



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 311 307**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/785 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99958659 .7**

96 Fecha de presentación : **20.10.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1123383**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2001**

54

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

30

Prioridad: **20.10.1998 US 104941 P**

73

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

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2009

72

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

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2009

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 311 307 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 D surfactante para la prevención y el diagnóstico del enfisema pulmonar.

5 **Interés del gobierno en la invención**

Algunos de los aspectos de la invención dada a conocer en la presente memoria se realizaron con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos y con la subvención del National Institutes of Health, HL 41320, SCOR HL 56387, HL 28623, HL 58795 y HL 03905. El gobierno de los Estados Unidos posee ciertos derechos sobre estos aspectos de la invención.

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al campo de las proteínas biológicamente activas. Más específicamente, la presente invención se refiere a las proteínas SP-D implicadas en la homeostasis y estructura del surfactante pulmonar, y en la estructura alveolar en los pulmones y en las SP-D de ratones knockout.

Antecedentes de la invención

En los pulmones normales, el surfactante pulmonar es esencial para la mecánica y el intercambio de gases en el pulmón. El surfactante pulmonar lo producen las células epiteliales de tipo II y está compuesto de un componente fosfolípido que confiere al surfactante la capacidad de disminuir la tensión superficial en el pulmón. Además, existen proteínas asociadas con el surfactante denominadas colectinas que son colágenos, de dominios tipo lectina que contienen polipéptidos. Dos de estas, las denominadas proteína surfactante A (SP-A) y proteína surfactante D (SP-D), están implicadas con toda probabilidad en la estructura y la función del surfactante y en el sistema inmunológico del huésped. Las deficiencias tanto cuantitativas como cualitativas del surfactante pulmonar están asociadas a insuficiencias respiratorias neonatales, al síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos, a deficiencias congénitas de la proteína B surfactante, y al asma alérgico. Además, la deficiencia en el surfactante pulmonar puede contribuir al incremento de la susceptibilidad de algunos individuos a agresiones microbiales, especialmente en el establecimiento de una inmunidad específica inadecuada o deficiente. Estos trastornos así como algunos trastornos asociados con el aumento de riesgo de neumonía (fibrosis quística, asma, prematuridad, bronquitis crónica, daño alveolar difuso) pueden estar asociados también con los defectos adquiridos o deficiencias en la función de la colectina. Los grupos de surfactantes alveolares están regulados a múltiples niveles incluyendo la síntesis intracelular, la secreción, la recaptación y la degradación de estos compuestos mediante macrófagos alveolares. La síntesis y el aclaramiento de fosfolípidos y proteínas surfactantes están influenciados además por el desarrollo, los estímulos mecánicos y humorales que sirven para mantener las concentraciones de surfactante en un estado estable después del nacimiento.

Se ha investigado extensamente el papel de las colectinas en un surfactante y en una función pulmonar normal. La familia de colectinas de lectinas de tipo-C incluye un número de moléculas con funciones de defensa del organismo conocidas. La SP-A y la SP-D, también lectinas de tipo-C, se unen al virus del herpes simple y al de la gripe así como a las bacterias gram-positivo y gram-negativo y a varios hongos. Mediante la unión, mejoran la captación mediante los macrófagos y neutrófilos alveolares. Se han identificado varios lugares de unión celular para la SP-A y la SP-D en macrófagos alveolares o, en el caso de la SP-A, en las células epiteliales de tipo II. El importante papel de la SP-A en las funciones inmunológicas del huésped fue respaldado por la observación de que los ratones deficientes en SP-A son susceptibles a las infecciones por estreptococos del grupo B, *Pseudomonas aeruginosa*, virus sincitial respiratorio, adenovirus y microplasma *in vivo*. Por consiguiente, la SP-A desempeña un papel claro y la SP-D tiene un papel similar en los mecanismos de defensa respiratorios. Las colectinas también pueden participar en el reconocimiento o la eliminación de otros materiales orgánicos complejos, tales como los alérgenos del polen y los ácaros. Sin embargo, hasta la fecha no se han asociado enfermedades en humanos con las deficiencias específicas de SP-A y SP-D.

La SP-D es una proteína de 43 kilodaltons de la que se ha sugerido que juega un papel en el sistema inmunológico del huésped en los pulmones. Su ADNc y su gen han sido secuenciados en varios mamíferos incluyendo en los humanos. La SP-D comparte una homología estructural considerable con otras lectinas de tipo C, incluyendo la proteína surfactante A (SP-A), la conglutinina, la colectina bovina 43, y la proteína de unión a la manosa. Los estudios *in vitro* y su relación estructural próxima a una familia de la lectina dependiente de Ca^{2+} en mamíferos (particularmente grupos estructurales compartidos) apoyan su papel en el mecanismo de defensa del huésped. La SP-D se sintetiza fundamentalmente y a concentraciones relativamente elevadas por las células epiteliales de Tipo II y las células epiteliales bronquiolares no ciliadas en el pulmón pero también se pueden expresar en el aparato gastrointestinal, el corazón, el riñón, el páncreas, el aparato genitourinario y las células mesentéricas. Los estudios *in vitro* han demostrado que la SP-D se une a la superficie de los organismos a través de su dominio lectina (o el dominio de unión al azúcar) que conduce a la unión, agregación, opsonización y, en algunos casos, a la activación de la destrucción por fagocitos *in vitro*. La SP-D se une a los lipopolisacáridos, a varias bacterias, a hongos y virus, incluyendo el virus de la gripe. También se une tanto a macrófagos alveolares como a células polimorfonucleares. Posiblemente juega un papel en la homeostasis de los fosfolípidos surfactantes, incluyendo los efectos de la SP-A en el metabolismo de los fosfolípidos mediante las células de Tipo II *in vitro*, sin embargo, esto es controvertido y el papel preciso de la SP-D *in vivo* todavía no está claro.

Los estudios *in vitro* apoyan el concepto de que las proteínas surfactantes pueden ser importantes en la regulación de la homeostasis del surfactante. Aunque las proteínas surfactantes hidrofóbicas SP-B y SP-C juegan un papel en la producción de la monocapa del surfactante, los estudios *in vitro* indican que la proteína surfactante A también puede facilitar la captación y/o la secreción del surfactante mediante las células epiteliales de tipo II. De hecho, se había creído mayoritariamente que la SP-A tendría un papel importante en la homeostasis del surfactante. Sin embargo, estudios recientes de la SP-A en ratones knockout no han apoyado el papel principal de la proteína surfactante A en la secreción o recaptación del surfactante. La ausencia de SP-A no conduce a anomalías estructurales fisiológicas o morfológicas claras en el pulmón. Los ratones knockout para la SP-A carecen de figuras de mielina tubulares pero producen un surfactante altamente funcional que se absorbe rápidamente y produce monocapas. La síntesis de lípidos en el surfactante, la secreción y la recaptación fueron esencialmente normales en ratones knockout para la SP-A.

Por consiguiente, la proteína surfactante adicional que actúa en la regulación del surfactante todavía no se ha identificado. Además, el papel preciso de la SP-D en la función pulmonar normal no se ha definido claramente hasta el momento y su papel en la susceptibilidad a las enfermedades no está claro.

Botas *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Vol. 95 págs. 11869-11874), da a conocer la generación de ratones deficientes en SP-D.

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

Kuan *et al.* (J. Clin. Invest., 1992, Vol. 90, págs. 97-106) investiga las interacciones de la SP-D con lipopolisacáridos bacterianos.

Crouch *et al.* (J. Biol. Chem., 1993, 5, 268(4), págs. 2976-2983) describe la organización genética de la SP-D.

Wang *et al.* (Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998, Vol. 158, págs. 510-518) da a conocer que la SP-A y la SP-D pueden inhibir la liberación de histamina en la fase temprana del alérgeno, provocando la supresión de la proliferación de linfocitos en la fase final de la inflamación bronquial.

El documento WO 91 00871 da a conocer la preparación de composiciones surfactantes pulmonares estables.

El documento WO 94 23582 A da a conocer unos vectores adenovirales que codifican para la SP-A, la SP-B y la SP-C.

Johansson *et al.* (Eur. Resp. Jour., 1994, 7 : págs. 372-391) da a conocer los papeles estructurales y funcionales de la SP-A, la SP-B, la SP-C y la SP-D.

Van Iwaarden *et al.* (Biochem., 1992, 286: págs. 5-8) da a conocer que una rata con SP-D mejora la producción de radicales de oxígeno mediante macrófagos alveolares de la rata.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un ratón SP-D (-/-) que se puede utilizar como modelo para el enfisema. Anteriormente no se sabía que la proteína SP-D estaba implicada en la homeostasis lipídica del pulmón. Tampoco se sabía que un ratón knockout presentaría síntomas de enfisema.

Según un aspecto de la presente invención se da a conocer la utilización de una proteína aislada SP-D de mamífero, o vectores que expresan la proteína SP-D de mamíferos en la preparación de una formulación en aerosol para el tratamiento del enfisema.

En una forma de realización, el enfisema se ha desarrollado después de una lesión pulmonar crónica.

En otra forma de realización, la proteína SP-D se administra intra-traquealmente.

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

Breve descripción de las figuras

Figuras 1A -1D: Comparación de los cambios en áreas fraccionadas (% área Fx) de la vía aérea (a) y de parénquima respiratorio (b) con la edad en un ratón SP-D (-/-) y los controles SP-D (+/+) emparejados por edad. Análisis de los cambios de dichos parámetros con la edad para cada genotipo individual (c y d). Los datos se expresan como % de las áreas fraccionadas y representan la media \pm DS.

Figura 2: Ramas de descenso de las curvas de presión-volumen de ratones SPD (+/+) y SP-D (-/-). Los datos se expresan como ml/kg y representan la media \pm DS.

ES 2 311 307 T3

Figura 3: Citoquinas proinflamatorias en los homogeneizados de pulmón en ratones SP-D (-/-). Las concentraciones de TNF- α , IL-6 y MIP-2 en los homogeneizados de pulmón se evaluaron a partir de ratones SP-D (-/-) (barra oscura) y SP-D (+/+) (barra rayada). Los datos se expresan como pg/ml y representan la media \pm SE con n = 5 ratones por grupo; * p < 0,05 comparado con ratones SP-D (+/+).

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

Figura 5: Recuento de las colonias pulmonares en ratones SP-D (-/-) y SP-D (+/+) después de infectarse con *Streptococo* del Gpo B (GBS).

