la incorporación aproximadamente 20% mayor que en los ratones SP-D (-/-) (p<0,05).

5 Este resultado fue completamente inesperado en ese trabajo anterior sugiriendo un papel definido para la SP-A y un papel limitado para la SP-D en la homeóstasis de fosfolípido pulmonar. Las enfermedades anteriores asociadas con la homeóstasis de tensioactivo implicaron acumulaciones de tanto proteínas como lípidos de tensioactivos, de este modo el ratón nulo SP-D (-/-) demuestra por primera vez que la SP-D es un factor importante en la homeóstasis de lípido de tensioactivo y que la homeóstasis de lípido y proteína de tensioactivo se puede disociar *in vivo*, ya que la
10 concentración de proteína total en el tensioactivo no cambió. Sin embargo, se produjo un modesto decremento en la concentración total de la SP-A según se explica en el ejemplo 3.

Ejemplo 3

15 *Reducción de los niveles SP-A en el ratón SP-D (-/-)*

No se observaron diferencias en ARNsm de proteínas SP-B y SP-C en ratones SP-D (-/-). En contraste, la hibridización de transferencia Northern del ARN pulmonar total de ratones SP-D (+/+), SP-D (+/-), SP-D (-/-) y la hibridización con la sonda SP-A mostró que el ARNm de SP-A se redujo en los ratones SP-D (-/-). Consistente con la reducción en
20 el ARNm de SP-A, la proteína SP-A de BAL se redujo aparentemente mediante aproximadamente 25% en los ratones SP-D (-/-) según se evaluó mediante un análisis de transferencia Western del lavado alveolar de tres ratones.

Por lo tanto, la SP-D posee un papel en la regulación de la producción de SP-A. Ya que está implicada en la defensa de huésped en los pulmones, la SP-D puede afectar la defensa del huésped de dos maneras. Mediante el aumento de
25 la regulación de la producción de SP-A y mediante la interacción directa con células microbianas e inmunes.

Se evaluó la ultraestructura del material rico en fosfolípido aislado del BAL de los ratones SP-D (-/-) tal como se explica en el ejemplo 4.

30 Ejemplo 4

Cambios en la estructura de tensioactivo en el ratón SP-D (-/-)

El tensioactivo agregado grande se aisló a partir de un lavado alveolar de reserva de ratones SP-D (-/-) y SP-D (+/+) y se examinó mediante EM utilizando la técnica descrita anteriormente. Los agregados lipídicos en los ratones SP-D (-/-) se agrandaron y se organizaron en disposiciones de fosfolípidos densas electrónicas y contenían menos mielina
35 tubular comparada con las de los ratones SP-D (+/+). La ultraestructura demostró ser notablemente anormal, conteniendo cantidades reducidas de mielina tubular y formando estructuras lipídicas únicas empaquetadas densamente. Claramente, a continuación, la SP-D posee un papel en la organización estructural de los lípidos alveolares.

40 *Formas agregadas del lavado alveolar*

El tensioactivo en el alvéolo se puede separar en fracciones de agregados grandes (pesados, densos) y en agregados pequeños (ligeros, vesiculares) mediante centrifugación. Los lavados alveolares se centrifugaron a 40.000 x g durante
45 n un regulador de sacarosa 0,8 M durante 15 min. El tensioactivo agregado grande se recogió a continuación a partir de la interfase, se diluyó con salino normal y se centrifugó otra vez a 40.000 x g durante 15 min. El sobrenadante de la primera centrifugación a 40.000 x g que contiene tensioactivo de agregado pequeño se concentra a 4°C mediante ultrafiltración utilizando un filtro de retención de peso molecular de 300.000 (Minitan, Millipore Corp., Bedford, MA) o concentradores centrífugos (Amicon Corp., Danvers, MA). El tensioactivo de agregado pequeño se diluye con 50 ml
50 de salino normal y se ultrafiltra 3 veces para eliminar las proteínas solubles.

Por último, se analizó la estructura del pulmón. Aunque, normal en los ratones SP-D (+/-), se observaron en ratones SP-D (-/-) números incrementados de macrófagos alveolares espumosos grandes y alvéolos alargados. En el ejemplo
55 5 se indica el procedimiento y los resultados para la identificación de anomalías pulmonares.

Ejemplo 5

Anormalidades pulmonares en el ratón SP-D (-/-)

60 Para determinar si la ausencia de la expresión SP-D llevó a anomalías estructurales, los pulmones de ratones nulos, normales y heterocigotos se fijaron inflados y se llevaron a cabo los análisis de morfología e histoquímicos en secciones mediante microscopía óptica. No hubo evidencia de infección ni de alteraciones obvias en células epiteliales de las vías aéreas en el nivel de la microscopía óptica. Sin embargo, las anomalías heterogéneas en el parénquima pulmonar, con alvéolos engrandecidos, se observaron consistentemente en SP-D (-/-) pero no en los controles SP-D (+/-) o SP-D (+/+).

ES 2 311 013 T3

Procedimiento morfológico e histoquímico

Se sacrificó el tejido pulmonar de ratones SP-D (+/+) y SP-D (-/-) a 2 semanas, 3 semanas y 6 semanas. Los animales se pesaron, se anestesiaron con una mezcla de cetamina, acepromazina y xilazina 4:1:1 y se exsanguinaron cortando la vena cava inferior y la aorta descendente. Se canuló la tráquea y los pulmones se colapsaron desgarrando el diafragma. Los pulmones se inflaron fijados a 25 cm de presión de agua con 4% de paraformaldehído en salino regulado de fosfato (PBS) durante 1 minuto. La tráquea se ató ya que la cánula se había eliminado para mantener el fijador en el pulmón inflado. Los pulmones y el corazón extirpados se dejaron equilibrar en fijador frío hasta que se hundieron en el fondo del recipiente. Los volúmenes de pulmón y de corazón se determinaron a continuación mediante el desplazamiento de fluido. Cada lóbulo se midió junto con su eje más largo, se biseccionó perpendicularmente a lo largo del eje y se procesó en bloques de parafina. Se cortaron cinco secciones micrométricas en series en toda la longitud de cada lóbulo, se colocaron en portaobjetos recubiertos de polisina y se tiñeron con hematoxilina y eosina, con tinción tricrómica de Masson para el colágeno u oceína para la elastina.

15 *Morfología de pulmón*

Con mayor detalle, el examen dentro de las 2 primeras semanas de vida demostró anomalías no detectables en la morfología pulmonar, aunque se observaron en los alvéolos de ratones SP-D (-/-) a los 14 días de edad números incrementados de macrófagos alveolares de aspecto normal. En contraste, las anomalías de la histología pulmonar se observaron en los ratones SP-D (-/-) a 3 y a 6 semanas de edad consistiendo en espacios aéreos alargados e infiltración con macrófagos alveolares, espumosos, atípicos. Los espacios aéreos asociados con la acumulación de macrófagos alveolares, espumosos, hipertróficos e infiltrados monocíticos perivasculares/peribronquiales se observaron alrededor de los 6 a 7 meses de edad, aunque la extensión del engrandecimiento del espacio aéreo en los ratones individuales SP-D (-/-) varió de moderado a grave en este grupo de edad.

En ratones SP-D (-/-) de 7 meses de edad, se observaron lesiones fibróticas subpleurales que se tiñeron intensamente para el colágeno. Se observaron asimismo las anomalías en la deposición de elastina en el parénquima de los pulmones de ratones SP-D (-/-) en este punto de tiempo. Éstas consistieron en regiones de parénquima de pulmón con un espesor delgado y más fibras elásticas elevadamente enrolladas, además de regiones de inflamación en las que la elastina teñida disminuyó en los tabiques alveolares adyacentes (adyacentes a la acumulación y fibrosis macrófaga).

Se observó tejido linfocítico asociado a los bronquios aumentado (BALT) en los ratones SP-D (-/-). La intensidad de la inmunotinción SP-B en las células de tipo II fue similar entre los tres genotipos. Las células de tipo II se purificaron según se indica a continuación. Sin embargo, existieron áreas focales de números aumentados de células intraalveolares espumosas, grandes, que parecían ser macrófagos alveolares que contenían vesículas citoplásmicas abundantes. Estas células aumentaron en tamaño como resultado de aumentar el número y volumen de vesículas citoplásmicas. Las vesículas teñidas con rojo Nilo y que presentaron fluorescencia cuando se excitaron con luz verde a 520-550 nm después de la tinción con azul Nilo y contuvo de este modo el lípido o fosfolípido. Estos macrófagos se tiñeron asimismo con antisuero SP-B. En el lavado alveolar, se observaron aproximadamente 4 veces más de macrófagos ($1,2 \times 10^6$ por ratón) en SP-D (-/-) comparados con los de los ratones normales ($0,36 \times 10^6$ /ratón, pero no hubo cambios en los conteos celulares relativos de neutrófilos o linfocitos). El tamaño de macrófago se estimó a partir del diámetro de macrófagos fijados y teñidos de las preparaciones de citospina sedimentadas en portaobjetos de vidrio a $1500 \times g$ durante 2 min. El diámetro medio de macrófagos de (+/+) fue $11,75 \pm 1,75 \mu m$ comparado con el de los ratones (-/-) de $18,75 \pm 7,25 \mu m$. Los macrófagos grandes anormalmente, definidos como los de un diámetro dos veces normal, comprendían $22,4 \pm 0,6\%$ de los macrófagos de ratones (-/-) comparados con $18 \pm 1,0\%$ de ratones (+/+). Los números y la morfología de macrófagos alveolares no eran diferentes de los ratones SP-D (+/-). Las características ultraestructurales de las células de tipo II fueron similares en SP-D (-/-) comparadas con las de los ratones SP-D (+/+). La morfología de los macrófagos alveolares es consistente con la de las células “espumadas” activas, conocidas por asociarse con la inflamación.

50 *Aislamiento de células de tipo II murina*

Las células de tipo II se aislaron de forma rutinaria en este laboratorio utilizando el procedimiento siguiente. Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal y pentobarbital (50 mg/ml $3,25 \text{ ml/kg}$ de peso corporal). Después de la apertura de la cavidad abdominal, los ratones se desangran cortando la vena cava inferior. La tráquea se expuso, se canuló con un adaptador de boquilla leer de calibre 20 y se cierra con una sutura. Se elimina la placa del pecho y los pulmones se perfunden con 10-20 ml de salino estéril vía la arteria pulmonar hasta que visualmente está libre de sangre. Se instila la despasa (Colaborativa Resecar, Inc., Bedford, MA) en los pulmones vía el catéter traqueal, seguida de agarosa de baja fusión al 1% y calentada a $45^\circ C$. Los pulmones se cubren inmediatamente con hielo y se incuban durante 2 minutos para fijar la agarosa. Se diseccionan los pulmones, se ponen en un tubo de cultivo que contiene 1 ml de despasa adicional y se incuban durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación los pulmones se transfirieron a un disco de cultivo de 60 mm que contenía 100 U/ml de Adnata 1 (Sigma, St. Louis, MO) en 7 ml de DMEM (Gibco BRL, Gaithersburgh, MD). El tejido se separa suavemente de las vías aéreas y se hace turbulencia durante 5 minutos. Las células se colocan a continuación sobre hielo hasta que se filtran. La suspensión celular se filtra sucesivamente a través de coladores celulares de 100 μm y 40 μm y a continuación a través de 25 μm de gasa de nilón (Tetko, Briarcliff Manor, NY). Las células se granulan durante 7 minutos a $130 \times g$ a $4^\circ C$ y se resuspenden en 10 ml de DMEM con 10% de FBS (Intergen Co., Purchase, NY). Las suspensiones de célula cruda se añaden a discos de cultivo de 100 mm que se recubrieron previamente con anticuerpos CD-45 y CD-32 (Pharmingen,

ES 2 311 013 T3

San Diego, CA) y se incubaron durante 102 horas a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Se sacan las placas del incubador y se “criban” suavemente para liberar las células de tipo II fijadas. La suspensión celular se centrifuga a 130 x g a 4°C y se resuspenden en 10 ml de DMEM con 10% de FBS (Intergen Co., Purchase, NY). Las suspensiones de células crudas se añaden a discos de cultivo de 100 mm que se habían recubierto previamente con anticuerpos CD-45 y CD-32 (Pharmingen, San Diego, CA) y se incubaron durante 102 horas a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Se sacan las placas del incubador y se “criban” suavemente para liberar las células de tipo II fijadas. La suspensión celular se centrifuga a 130 x g durante 7 minutos y las células se resuspenden en DMEM que contiene 10% de FBS.

Parénquima del espacio aéreo y respiratorio

Las mediciones morfométricas se llevaron a cabo en ratones de 5 días (0,5 semanas), 14 días (2 semanas) y 17 días (2,5 semanas), de 3 y 6 semanas y de 6 a 7 meses de edad. Se determinó la proporción total (% de área fraccionada) del parénquima respiratorio y del espacio aéreo utilizando un procedimiento de conteo de punto. Las mediciones se llevaron a cabo en secciones tomadas a intervalos completos de lóbulos izquierdo, superior derecho o inferior derecho. Los portaobjetos se visualizaron utilizando un objetivo de 20 x y las imágenes (campos) se transfirieron mediante videocámara a una pantalla de ordenador utilizando el programa informático MetaMorph Imaging (Universal Imaging Corp., West Chester, PA). Una parrilla de malla de 121 puntos, generada por ordenador, se superpuso en cada campo y se contó el número de intersecciones (puntos) que cayeron fuera del parénquima respiratorio (alvéolos y conductos alveolares) o del espacio de aire. Se excluyeron del estudio los puntos que caen sobre los bronquiolos, venas grandes y arteriolas y vénulas más pequeñas. Las áreas fraccionales (% Fx Area) se calcularon dividiendo el número de puntos para cada componente (n) por el número total de puntos que contenía dentro del campo (N) y a continuación multiplicar por 100.

$$\% \text{ Fx Area} = n/N \times 100$$

Se analizaron diez campos por sección para recoger datos. Se seleccionaron las coordenadas x e y para cada campo utilizando el medidor el generador de número aleatorio.

Mientras, tal como se muestra en la figura 1, no se observaron diferencias en la proporción relativa (% de área fraccional) de espacio aéreo (a) y parénquima respiratorio (b) a 5 días (0,5 semanas), 14 días (2 semanas) o 17 días (2,5 semanas) de edad, el % de área fraccional del espacio aéreo se incrementó significativamente (p=0,013) en ratones SP-D (-/-) de aproximadamente 3 semanas de edad. Más específicamente, las áreas fraccionales dedicadas a tanto el espacio aéreo (a) como al parénquima (b) divergían significativamente entre los dos genotipos diferentes a 3 semanas (*p = 0,013), 6 semanas (*p= 0,0007) y 28 semanas (*p=0,004) de edad. Probablemente, el % de área fraccional del parénquima respiratorio disminuyó en ratones SP-D (-/-) comparados con los de los controles de SP-D (+/+) que encajaban por edad (34% del parénquima/66% de espacio aéreo comparado con 42,5% de parénquima/57,5% de espacio aéreo, respectivamente), figura 1. Las proporciones relativas de espacio aéreo y de parénquima respiratorio continuó divergiendo significativamente de los controles en los puntos de tiempo más tardíos, el % de áreas fraccionales que está en el intervalo de 27% de parénquima/73% de espacio aéreo a 37% de parénquima/63% de espacio aéreo en ratones SP-D (-/-) de 7 meses de edad (n=5). Los controles de SP-D (+/+) que encajaban en la edad mostraron menos variabilidad, estando en el intervalo de 45% de parénquima/55% de espacio aéreo a 47% de parénquima/53% de espacio aéreo, en este punto de tiempo (n=4). La reducción del porcentaje total en el parénquima en los ratones SP-D (-/-) de 7 meses de edad fue 32% de los valores de control, mientras el incremento de porcentaje en el espacio aéreo en los ratones SP-D (-/-) fue 27% de los valores de control.

Proliferación celular

Los animales se preinyectaron con BrdU 4 horas antes del sacrificio para evaluar las alteraciones en la proliferación celular. Se llevó a cabo la detección inmunohistoquímica del BrdU incorporado se llevó a cabo utilizando un kit disponible comercialmente (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA). Las secciones de intestino delgado de cada animal se inmunotñieron en paralelo con las secciones de pulmón como un control positivo para la incorporación de BrdU.

Los índices de marcado de BrdU fueron relativamente bajos y no se observaron cambios en el marcado de BrdU de células parenquimales respiratorias o macrófagos alveolares en los pulmones de ratones SP-D (-/-) comparados con los controles.

Volúmenes de pulmón

La determinación de los volúmenes de pulmón utilizando curvas de presión-volumen fue como sigue. Los ratones de doce semanas de edad se inyectaron con pentobarbital de sodio y se colocaron en una cámara que contenía el 100% de oxígeno para asegurar el colapso completo de los alvéolos mediante la absorción de oxígeno. Los ratones se sacrificaron mediante desangrado, la tráquea se canuló y se conectó a una jeringa unida a un sensor de presión vía un conector de tres vías (Mouse Pulmonary Testing System, TSS Incorporated, Cincinnati, OH). Después de abrir el diafragma, se inflaron los pulmones en incrementos de 75 µl cada 10 segundos hasta una presión máxima de 28 cm de agua y a continuación se desinflaron. Se generaron para cada animal curvas de volumen-presión, determinando los volúmenes pulmonares (divididos por el peso corporal) a 10, 5 y 0 cm de agua durante la curva de deflación.

ES 2 311 013 T3

En la figura 2, las curvas de presión-volumen se generaron en 5-6 ratones de 12 semanas de edad. Los volúmenes pulmonares asociados con los limbos de deflación fueron significativamente mayores para ratones SP-D (-/-) de 12 meses de edad comparados con los de los ratones que encajaban en edad a 10 cm de H₂O y a la presión máxima de 28 cm de H₂O (*p < 0,05).

5

Las diferencias significativas estadísticamente se determinaron utilizando análisis de varianza para las áreas fraccionales y curvas de presión-volumen, seguidas del procedimiento Student-Newman-Keuls o el ensayo de la T de Student para la comparación de los pesos corporales, volúmenes de pulmón y corazón, proporciones de volumen: peso corporal, proteína total y contenido de ADN. Las diferencias de p<0,5 fueron consideradas significativamente. Los valores se dan como la media ± SE.

10

Los volúmenes pulmonares resultaron evidentes directamente en los ratones SP-D (-/-) en las 12 semanas de edad, en concordancia con los estudios histológicos y morfométricos que demostraban el enfisema, ver figura 2.

15 *Alvéolos*

Se observaron consistentemente los alvéolos engrandecidos en los ratones SP-D (-/-). Esto proporciona la evidencia para la implicación de la SP-D en la regulación de la remodelación alveolar en los pulmones. Ya que las anomalías y la remodelación del espacio aéreo es una característica definitoria del enfisema, el ratón SP-D (-/-) es un modelo ideal para el enfisema.

20

Ejemplo 6

Citocinas, producción de peróxido de hidrógeno y actividades de metaloproteínasa

25

Mediciones de citocina

Se centrifugaron a 2.000 RPM los homogeneizados de pulmón de ratones de 6 a 9 semanas y se almacenaron a -20°C. Se cuantificaron el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina (IL)-1 β , IL-6 y proteína inflamatoria macrófaga (MIP)-2 utilizando los kits ELISA de sándwich de murina (R&D Systems, Minneapolis, MN) según las indicaciones del fabricante. Todas las placas se leyeron en un lector de microplaca (Molecular Devices, Menlo Park, CA) y se analizaron con la utilización de un programa de análisis asistido por ordenador (Softmax, Molecular Devices). Sólo se aceptaron para el análisis ensayos que poseen curvas estándares con un valor de línea de regresión calculado de >0,95.

30

Producción de peróxido de hidrógeno

Los macrófagos alveolares se recogieron mediante lavado broncoalveolar con 1 ml de medio RPMI libre de colorante (Gibco, Gran Island, NY) tres veces. El fluido de lavado broncoalveolar (BALF) de 8 - 10 ratones se guardó para proporcionar números suficientes de macrófagos para el análisis. El lavado se centrifugó a 1200 PRM durante 10 minutos y se resuspendieron en PBS un millón de macrófagos. La producción de peróxido de hidrógeno mediante los macrófagos se midió utilizando un ensayo disponible comercialmente (ensayo Bioxytech H₂O₂-560, OXIS International, Portland, OR), basado en la oxidación de iones ferrosos (Fe²⁺) a iones férricos (Fe³⁺) mediante peróxido de hidrógeno bajo condiciones ácidas. Los procedimientos siguieron las recomendaciones del fabricante. La producción de peróxido de hidrógeno se determinó después de la activación con 10 ng/ml de acetato de forbol de miristato (PMA) o sin estimulación.

45

Actividad metaloproteínasa

Se centrifugaron las muestras de lavado de ratón (100.000 x g, 1 hora) en un rotor SW-28 (Beckman, Palo Alto, CA). Los sobrenadantes se concentraron utilizando unidades de filtración Centricon-30 (Amicon, Inc., Beverly, MA). Se realizó la electroforesis a las muestras (200 μ g de proteína) bajo condiciones no reductoras (laemmli) en 10% de Zymogram, gelatina y geles de caseína (Novex, San Diego, CA). Después de la electroforesis, los geles se lavaron dos veces con 2,5% de Tritón X-100 (37°C, 15 min) y se incubaron durante 16 horas con Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1 μ M. Los geles se tiñeron con 0,5 (peso/volumen) de azul Coomassie en 50% de metanol, 10% de ácido acético durante 1 hora y a continuación se destiñó. Las metaloproteínasas se detectaron como bandas claras sobre el fondo azul. Los ARNm de metaloproteínasas 2 y 9 se cuantificaron mediante análisis de transferencia Northern del total de ARNm del pulmón a partir del tipo salvaje y de ratones de SP-D (-/-) utilizando sondas de ADNc [³²P]-marcadas (Chemicon International, Inc., Temecula, CA).

50

Resultados

Los homogeneizados de pulmón de ratones SP-D (-/-) de 6 a 9 semanas de edad no contenían niveles inflamatorios de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 o MIP-2, aunque los niveles basales de IL-1 β se incrementaron significativamente, figura 3. En contraste, la producción oxidante, según se evaluó mediante la medición de la producción de peróxido de hidrógeno mediante los macrófagos alveolares aislados de ratones SP-D (-/-), se incrementó 10 veces, figura 4. La producción de peróxido de hidrógeno y de superóxido es una medida de la activación de macrófago, particularmente la activación microbicida. Ya que la producción de oxidante se ha asociado con la activación de un

55

60

número de metaloproteinasas y con el enfisema tanto en los estudios de humanos como de animales, se estimaron las actividades de metaloproteinasas mediante la degradación de los sustratos de gelatina después de SDS-PAGE de los sobrenadantes BALF aislados de ratones SP-D (-/-) y SP-D (+/+). Las bandas de actividad en concordancia con las metaloproteinasas 2 y -9 se detectaron directamente en tantos genotipos, pero no se alteraron en BALF de los ratones SP-D (-/-). Probablemente, la abundancia de las metaloproteinasas 2 y -9 de ARNm fueron similares en las muestras de ARN de pulmón entero de ratones SP-D (-/-) y SP-D (+/+) según se evaluó mediante análisis de transferencia Northern. Sin embargo, la producción de MMP-2 y 9 mediante macrófagos alveolares aislados de ratones SP-D (-/-) se incrementó notablemente. Sin embargo, se incrementó notablemente la producción de MMP-2 y -9 mediante macrófagos alveolares aislados de los ratones SP-D (-/-). Probablemente, la inmunotinción para la MME (metaloelastasa de macrófago) y MMP-9 aumentó en los pulmones de los ratones SP-D (-/-).

Los resultados de los ejemplos 1-6 fueron completamente inesperados. No existe nada en la literatura que sugiera que un ratón nulo SP-D es un modelo para el enfisema.

En resumen, el ratón SP-D (-/-) demuestra de forma concluyente un papel notable y sorprendente para la SP-D en la regulación de la homeostasis de tensioactivo, la estructura del tensioactivo alveolar en el pulmón, en la regulación de la expresión SP-A o que juega un papel inhibitorio crítico de oxidante, en la producción de peróxido de hidrógeno en el pulmón. Los niveles SP-D son importantes para la supresión de la producción de oxidante en desarrollo y en el daño y en la regulación de la remodelación alveolar y en la supresión de proteasas que causan el enfisema. Esto hace que el ratón SP-D (-/-) sea un modelo excelente para el enfisema. El ejemplo 7 resumirá los resultados del modelo de ratón del enfisema.

Ejemplo 7

25 *Ratón SP-D (-/-) como modelo para el enfisema*

La deficiencia SP-D causó inflamación, producción oxidante aumentada mediante los macrófagos alveolares aislados, enfisema y fibrosis localizada en los ratones SP-D (-/-) inactivados en los genes. El tiempo y la naturaleza progresiva de estas anomalías pulmonares apoya la conclusión que el engrandecimiento alveolar de los ratones SP-D (-/-) está causado por la remodelación alveolar asociada con la inflamación crónica, más que con las anomalías de desarrollo que aparecen durante la alveologénesis. Los presentes descubrimientos concuerdan con un papel importante y no anticipado de la SP-D en la modulación de la inflamación pulmonar y en la producción de oxidante y sugiere que los cambios en la regulación o función de la SP-D puedan desempeñar un papel en los procedimientos patológicos que llevan a un enfisema seguido de un daño pulmonar crónico.

Los análisis histológicos y morfométricos de pulmones a partir de SP-D (-/-) no revelaron anomalías en la estructura de pulmón hasta las 3 semanas de la edad postnatal, una semana después que la alveologénesis se completa en el ratón. Esto fue concordante con la observación de que las proporciones relativas del parénquima respiratorio y del espacio aéreo fueron similares tanto en ratones SP-D (-/-) como en SP-D (+/+), entre los días postnatales 5 y 17. Después de las 2 semanas de edad, se observaron las proporciones incrementadas parénquima- espacio aéreo en ratones SP-D (-/-), en concordancia con la remodelación en desarrollo del parénquima y los espacios alveolares. Los espacios engrandecidos aéreos se asociaron por lo general con la acumulación focal de macrófagos alveolares, espumosos, grandes, aunque hubo alguna heterogeneidad tanto en la localización como en la extensión de los infiltrados inflamatorios y en la remodelación de ratones más viejos. Mientras se observó la acumulación focal de macrófagos alveolares en los pulmones de ratones SP-D (-/-) tan pronto como a las 2 semanas de edad, la morfología de macrófago permaneció normal en este tiempo. La morfología de macrófago alveolar anormal, que consiste en células espumosas engrandecidas, se observó a las 3 semanas de edad y a continuación coincidió con el engrandecimiento de estructuras alveolares. Los estudios anteriores demostraron números incrementados de macrófagos alveolares engrandecidos en ratones SP-D (-/-) a las 8 semanas de edad. De este modo, el desarrollo de enfisema en los ratones SP-D (-/-) concuerda con la acumulación temporal y espacial de los macrófagos activados y con la producción aumentada de proteasas MMP-2, 9 y MME sugiriendo su papel en el procedimiento de remodelación. Los presentes descubrimientos no apoyan un papel para la SP-D en la morfogénesis y alveologénesis de pulmón normal, un procedimiento por lo general completado aproximadamente a las 2 semanas de la edad postnatal en ratones.

Los presentes descubrimientos no apoyan un papel importante para la SP-D en la modulación de la activación de macrófago alveolar y en la producción de oxidante, llevando a la activación de proteasa, enfisema y fibrosis. La infiltración de macrófago y la remodelación pulmonar en ratones SP-D (-/-) se asoció con diferencias modestas pero significativas en niveles inflamatorios de diversos mediadores proinflamatorios, incluyendo la IL-1b, MIP-2, pero no la TNF- α ni la IL-6, sino más bien con una producción de peróxido de hidrógeno notablemente aumentada por macrófagos alveolares aislados. Aunque los niveles basales de IL- β 1 se incrementaron significativamente en ratones SP-D (-/-), la IL- β 1 no incrementó a niveles típicamente detectados en la inflamación grave. Mientras se observaba un incremento de IL-1 β y de la producción de peróxido de hidrógeno en ratones SP-D (-/-), sigue sin estar claro si las anomalías pulmonares vistas en estos ratones mediaron directamente mediante citocina o daño inducido oxidante. Aunque se ha propuesto que la SP-D juega un papel importante en la defensa del huésped, no hubo evidencia histológica o serológica de infección en la colonia SP-D (-/-).

La producción de peróxido de hidrógeno incrementada y los números incrementados de macrófagos alveolares encontrados en los pulmones de ratones SP-D (-/-) apoyan el concepto que la SP-D juega un papel anti-inflamatorio

crítico en el pulmón y regula la producción de peróxido de hidrógeno mediante los macrófagos alveolares *in vivo*. Las relaciones entre el daño oxidante y el desarrollo del enfisema y la fibrosis pulmonar están bien establecidas en numerosos modelos animales y genéticos. Por ejemplo, la exposición neonatal a la hiperoxia causó la remodelación alveolar y la fibrosis en ratones recién nacidos. Ya que la activación de las metaloproteinasas se ha asociado con el

5 daño oxidante y el enfisema, las actividades de metaloproteinasa se evaluaron en BALF a partir de ratones SP-D (-/-). Mientras la actividad de la proteasa consistente con las metaloproteinasa-2 y -9 se detectaron fácilmente mediante zimografía en homogeneizados de pulmón, pero, no se detectaron cambios consistentes en ratones SP-D (-/-) las actividades de estas proteinasas o en sus ARNm. Sin embargo, se demostró la producción incrementada notablemente de MMP-2 y MMP-9 en los macrófagos alveolares aislados de ratones SP-D (-/-) *in vitro* y en la inmunotinción de

10 MME y de MMP-2 se incrementó en los pulmones de ratones SP-D (-/-) *in vivo*. De este modo, las concentraciones incrementadas localizadas de metaloproteinasas y/o alteraciones en otras proteasas o antiproteasas se asocian con la deficiencia de SP-D. Las deficiencias en antiproteasas, además del tabaco y del daño oxidante de tóxicos oxidantes (por ejemplo, bleomicina o paraquat), se han asociado todas con el enfisema o la fibrosis pulmonar en el pulmón humano.

15 Mientras el contenido de fosfolípido de tensioactivo se incrementó en ratones SP-D (-/-) y se asoció con números incrementados de macrófagos alveolares, espumosos, grandes, el contenido de fosfolípido incrementado solo no es probable que sea suficiente para causar la remodelación alveolar observada en ratones SP-D (-/-). De hecho, el efecto total de fosfolípidos de tensioactivo parece que sea anti-inflamatorio, alterador de la fagocitosis, producción oxidante y liberación de citocina e inhibidor de la proliferación de linfocito, producción de inmunoglobulina y expresión de

20 moléculas de adhesión. Por otro lado, los ratones transgénicos en los que se sobreexpresó GM-CSF en el epitelio respiratorio tuvieron números notablemente incrementados de macrófagos alveolares de aspecto normal, pero no desarrollaron proteinosis/lipoidosis alveolar pulmonar, enfisema, o fibrosis. En contraste, los fosfolípidos de tensioactivo y proteínas incrementaron notablemente en pulmones de tanto ratones deficientes en GM-CSF (-/-) como en la subunidad beta común de receptor GM (β c) en asociación con la acumulación de macrófago alveolar e infiltrados de monocito perivascular/peribronquial; sin embargo, ni el modelo de proteinosis/lipoidosis alveolar pulmonar se asoció con el enfisema o la fibrosis. Probablemente, los ratones transgénicos que sobreexpresan IL-4 en el pulmón mostraron asimismo cantidades incrementadas de proteínas y lípidos de tensioactivo, además de números incrementados de

25 células inflamatorias, pero no desarrollaron enfisema.

30 Aunque las concentraciones de SP-D en el pulmón cambien durante el desarrollo, incrementándose con la edad, los niveles de SP-D se influenciaron asimismo mediante condiciones clínicas diversas. Estudios recientes demostraron una reducción notable de las concentraciones SP-D en BALF obtenida de pacientes con fibrosis quística (FC), apoyando el papel potencial para la SP-D en la patogénesis de la inflamación crónica asociada con la enfermedad pulmonar FC. Los niveles de SP-D se redujeron asimismo en BALF de fumadores, lo que sugiere que niveles reducidos de SP-D pueden contribuir al desarrollo posterior de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (CDPD) y enfisema en estos pacientes. Aunque las concentraciones de SP-D en BALF se incrementaron en pacientes con proteinosis alveolar pulmonar (PAP), los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF) y neumonía intestinal asociada con la enfermedad vascular de colágeno (IPCD) tenían niveles BALF de SP-D disminuidos. Por otro lado, las concentraciones de SP-D aumentaron en pacientes con PAP, IPF e IPCD; aunque los niveles de suero de tanto SP-a como SP-D variaron con la gravedad de IPF y durante el curso de las terapias anti-inflamatorias. Estos descubrimientos clínicos, además del presente estudio, demuestran que la SP-D se requiere para el mantenimiento de la arquitectura de pulmón normal y la supresión de la producción de oxidante, apoyando el concepto que los cambios en las concentraciones de SP-D se pueden implicar en la patogénesis del daño pulmonar asociado con condiciones clínicas diversas, incluyendo

35 daño oxidante, abscesos pulmonares, enfermedades secundarias, fibrosis quística, fibrosis pulmonar intersticial (IPF), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), diversas infecciones pulmonares, síndrome de distrés respiratorio (RDS), displasia broncopulmonar (BPD), daño pulmonar inducido por quimioterapia, fibrosis pulmonar secundaria a abscesos primarios (es decir, sarcoide) y asma.

50 En nuestros estudios anteriores, no se observaron anomalías en los macrófagos alveolares o morfología de pulmón en los ratones heterocigotos SP-D (+/-), demostrando que una reducción del 50% en la concentración de SP-D en BALF no es suficiente para causar anomalías pulmonares. Las concentraciones precisas de SP-D que se requieren para la inhibición del daño inducido por oxidante y la remodelación del pulmón no están claras actualmente. Si el daño o estrés oxidante adicional a los pulmones de ratones SP-D (+/-) o SP-D (-/-) excacerbará el enfisema y la fibrosis, en este modelo de animal permanece sin determinar.