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

Figuras 7A y 7B: Recuento total de células del fluido de lavado Broncoalveolar (LBA) después de infectarse con GBS y H. flu.

Figuras 8A y 8B: Niveles de citoquinas en los homogeneizados pulmonares después de infectarse con GBS y H. flu.

Figuras 9A y 9B: Niveles de nitrito del LBA después de infectarse con GBS y H. flu.

Figuras 10A y 10B: Fagocitosis analizada mediante un microscopio óptico y análisis FACS después de infectarse con GBS y H. flu.

Figuras 11A y 11B: Niveles de peróxido y superóxido de hidrógeno en macrófagos aislados del LBA después de infectarse con GBS y H. flu.

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

Figura 13A y 13B: Cinéticas de aclaramiento del lavado pulmonar y alveolar total de la proteína SP-D en ratones.

Figura 14: Vector adenoviral Ad-iSPD que contiene ADNc de la SP-D de rata.

Figura 15: Cuantificación de inmunoblots de la SP-A y la SP-D en los lavados alveolares de ratones salvajes y ratones CCSP.IL-4 (ratón IL-4). p < 0,01.

40 Descripción detallada de la invención

Hemos producido un ratón knockout SP-D (-/-) para identificar el papel de la SP-D en la función y el desarrollo pulmonares normales y para demostrar la progresión temporal del aumento de la vía aérea postnatal y los cambios inflamatorios espontáneos en los pulmones en estos ratones. Los ratones SP-D (-/-) desarrollan un enfisema pulmonar progresivo, asociado con una inflamación crónica y un aumento de la producción de oxidante por los macrófagos alveolares. Las anomalías pulmonares convierten a este ratón en 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 del volumen del pulmón, se necesita el modelo urgentemente. Basándonos en el modelo del ratón para el enfisema, hemos propuesto algunas maneras para ensayar la proteína SP-D y los vectores de expresión, y los fármacos potenciales en el modelo de ratón para probar la eficacia en el tratamiento del enfisema u otras formas de lesión pulmonar crónica. También hemos propuesto la utilización de la proteína SP-D y los vectores de expresión para el tratamiento de otras muchas enfermedades de producción aberrante del surfactante, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, lesión pulmonar, exposición al oxígeno/tóxicos, infección, exposición aumentada a un oxidante. Finalmente, hemos propuesto la utilización del ADNc de la SP-D, anticuerpos de la SP-D, PCR, y técnicas de hibridación diferencial para identificar a pacientes con riesgo de enfisema, síndromes de insuficiencia pulmonar y otros tipos de enfermedades respiratorias. Aunque se pueden utilizar otros materiales y procedimientos similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación. El Ejemplo 1 describe las etapas necesarias para producir el ratón SP-D (-/-).

ES 2 311 307 T3

TABLA 1

Comparación de pesos corporales, volumen pulmonar, y proporciones volumen-a-peso corporal (media ± DS)

EDAD	PESOS CORPORALES		VOLUMENES PULMONARES		VP:PC	
	(g)		(ml)		(ml/g x 10 ²)	
	SPD (-/-)	SP-D (+/+)	SPD (-/-)	SP-D (+/+)	SPD (-/-)	SP-D (+/+)
2° día	1,8 ± 0,1*	3,4 ± 0,1	ND	ND	ND	ND
5° día	3,7 ± 0,3	4,8 ± 0,2	ND	ND	ND	ND
7° día	3,9 ± 0,2*	5,3 ± 0,2	ND	ND	ND	ND
14° día	6,6 ± 0,2*	7,7 ± 0,2	ND	ND	ND	ND
17° día	10,9 ± 0,5	10,6 ± 0,7	0,36 ± 0,02	0,36 ± 0,03	3,25 ± 0,05	3,36 ± 0,03
3 sem	10,9 ± 0,5*	14,1 ± 1,2	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,03	3,43 ± 0,21**	2,50 ± 0,18
6 sem	23,2 ± 0,6	24,7 ± 0,5	0,63 ± 0,03	0,58 ± 0,02	2,71 ± 0,13**	2,25 ± 0,18
9 sem	25,2 ± 1,2	27,8 ± 1,3	0,55 ± 0,03	0,61 ± 0,02	2,10 ± 0,16	2,20 ± 0,09
28 sem	36,9 ± 4,3	31,2 ± 1,6	0,67 ± 0,09	0,58 ± 0,06	2,03 ± 0,51	1,86 ± 0,10

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

Ejemplo 1

Construcción del ratón knockout SP-D (-/-)

Los ratones SP-D (-/-) se generaron mediante la inactivación dirigida del gen. La integración de un vector diana pGKneo que contenía secuencias para el exón 2 del gen de la SP-D generó una delección en el segundo exón del gen de la SP-D, que incluyó la extracción de la metionina de iniciación y la traslación de las secuencias de iniciación. La secuencia del gen de los exones 1 y 2 del ratón SP-D se pueden encontrar bajo el N° de acceso AF047741 del Genbank. El vector diana se diseñó utilizando un pGKneo mediante la subclonación primero de un fragmento genómico de extremos romos de 5,1 kb acabado en HindIII KpnI que codifica para el intrón 2 a través del exón 6 en un sitio KpnI entre el casete de resistencia a la neomicina y el casete de timidina quinasa. Seguidamente, se cortó un fragmento genómico de 1,5 kb PstI que contenía una porción del intrón I con ligandos XhoI y se clonó en un sitio XhoI en 5' del casete de resistencia a la neomicina. Ocho de los 104 clones ES que sobrevivieron el proceso de doble selección se marcaron satisfactoriamente tal como se determinó mediante los análisis por PCR de 5' y 3'. El clon 93, un clon altamente indiferenciado y proliferado, se expandió y se inyectó en blastocitos C57/B16 generando machos quiméricos. Los machos quiméricos se cruzaron con hembras Swiss Negras NIH. Se obtuvo una hembra portadora del gen marcado y se cruzó con machos Swiss Negras NIH para generar ratones SP-D (-/-) y SP-D (±) normales. La distribución de los genotipos de las parejas heterocigóticas siguieron un patrón Mendeliano, con 30 (+/+), 45 (+/-), y 25% (-/-) de 115 descendientes, indicando que no existían anomalías evidentes en la supervivencia relacionada con los alelos de SP-D.

Los ratones SP-D (-/-) sobrevivieron y se criaron normalmente en un estabulario bajo unas instalaciones de contención mediante barreras en el Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio. Los ratones no presentaban ningún virus tal como indicaba el análisis serológico. No se detectó ninguna evidencia serológica de infección vírica en los ratones SP-D (-/-) durante la necropsia.

Para determinar el genotipo, se digirió ADN de fragmentos terminales con BamHI y se sondearon con un producto derivado de la PCR del ADN genómico de ratón, que contenía el exón 2 y una parte del intrón 2, y con el ADNc del clon de resistencia G418. Esto demostró una pérdida simultánea del exón 2 con la aparición de unas secuencias que codifican para la resistencia G418 en ratones SP-D (±) y SP-D (-/-).

Para demostrar que la SP-D no se expresaba en animales "knockout", se realizó un análisis de transferencia de ARN con un ARN total de pulmón de animales knockout, normales y heterocigóticos. Los resultados mostraron una

ES 2 311 307 T3

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

El análisis mediante Western blot de los homogeneizados de pulmón utilizando antisuero SP-D de conejo antiratón reveló que la SP-D se redujo aproximadamente un 50% en ratones SP-D (+/-) heterocigóticos y no se encontró en ratones SP-D (-/-).

Tanto los ratones SP-D (-/-) como los SP-D (+/-) sobrevivieron de forma normal en los periodos perinatal y postnatal. Se obtuvieron los pesos del cuerpo, los pulmones y el corazón, a las edades seleccionadas, mediante una medición directa; y los volúmenes de los pulmones y el corazón se obtuvieron mediante el desplazamiento de fluidos. Se evaluó el contenido de proteínas pulmonares y el ADN utilizando albúmina sérica bovina 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 a los de los ratones SP-D (+/+) después de las 3 semanas de edad, Tabla 1. Aunque que los volúmenes pulmonares no fueron significativamente diferentes, las proporciones de volumen pulmonar - peso corporal aumentaron en los ratones SP-D (-/-) a las 3 y a las 6 semanas de edad, Tabla 1. No se observaron diferencias significativas en el volumen cardíaco o en las proporciones de volumen cardíaco - peso corporal. En el periodo maduro (5 meses), no se apreciaron cambios en el peso pulmonar húmedo, en el ADN pulmonar total o en las proteínas.

Sin embargo, aunque que no se observó ninguna anomalía en el peso corporal, los ejemplos 2 hasta el 5 describen las otras anomalías o cambios encontrados en los ratones SP-D (-/-).

El ejemplo 2 demuestra el efecto en los niveles de fosfolípidos. Los niveles de fosfolípidos alveolares y tisulares, especialmente los niveles de depósitos de fosfatidilcolina, aumentaron considerablemente mientras que los niveles de proteínas en el lavado broncoalveolar total (LBA) se mantuvieron sin cambios.

Ejemplo 2

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

La fosfatidilcolina, alveolar, tisular y saturada total (Sat-PC) ($p < 0,001$) aumentó aproximadamente 3 veces en ratones SP-D (-/-). Los niveles de Sat-PC en ratones SP-D (+/-) no se alteraron. Para el análisis de la composición de lavado de fosfolípido alveolar, se evaluaron de dos a cuatro muestras consistentes en el lavado acumulado de dos a tres ratones para comprobar la abundancia relativa de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, esfingomielina, y ácido liso-bis-fosfatídico. La composición fosfolípida no fue diferente entre los genotipos. La incorporación de (^3H)colina en la Sat-PC pulmonar total se incrementó ligeramente 8 horas después de la inyección, siendo la incorporación aproximadamente un 20% mayor en los ratones SP-D (-/-) ($p < 0,05$).

Este resultado fue completamente inesperado ya que los trabajos anteriores sugerían un papel definitivo para la SP-A y un papel limitado para la SP-D en la homeostasis de fosfolípidos pulmonares. Las enfermedades anteriores asociadas a la homeostasis del surfactante implicaban unas acumulaciones tanto de proteínas surfactantes como de lípidos, por consiguiente el ratón knockout SP-D (-/-) demuestra por primera vez que la SP-D es un factor importante en la homeostasis del lípido surfactante y que la homeostasis del lípido surfactante y de la proteína se pueden disociar *in vivo*, ya que la concentración total de proteínas en el surfactante no cambió. Sin embargo, se encontró una disminución moderada en la concentración total de SP-A tal como se explica en el Ejemplo 3.