La modesta reducción de la concentración de SP-A de pulmón detectado en ratones SP-D (-/-) no es probable que contribuya a los cambios en la morfología de pulmón observados en estos ratones, ya que ni los ratones SP-A (+/-) ni SP-A (-/-) desarrollaron el enfisema. Además, la morfología de pulmón de los ratones deficientes SP-A fue normal, y,

60 en contraste con los ratones SP-D (-/-), la deficiencia de SP-A se asoció con la producción de peróxido de hidrógeno disminuida mediante macrófagos alveolares aislados.

Los ratones SP-D (-/-) desarrollaron un enfisema grave y progresivo. Las anomalías de remodelación alveolar y macrófagos fueron evidentes tan pronto como a las 3 semanas de edad, mientras la fibrosis pulmonar, focal, suave se observó a los 6 a 7 meses de edad, demostrando un papel para la SP-D en la regulación de la inflamación y remodelación alveolar. El presente estudio demostró asimismo un papel inesperado para la SP-D en la regulación de la producción de peróxido de hidrógeno mediante los macrófagos *in vivo*, que puede contribuir al desarrollo del enfisema en pulmones de ratones SP-D (-/-). Si la deficiencia de SP-D contribuye a la inflamación en desarrollo o al desarrollo

ES 2 311 013 T3

de enfisema y fibrosis encontrada en diversas enfermedades pulmonares crónicas humanas, incluyendo las causadas por el tabaco y otros oxidantes, permanece sin determinar.

A causa de la falta de terapias farmacéuticas para el tratamiento del enfisema, es imperativo un modelo para ensayar posibles terapias. El ratón SP-D (-/-) proporciona este modelo. El ejemplo 8 proporciona una estructura de muestra para ensayar productos farmacéuticos, preparaciones de proteína o manipulaciones genéticas para el tratamiento del enfisema.

Ejemplo 8

Ensayo de terapias en el modelo de ratón

Se administraron a ratones SP-D (-/-) intratraquealmente un número de dosis o concentraciones de proteína o de producto farmacéutico diluido en un regulador adecuado. La proteína y el producto farmacéutico se purifican como adecuado para su utilización *in vivo*. El adenovirus recombinante u otros vectores genéticos que contiene el gen de interés se administran como sigue. Los ratones SP-D (-/-) se inmunosuprimen para bloquear específicamente las respuestas inmunes mediadas por las células T y se tratan con una construcción adenoviral diseñada para expresar el gen de interés en células transducidas. Los ratones se inyectan intraperitonealmente con anticuerpo H57 3 días antes de recibir la construcción adenoviral. H57 altera el reconocimiento inmune en el receptor de célula T y disminuye los linfocitos T y B de bazo y pulmón. Se instala una dosis intratraquealmente y se trata otro grupo intraperitonealmente con H57 seguido de la administración intratraqueal del vehículo solo. Los niveles de la proteína de interés se miden 1 semana después de la administración para detectar la absorción y expresión del vector. Se ensayan cuatro ratones y se utilizan como control ratones SP-D (-/-) sin tratar. La inoculación intratraqueal implica la anestesia con isoflurano y se realiza una incisión en la línea de la mitad anterior para exponer la tráquea. Se inserta en la tráquea una jeringa tuberculina con una aguja de calibre 30 y se dispersan en los pulmones 100 μ l de inoculación de proteína o de producto farmacéutico. Se cierra la incisión con una gota de Nexaband Nonpyogenic. Se inyecta intratraquealmente PBS como control.

Para ensayar la eficacia de la proteína, el producto farmacéutico o la manipulación genética en la disminución de los efectos de enfisema, se llevan a cabo un número de ensayos.

Para determinar los efectos de la proteína o del producto farmacéutico en la estructura del pulmón, se fijan inflados los pulmones y se analizan las secciones con microscopía electrónica. Los pulmones de ratones tratados y sin tratar se inflan vía una cánula traqueal a 20 cm de presión con 4% de paraformaldehído y se elimina en bloque del tórax. Los pulmones se deshidratan y se incrustan en parafina. Las secciones de tejido (5 μ m) se tiñen con hematoxilina y eosina.

Para ensayar el número y la morfología de macrófagos: la tinción con rojo Nilo detecta vesículas y la tinción con azul Nilo y la excitación con luz verde de 520-550 nm es un procedimiento adicional para detectar lípidos o fosfolípidos. El número de macrófago se determina por la tinción con anti-MAC-1 u otro antisuero específico de macrófago. El tamaño de macrófago se estima a partir del diámetro de macrófagos teñidos y fijados a partir de preparaciones de citospina sedimentadas en portaobjetos de vidrio a 1.500 x g durante 2 minutos.

La composición de tensioactivo y la ultraestructura se analiza como sigue: la estructura de tensioactivo se analiza mediante el aislamiento de los agregados grandes a partir de un lavado alveolar de reserva de ratones tratados y sin tratar SP-D (-/-) y se examinan mediante EM (ver protocolo a continuación). Para el análisis de la composición de fosfolípidos de lavado alveolar, dos de las cuatro muestras que consisten en el lavado de reserva de dos a tres ratones se evalúan para la abundancia relativa de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, esfingomielina, y ácido liso-bis-fosfatídico. La incorporación de (³H)colina en el Sat-PC del pulmón total se evalúa para determinar la concentración de fosfolípido total.

Formas agregadas del lavado alveolar

El tensioactivo en el alveolar se puede separar en fracciones de agregados grandes (pesados, densos) y agregados pequeños (ligeros, vesiculares) mediante centrifugación. Los lavados alveolares se centrifugaron a 40.000 x g en un regulador de sacarosa de 0,8 M durante 15 minutos. El tensioactivo agregado grande se recogió a continuación a partir de la interfase, se diluyó con salino normal y se centrifugó otra vez a 40.000 x g durante 15 min. El sobrenadante de los primeros 40.000 x g centrifugados que contiene tensioactivo agregado pequeño se concentra a 4°C mediante ultracentrifugación utilizando un filtro de retención de peso molecular de 300.000 (Minitan, Millipore Corp., Bedford, MA) o concentradores de centrífuga (Amicon Corp., Danveres, MA). El tensioactivo agregado pequeño se diluye con 50 ml de salino normal y se ultrafiltra 3 veces para eliminar las proteínas solubles.

La SP-D como tratamiento para las enfermedades pulmonares

A causa de la delección de la SP-D producida por el modelo de ratón para el enfisema, la SP-D es una elección obvia como un tratamiento para la prevención del enfisema. Es asimismo un tratamiento obvio para otros tipos de enfermedades pulmonares ya que muchas de estas enfermedades se caracterizan por una producción de tensioactivo aberrante. Además, su influencia sobre SP-A y su posible papel en la defensa del huésped la hace una herramienta útil para aumentar la función inmune en los pulmones. La viabilidad de la transferencia de gen al epitelio respiratorio es

muy prometedora como un tratamiento para enfermedades pulmonares diversas. Se han desarrollado una variedad de vectores basados en virus y en no virus para transferir los genes a las células de las vías aéreas, incluyendo vectores adenovirales recombinantes. Estos vectores son particularmente prometedores para la utilización en el tratamiento respiratorio porque poseen el potencial de aerosolizarse. El ejemplo 9 es un experimento utilizando proteína SP-D de ratón purificada para el tratamiento del enfisema en ratones SP-D (-/-). El ejemplo 10 es un experimento utilizando el adenovirus para expresar la SP-D de rata para el tratamiento de enfisema en ratones SP-D (-/-). El ejemplo 11 proporciona una estructura de muestra para la utilización de péptidos SP-D o vectores que expresan la SP-D para la prevención y tratamiento de estas enfermedades. El enfisema se utiliza como una enfermedad pulmonar ejemplo. El adenovirus se utiliza como un vector ejemplo.

Ejemplo 9

Tratamiento con SP-D purificada

Los ratones SP-D (-/-) se trataron con SP-D de ratón purificada, purificada según se describe a continuación. Los niveles de PC saturados se analizaron en el lavado alveolar y en el lavado de pulmonar total. Las dosis repetidas intratraquealmente a intervalos de 24 horas resultaron en la corrección parcial de la acumulación de lípido después de 3 a 7 dosis, ver figura 12.

La vida media de la SP-D en la vía respiratoria se determinó como 13 horas en ratón (ver figura 13) (la técnica se describe a continuación); por lo tanto, la deficiencia en SP-D se puede tratar mediante la sustitución de la proteína SP-D a un intervalo razonable mediante aerosol o un inhalador particulado o mezclas de tensioactivo.

Purificación de ratón SP-D

Se recogió el fluido de lavado broncoalveolar de ratón (BAL) de ratones mutantes nulo GM-CSF y SP-A doble, se congeló y se guardó para una purificación posterior de SP-D. La maltosil-agarosa (Sigma) se empaquetó en una columna de flujo de gravedad (10 x 80 mm) y se equilibró con regulador que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, cloruro de calcio 10 mM, azida de sodio 0,02% (peso/volumen) (TCB). El BAL se preparó 20 mM con respecto a Tris-HCl y a 10 mM con respecto a EDTA, pH 7,4 y se agitó una hora a temperatura ambiente. La solución turbia se centrifugó a 10.000 x g durante 40 minutos a 4 grados C. El sobrenadante se preparó a 20 mM con respecto al cloruro de calcio y se reajustó a pH 7,4 antes de cargarse sobre la columna de maltosil-agarosa. La columna se lavó hasta la absorbancia de base con TCB seguido del lavado con TCB que contenía cloruro de sodio 1,0 M. La SP-D, que posee un requisito específico para el calcio en la unión a la maltosa se eluyó con cloruro de manganeso 50 mM, Tris-HCl 20 mM, azida de sodio 0,02% (peso/volumen), pH 7,4. Las fracciones que contenían SP-D se determinaron mediante electroforesis de gel de poliacrilamida SDS o mediante un ELISA directo, se reservaron y se dializaron contra los tres cambios de Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 100 mM y EDTA 5 mM, pH 7,4. Este protocolo se adaptó de Strong, Peter, Kishore, Uday; Morgan, Cliff; Bernal, Andres Lopez; Singh, Mamta y Reid, Kenneth B.M.; Journal of Immunological Methods 220 (1998) 139-149.

Tratamiento de ratones con componentes de tensioactivo

Se ha utilizado con éxito una técnica para la intubación ciega oral utilizando tubos de alimentación de 26 g en ratones bajo anestesia con isofluorano para el tratamiento repetitivo de ratones con SP-D diariamente hasta 7 días sin problemas. Esta aproximación evita la cirugía y permite el tipo de experimentos propuestos para la sustitución de SP-D y el tratamiento con las proteínas SP-D mutantes.

Inicialmente los ratones SP-D (-/-) se trataron con ratón SP-D purificada mediante instilación traqueal. Tres o más dosis de 2,9 g de SP-D proporcionadas a intervalos de 24 horas disminuyeron tanto las reservas de PC alveolares como las saturadas (ver figura 14). Esta dosis de SP-D proporcionada es aproximadamente la cantidad presente en la reserva endógena en ratones SP-D (+/+). Dada la clara asociación de pulmón y cinética de depuración, esta es una dosis baja. De este modo la administración exógena de SP-D influencia directamente el metabolismo de lípido de tensioactivo y proporciona un modelo experimental en el que se puede ensayar la función de las moléculas de SP-D modificadas *in vivo*.

Protocolo de vida media biológico

Se ha medido la vida media biológica de la SP-D en ratones para diseñar experimentos para el tratamiento con SP-D. Se yodaron con ¹²⁵I la SP-D de ratón purificada utilizando el reactivo Bolton-Hunter como se ha llevado a cabo anteriormente para la SP-A y las otras proteínas de tensioactivo. La depuración de SP-D de los lavados alveolares de ratones SP-D (+/+) y la SP-D (-/-) fue similar con una vida media de aproximadamente 13 horas (ver figura 13). El $t^{1/2}$ de 17 h para la SP-D en los pulmones de ratones SP-D (-/-) fue algo más largo que el $t^{1/2}$ de 13 horas para los ratones SP-D (+/+).

La deficiencia GM-CSF causa un incremento en la SP-D de 48 veces y el cruce GM-CSF (-/-) x SP-A (-/-) posee un SP-D elevado de forma similar pero no SP-A. Se ha aislado la SP-D de lavados alveolares de ratones GM-CSF (-/-) x SP-A (-/-) en una pureza elevada y en grandes cantidades mediante procedimientos descritos por Persson *et al.* utilizando una columna de afinidad de manosa-Sepharose 6B en presencia de Ca²⁺.

ES 2 311 013 T3

Ejemplo 10

Tratamiento con la SP-D expresada a partir de adenovirus

5 Se construyó un adenovirus nuevo que expresa la SP-D de rata. El virus produjo SP-D en las células y en los pulmones de ratones normales o deficientes de SP-D. Los análisis de transferencia Western mostraron que la SP-D de rata se produjo en 293 células además de en ratones.

Construcción de adenovirus Ad-rSPD (ver figura 14)

10 El tipo salvaje de ADNc de SPD de rata se liberó del plásmido WT-rSPD/pG3Z con digestión de EcoR I y el extremo 3' rellenado con Klenow. Se insertó el ADNc rSPD de 1,3 kB en el sitio EcoR V del plásmido pAvS6a para producir un plásmido pAvS6a-rSPD. El plásmido pAvS6a-rSPD posee un promotor RSV, un ADNc rSPC, una señal SV40 poliA y una secuencia Ad5 (9,24-17,34 mu). El pAvS6a-rSPD no linealizado se cotransfectó en 293 células con
15 Cla I, se digirió un fragmento grande de ADN Ad dl/327 adenovírico, que posee la región E3 (78,5-84,7 mu). Después de la recombinación homóloga, las placas individuales se analizaron mediante el análisis de transferencia de Western para determinar la expresión de la proteína rSPD. Un clon positivo de rSPD se sometió a una ronda de purificación de placa. El adenovirus Ad-rSPD posee delecciones en regiones E1 y E3 y su replicación es deficiente. Después de la amplificación en 293 células, el adenovirus Ad-rSPD se produjo a través de dos rondas de ultracentrifugación por
20 gradiente de CsCl. El adenovirus expresó SP-D y por lo tanto se podría utilizar para restaurar las anomalías pulmonares mediante administración intratraqueal. Por lo tanto, esto permanece como una posibilidad muy positiva para el tratamiento del enfisema y de muchas otras enfermedades por deficiencia de SP-D además de diversas otras formas de daño y deficiencia pulmonar.

25 Ejemplo 11

Tratamiento con SP-D expresada a partir de otros vectores, proteínas o productos farmacéuticos

30 Los requisitos temporales, espaciales y estequiométricos para la SP-D en la restauración de la homeostasis de fosfolípidos se determinaron en el ejemplo 9. Los estudios iniciales para determinar la cinética de depuración de la SP-D se llevaron a cabo con SP-D marcada con ¹²⁵I administrada intratraquealmente; se calculó la vida media y la información se utilizó en el diseño de los experimentos de sustitución de la SP-D. Se aclaró la dosis de la SP-D requerida para conseguir las concentraciones de SP-D fisiológicas normales de la SP-D después de la administración.

35 La administración de la proteína SP-D purificada se utilizó para tratar diversas enfermedades pulmonares en el ejemplo 9. Sin embargo, las anomalías fisiológicas en la enfermedad pulmonar pueden requerir la corrección a largo plazo de la SP-D en los pulmones. Por lo tanto, se utilizarán el adenovirus recombinante u otros vectores genéticos que contienen el gen SP-D mamífero (ver ejemplo 10 y 11). Los vectores de adenovirus recombinantes utilizaron proteína secretoria celular Clara (CCSP) y promotores SP-C para expresar selectivamente la SP-D en compartimientos
40 bronquiolares (célula Clara) y alveolares (célula de tipo II) (ver ejemplo 10). Tres días antes del tratamiento con el vector adenoviral los ratones se inmunosuprimen mediante inyección intraperitoneal con 200 µg de anticuerpo receptor de célula anti-T monoclonal H57. El adenovirus se administró mediante inyección intratraqueal de 5 X 10⁸ PFU de virus. Los niveles de la proteína SP-D se midieron 1 semana después de la administración para detectar la absorción y la expresión del vector. Se ensayaron cuatro ratones y se utilizaron como control los ratones SP-D (-/-) que no
45 recibieron tratamiento. Para ensayar la eficacia de la SP-D en la disminución de los efectos del enfisema, se llevan a cabo un número de ensayos como sigue.

Para determinar los efectos de una proteína o un producto farmacéutico en la estructura de pulmón (ejemplo 11), los pulmones se inflaron fijados y se evaluaron las secciones mediante microscopía electrónica. Los pulmones se
50 inflaron vía una cánula traqueal de 20 cm de presión con 4% de paraformaldehído y se sacaron en bloque del tórax. Los pulmones se deshidrataron y se incrustaron en parafina. Las secciones de tejido (5 µm) se tiñen con hematoxilina y eosina.

Se analizaron el número y la morfología de los macrófagos. La tinción con rojo Nilo detecta vesículas y la tinción
55 con azul Nilo y la excitación con luz verde de 520-550 nm es un procedimiento adicional para detectar lípido o fosfolípido. El número de macrófago se determina mediante marcadores de conteo directo o de superficie celular de macrófago. El tamaño de macrófago se estima a partir del diámetro de macrófagos fijos y teñidos de las preparaciones de citospina sedimentadas sobre portaobjetos de vidrio a 1500 x g durante 2 minutos.

60 La composición de tensioactivo y la ultraestructura se analizan como sigue: la estructura del tensioactivo se analiza mediante el aislamiento de agregados grandes del lavado alveolar de reserva de ratones tratados y no tratados SP-D (-/-) y se examinaron mediante EM. Para el análisis de la composición de fosfolípido de lavado alveolar, se evalúan para la abundancia relativa de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, esfingomiélin y ácido liso-bis-fosfatídico dos de las cuatro muestras que consisten en el lavado de reserva de dos a tres ratones. Se evalúa
65 la incorporación de (³H)colina en el Sat-PC del pulmón total para determinar la concentración de fosfolípido total.

Una vez que se ha determinado la eficacia del tratamiento, se puede ensayar el tratamiento en otros mamíferos adecuados.

Implicación de la SP-D en la infección pulmonar

El papel de SP-D y SP-A en la defensa de huésped en los pulmones se ha demostrado de forma repetida. La SP-A y la SP-D poseen interacciones específicas con microorganismos diversos *in vitro*, modificando la inflamación pulmonar *in vitro* mediante la alteración de la producción de citocina y de radicales libres. Se evaluó *in vivo* el papel de la SP-D en la depuración de bacterias y en la respuesta inflamatoria del pulmón utilizando un modelo de ratón de la deficiencia SP-D. Los ratones deficientes SP-A se conocen que son más propensos a las infecciones. Un número de estudios *in vitro* ha mostrado un papel posible para la SP-D en la defensa del huésped además de su papel en el aumento de la regulación de la SP-A. Los ejemplos 8-11 describen los protocolos de muestra para el ensayo de la SP-D como una terapia en los ratones SP-D (-/-) bacterial o fúngicamente infectados además de en los ratones SP-A (-/-). Los ejemplos 12-14 son experimentos que muestran el papel de la SP-D en la respuesta a la infección bactericida, fúngica y vírica. El ejemplo 13 es un experimento que muestra el efecto de infectar los ratones SP-D (-/-) con el virus sincitial respiratorio.

Ejemplo 12

Depuración de agentes bacterianos de ratones SP-D (-/-)

Los ratones deficientes en SP-D (SP-D -/-) se infectaron de forma intratraqueal con el estreptococo del grupo B (GBS) o el *Hemophilus influenzae* (Hflu) para evaluar la depuración comparada con los ratones de tipo salvaje. Se administró el estreptococo del grupo A a 10^8 CPU. La inflamación pulmonar se evaluó asimismo mediante el análisis del fluido BAL del total de las células (figuras 5, 6 y 7), niveles de citocina en los homogeneizados de pulmón (figura 8), producción de radicales de oxígeno mediante los macrófagos alveolares (figura 11) y los niveles de nitrito en BAL (figura 9).

Los ratones SP-D (-/-) depuraron las bacterias de forma similar al ratón de tipo salvaje (ver figuras 5 y 6). La infección con GBS y Hflu resultó en células totales significativamente mayores en el fluido BAL de los ratones SP-D (-/-) comparados con los ratones de tipo salvaje (figura 7). Las alteraciones selectivas de los niveles de citocina se detectaron en ratones SP-D (-/-). Los niveles del factor de necrosis tumoral (TNF-) y de interleucina (IL)-6 fueron superiores en los homogeneizados de pulmón de los ratones SP-D (-/-) más pronto después de la infección con GBS o Hflu (figura 8). La proteína-2 inflamatoria de macrófago (MIP-2), un quimioatrayente neutrófilo, fue significativamente mayor en los homogeneizados pulmonares de los ratones SP-A (-/-) después de la infección con Hflu pero no con GBS (figura 8). Los macrófagos de los ratones SP-D (-/-) generaron superóxido y peróxido de hidrógeno significativamente mayor que el comparado con los ratones de tipo salvaje (figura 11).

Los niveles de nitrito BAL se incrementaron en los ratones SP-D (-/-) según se compara con los ratones de tipo salvaje. La producción de óxido nítrico se midió como nitrito en BALF. El óxido nítrico juega un papel en la defensa del huésped mediante la contribución a la muerte bactericida. El óxido nítrico reacciona con el superóxido para formar peroxinitrito que es un potente agente bactericida.

En la figura 10 la fagocitosis se evaluó utilizando la microscopía óptica y la citometría de flujo. Los ratones SP-D (-/-) mostraron una fagocitosis de bacterias significativamente reducida según se compara con los de tipo salvaje.

Por lo tanto, en la ausencia de la SP-D se observaron las respuestas inflamatorias aumentadas siguiendo la infección del pulmón con GBS o Hflu. La producción de especies de oxígeno reactivas mediante macrófagos alveolares se incrementó en los ratones SP-D (-/-). Estos resultados apoyan un papel de la SP-D crítico y distinto en las respuestas pulmonares inmunes e inflamatorias a la infección bactericida, *in vivo*.

En el ejemplo 13, los ratones SP-D (-/-) se infectaron con el virus sincitial respiratorio.

Los mecanismos de defensa de huésped han evolucionado para mantener el pulmón limpio de patógenos microbianos incluyendo los mediadores innatos de la limpieza bactericida y vírica y las respuestas inmunes adquiridas.

Ejemplo 13

Depuración de virus de los ratones SP-D (-/-)

Los ratones SP-D (-/-) se infectaron intratraquealmente con el virus sincitial respiratorio (RSV), un patógeno respiratorio común en niños. Se evaluaron los títulos víricos y la inflamación pulmonar en los ratones SP-D (-/-) y en los ratones de tipo salvaje. Los títulos de RSV en los homogeneizados de pulmón se incrementaron significativamente en SP-D (-/-) comparados con los de los ratones de tipo salvaje 3 y 5 días después de la administración. Sin embargo, se encontraron números incrementados significativamente de las células inflamatorias en el fluido BAL de ratones SP-D (-/-) con un porcentaje superior de PMNs comparados con el de los ratones de tipo salvaje, 3 y 5 días después de la infección de RSV. Además, la inflamación de pulmón evaluada mediante histología, 5 días después de la infección de RSV fue superior en SP-D (-/-) comparada con la de los de tipo salvaje. Las citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-1, IL-6 y MIP-2 fue superior en los homogeneizados de pulmón de ratones SP-D (-/-) 3 y 5 días después de la infección de RSV. Los ratones SP-D (-/-) tuvieron menos depuración vírica eficaz del pulmón y se demostraron respuestas inflamatorias mayores después de la infección de RSV que la de los ratones de tipo salvaje. Estos descubri-

ES 2 311 013 T3

mientos demuestran que la SP-D juega un papel importante en la defensa innata y en la regulación de la inflamación del pulmón después de la infección RSV *in vivo*. Se observaron descubrimientos similares después de que la gripe y el adenovirus infectasen el pulmón.

5 Ejemplo 14

Depuración de los hongos de ratones SP-D (-/-)

10 El ratón se infecta como expone a continuación: se utiliza un prototipo adecuado de un patógeno fúngico. El agente infeccioso se purifica como adecuado y se suspende en un regulador adecuado y se administra intratraquealmente con o sin SP-D en el ratón SP-D (-/-) (como en los ejemplos 12 y 13). El prototipo fúngico se administra a una dosis adecuada. Los ratones SP-D (-/-) y SP-D (+/+) se utilizaron para ensayar el efecto de la SP-D en la propensión de los ratones a la infección. Los ratones SP-D (-/-) con o sin proteína SP-D se utilizaron para ensayar la SP-D como una terapia para la infección. La depuración para la infección se evalúa como en los ejemplos 12 y 13 y como sigue.

15 La depuración fúngica se determina mediante la purificación de los homogeneizados del pulmón y del bazo a 6, 24 y 48 horas después de la inoculación en los animales con el agente infeccioso o el agente infeccioso con SP-D. La depuración bactericida del pulmón se determina después de variar las concentraciones SP-D de forma adecuada. Los cultivos cuantitativos se determinan asimismo para los ratones SP-D (+/-) para determinar si el 50% de la reducción de SP-D proporciona suficiente SP-D endógeno para la limpieza bactericida o vírica.

Las concentraciones adecuadas de SP-D mamífero se utilizan en otros mamíferos para el tratamiento de infecciones pulmonares.

25 *Productos farmacéuticos que regulan los niveles de SP-D*

La importancia de la SP-D en la función normal y en el desarrollo del pulmón se demuestra claramente mediante el ratón nulo SP-D (-/-). Por lo tanto, los agentes que regulan la producción, expresión, o la acción de la SP-D son importantes productos farmacéuticos futuros y ayudas experimentales para la identificación adicional de tales productos farmacéuticos. Un experto ordinario en la materia sugeriría muchas técnicas para la identificación de tales agentes. Los ejemplos 15 y 16 describen un protocolo de muestra para dos de estas técnicas. El ejemplo 17 muestra que la IL-4 aumenta notablemente los niveles de SP-D *in vivo* y podría de este modo utilizarse para tratar enfermedades pulmonares con o sin la adición de SP-D.

35 Ejemplo 15

Proteínas que interactúan con el promotor SP-D

Se establece una técnica de un híbrido utilizando el promotor SP-D para identificar proteínas que aumentan la regulación de la expresión de la SP-D. Estas proteínas se ensayan a continuación sobre el ratón SP-D (-/-) para la eficacia en el tratamiento del enfisema y de otras enfermedades e infecciones pulmonares como en el ejemplo 8.

Ejemplo 16

45 *Proteínas que interactúan directamente con la proteína SP-D*

La técnica de dos híbridos se establece para identificar las proteínas que interactúan directamente con la proteína SP-D. Estas proteínas se ensayan a continuación en el ratón SP-D (-/-) para la eficacia en el tratamiento del enfisema y de otras enfermedades e infecciones pulmonares como en el ejemplo 8.

50 Ejemplo 17

IL-4 aumenta los niveles SP-D in vivo

55 Los ratones que expresan IL-4 en células Clara (CCSP-IL-4) desarrollan inflamación crónica de las vías aéreas y un síndrome tipo proteinosis alveolar. Para identificar el papel de la IL-4 en la homeostasis de tensioactivo, se midió el metabolismo del lípido y la proteína en los pulmones de ratones CCSP-IL-4 *in vivo*. Las reservas de fosfatidilcolina saturada alveolar (Sat PC) se incrementaron 6,5 veces y las reservas del Sat PC del tejido del pulmón se incrementaron 4,8 veces en los ratones transgénicos IL-4 (ver figura 15). La SP-D se incrementó aproximadamente 90 veces en los ratones IL-4 comparada con la de los ratones de tipo salvaje y se asoció con 2,8 veces de incremento de ARNm SP-D (figura 15). La incorporación del palmitato y colina en el Sat PC se incrementó aproximadamente 2 veces en ratones CCSP-IL-4. La depuración neta de Sat PC de los pulmones de ratones CCSP-IL4 fue 6 veces mayor (60 mol/kg) en los ratones IL-4 que en los ratones de tipo salvaje (10,3 mol/kg). La expresión de IL-4 en las células Clara incrementó la síntesis y la depuración de lípido de tensioactivo, estableciendo un equilibrio nuevo con reservas de tensioactivo incrementado y una proteinosis alveolar asociada con un incremento selectivo en la proteína SP-D, demostrando un efecto inesperado anteriormente de IL-4 en la homeostasis de tensioactivo pulmonar y en la regulación de los niveles de SP-D mediante IL-4.

Ejemplo 18

Diagnóstico utilizando la proteína o la secuencia SP-D

5 La SP-D es importante en la función y desarrollo normal de pulmón. Los ratones SP-D (-/-) son un modelo para el enfisema. Esto sugiere a continuación que las mutaciones en el gen o alelos del gen para SP-D poseen un efecto profundo sobre la propensión a la enfermedad pulmonar. Por lo tanto, un procedimiento para identificar las mutaciones o alelos, y una proteína mutante identifican individuos en riesgo de enfisema, infecciones pulmonares y un número de otras enfermedades respiratorias. El ejemplo 18 y el 19 son los mismos protocolos para estas técnicas de diagnóstico.

10

Ejemplo 19

Diagnóstico de pacientes con mutaciones en el gen SP-D

15 Las mutaciones en el gen SP-D es probable que estén implicadas en los síntomas y en la etiología del enfisema. Por lo tanto, las mutaciones se identifican mediante análisis de secuencia de un número de pacientes estadísticamente significativo. Estas mutaciones se utilizan para producir un ensayo de diagnóstico. Las mutaciones en el gen SP-D se detectan de las maneras siguientes: se lleva a cabo un análisis PCR del gen SP-D utilizando cebadores adecuados. Los fragmentos de PCR que resultan se analizan mediante SSCP y se secuencian para determinar la mutación o alelo. De
20 manera alternativa, la hibridización diferencial de ADN genómico o de ADNc se utiliza para detectar mutaciones.

Ejemplo 20

Diagnóstico de pacientes con la proteína SP-D mutante

25

Se producen anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen específicamente la proteína mutante SP-D o un alelo de la SP-D asociado con el enfisema u otras enfermedades pulmonares. Estos anticuerpos se utilizan a continuación para establecer un análisis de transferencia unido al enzima para la propensión a estas enfermedades pulmonares. Los anticuerpos del ejemplo 20 se pueden utilizar para este ensayo.

30

El ejemplo 20 presenta un protocolo para la purificación de anticuerpos policlonales o una purificación adicional de anticuerpos monoclonales utilizando la tecnología transgénica.

Ejemplo 21

35

Purificación de los anticuerpos monoclonales y policlonales específicos de SP-D

La producción de anticuerpos policlonales específicos con unos requisitos de reactividad elevados requiere la purificación extensa del antígeno de interés. Se han desarrollado anticuerpos policlonales diversos utilizando antígenos purificados parcialmente para la inyección que han resultado en anticuerpos que poseen un título elevado con respecto al antígeno de interés y son además reactivos a las impurezas. El tejido de fase sólida de ratones transgénicos se han utilizado para eliminar los anticuerpos no específicos de estos antisueros. La proteína D de tensioactivo (SP-D) se purificó utilizando una columna de maltosa con elución de manganeso. La SP-D purificada se inyectó en conejos de Nueva Zelanda en el adyuvante Freund incompleto. Los antisueros que resultaron se ensayaron contra el lavado de pulmón completo en un análisis de transferencia Western, revelando la unión al SP-D y a otras proteínas. Estos antisueros se hicieron reaccionar toda la noche con un homogeneizado de pulmón de fase sólida a partir de un ratón mutante nulo que no produce ninguna proteína SP-D. El antisuero se hizo reaccionar contra el lavado de pulmón completo después de la absorción mostrando reactividades solo contra la SP-D. Estos antisueros se evaluaron asimismo en experimentos de inmunohistoquímica que demostraron muy bajas reactividades a las secciones pulmonares de ratones mutantes nulos SP-D y reactividades celulares de tipo II muy específicas en los ratones de control normales. Esta técnica incrementa grandemente la capacidad de preparar anticuerpos elevadamente específicos con títulos elevados y elimina la necesidad de utilizar agentes bloqueadores cuando se utilizan anticuerpos absorbidos.

50

Estos anticuerpos se podrían utilizar para el diagnóstico, purificación e investigación adicional de la proteína SP-D.

55

Ejemplo 22

SP-D inhibe la infección vírica

60 Los resultados anteriores (ejemplo 13) mostraron que la SP-D posee un papel en la depuración de RSV de pulmones de ratones. Por lo tanto, fue de interés ver si la SP-D poseía un papel similar en la depuración de otros virus.

Los ratones SP-D (-/-) se infectaron intratraquealmente con el virus de la gripe A y de forma separada con adenovirus. Se evaluaron los títulos víricos y la inflamación del pulmón en ratones SP-D (-/-) y en ratones de tipo salvaje. Los títulos de la gripe A en los homogeneizados de pulmón incrementaron significativamente en SP-D (-/-) comparados con los de los ratones de tipo salvaje a 3 y 5 días después de la administración. Los números incrementados significativamente de células inflamatorias se encontraron en el fluido BAL de ratones SP-D (-/-) con un mayor porcentaje de PMNs comparada con los ratones de tipo salvaje, después de la infección de la gripe A.

65

ES 2 311 013 T3

Por lo tanto, los ratones deficientes en SP-D son propensos a la infección vírica de la gripe A *in vivo* y desarrollan respuestas inflamatorias de pulmón notablemente incrementadas al virus y la SP-D se une al adenovirus *in vitro* y jugará probablemente un papel en la depuración de adenovirus *in vivo* también.