Ejemplo 3

Reducción de los niveles de SP-A en el Ratón SP-D (-/-)

No se observaron diferencias en los ARNm SP-B y SP-C o en las proteínas en ratones SP-D (-/-). Por el contrario, la hibridación con Northern blot del ARN pulmonar total en ratones SP-D (+/+), SP-D (+/-) y SP-D (-/-) y la hibridación con una sonda SP-A mostraron que el ARNm SP-A se redujo en ratones SP-D (-/-). En concordancia con la reducción en ARNm SP-A, la proteína LBA SP-A se redujo aparentemente aproximadamente un 25% en ratones SP-D (-/-) como mostró la evaluación mediante un análisis por Western blot del lavado alveolar en tres ratones.

Por consiguiente, la SP-D juega un papel en la regulación de la producción de la SP-A. Como la SP-A está implicada en el sistema inmunológico del huésped en los pulmones, la SP-D puede afectar al sistema inmunológico del huésped de dos maneras. Mediante la sobre-regulación de la producción de la SP-A y mediante la interacción directa con las células inmunológicas y microbianas.

La ultraestructura del material rico en fosfolípido aislado a partir del LBA de los ratones SP-D (-/-) se evaluó tal como se explica en el Ejemplo 4.

Ejemplo 4

Cambios en la estructura del surfactante en ratones SP-D (-/-)

5 Se aisló un agregado grande del surfactante a partir del lavado alveolar acumulado de ratones SP-D (-/-) y SP-D (+/+) y se examinó mediante EM utilizando la técnica que se resume a continuación. Los agregados lipídicos en ratones SP-D (-/-) se ampliaron y se organizaron en matrices de fosfolípidos opacas a los electrones y contenían menos mielina tubular en comparación con los ratones SP-D (+/+). La ultraestructura resultó ser considerablemente anormal, presentando unas cantidades reducidas de mielina tubular y formando unas estructuras lipídicas únicas densamente empaquetadas. Por consiguiente, la SP-D juega un papel en la organización estructural de los lípidos alveolares.

15 *Formas de los agregados del lavado alveolar.* El surfactante en el lavado alveolar se puede separar en fracciones de un agregado grande (pesado, denso) o de un agregado pequeño (ligero, vesicular) mediante centrifugación. Los lavados alveolares se centrifugaron a 40.000 x g sobre un gradiente de sacarosa 0,8M durante 15 minutos. Después, se extrajo de la interfaz el agregado grande de surfactante, se diluyó con solución salina normal y se centrifugó otra vez a 40.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante de la primera centrifugación a 40.000 x g que contiene el agregado pequeño del surfactante se concentra a 4°C mediante ultrafiltración utilizando un filtro de retención de peso molecular de 300.000 (Minitan, Miliore Corp., Bedford, MA) o concentradores centrífugos (Amicon Corp., Danvers, MA). El agregado pequeño del surfactante se diluye con 50 ml de solución salina normal y se ultrafiltró 3 veces para extraer las proteínas solubles.

20 Finalmente, se analizó la estructura del pulmón. Aunque, es normal en ratones SP-D (+/+), se observó un aumento del número de macrófagos alveolares grandes esponjosos y de alvéolos agrandados en ratones SP-D (-/-). En el Ejemplo 5 se resumen el procedimiento y los resultados de la identificación de anomalías pulmonares.

Ejemplo 5

Anormalidades pulmonares en los ratones SP-D (-/-)

30 Para determinar si la ausencia de la expresión de la SP-D conduce a anomalías estructurales se fijaron por inflación los pulmones de ratones knockout, normales y heterocigóticos, y se realizó el análisis morfológico e histoquímico en secciones mediante un microscopio óptico. No se encontró ninguna evidencia de infección ni ninguna alteración obvia en las células epiteliales de las vías respiratorias al nivel del microscopio óptico. Sin embargo, se observaron de forma consistente anomalías heterogéneas en el parénquima pulmonar, con alvéolos agrandados, en los SP-D (-/-) pero no en los SP-D (+/-) o en los controles SP-D (+/+).

Procedimiento morfológico e histoquímico

40 Los ratones SP-D (+/+) y SP-D (-/-) se sacrificaron a las 2 semanas, a las 3 semanas y a las 6 semanas de edad y se extrajo el tejido pulmonar. Los animales se pesaron, se anestesiaron con una mezcla de ketamina, acepromazina y xilacina al 4:1:1, y se desangraron mediante el corte de la vena cava inferior y de la aorta descendente. Se colocó una cánula en la tráquea, y se colapsaron los pulmones mediante la penetración del diafragma. Los pulmones se fijaron por inflación a 25 cm de presión de agua con un 4% de paraformaldehído en una solución tampón fosfato (PBS) durante 1 minuto. La tráquea se anudó al extraer la cánula para mantener la fijación en el pulmón inflado. Los pulmones y el corazón extirpados se dejaron equilibrar en un fijador frío hasta que se hubieron hundido hasta el fondo del contenedor. A continuación, se determinaron los volúmenes pulmonar y cardíaco mediante el desplazamiento de fluido. Cada lóbulo se midió siguiendo su eje más largo, se diseccionaron perpendicularmente al eje más largo y se procesaron en bloques de parafina. Se cortaron secciones cinco micras en series a través de la longitud de cada lóbulo, se cargaron en portaobjetos recubiertos de polisina, y se tiñieron con hematoxilina y eosina, tinción tricromática de Masson para colágeno, u oocina para elastina.

Morfología pulmonar

55 Con más detalle, el examen durante las 2 primeras semanas de vida demostró que no se detectaban anomalías en la morfología pulmonar, aunque se constató un aumento de los números de macrófagos alveolares de aparición normal en el alvéolo de los ratones SP-D (-/-) a los 14 días de edad. Por el contrario, sí se observaron anomalías en la histología pulmonar en ratones SP-D (-/-) a las 3 y a las 6 semanas de edad consistentes en un agrandamiento de las vías aéreas y de la infiltración con macrófagos alveolares atípicamente esponjosos. Durante los 6 a 7 meses de edad se observaron unos agrandamientos de las vías aéreas asociados con la acumulación de macrófagos alveolares esponjosos hipertróficos e infiltrados monocíticos perivasculares/peribronquiales, aunque la amplitud del agrandamiento de la vía aérea en ratones SP-D (-/-) variaba individualmente de moderado a severo en este grupo de edad.

65 En ratones SP-D (-/-) de 7 meses de edad se observaron unas lesiones fibróticas subpleurales que se teñían intensamente con colágeno. También se observaron anomalías en el depósito de elastina en el parénquima de los pulmones de ratones SP-D (-/-) en este periodo de tiempo. Esto consistía en regiones del parénquima pulmonar con fibras elásticas cortas y gruesas y más altamente enrolladas, así como en regiones de inflamación en donde la tinción de la elastina disminuía en el septo alveolar adyacente (adyacente a la acumulación de macrófagos y la fibrosis).

ES 2 311 307 T3

En los ratones SP-D (-/-) se distinguió un aumento del tejido limfocítico asociado a los bronquios (LBAT). La intensidad de la inmunotinción en la SP-B en células de tipo II fue similar entre los tres genotipos. Las células de tipo II se purificaron tal como se explica a continuación. Sin embargo, existían unas áreas focales con un aumento del número de células intraalveolares esponjosas grandes, que parecían ser macrófagos alveolares que contenían abundantes vesículas citoplásmicas. Estas células aumentaron de tamaño como resultado del aumento del número y del volumen de las vesículas citoplásmicas. Las vesículas teñidas con Rojo de Nilo y que presentaban fluorescencia cuando se excitaban con luz verde de una longitud de onda de 520-550 nm después de haberse teñido con Rojo de Nilo y por consiguiente que contenían lípido o fosfolípido. Estos macrófagos también se tiñeron mediante antisuero de SP-B. En el lavado alveolar, se observaron aproximadamente 4 veces más macrófagos ($1,2 \times 10^6$ por ratón) en los ratones SP-D (-/-) en comparación con los ratones normales ($0,36 \times 10^6$ por ratón), pero no se encontraron cambios en el recuento relativo de células neutrófilas o linfocitos. El tamaño de los macrófagos se calculó a partir del diámetro de los macrófagos fijados y teñidos de las preparaciones de cytopspin sedimentadas en los portaobjetos de cristal a $1500 \times$ g durante 2 minutos. El diámetro medio de los macrófagos de (+/+) fue de $11,75 \pm 1,75 \mu\text{m}$ en comparación con los ratones (-/-) $18,75 \pm 7,25 \mu\text{m}$. Los macrófagos anormalmente grandes, definidos como aquellos que presentan un diámetro doble del normal, comprendían el $22,4 \pm 0,6\%$ de los macrófagos de ratones (-/-) en comparación con el $18 \pm 1,0\%$ de los ratones (+/+). Los números y la morfología de los macrófagos alveolares no fue diferente en los ratones SP-D (-/-). Las características ultraestructurales de las células tipo II fueron similares en los SP-D (-/-) en comparación con las de los ratones SP-D (+/+). La morfología de los macrófagos alveolares es consecuente con la de las células “esponjosas” activadas, que se sabe que está asociadas con la inflamación.

Aislamiento de las células murinas de tipo II

Las células de tipo II se aíslan de forma rutinaria en este laboratorio utilizando el siguiente procedimiento. Los ratones se anestesian mediante una inyección intraperitoneal y pentobarbital (50 mg/ml $3,25 \text{ ml/kg}$ de peso corporal). Después de abrir la cavidad abdominal, se desangra a los ratones mediante el corte de la vena cava inferior. La tráquea queda expuesta y se coloca una cánula con un adaptador luer de calibre 20, y se asegura con una sutura. Se extrae la placa pectoral y los pulmones se perfunden con 10-20 ml de solución salina estéril a través de la arteria pulmonar hasta que visualmente no quede sangre. La dispasa se instala en los pulmones a través del catéter traqueal, seguido de agarosa poco fundida al 1%, calentada a 45°C . Los pulmones se recubren inmediatamente con hielo y se incuban durante 2 minutos para que la agarosa se asiente. Los pulmones se diseccionan, se colocan en un tubo de cultivo que contiene 1 ml adicional de Dispasa, y se incuban durante 45 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, los pulmones se transfieren a una placa de cultivo de 60 mm que contiene 100 U/ml de ADNasa 1 (Sigma, St. Louis, MO) en 7 ml de DMEM (Gibco, BRL, Gaithersburg, MD). El tejido se separa cuidadosamente de las vías respiratorias y se agita durante 5 minutos. Después, las células se colocan en hielo hasta que se hayan filtrado. La suspensión celular se filtra sucesivamente a través de tamices celulares de 100 μm y 40 μm , y después a través de una malla de nailon de 25 μm de calibre (Tetko, Biercliff Manor, NY). Las células se sedimentan durante 7 minutos a $130 \times$ g a 4°C y se resuspenden en 10 ml de DMEM con un 10% de SBF (Intergen Co., Purchase, NY). Las suspensiones celulares crudas se añaden a placas de cultivo de 100 mm que previamente se han recubierto con anticuerpos CD-45 y CD-32 (Pharmingen, San Diego, CA) y se incuban durante 102 horas a 37°C en presencia de un 5% de CO_2 . Las placas se extraen del incubador y se “escrutan” cuidadosamente para liberar las células de tipo II fijadas. La suspensión celular se centrifuga a $130 \times$ g a 4°C y se vuelve a suspender en 10 ml de DMEM con un 10% de SBF (Intergen Co., Purchase, NY). Las suspensiones celulares crudas se añaden a unas placas de cultivo de 100 mm que previamente se han recubierto con anticuerpos CD-45 y CD-32 (Pharmingen, San Diego, CA) y se incuban durante 102 horas a 37°C en presencia de un 5% de CO_2 . Las placas se extraen del incubador y se “escrutan” cuidadosamente para liberar las células de tipo II fijadas. La suspensión celular se centrifuga a $130 \times$ g durante 7 minutos y las células se resuspenden en DMEM que contiene un 10% de SBF.

Vía aérea y parénquima pulmonar

Se realizaron unas mediciones morfométricas en ratones a los 5 días (0,5 semanas), a los 14 días (2 semanas) y a los 17 días (2,5 semanas), a las 3 y 6 semanas, y a los 6 hasta los 7 meses de edad. La proporción total (% del área fraccional) del parénquima respiratorio y de la vía aérea se determinó utilizando un procedimiento de recuento de puntos. Las mediciones se realizaron en secciones tomadas a intervalos a lo largo de los lóbulos izquierdo, derecho superior o derecho inferior. Los portaobjetos se observaron utilizando un objetivo de 20x, y las imágenes (campos) se transfirieron mediante una videocámara a la pantalla de un ordenador utilizando el software Metamorph Imaging (Universal Imaging Corp., West Chester, PA). Se superpuso una red de rejillas de 121 puntos, generada por ordenador, en cada campo, y se contaron el número de intersecciones (puntos) que caían sobre el parénquima respiratorio (alvéolos y conductos alveolares) o la vía aérea. Los puntos que caían sobre los bronquiolos, los vasos amplos, y las arteriolas y las vénulas más pequeñas se excluyeron del estudio. Las áreas fraccionales (% de Área Fx) se calcularon mediante la división del número de puntos para cada compartimiento (n) por el número total de puntos contenidos en el interior del campo (N), y después se multiplicó por 100:

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

Se analizaron diez campos por sección para reunir los datos. Las coordenadas x e y para cada campo medido se seleccionaron utilizando un generador de números aleatorio.

Aunque, tal como se muestra en la Figura 1, no se observaron diferencias en la proporción relativa (% de área fraccional) de la vía aérea (a) y del parénquima respiratorio (b) a los 5 días (0,5 semanas), a los 14 días (2 semanas), o a los 17 días (2,5 semanas) de edad, el % de área fraccional de la vía aérea aumentó significativamente ($p = 0,013$) en ratones SP-D (-/-) de 3 semanas de edad. Más específicamente, el área fraccional unida tanto a la vía aérea (a) como al parénquima (b), divergía significativamente entre los dos genotipos distintos a las 3 semanas ($*p = 0,013$), a las 6 semanas ($*p = 0,0007$), y a las 28 semanas ($*p = 0,004$) de edad. Asimismo, el % de área fraccional de parénquima respiratorio disminuyó en los ratones SP-D (-/-) en comparación con los controles SP-D (+/+) emparejados por edad (el 34% de parénquima/66% de vía aérea en comparación con el 42,5% de parénquima/57,5% de vía aérea, respectivamente), Figura 1. Las proporciones relativas de la vía aérea y del parénquima respiratorio continuaban divergiendo significativamente de los controles en periodos de tiempo posteriores, situándose el % de áreas fraccionales en un intervalo del 27% de parénquima/73% de vía aérea a 37% de parénquima/63% de vía aérea en ratones SP-D (-/-) de 7 meses de edad ($n = 5$). Los controles SP-D (+/+) emparejados por edad mostraron menos variabilidad, situándose en el intervalo entre el 45% de parénquima/55% de vía aérea al 47% de parénquima/53% de vía aérea, en este periodo de tiempo ($n = 4$). El porcentaje total de reducción del parénquima a los 7 meses de edad en ratones SP-D (-/-) fue de un 32% de los valores de los controles, mientras que el porcentaje de aumento de la vía aérea en los ratones SP-D (-/-) fue de un 27% de los valores de los controles.

Proliferación celular

Los animales fueron pre-inyectados con BrdU 4 horas antes del sacrificio para evaluar las alteraciones en la proliferación celular. Se llevó a cabo la detección inmunohistoquímica de la BrdU incorporada utilizando un equipo disponible comercialmente (Zymed Laboratorios, Inc., San Francisco, CA). Las secciones de intestino delgado de cada animal se inmunotñieron en paralelo con las secciones pulmonares como control positivo para la incorporación de la BrdU.

Los índices de marcado de la BrdU fueron relativamente bajos, y no se observaron cambios en el marcado BrdU en células del parénquima respiratorio o en los macrófagos alveolares en los pulmones de ratones SP-D (-/-) en comparación con los controles.

Volúmenes pulmonares

La determinación de los volúmenes pulmonares utilizando unas curvas de presión-volumen se realizó de la siguiente manera: Se inyectó a ratones de doce semanas de edad con fenobarbital sódico y se colocaron en una cámara que contenía un 100% de oxígeno para asegurar el colapso completo de los alvéolos por absorción del oxígeno. Los ratones se sacrificaron por desangramiento, se colocó una cánula en la tráquea y se conectó a una jeringa unida a un sensor de presión a través de un conector de tres vías (Mouse Pulmonary Testing System, TSS Incorporated, Cincinnati, OH). Después de abrir el diafragma, los pulmones se inflaron a incrementos de 75 μ l cada 10 segundos hasta una presión de 28 cm de agua y después se desinflaron. Las curvas de presión-volumen se generaron para cada animal, determinando los volúmenes pulmonares (dividido por el peso corporal) a 10,5 y 0 cm de agua durante la curva de desinflado. En la Figura 2 se muestran las curvas de presión-volumen generadas en 5-6 ratones de 12 semanas de edad. Los volúmenes pulmonares asociados con las ramas de descenso de las curvas de presión-volumen fueron significativamente mayores en los ratones SP-D (-/-) de 12 semanas de edad en comparación con los ratones SP-D (+/+) emparejados por edad a 10 cm H₂O y a una presión máxima de 28 cm H₂O ($*p = < 0,05$).

Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron utilizando tanto un análisis de variación de las áreas fraccionales y las curvas de presión-volumen, seguido del procedimiento Student-Newman-Keuls, o del test T de Student para la comparación de los pesos corporales, los volúmenes pulmonares y cardíaco; volúmenes, volumen: proporciones de peso corporal, contenido total de proteínas y ADN. Las diferencias de $p < 05$ se consideraron significativas. Los valores se proporcionan como la media \pm DS.

El incremento de los volúmenes pulmonares fue fácilmente apreciable en los ratones SP-D (-/-) a las 12 semanas de edad, en concordancia con los estudios histológicos y morfométricos que manifestaban enfisema, ver Figura 2.

Alvéolos

Los alvéolos agrandados se observaron consistentemente en los ratones SP-D (-/-). Por consiguiente, es muy probable que la SP-D esté implicada en la regulación de la remodelación alveolar en los pulmones. Puesto que las anomalías y la remodelación de la vía aérea es una característica definitoria del enfisema, el ratón SP-D (-/-) es un modelo ideal para el estudio del enfisema.

ES 2 311 307 T3

Ejemplo 6

Citoquinas, producción de peróxido de hidrógeno, y actividades de la metaloproteinasas

5 *Procedimientos*

Mediciones de la citoquina

10 Los homogeneizados de pulmón de ratones de 6 a 9 semanas de edad se centrifugaron a 2000 RPM y se almacenaron a -20°C. Se cuantificaron el factor tumoral de necrosis alfa (TNF- α), la interleuquina (IL)1 β , IL-6, y la proteína inflamatoria macrófaga (MIP)-2 utilizando kits de ELISA de sándwich murina (R&D Systems, Minneapolis, MN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las placas se leyeron en un lector de microplacas (Molecular Devices, Menlo Park, CA) y se analizaron utilizando un programa de análisis asistido por ordenador (Softmax; Molecular Devices). Sólo se aceptaron para análisis los ensayos que presentaban unas curvas estándares con un valor de la línea de regresión calculada de > 0,95.

Producción de Peróxido de Hidrógeno

20 Los macrófagos alveolares se recogieron mediante un lavado broncoalveolar con 1 ml de dye-free RPM1 media sin tinción (Gibco, Grand Island, NY) tres veces. El fluido del lavado broncoalveolar (FLBA) de 8-10 ratones se agrupó para proporcionar un número suficiente de macrófagos para el análisis. El lavado se centrifugó a 1200 RPM durante 10 minutos y se resuspendieron en PBS un millón de macrófagos. Se midió la producción de peróxido de hidrógeno por los macrófagos utilizando un ensayo disponible comercialmente (Bioxytech H₂D₂ - 560 assay, OXIS International, Portland, OR) basado en la oxidación de iones ferrosos (Fe²⁺) a iones férricos (Fe³⁺) por peróxido de hidrógeno bajo 25 condiciones ácidas. Los procedimientos se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. La producción de peróxido de hidrógeno se determinó después de la activación con 100 ng/ml de acetato de miristato forbol (PMA) o sin estimulación.