5 Ejemplo 23

SP-D inhibe las especies de lípido reactivas

10 El tensioactivo deficiente en SP-D ha incrementado los intermedios de oxígeno-lípido (reactantes lipídicos tóxicos). De este modo, la SP-D inhibe las especies lipídicas reactivas en el espacio aéreo y puede poseer beneficios potenciales para la mejora de la enfermedad mediada por oxígeno reactivo, daño pulmonar inducido químicamente, oxígeno, ozono, agentes quimioterapéuticos y enfermedades inflamatorias, daño de reperfusión, ahogo, trasplante y rechazo.

15 Las especies de oxígeno reactivas se midieron mediante el kit para el ensayo de hidroperóxido lipídico (LPD) (Caymen chemicals, cat. n° 705002). El tensioactivo se aisló de ratones SP-D con inactivación génica y de tipo salvaje de mediante lavado pulmonar y se midieron los productos de peroxidación de lípido utilizando reacciones redox con iones ferrosos. No se detectaron peróxidos lipídicos en el tensioactivo de ratones de tipo salvaje (n=4) pero se detectaron fácilmente en el fluido de lavado de ratones SP-D (-/-) $0,896 \pm 0,305$ ng del producto de peroxidación lipídico/mg de fosfolípido (n=4).

20 Ejemplo 24

SP-D inhibe la infección vírica

25 Los resultados anteriores (ejemplo 13) mostraron que la SP-D posee un papel en la depuración de RSV de los pulmones de ratones. Por lo tanto, fue de interés ver si la SP-D posee un papel similar en la depuración de otros virus.

30 Los ratones SP-D (-/-) se infectaron intratraquealmente con el virus de la gripe A y de forma separada con adenovirus. Se evaluaron los títulos víricos y la inflamación del pulmón en ratones SP-D (-/-) y en ratones de tipo salvaje. Los títulos de la gripe A en los homogeneizados de pulmón se incrementaron significativamente en los ratones SP-D (-/-) comparados con los de los ratones de tipo salvaje a los 3 y 5 días después de la administración. Los números incrementados significativamente de las células inflamatorias se encontraron en el fluido BAL de ratones SP-D (-/-) con un porcentaje superior de los PMNs comparado con el de los ratones de tipo salvaje, después de la infección con la gripe A.

35 Por lo tanto, los ratones deficientes en SP-D son propensos a la infección vírica de la gripe A *in vivo* y desarrollan respuestas inflamatorias de pulmón notablemente incrementadas al virus y la SP-D se une al adenovirus *in vitro* y desempeñará probablemente un papel en la depuración de adenovirus *in vivo* también.

40

45

50

55

60

65

ES 2 311 013 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una formulación de aerosol que comprende una proteína SP-D de mamífero aislada en la preparación de un medicamento para incrementar la depuración de partículas víricas causadas por un adenovirus de pulmón.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho medicamento puede reducir los síntomas de la enfermedad vírica.
- 10 3. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho medicamento puede reducir el título vírico.
4. Utilización según la reivindicación 3, en la que dicha enfermedad vírica es una enfermedad vírica pulmonar.
5. Utilización según la reivindicación 4, en la que dicho medicamento puede reducir la inflamación pulmonar.
- 15 6. Utilización según la reivindicación 4, en la que dicho medicamento puede reducir el título vírico pulmonar.
7. Utilización según la reivindicación 4, en la que dicho medicamento es adecuado para ser administrado mediante administración pulmonar.
- 20 8. Utilización según la reivindicación 7, en la que dicha administración pulmonar es por inhalación.
9. Utilización según la reivindicación 7, en la que dicho medicamento comprende además por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por: un broncodilatador, una antihistamina, epinefrina, un antibiótico y pentamidina.
- 25 10. Utilización según la reivindicación 7, en la que dicho medicamento es adecuado para administrarse en una dosis única.
- 30 11. Utilización según la reivindicación 7, en la que dicho medicamento es adecuado para administrarse en dosis múltiples.
12. Utilización según la reivindicación 7, en la que dicho medicamento se prepara en una formulación de liposoma.
- 35 13. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha SP-D se expresa a partir de un vector.
14. Formulación de aerosol que comprende una proteína SP-D de mamífero aislada para el incremento de la depuración de partículas víricas causadas por un adenovirus de pulmón.
- 40 15. Formulación de aerosol según la reivindicación 14, en la que dicha formulación puede reducir los síntomas de la enfermedad vírica.
16. Formulación de aerosol según la reivindicación 14, en la que dicha formulación puede reducir el título vírico.
- 45 17. Formulación de aerosol según la reivindicación 16, en la que dicha enfermedad vírica es una enfermedad vírica pulmonar.
18. Formulación de aerosol según la reivindicación 17, en la que dicha formulación puede reducir la inflamación pulmonar.
- 50 19. Formulación de aerosol según la reivindicación 17, en la que dicha formulación puede reducir el título vírico pulmonar.
20. Formulación de aerosol según la reivindicación 17, en la que dicha formulación es adecuada para ser suministrada mediante administración pulmonar.
- 55 21. Formulación de aerosol según la reivindicación 20, en la que dicha administración pulmonar es por inhalación.
22. Formulación de aerosol según la reivindicación 20, en la que dicha formulación comprende además por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por: un broncodilatador, una antihistamina, epinefrina, un antibiótico y pentamidina.
- 60 23. Formulación de aerosol según la reivindicación 20, en la que dicha formulación es adecuada para administrarse en una dosis única.
- 65 24. Formulación de aerosol según la reivindicación 20, en la que dicha formulación es adecuada para administrarse en dosis múltiples.

ES 2 311 013 T3

25. Formulación de aerosol según la reivindicación 20, en la que dicha formulación preparada en una formulación de liposoma.

5

26. Formulación de aerosol según la reivindicación 14, en la que dicha SP-D se expresa a partir de un vector.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

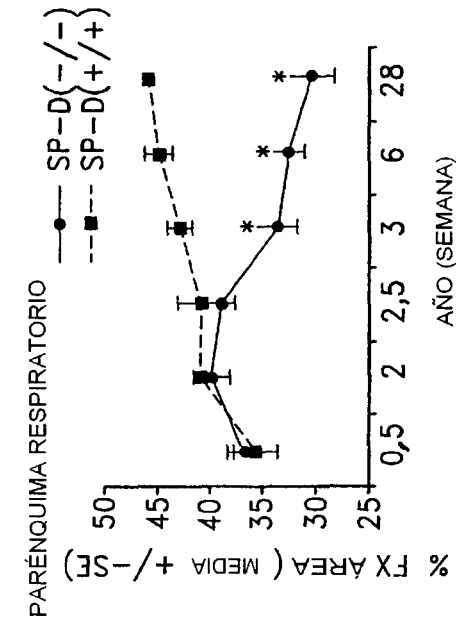


FIG. 1A

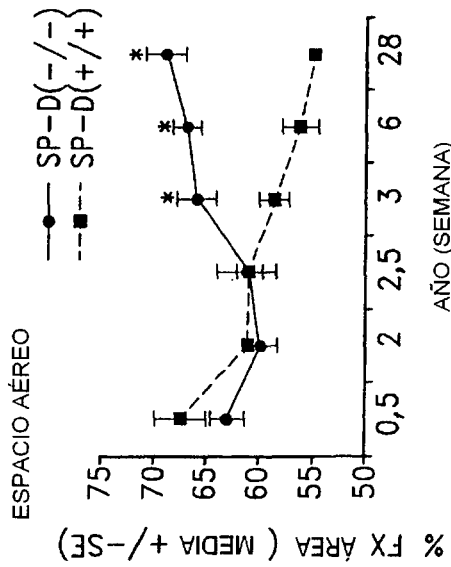


FIG. 1B

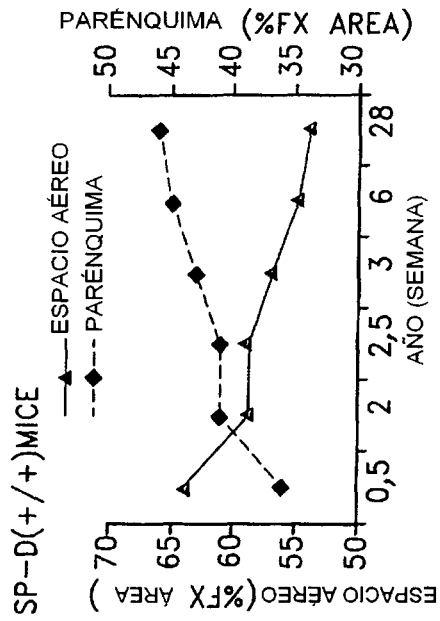


FIG. 1C

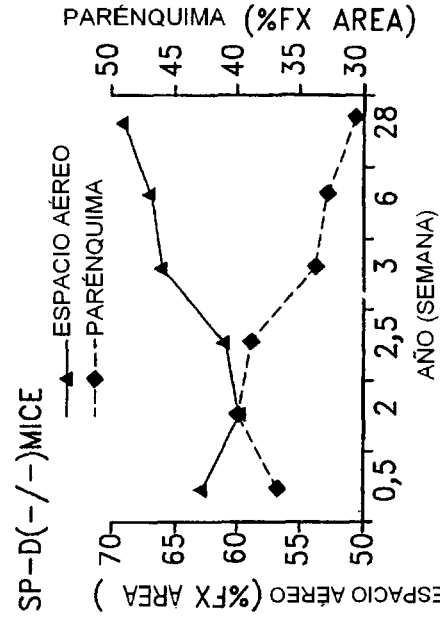


FIG. 1D

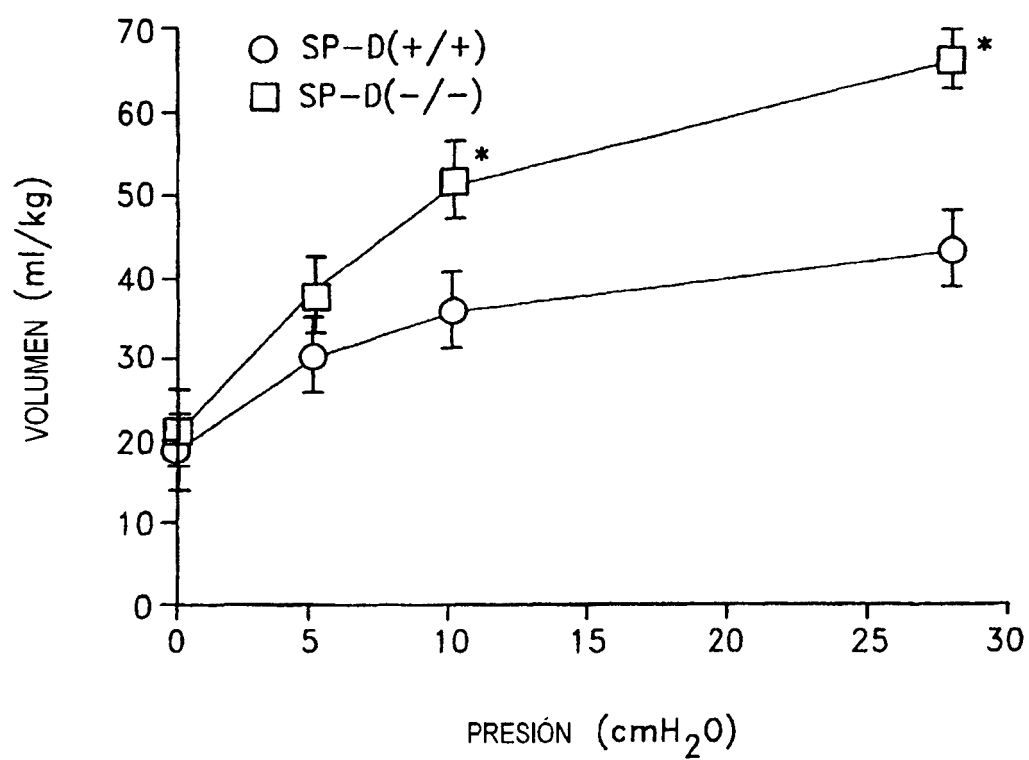


FIG.2

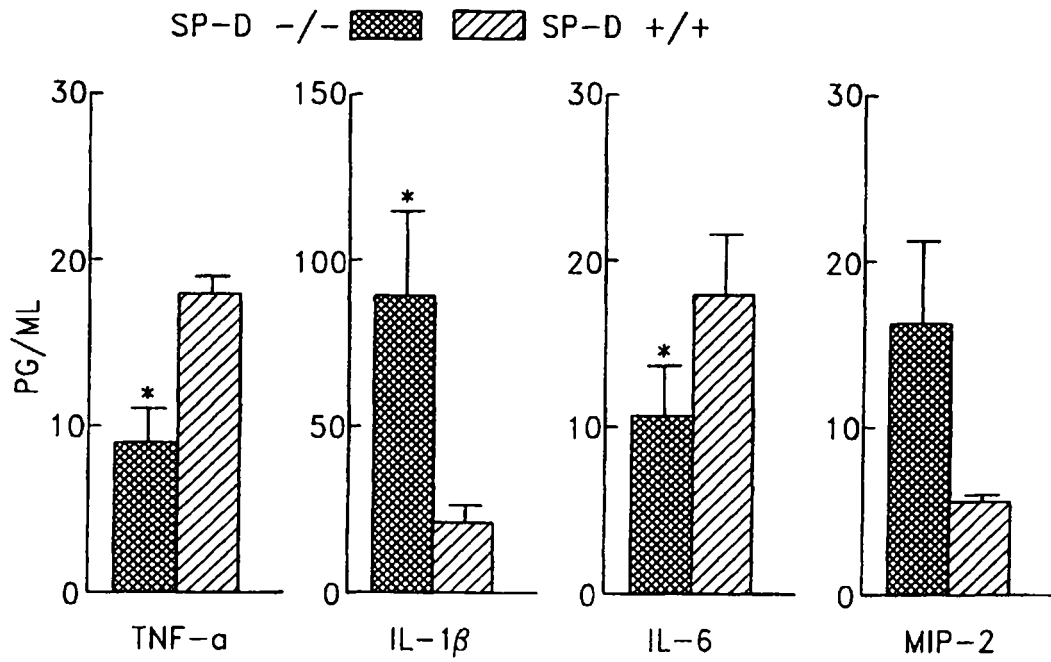


FIG.3

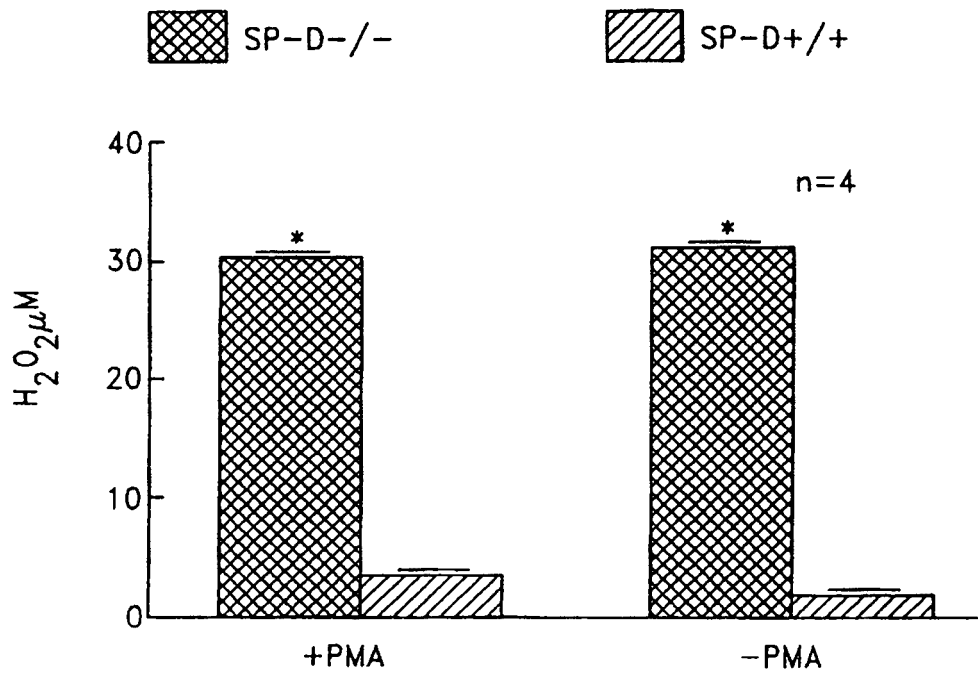


FIG. 4

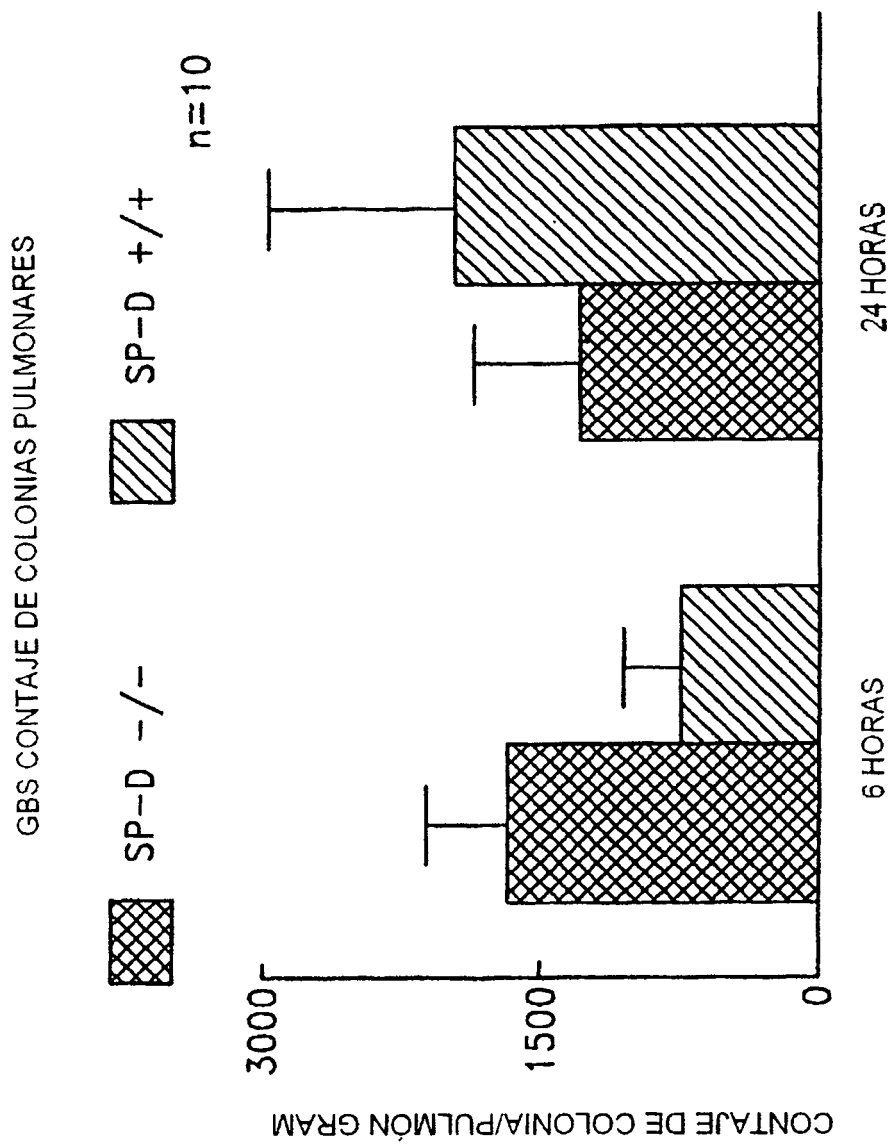


FIG.5

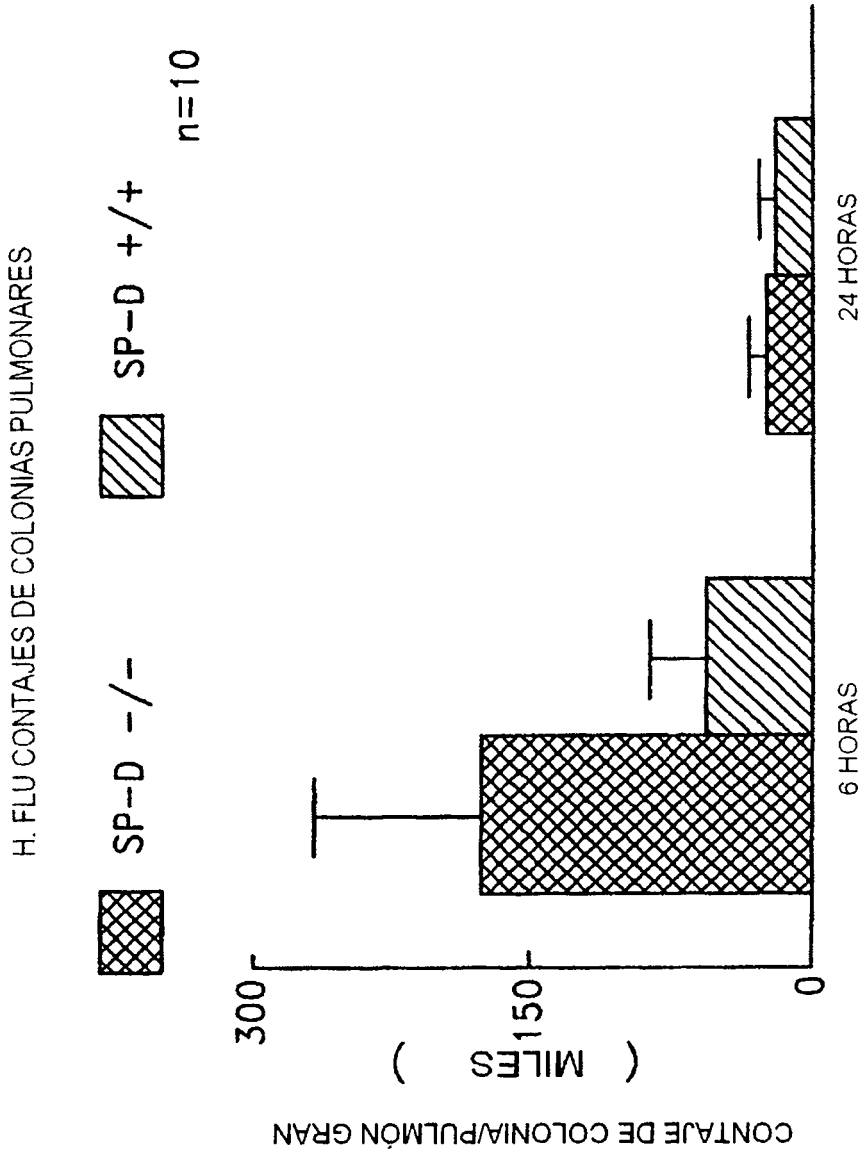


FIG.6

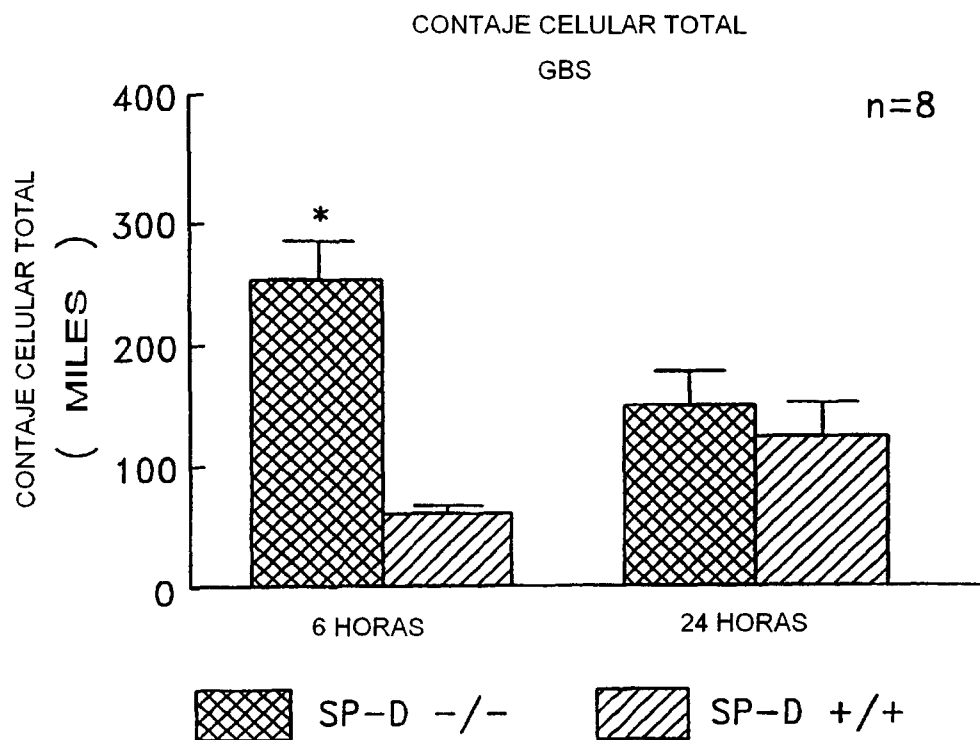


FIG. 7A

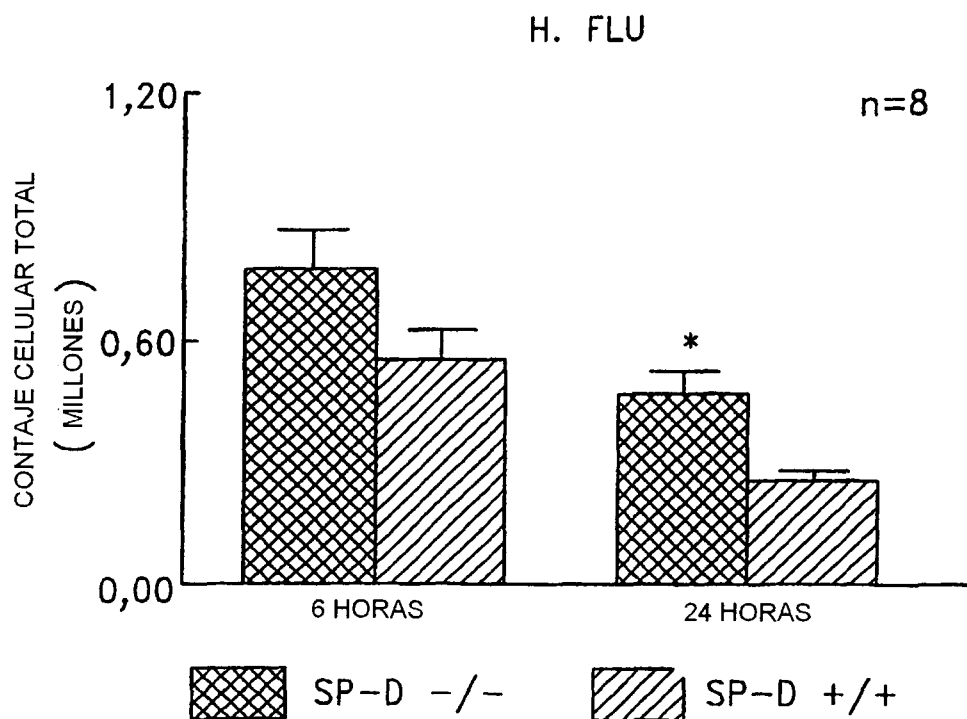


FIG. 7B

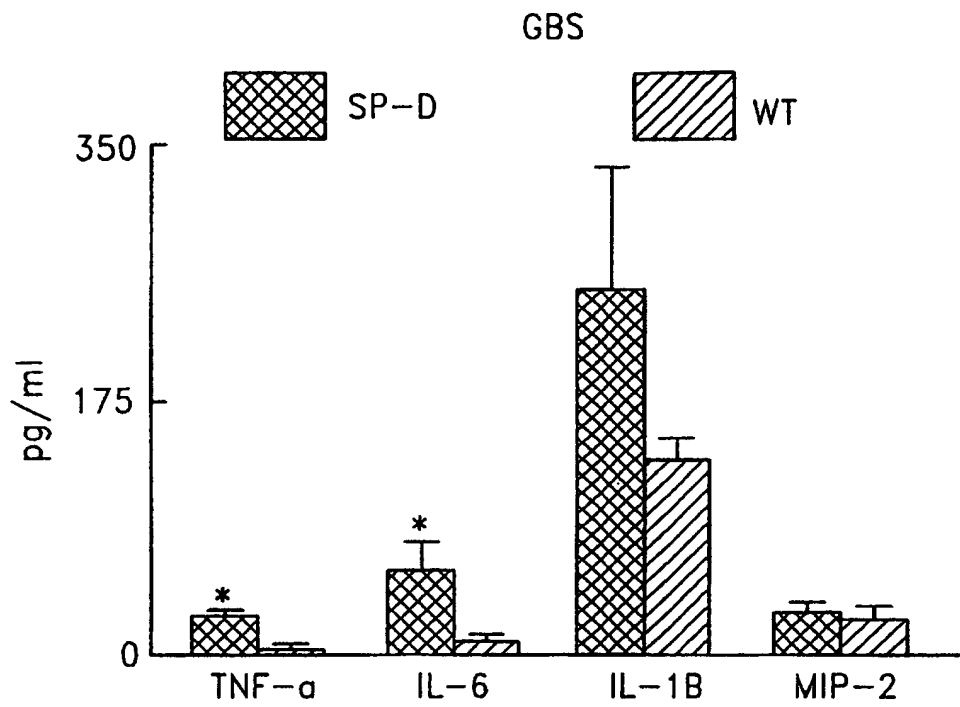