Actividad de la Metaloproteinasas

30 Las muestras de lavado de ratones se centrifugaron (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 una electroforesis de las muestras (200 μ g de proteína) bajo condiciones no reductoras (Laemmli) en Zymogram al 10%, gelatina y geles de caseína (Novex, San Diego, CA). Después de la electroforesis, los geles se 35 lavaron dos veces con un Triton-X-100 al 2,5% (a 37°C, durante 15 minutos) y se incubaron durante 16 horas con Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, y de ZnCl₂ 1 μ M. Los geles se tiñeron con un Azul de Coomassie al 0,5% (p/v) de en un 50% de metanol, un 10% de de ácido acético durante 1 hora y después se destiñeron. Las metaloproteinasas se detectaron en forma de unas bandas claras en contraste con el fondo azul. El ARNm de las metaloproteinasas 2 y 9 del se cuantificó mediante análisis con Northern blot del ARNm pulmonar total de tipo salvaje y de los ratones SP-D 40 (-/-) utilizando sondas de ADNC marcadas con [³²P] (Chemicon International, Inc., Temecula, CA).

Resultados

45 Los homogeneizados de pulmón de los ratones SP-D (-/-) de 6 a 9 semanas de edad no contenían niveles de inflamación de las citoquinas preinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6, o MIP-2, aunque los niveles basales de la IL-1 β aumentaron significativamente, Figura 3. Por el contrario, la producción de oxidantes, evaluada mediante la medición de la producción de peróxido de hidrógeno por los macrófagos alveolares aislados de los ratones SP-D (-/-), aumentó 10 veces, Figura 4. La producción de peróxido de hidrógeno y superóxido es una medida de la activación de los macrófagos, particularmente de la activación microbicida. Puesto que la producción de oxidantes se ha asociado con 50 la activación de un número de metaloproteinasas y con el enfisema tanto en estudios con personas como con animales, se estimaron las actividades de las metaloproteinasas mediante la degradación de sustratos gelatinosos después los sobrenadantes SDS-PAGE de LBAT aislados a partir de los ratones SP-D (-/-) y SP-D (+/+). Se detectaron fácilmente unas bandas de actividad concordantes con la metaloproteinasas-2 y -9 en ambos genotipos, pero no existió alteración en el FLBA de ratones SP-D (-/-). Asimismo, la abundancia de metaloproteinasas-2 y -9 en el ARNm fueron similares 55 en todas las muestras de ARN pulmonar total de ratones SP-D (-/-) y SP-D (+/+) evaluados con el análisis de Northern blot.

60 Los resultados mostrados en los Ejemplos 1-6 fueron completamente inesperados. No existe ningún documento en la literatura que sugiera que un ratón knockout para SP-D sea un modelo para el enfisema.

65 En resumen, el ratón SP-D (-/-) demuestra de forma concluyente un papel extraordinario y sorprendente de la SP-D en la regulación de la homeostasis del surfactante, en la estructura del surfactante alveolar en el pulmón, en la regulación de la expresión de la SP-A, o que juega un papel inhibitor importante en la producción de peróxido de hidrógeno, oxidante en el pulmón. Por consiguiente, sus niveles son importantes para la supresión de la producción de oxidante en curso y lesiones y para la regulación de la remodelación alveolar. Esto convierte al ratón SP-D (-/-) en un modelo excelente para el enfisema. En el Ejemplo 7, se resumen los resultados para el modelo de ratón para el enfisema.

Ejemplo 7

El ratón SP-D (-/-) como modelo para el enfisema

5 La deficiencia de SP-D provoca inflamación, aumento de la producción de oxidante por los macrófagos alveolares aislados, enfisema, y fibrosis localizada en ratones SP-D (-/-) con gen inactivado. La naturaleza progresiva y coordinada de estas anomalías pulmonares apoyan la conclusión de que el agrandamiento alveolar en ratones SP-D (-/-) está provocada por la remodelación alveolar asociada con la inflamación crónica, más que con el desarrollo de las anomalías que tienen lugar durante la alveologénesis. Los presentes hallazgos coinciden con la hipótesis de un papel importante e inesperado de la SP-D en la modulación de la inflamación pulmonar y en la producción de oxidantes y sugieren que los cambios en la regulación o función de la SP-D puede jugar un papel en los procesos patológicos que conducen a un enfisema seguido de una lesión pulmonar crónica.

15 Los análisis histológicos y morfométricos de los pulmones de ratones SP-D (-/-) revelaron la ausencia de anomalías en la estructura pulmonar hasta las 3 semanas de edad después del parto, una semana después de que se haya completado la alveologénesis en ratones. Esto coincide con la observación de que las proporciones relativas del parénquima respiratorio y de la vía aérea eran similares tanto en ratones SP-D (-/-) como en ratones SP-D (+/+) entre los días 5 y 17 después del parto. Después de las 2 semanas de edad, se observó un aumento de las proporciones de la vía aérea parenquimal en ratones SP-D (-/-), coinciden con la remodelación en curso de los espacios del parénquima y alveolares. El agrandamiento de las vías aéreas se había asociado generalmente con la acumulación focal de los macrófagos alveolares grandes y esponjosos, aunque existía alguna heterogeneidad tanto en la localización y extensión de los infiltrados inflamatorios como en la remodelación en ratones más viejos. Aunque se observó una acumulación focal de macrófagos alveolares en los pulmones de ratones SP-D (-/-) ya a las 2 semanas de edad, la morfología del macrófago permaneció normal en este periodo de tiempo. A las 3 semanas de edad se observó una morfología de macrófago alveolar anormal, que consistía en células grandes esponjosas, y fue coincidente con el agrandamiento de las estructuras alveolares a partir de ese momento. Los estudios previos demostraron un aumento del número de macrófagos alveolares agrandados en ratones SP-D (-/-) de 8 semanas de edad. Por consiguiente, el desarrollo del enfisema en ratones SP-D (-/-) coincide con la acumulación temporal y espacial de macrófagos activados, sugiriendo su papel en el proceso de regulación. Los presentes hallazgos no apoyan un papel de la SP-D en la morfogénesis y alveologénesis en pulmones normales, un proceso generalmente completado aproximadamente a las 2 semanas de edad después del parto en ratones.

35 Los presentes hallazgos confirman un papel importante de la SP-D en la modulación de la activación del macrófago alveolar y en la producción de oxidante, que conduce al enfisema y a la fibrosis. La infiltración del macrófago y la remodelación pulmonar en ratones SP-D (-/-) estaban asociados con diferencias moderadas pero significativas en los niveles inflamatorios de varios mediadores proinflamatorios, incluyendo la IL-1b, la MIP-2, pero no el TNF- α y la IL-6, pero más bien con un considerable aumento de la producción de peróxido de hidrógeno por parte de los macrófagos alveolares aislados. Aunque los niveles basales de la IL- β 1 aumentaron significativamente en los ratones SP-D (-/-), la IL- β 1 no aumentó a niveles normalmente detectados en inflamaciones severas. Aunque se observó un aumento de la IL- β 1 y de la producción de peróxido de hidrógeno en los ratones SP-D (-/-), todavía no está claro si las anomalías encontradas en dichos ratones son mediados directamente por la citoquina o alguna lesión inducida por el oxidante. Aunque se ha sugerido que la SP-D juega un papel importante en el sistema inmunológico del huésped, no existía evidencia histológica o serológica de infección en la colonia de SP-D (-/-).

45 La producción de peróxido de hidrógeno aumentada y el aumento del número de macrófagos alveolares encontrados en los pulmones de ratones SP-D (-/-) apoyan el concepto de que la SP-D juega un papel antiinflamatorio importante en el pulmón y regula la producción de peróxido de hidrógeno por parte de los macrófagos alveolares *in vivo*. Las relaciones entre la lesión por 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 provoca la remodelación alveolar y fibrosis en los ratones recién nacidos. Puesto que la activación de las metaloproteinasas se ha asociado con la lesión por oxidante y el enfisema, se evaluaron las actividades de las metaloproteinasas en FLBA de los ratones SP-D (-/-). Mientras la actividad de la proteasa coincidente con la metaloproteinasa -2 y -9 se detectó fácilmente por zimografía, no se detectaron cambios coincidentes con las actividades de estas proteinasas ni en sus ARNm en ratones SP-D (-/-). Todavía es posible, sin embargo, que las concentraciones aumentadas localizadas en tejido de las metaloproteinasas y/o las alteraciones en otras proteasas o antiproteasas puedan estar asociadas con la deficiencia de SP-D. Las deficiencias en las antiproteasas, así como el hábito de fumar y las lesiones por oxidantes por parte de tóxicos de oxidación (por ejemplo, la bleomicina o paracuat), se han asociado todas ellas con el enfisema o fibrosis pulmonar en el pulmón humano.

60 Aunque se aumentó el contenido de fosfolípidos surfactantes en ratones SP-D (-/-) y se asoció con el aumento del número de macrófagos alveolares grandes y esponjosos, el aumento del contenido fosfolípido por si solo no parece ser suficiente para provocar la remodelación alveolar observada en ratones SP-D (-/-). De hecho, el efecto total de los fosfolípidos surfactantes parece ser antiinflamatorio, alterando la fagocitosis, la producción de oxidantes y la liberación de las citoquinas, e inhibiendo la proliferación de linfocitos, la producción de inmunoglobulina, y la expresión de moléculas de adhesión. Por otra parte, los ratones transgénicos en los que la GM-CSF se había sobre expresado en el epitelio respiratorio presentaban un aumento considerable de los números de macrófagos alveolares de apariencia normal, pero no desarrollaron proteinosis/lipoidosis alveolar pulmonar, enfisema o fibrosis. Por el contrario, los fosfolípidos y proteínas surfactantes aumentaron considerablemente en los pulmones tanto en ratones GM-CSF (-/-) como

en ratones que presentaban deficiencia del receptor GM de la subunidad beta común (βc) en asociación con la acumulación de macrófagos alveolares y los infiltrados de monócitos perivascuales/peribronquiales; sin embargo, ningún modelo de proteinosis/lipoidosis alveolar pulmonar se asoció con el enfisema o fibrosis. Asimismo, los ratones transgénicos que reexpresan la IL-4 en el pulmón también presentaban cantidades aumentadas de proteínas surfactantes y lípidos, así como un aumento de los números de células inflamatorias, pero no desarrollaron enfisema.

Aunque las concentraciones de la SP-D en el pulmón cambian durante el desarrollo, aumentando con la edad, los niveles de la SP-D también se encuentran influenciados por diversos estados clínicos. Estudios recientes han demostrado una reducción considerable de las concentraciones de SP-D en FLBA obtenido de pacientes con fibrosis quística (FC), sugiriendo un papel potencial de la SP-D en la patogénesis de la inflamación crónica asociada con la enfermedad pulmonar de la FC. Los niveles de la SP-D también se redujeron en FLBA de fumadores, sugiriendo que la disminución de los niveles de la SP-D pueden contribuir al desarrollo posterior de enfermedad pulmonar obstructiva crónicas (EPOC) y de enfisema en estos pacientes. Aunque las concentraciones de la SP-D en FLBA aumentaron en pacientes con proteinosis alveolar pulmonar (PAP), los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF) y neumonía intersticial asociada con la enfermedad vascular del colágeno (IPCD) presentaban una disminución de los niveles FLBA de SP-D. Por otra parte, las concentraciones séricas de SP-D aumentaron en pacientes con PAP, IPF, y IPCD; aunque los niveles séricos tanto de la SP-A como de la SP-D variaban según la gravedad de la IPF y durante el transcurso de las terapias antiinflamatorias. Estos hallazgos clínicos, así como el presente estudio, demuestran que la SP-D es necesaria para el mantenimiento de una arquitectura pulmonar normal y para la supresión de la producción de oxidantes, apoyando el concepto de que los cambios en las concentraciones de la SP-D pueden estar implicados en la patogénesis de las lesiones pulmonares asociados con diversos estados clínicos, incluyendo la lesión por oxidación, abscesos pulmonares, enfermedades secundarias, fibrosis quística, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), varias infecciones pulmonares, síndrome de dificultad respiratoria (RDS), displasia broncopulmonar (BPD), lesiones pulmonares inducidas por la quimioterapia, absceso secundario a primario de fibrosis pulmonar (es decir, sarcoidosis), y asma.

En los estudios previos, no se observaron anomalías en los macrófagos alveolares ni en la morfología pulmonar en los ratones heterocigóticos SP-D (-/-), demostrando que una reducción del 50% en la concentración de la SP-D en FLBA no es suficiente para provocar anomalías pulmonares. Las concentraciones exactas de SP-D que son necesarias para la inhibición de las lesiones pulmonares inducidas por oxidante y para la remodelación pulmonar no están claras por el momento. Todavía no se ha determinado si una lesión posterior o un estrés oxidante en los pulmones de ratones SP-D (+/-) o SP-D (-/-) agravarán el enfisema o la fibrosis en este modelo animal.

La reducción moderada de las concentraciones de la SP-D pulmonar encontrada en ratones SP-D (-/-) no parece contribuir a los cambios en la morfología celular observados en dichos ratones, ya que ni los ratones SP-D (+/-) ni los SP-D (-/-) desarrollaron el enfisema. Además, la morfología pulmonar de ratones con deficiencia de SP-A fue normal, y, al contrario de los ratones SP-D (-/-), la deficiencia de SP-A se asoció con la disminución de la producción de peróxido de hidrógeno por parte de los macrófagos alveolares aislados.

Los ratones SP-D (-/-) desarrollaron un enfisema agudo y progresivo. La remodelación alveolar y las anomalías de macrófagos fueron evidentes tan pronto como a las 3 semanas de edad, mientras que la fibrosis pulmonar focal leve se observó durante los 6 a 7 meses de edad, demostrando un papel de la SP-D en la regulación de la inflamación y de la remodelación alveolar. El presente estudio también demuestra una función inesperada de la SP-D en la regulación de la producción de peróxido de hidrógeno por parte de los macrófagos alveolares *in vivo*, que puede contribuir al desarrollo del enfisema en los pulmones de ratones SP-D (-/-). Todavía no se ha determinado si la deficiencia de SP-D contribuye a la inflamación en curso o al desarrollo del enfisema y la fibrosis encontradas en varias enfermedades pulmonares crónicas en personas, incluyendo las provocadas por el tabaco y otros oxidantes.

50 *Terapias de prueba en el modelo de ratón*

Debido a la falta de terapias farmacéuticas para el tratamiento del enfisema, es imprescindible un modelo para probar posibles terapias. El ratón SP-D (-/-) proporciona este modelo. Por consiguiente, el Ejemplo 6 proporciona un marco de muestra para las pruebas farmacéuticas, las preparaciones de proteínas, o las manipulaciones genéticas para el tratamiento del enfisema.

55 **Ejemplo 8**

Se administran intratraquealmente varias dosis o concentraciones de proteína o de fármacos diluidos en un tampón apropiado a los ratones SP-D (-/-). La proteína y el fármaco se purifican de forma apropiada para su utilización *in vivo*. Se administra un adenovirus recombinante u otros vectores genéticos que contienen el gen de interés de la siguiente manera. Los ratones SP-D (-/-) son inmunodeprimidos para bloquear específicamente las respuestas inmunológicas mediados por linfocitos T, y se tratan con un constructo adenovírico diseñado para expresar el gen de interés en células transducidas. Se inyecta a los ratones intraperitonealmente el anticuerpo H57 3 días antes de recibir el constructo adenovírico. El H57 altera el reconocimiento inmunológico en el receptor de los linfocitos T y disminuyen los linfocitos esplénicos y pulmonares T y B. Se instila una dosis intratraquealmente y otro grupo se trata intraperitonealmente con H57 seguido de una administración intratraqueal del vehículo sólo. Los niveles de la proteína de interés se miden 1 semana después de la administración para detectar el aclaración y la expresión del vector. Se realizan pruebas a cuatro ratones y los ratones SP-D (-/-) no tratados se utilizan como control. La inoculación intratraqueal implica la anestesia

ES 2 311 307 T3

con isofluorano, y se practica una incisión en la línea media anterior para exponer la tráquea. Se inserta una aguja de calibre 30 unida a una jeringa de tuberculina en la tráquea, y se dispersa en los pulmones 1 inóculo de 100- μ de proteína o fármaco. La incisión se cierra con una gota de Nexaband. Se inyecta PBS no piogénico intratraquealmente como control.

5

Para probar la eficacia de la proteína, del fármaco o de la manipulación genética en los efectos de disminución del enfisema, se realizaron diversas pruebas.

10 Para determinar los efectos de la proteína o del fármaco en la estructura pulmonar los pulmones se fijaron por inflación y las secciones se evaluaron mediante un microscopio electrónico. Los pulmones de ratones tratados y no tratados se inflaron a través de una cánula traqueal a 20 cm de presión con un 4% de paraformaldehído y se extrajeron del tórax en bloque. Los pulmones se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de tejido (5 m) se tiñeron con hematoxilina y eosina.

15 Para comprobar el número y la morfología de los macrófagos: la tinción con Rojo de Nilo detecta vesículas y la tinción con Azul de Nilo y la excitación con luz verde de una longitud de onda de 520-550 nm es un procedimiento adicional para detectar lípidos y fosfolípidos. El número de macrófagos se determina mediante la tinción con anti-suero de SP-B. El tamaño del macrófago se calcula a partir del diámetro de los macrófagos fijados y teñidos de las preparaciones de cytospin sedimentadas en los portaobjetos de cristal a 1580 x g durante 2 minutos.

20

La composición y la ultraestructura del surfactante se analizan de la siguiente manera: la estructura del surfactante se analiza aislando los agregados grandes del lavado alveolar acumulado de los ratones SP-D (-/-) tratados y no tratados y se examinan mediante EM (ver protocolo a continuación). Para el análisis de la composición del lavado alveolar de los fosfolípidos, se evaluaron de dos a cuatro muestras consistentes en el lavado acumulado de dos a tres ratones para comprobar la abundancia relativa de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, esfingomielina, y ácido liso-bis fosfatídico. La incorporación de $\{^3\text{H}\}$ colina en la Sat-PC pulmonar total se evalúa para determinar la concentración total de fosfolípidos.

25

Formas de agregados del lavado alveolar. El surfactante en el lavado alveolar se puede separar en fracciones de agregado grande (pesado, denso) y agregado pequeño (ligero, vesicular) mediante centrifugación. Los lavados alveolares se centrifugaron a 40.000 x g en un gradiente de sacarosa 0,8 M durante 15 minutos. Después se recogió el agregado grande del surfactante de la interfase, se diluyó con solución salina normal y se volvió a centrifugar a 40.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante de la primera centrifugación a 40.000 x g que contiene el agregado pequeño del surfactante se concentra a 4°C mediante ultrafiltración utilizando un filtro de retención de peso molecular de 300.000 (Minitan, Miliore Corp., Bedford, MA) o concentradores centrífugos (Amicon Corp., Danvers, MA). El agregado pequeño del surfactante se diluye con 50 ml de solución salina normal y se ultrafiltra 3 veces para extraer las proteínas solubles.

35

La SP-D como tratamiento de las enfermedades pulmonares

40

Puesto que la delección de la SP-D produce el modelo de ratón para el enfisema, la SP-D es una elección obvia para el tratamiento o la prevención del enfisema. También es un tratamiento obvio para otros tipos de enfermedades pulmonares puesto que muchas de éstas enfermedades se caracterizan por una producción aberrante de surfactante. Además, su efecto en la SP-A y su posible papel en el sistema inmunológico del huésped la convierten en una herramienta útil para aumentar la función inmunológica en los pulmones. La viabilidad de la transferencia genética al epitelio respiratorio es muy prometedora como tratamiento para varias enfermedades pulmonares. Una variedad de vectores de base viral y no viral se han desarrollado para transferir genes a las células de la vía respiratoria, incluyendo vectores adenovirales recombinantes. Dichos vectores son particularmente prometedores para su utilización en tratamientos respiratorios porque presentan el potencial de poder aerosolizarse. Por consiguiente, el Ejemplo 9 consiste en un experimento que utiliza la proteína SP-D de ratón purificada para el tratamiento del enfisema en ratones SP-D (-/-). El Ejemplo 10 consiste en un experimento que utiliza adenovirus para expresar la SP-D de rata para el tratamiento del enfisema en ratones SP-D (-/-). El Ejemplo 11 proporciona un marco de muestra para la utilización del péptido de la SP-D, o de vectores que expresan la SP-D para la prevención y el tratamiento de dichas enfermedades. El enfisema se utiliza como un ejemplar de la enfermedad pulmonar. El adenovirus se utiliza como un ejemplar de los vectores.

55

Tratamiento con SP-D purificada

Ejemplo 9

60 Los ratones SP-D (-/-) se trataron con SP-D de ratón purificada, purificada tal como se describe a continuación. Se analizaron los niveles de PC saturada en el lavado alveolar y en lavado pulmonar total. La administración de dosis intratraqueales repetidas a intervalos de 24 horas dieron como resultado una corrección parcial de la acumulación de lípido después de 3 a 7 dosis, ver Figura 12.