FIG. 8A

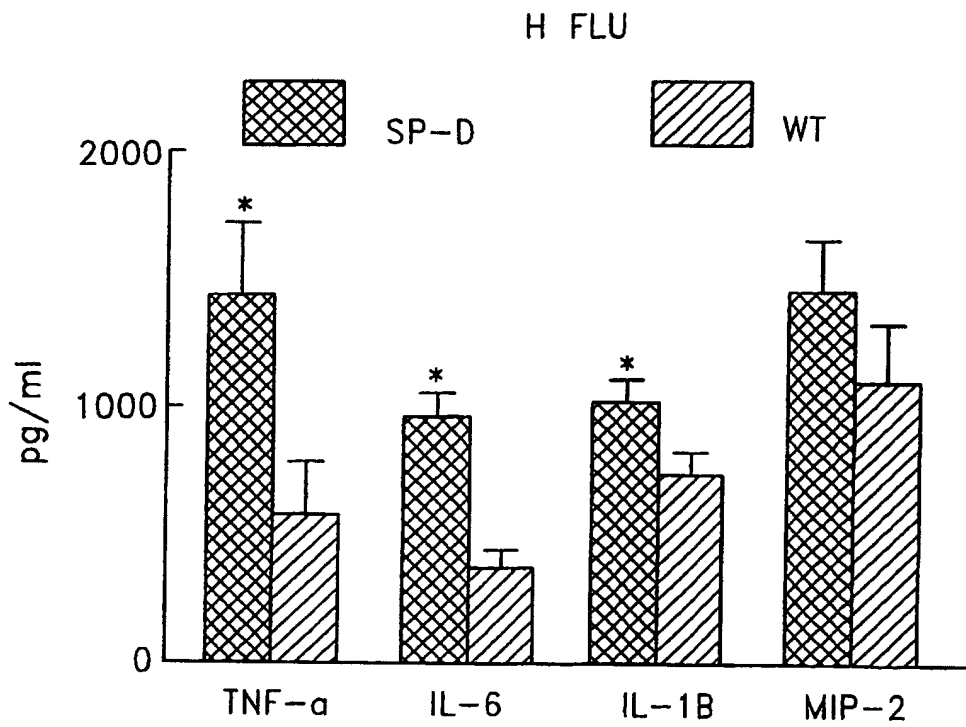


FIG. 8B

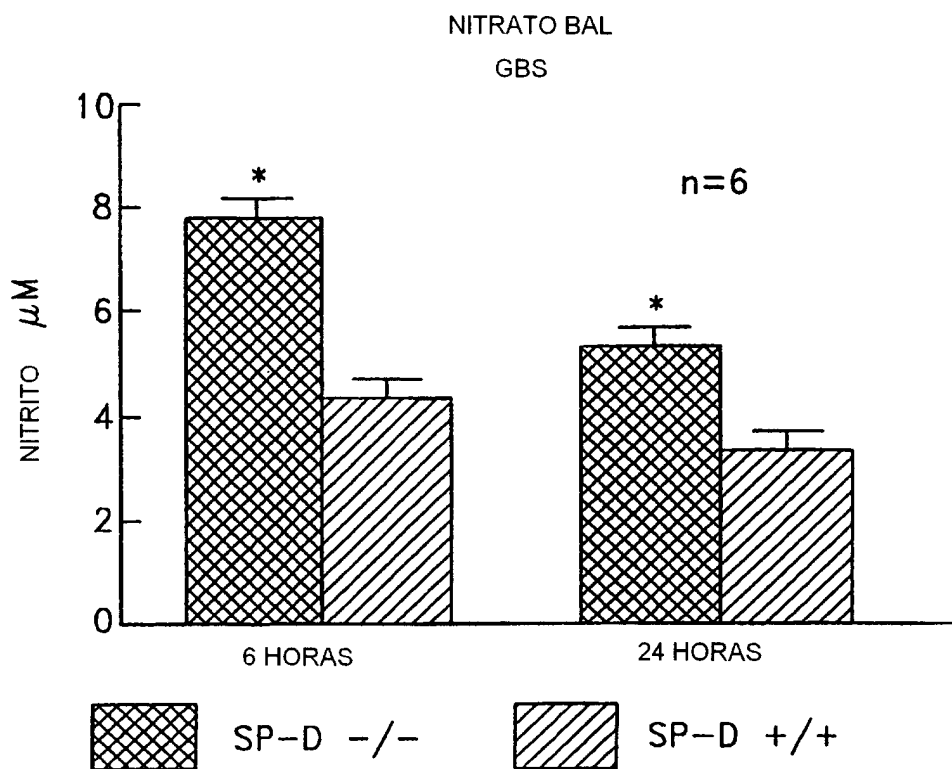


FIG.9A

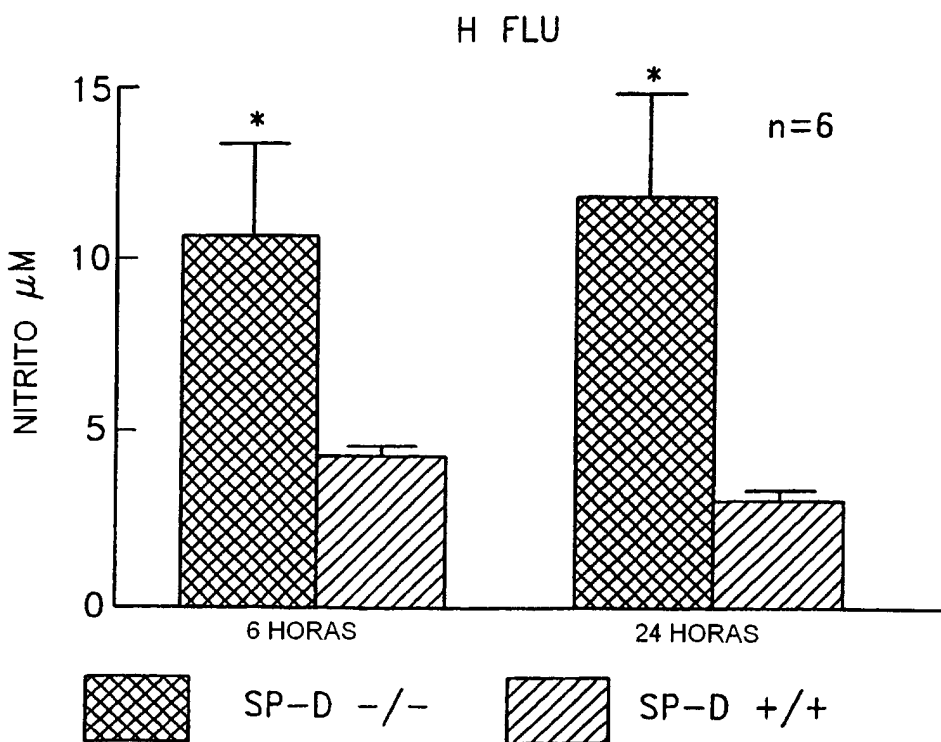


FIG.9B

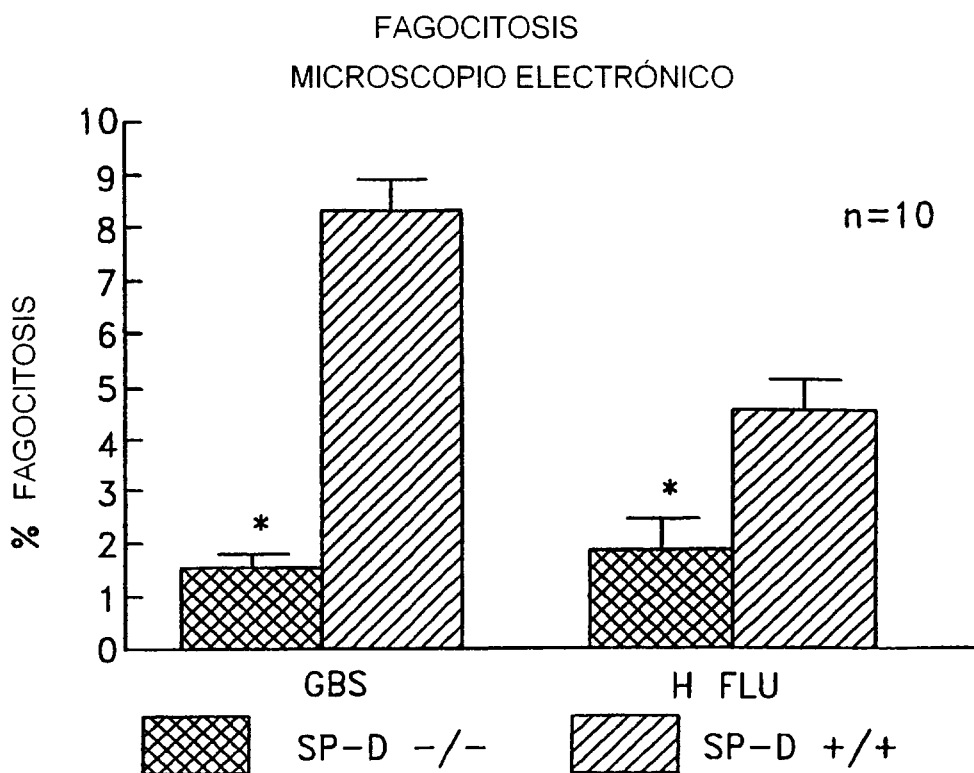


FIG. 10A

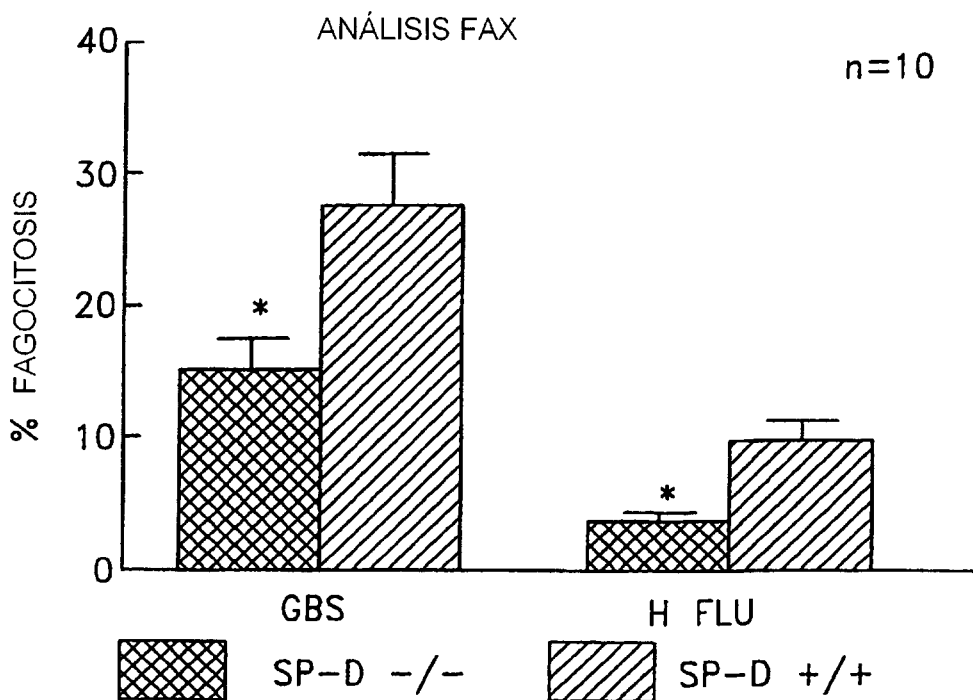


FIG. 10B

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO
GBS

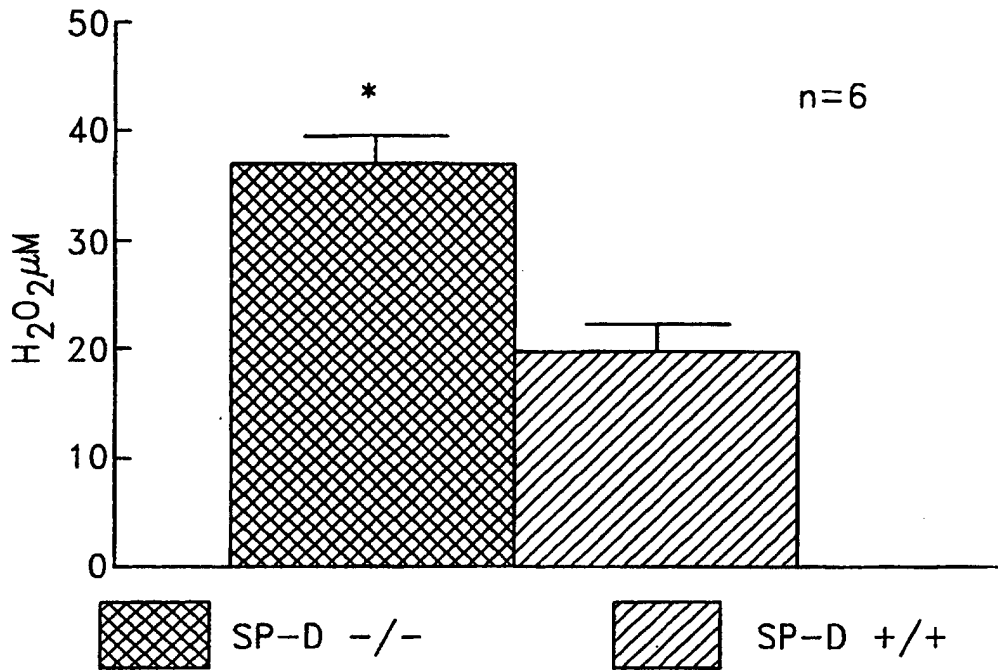


FIG. 11A

SUPERÓXIDO DE GBS

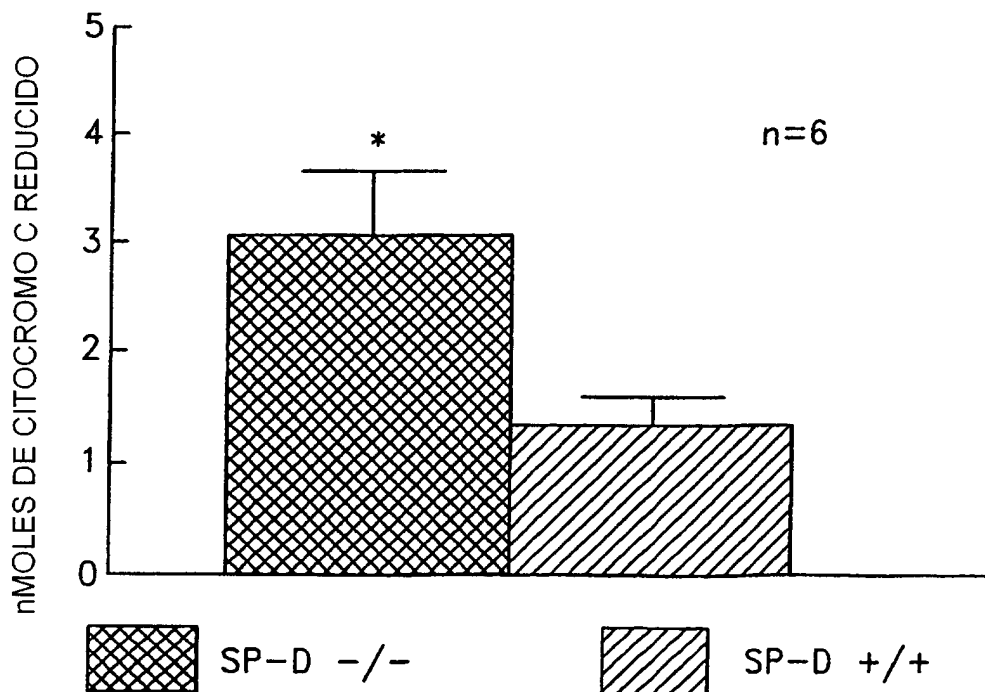


FIG. 11B

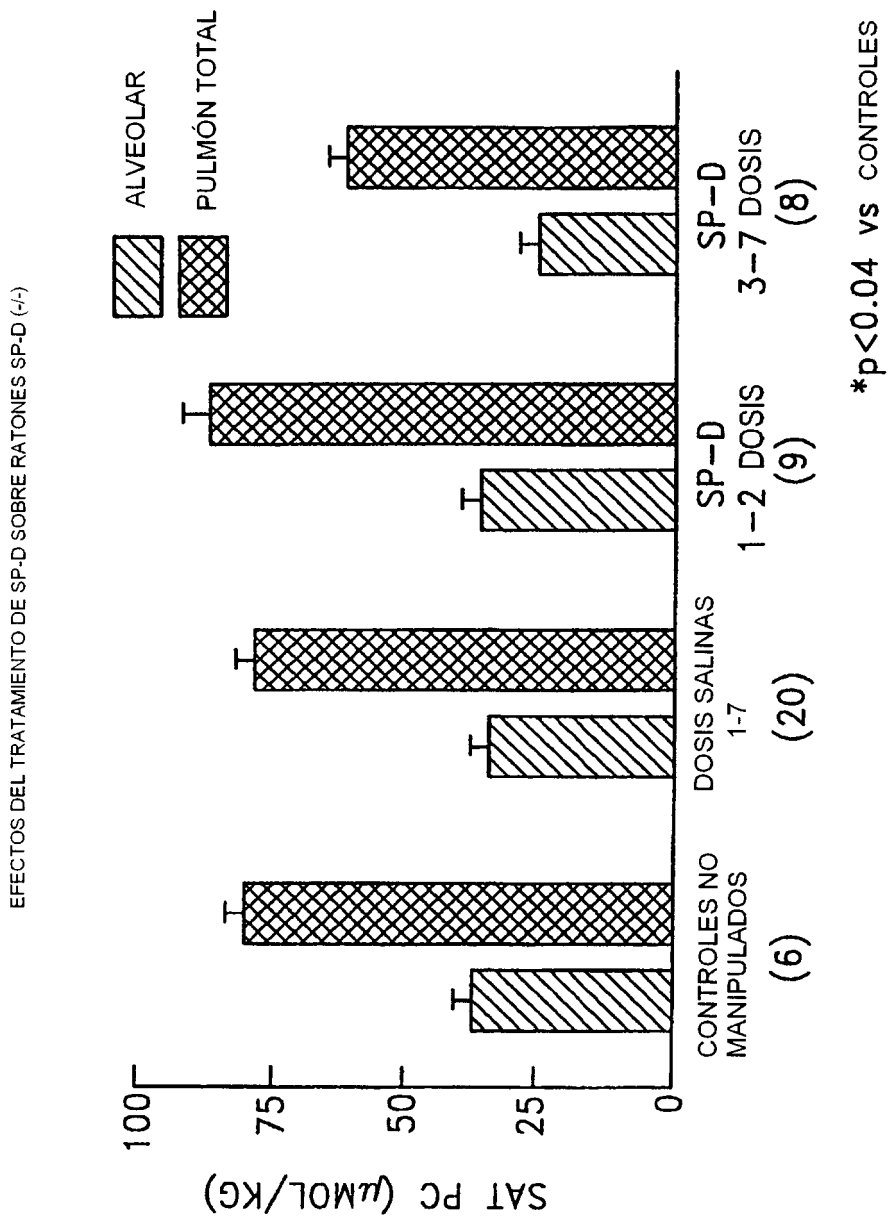


FIG. 12

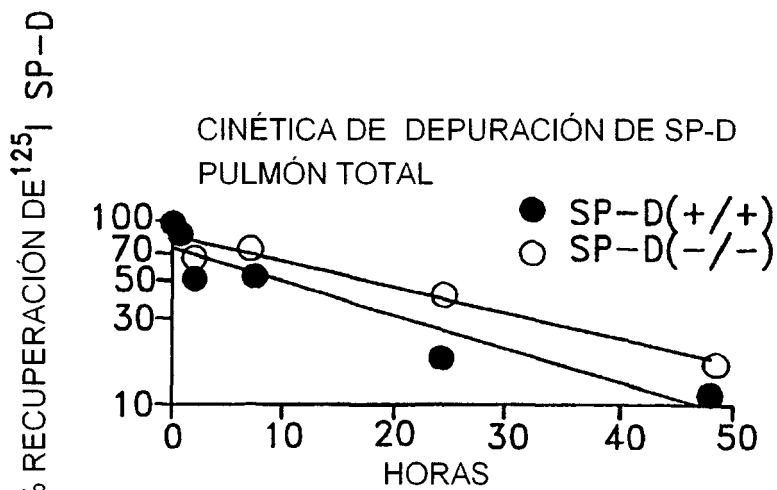


FIG. 13A