65 La vida media de la SP-D en la vía respiratoria se determinó en 13 horas en ratones (ver Figura 13) (la técnica se describe a continuación); por consiguiente, la deficiencia de SP-D se puede tratar reemplazando la proteína SP-D a un intervalo razonable mediante un aerosol o un inhalador de partículas o de mezclas de surfactantes.

Purificación de la SP-D de ratón

Se recolectó el fluido del lavado broncoalveolar (LBA) de ratón de ratones doble knockout mutantes GMCSF y SP-A, se congeló, y se agrupó para la posterior purificación de la SP-D. Se introdujo maltosil-agarosa (Sigma) en una columna de flujo por gravedad (10 x 80 mm) y se equilibró con un tampón que contenía de Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, cloruro cálcico 10 mM, 0,2% (P/V) de ácido sódico (TCB). El LBA se realizó con 20 mM con respecto a Tris-HCl, y con 10 mM con respecto a EDTA, pH 7,4 y se agitó durante una hora a temperatura ambiente. La solución turbia se centrifugó a 10.000 X g durante 40 minutos a 4 grados centígrados. El sobrenadante se preparó con 20 mM con respecto al cloruro cálcico y se reajustó a pH de 7,4 antes de cargarlo en la columna de matosil-agarosa. La columna se lavó hasta la absorbancia basal con TCB seguido de un lavado con TCB que contenía cloruro sódico 1,0 M de. La SP-D, que presenta un requerimiento específico de calcio en la unión con la maltosa se eliminó por solvente con cloruro de manganeso 50 mM, Tris-HCl 20 mM, 0,02% (P/V) de ácido sódico, pH 7,4. Las fracciones que contenían SP-D se determinaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS o mediante ELISA directa, agrupada, y dializada frente a tres cambios de Tris-HCl 20 mM, cloruro sódico 100 mM, EDTA 5 mM, pH 7,4. Este protocolo se adaptó de Strong, Meter; Kishore, Uday; Morgan, Cliff; Bernal, Andrés López; Singh, Mamta; y Reid, Kenneth. B.M; Journal of Immunological Methods 220 (1998) 139-149.

Tratamiento de ratones con componentes surfactantes. Hemos utilizado satisfactoriamente una técnica para la intubación oral ciega utilizando tubos de alimentación de 26 g en ratones anestesiados con isoflurano para el tratamiento repetido diariamente con SP-D en ratones hasta los 7 días sin problemas. Este enfoque evita la cirugía y permite realizar el tipo de experimentos propuestos para el reemplazo de la SP-D y el tratamiento con proteínas de SP-D mutada.

Inicialmente, los ratones SP-D (-/-) se trataron con SP-D de ratón purificada mediante un dispositivo traqueal. Tres o más dosis de 2,9 g de SP-D administrada a intervalos de 24 horas hicieron disminuir las agrupaciones de PC tanto alveolares como saturadas (ver Figura 14). Dicha dosis de SP-D administrada es aproximadamente la cantidad presente en el agrupamiento endógeno en ratones SP-D (-/-). Teniendo en cuenta la asociación pulmonar y la cinética de aclaramiento, ésta es una dosis baja. Esta administración exógena de la SP-D influye directamente en el metabolismo del lípido surfactante y proporciona un modelo experimental en el que podemos ensayar la función de las moléculas de la SP-D modificada *in vivo*.

Protocolo de la vida media biológica: Hemos medido la vida media biológica de la SP-D en ratones para diseñar los experimentos para el tratamiento con la SP-D. Hemos yodado la SP-D de ratón purificada con ¹²⁵I utilizando el reactivo Bolton-Hunter tal como hemos hecho anteriormente para la SP-A y las otras proteínas surfactantes. El aclaramiento de la SP-D en lavados alveolares de ratones SP-D (+/+) y SP-D (-/-) presentó una vida media similar de 13 horas (ver Figura 13). La $t^{1/2}$ de 17 horas para la SP-D en los pulmones de ratones SP-D (-/-) fue algo más larga que la $t^{1/2}$ de 13 horas para los ratones SP-D (+/+).

La deficiencia de GM-CSF provoca un incremento de 48 veces en la SP-D, y el cruce de GM-CSF (-/-) x SP-A (-/-) presenta una SP-D similarmente elevada pero no de SP-A. Hemos aislado la SP-D de los lavados alveolares de ratones GM-CSF (-/-) x SP-A (-/-) a una pureza elevada y en grandes cantidades mediante los procedimientos descritos por Persson *et al.* utilizando una columna de afinidad a la manosa-sefarosa 6B en presencia de Ca²⁺.

Ejemplo 10

Tratamiento con SP-D expresada por un adenovirus

Hemos construido un adenovirus que expresa la SP-D de rata. El virus produce SP-D en células y en los pulmones de ratones normales o con deficiencia de SP-D. Tenemos Western blots de la SP-D de rata producidos en 293 células y en ratones.

Construcción de un adenovirus Ad-rSPD (ver Figura 14). Se liberó el ADNc de la SPD de ratas de tipo salvaje del plásmido WT-rSPD/pG3Z con digestión EcoR I y los extremos 3' se rellenaron con Klenow. El ADNc de rSPD de 1,3 kB se insertó en el sitio del EcoR del plásmido pAvS6a para construir un plásmido pAvS6a-rSPD. El plásmido pAvS6a-rSPD presenta un promotor RSV, un ADNc de rSPC, una señal poli A SV40 y una secuencia Ad5 (9,24, 17,34 mu). El pAvS6a-rSPD no lineal se cotransfectó en 296 células con un Cla I digirió un fragmento grande de ADN adenoviral Ad dl327, que presenta una región E3 (78,5, 84,7 mu) delecionada. Después de la recombinación de homólogos, se analizaron las placas individuales mediante análisis por Western blot para determinar la expresión de la proteína rSPD. Un clon positivo de rSPD se sometió a una serie de purificación de la placa. El adenovirus Ad-rSPD presenta deleciones en las regiones E1 y E3 y su replicación es deficiente. Después de la amplificación de 293 células, el adenovirus Ad-rSPD purificado se produjo a través de dos series de ultracentrifugación de gradiente CsCl. El adenovirus que expresa la SP-D fue capaz de corregir algunas anomalías lipídicas por la administración intratraqueal. Por consiguiente, esto sigue siendo una posibilidad muy positiva para el tratamiento del enfisema y muchas otras enfermedades asociadas a la deficiencia de la SP-D así como otras varias formas de lesión y deficiencia pulmonar.

ES 2 311 307 T3

Ejemplo 11

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

5 Los requisitos temporales, espaciales y estequiométricos para el restablecimiento de la homeostasis de fosfolípidos se determinaron en el Ejemplo 9. Los estudios iniciales realizados para determinar la cinética del aclaramiento de la SP-D se realizaron con SP-D marcada ^{125}I 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 clarificó la dosis de SP-D requerida para conseguir concentraciones fisiológicas normales de SP-D después de la administración.

10 La administración de la proteína SP-D purificada se utilizó para el tratamiento de varias enfermedades pulmonares en el Ejemplo 9. Sin embargo, las anomalías fisiológicas de las enfermedades pulmonares requerirían una corrección a largo plazo de la SP-D en los pulmones. Por consiguiente, se utiliza un adenovirus recombinante u otros vectores genéticos que contienen el gen de la SP-D en mamíferos (ver Ejemplo 10 y 11). Los vectores de adenovirus recombinante utilizaron una proteína secretora de las células de Clara (CCSP) y promotores de la SP-C para expresar selectivamente la SP-D en compartimentos (ver Ejemplo 10) bronquiales (células de Clara) y alveolares (célula tipo II). Tres días antes del tratamiento con el vector adenoviral los ratones son inmunodeprimidos mediante una inyección intraperitoneal con 200 μg de anticuerpo monoclonal receptor de anti linfocito T, H57. El adenovirus se administró mediante una inyección intratraqueal de 5×10^8 PFU de virus. Los niveles de la SP-D se midieron 1 semana después de la administración para detectar la captación y la expresión del vector. Se testaron cuatro ratones y los ratones SP-D (-/-) que no recibían tratamiento se utilizaron como control. Para probar la eficacia de la SP-D en la disminución de los efectos del enfisema, se realizaron un número de pruebas de la siguiente manera.

25 Para determinar los efectos de una proteína o un fármaco en la estructura pulmonar (Ejemplo 11), los pulmones se fijan por inflación y las secciones se evalúan por un microscopio electrónico. Los pulmones se inflan a través de una cánula traqueal de 20 cm de presión con un 4% de paraformaldehído y se extraen del tórax en bloque. Los pulmones se deshidratan y se embeben en parafina. Las secciones de tejido (5 m) se tiñen con hematoxilina y eosina.

30 Se analizan el número y la morfología de los macrófagos. La tinción con Rojo de Nilo detecta vesículas y la tinción con Azul de Nilo y la excitación con luz verde de una longitud de onda de 520-550 nm es un procedimiento adicional para la detección de lípidos o fosfolípidos.

35 El número de macrófagos se determina mediante la tinción con antisuero SP-B. El tamaño de los macrófagos se determina a partir del diámetro de los macrófagos fijados y teñidos a partir de las preparaciones de citospin sedimentadas sobre los portaobjetos de cristal a 1500 x g durante 2 minutos.

40 La composición y la ultraestructura del surfactante se analizaron de la siguiente manera: la estructura del surfactante se analiza mediante el aislamiento de agregados grandes a partir del lavado alveolar agrupado de los ratones SP-D (-/-) tratados y no tratados y se examina por ME. Para el análisis de la composición de fosfolípidos del lavado alveolar, se evaluaron de dos a cuatro muestras consistentes en el lavado agrupado de dos a tres ratones para determinar la abundancia relativa de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, esfingomielina, y ácido liso-bis-fosfatídico. La incorporación de (^3H) colina en la Sat-PC pulmonar total se evalúa para determinar la concentración total de fosfolípidos.

45 Una vez que se ha determinado la eficacia del tratamiento, el tratamiento se puede probar en otros mamíferos apropiados.