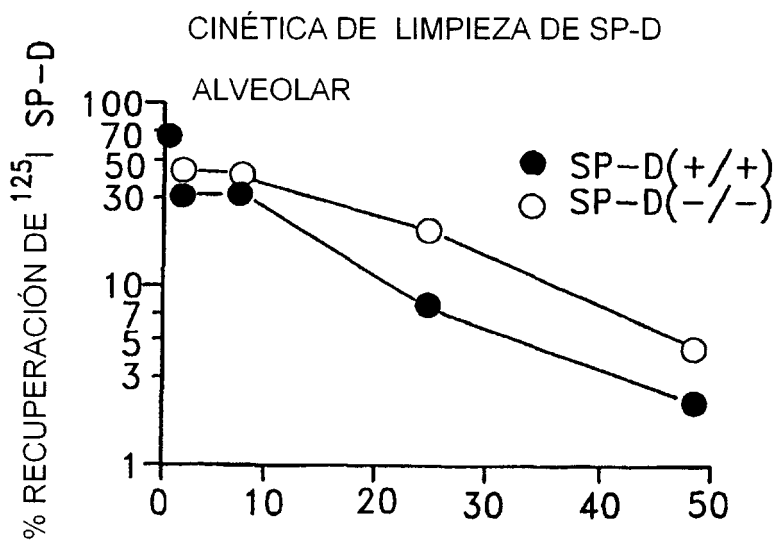


FIG. 13B

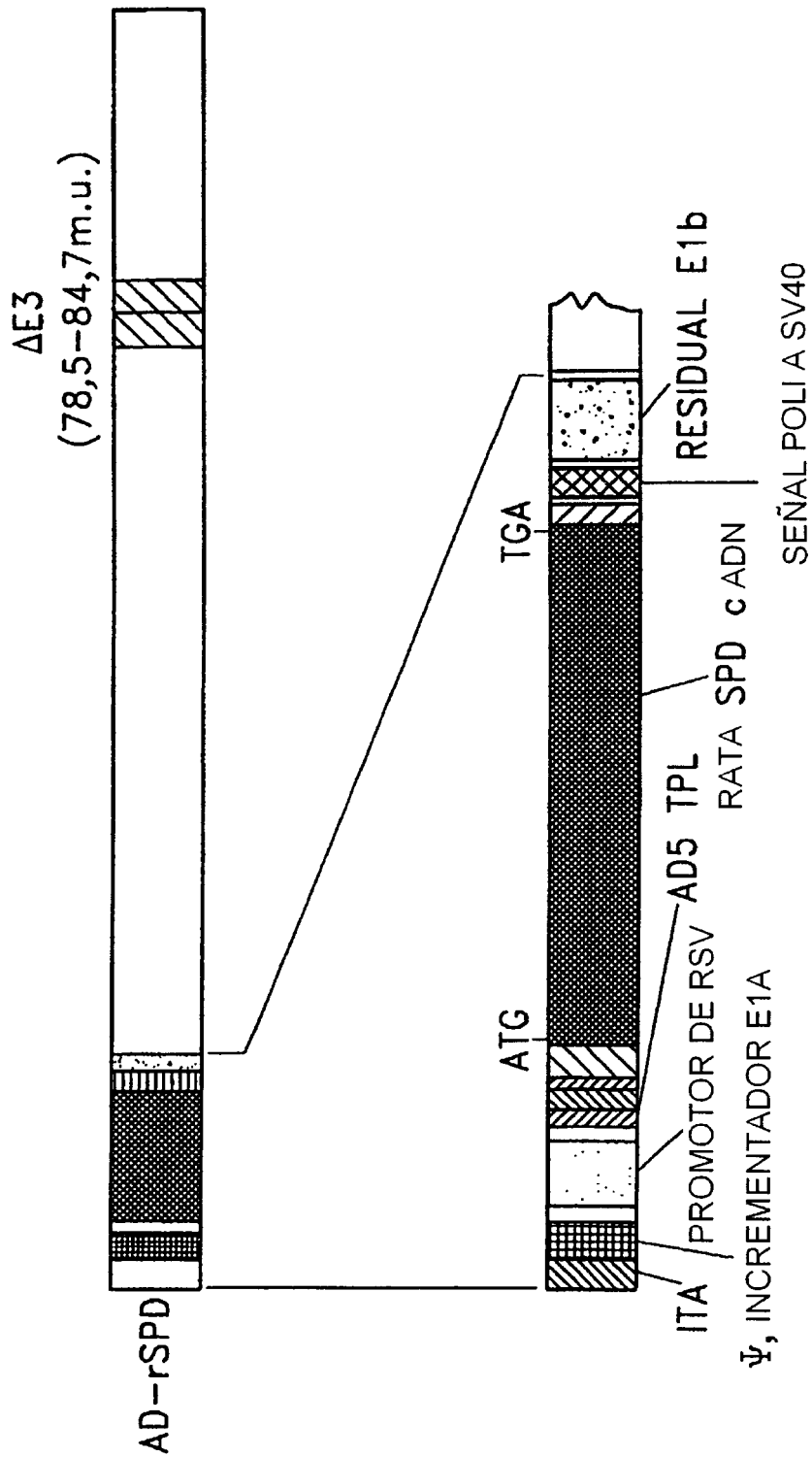


FIG.14

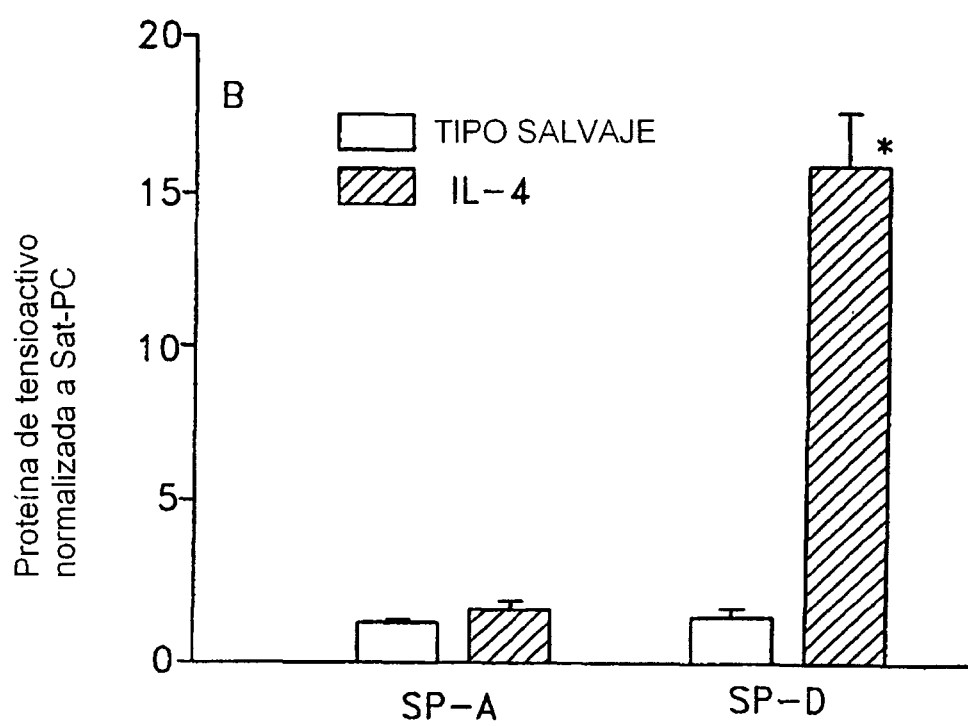


FIG. 15

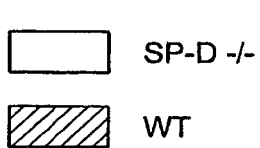
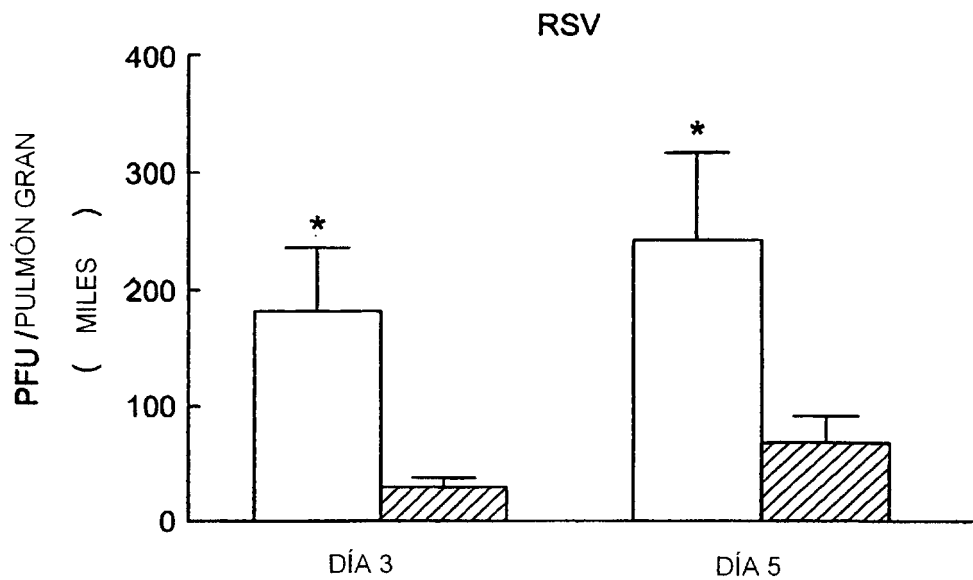


FIG. 16A

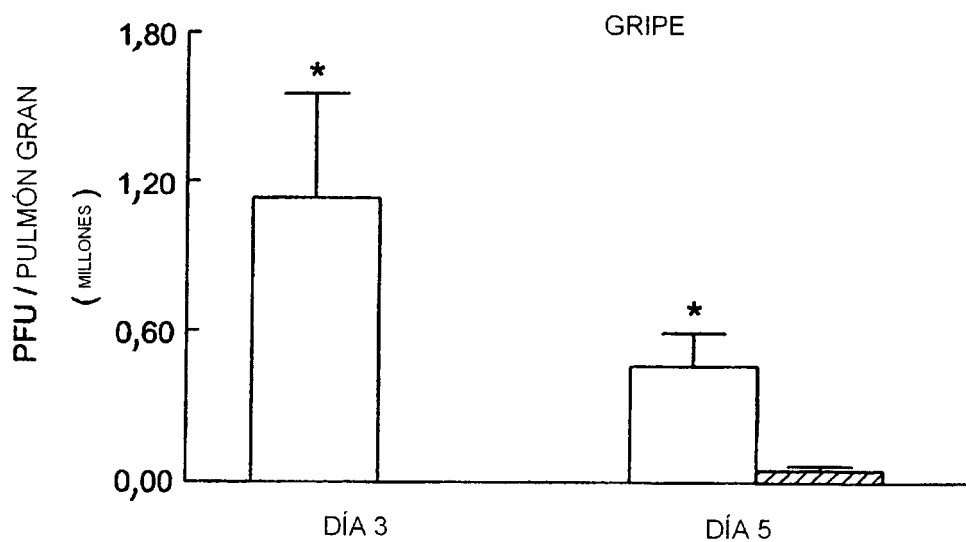


FIG. 16B

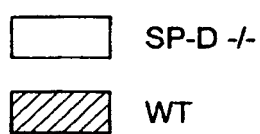
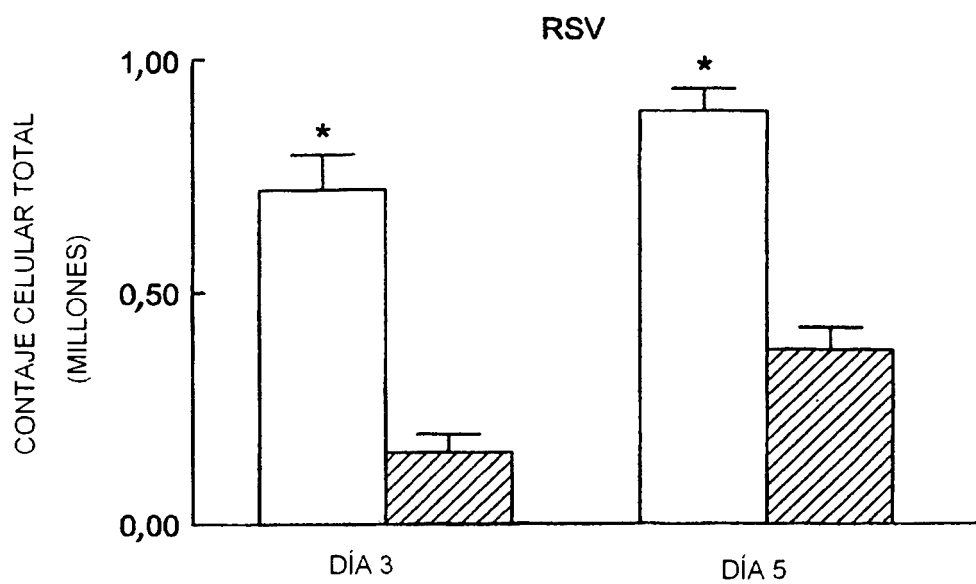


FIG. 17A

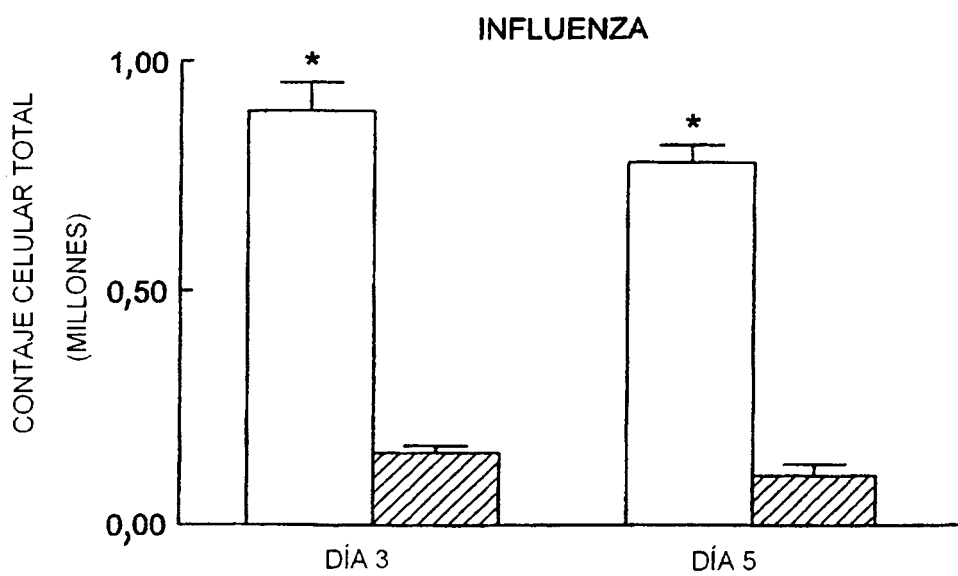


FIG. 17B

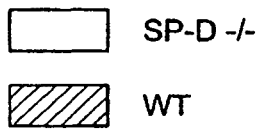
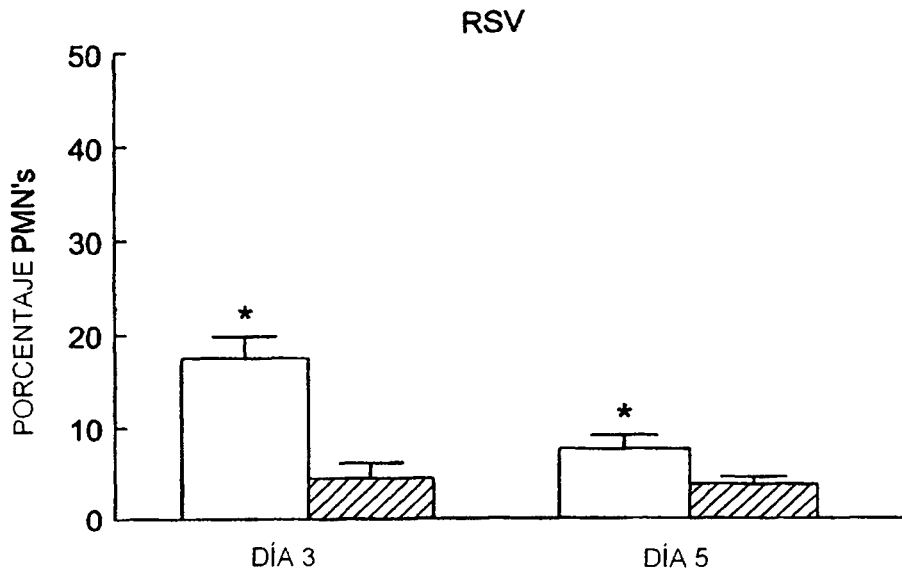


FIG. 18A

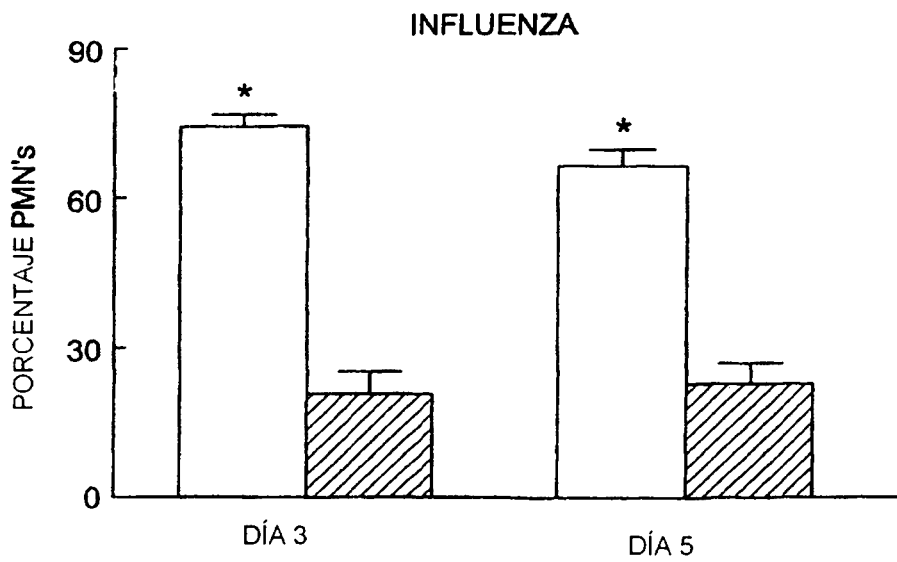


FIG. 18B