Implicación de la SP-D en la infección pulmonar

50 El papel que juegan la SP-D y la SP-A en el sistema inmunológico del huésped en los pulmones se ha demostrado repetidamente. La SP-A y la SP-D presentan interacciones específicas con varios microorganismos *in vitro*, modificando la inflamación pulmonar *in vitro* mediante la alteración de la producción de citoquina y de los radicales libres. El papel de la SP-D en el aclaramiento bacteriano y en la respuesta inflamatoria del pulmón se evaluó *in vivo* utilizando un modelo de ratón deficiente en SP-D. Se sabe que los ratones deficientes en SP-A son más susceptibles a las infecciones. Una serie de estudios *in vitro* han mostrado un posible papel para la SP-D en el sistema inmunológico del huésped en adición a su papel en el aumento de la sobre-regulación de la SP-A. Los Ejemplos 8-11 describen unos protocolos de muestra para probar la SP-D como terapia en los ratones SP-D (-/-) infectados bacteriamente o fúngicamente así como en ratones SP-A (-/-). Los Ejemplos 12-14 son experimentos que muestran el papel de la SP-D en la respuesta a infecciones bacterianas, fúngicas y virales. El Ejemplo 13 es un experimento que muestra el efecto de infectar a ratones SP-D (-/-) con virus sincitial respiratorio.

Ejemplo 12

El aclaramiento de agentes bacterianos de los ratones SP-D (-/-)

65 Los ratones deficientes en SP-D (SP-D (-/-)) se infectaron intratraquealmente con *Streptococcus* del Grupo B (GBS) o con *Hemophilus influenzae* (Hflu) para evaluar el aclaramiento en comparación con ratones de tipo salvaje. El *Streptococcus* del Grupo A se administró a 10^4 FCU. La inflamación pulmonar también se evaluó mediante el análisis

del fluido del LBA para el número total de células (Figuras 5, 6 y 7), los niveles de citoquina en los homogeneizados del pulmón (Figura 8), la producción del radical oxígeno por parte de los macrófagos alveolares (Figura 11) y los niveles de nitrito en LBA (Figura 9).

5 Los ratones SP-D (-/-) depuraron la bacteria de forma similar a los ratones de tipo salvaje (ver Figuras 5 y 6). La infección con GBS y Hflu dió como resultado unas células totales significativamente mayores en el fluido del LBA de los ratones SP-D (-/-) en comparación con los ratones de tipo salvaje (Figura 7). Se detectaron alteraciones selectivas de los niveles de citoquina en ratones SP-D (-/-). Los niveles de factor de necrosis tumoral (TNF) y de interleuquina (IL)-6 fueron superiores en los homogeneizados del pulmón de ratones SP-D (-/-) poco tiempo después de la infección con GBS o Hflu (Figura 8). La proteína inflamatoria macrófaga 2 (MIP-2), un quimioatractante de neutrófilos, fue significativamente superior en los homogeneizados del pulmón de ratones SP-A (-/-) después de la infección con Hflu pero no de la infección con GBS (Figura 8). Los macrófagos de los ratones SP-D (-/-) generaron una cantidad significativamente superior de superóxido y de peróxido de hidrógeno en comparación con los ratones de tipo salvaje (Figura 11).

15 Los niveles de nitrito en el LBA aumentaron en los ratones SP-D (-/-) en comparación con los ratones de tipo salvaje. La producción de óxido nítrico se midió como nitrito en el FLBA. El óxido nítrico juega un papel en el sistema inmunológico del huésped por su contribución en la eliminación de bacterias. El óxido nítrico reacciona con el superóxido para formar peroxinitrito que es un potente agente bactericida.

20 En la Figura 10 se evaluó la fagocitosis utilizando un microscopio óptico y un citómetro de flujo. Los ratones SP-D (-/-) presentaban una fagocitosis de bacterias significativamente reducida en comparación con los de tipo salvaje.

25 Por consiguiente, en ausencia de la SP-D, se observó un aumento de respuestas inflamatorias después de la infección bacteriana del pulmón con GBS o Hflu. La producción de especies reactivas del oxígeno por parte de los macrófagos alveolares aumentó en ratones SP-D (-/-). Estos resultados apoyan un papel crucial y diferente de la SP-D en las respuestas inmunológicas e inflamatorias en los pulmones a las infecciones bacterianas, *in vivo*.

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

Los mecanismos de los sistemas inmunológicos del huésped han evolucionado para mantener el pulmón libre de patógenos microbianos incluyendo los mediadores innatos del aclaramiento bacteriano y vírico y adquirir respuestas inmunológicas.

35 Ejemplo 13

Aclaramiento del virus en ratones SP-D (-/-)

40 Los ratones SP-D (-/-) se infectaron intratraquealmente con el virus sincitial respiratorio (VSR), un patógeno respiratorio común en niños. Los títulos virales y la inflamación pulmonar se evaluaron en los ratones SP-D (-/-) y en los ratones de tipo salvaje. Los títulos de RSV en los homogeneizados del pulmón fueron similares en los ratones SP-D (-/-) y los de tipo salvaje a los 3 y 5 días después de la administración. Sin embargo, se encontró que el número de células inflamatorias en el fluido del LBA de ratones SP-D (-/-) había aumentado significativamente con un porcentaje mayor de PMNs en comparación con los ratones de tipo salvaje, a los 3 y 5 días después de la infección con RSV. Además, la inflamación pulmonar evaluada mediante histología, 5 días después de la infección con RSV, era superior en los ratones SP-D (-/-) en comparación con los de tipo salvaje. Las citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo la TNF- α , la IL-6 y la MIP-2 eran superiores en los homogeneizados de pulmón de ratones SP-D (-/-) a los 3 y 5 días después de la infección con RSV. Los ratones SP-D (-/-) presentan un aclaramiento vírico eficaz del pulmón, sin embargo, mostraron unas respuestas inflamatorias superiores después de la infección con RSV a la de los ratones de tipo salvaje. Estos hallazgos demuestran que la SP-D juega un papel importante en la defensa innata y en la regulación de la inflamación en los pulmones después de una infección *in vivo* con RSV.

Ejemplo 14

55 *Aclaramiento fúngico en ratones SP-D (-/-)*

El ratón se infecta de la siguiente manera: se utiliza un prototipo adecuado de patógeno fúngico. El agente infeccioso se purifica de forma adecuada y se suspende en un tampón apropiado y se administra intratraquealmente con o sin SP-D en el ratón SP-D (-/-) (como en los Ejemplo 12 y 13). El prototipo fúngico se administra a una dosis adecuada. Se utilizan los ratones SP-D (-/-) y SP-D (+/+) para probar el efecto de la SP-D en la susceptibilidad a la infección de los ratones. Los ratones SP-D (-/-) con o sin la proteína SP-D se utilizaron para probar la SP-D como un tratamiento contra la infección. El aclaramiento de la infección se evalúa en los Ejemplos 12 y 13 y de la siguiente manera:

65 El aclaramiento fúngico se determina mediante la purificación de los homogeneizados del pulmón y del bazo a 6, 24, y 48 horas después de la inoculación de los animales con el agente infeccioso o agente infeccioso con SP-D. el aclaramiento bacteriano en los pulmones se determina después de variar apropiadamente las concentraciones de SP-D. Los cultivos cuantitativos también se determinan en los ratones SP-D (+/+) para determinar si una reducción del 50% de la SP-D proporciona suficiente SP-D endógena para el aclaramiento bacteriano o vírico.

ES 2 311 307 T3

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

Fármacos que regulan los niveles de SP-D

5 La importancia de la SP-D para el funcionamiento normal y el desarrollo del pulmón está claramente demostrada mediante el ratón knockout SP-D (-/-). Por consiguiente, los agentes que regulan la producción, la expresión, o la acción de la SP-D son futuros fármacos importantes y ayudas experimentales para la identificación de dichos fármacos. Muchas técnicas para la identificación de dichos agentes se pondrán de manifiesto para cualquier experto ordinario en la materia. Los Ejemplos 15 y 16 describen un protocolo de muestra para dos de éstas técnicas. El Ejemplo 17 muestra que la IL-4 aumenta notablemente los niveles de SP-D in vivo y se puede utilizar, por consiguiente, para el tratamiento de varias enfermedades pulmonares con o sin la adición de la SP-D.

Ejemplo 15

15 *Proteínas que interactúan con el promotor de la SP-D*

Se prepara una técnica de un solo híbrido que utiliza el promotor de la SP-D para identificar las proteínas que aumentan la regulación de la expresión de la SP-D. Después, estas proteínas se prueban con ratones SP-D (-/-) para comprobar la eficacia en el tratamiento del enfisema y otras enfermedades e infecciones pulmonares como se muestra en el Ejemplo 8.

Ejemplo 16

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

Se prepara una técnica de dos híbridos para identificar las proteínas que interactúan directamente con la proteína SP-D. Después, estas proteínas se prueban en el ratón SP-D (-/-) para comprobar la eficacia en el tratamiento del enfisema y otras enfermedades e infecciones pulmonares como se muestra en el Ejemplo 8.

Ejemplo 17

La IL-4 aumenta los niveles de la SP-D in vivo

35 Los ratones que expresan la IL-4 en las células de Clara (CCSP-IL-4) desarrollan una inflamación crónica de las vías respiratorias y un síndrome de la proteinosis alveolar. Para identificar el papel de la IL-4 en la homeostasis del surfactante, se midió el metabolismo lipídico y proteico en los pulmones de ratones CCSP-IL-4 *in vivo*. Los agrupamientos de fosfatidilcolina alveolar saturada (Sat PC) aumentaron 6,5 veces y los agrupamientos Sat PC de tejido pulmonar aumentaron 4,8 veces en los ratones transgénicos IL-4 (ver Figura 15). La SP-D aumentó aproximadamente 90 veces en los ratones IL-4 en comparación con los ratones de tipo salvaje y se asoció con la SP-D ARNm aumentado 2,8 veces (ver Figura 15). La incorporación de palmitato y de colina en la Sat PC de los pulmones de ratones CCSP-IL-4 fue 6 veces superior (60 mol/kg) en los ratones IL-4 que en los ratones de tipo salvaje (10,3 mol/kg). La expresión de la IL-4 en las células de Clara aumentó la síntesis y el aclaramiento de lípidos surfactantes, estableciendo un nuevo equilibrio con un aumento de agrupaciones de surfactante y de una proteinosis alveolar asociada con un aumento selectivo de la proteína SP-D, que demostró un efecto previamente inesperado para la IL-4 en la homeostasis del surfactante pulmonar.

Diagnóstico utilizando la proteína SP-D o la secuencia

50 La SP-D es importante en el funcionamiento y el desarrollo de pulmones normales. Los ratones SP-D (-/-) son un modelo para el enfisema. Esto sugiere, pues, que las mutaciones en el gen o en los alelos del gen que expresan la SP-D representan un profundo efecto en la susceptibilidad a enfermedades pulmonares. Por consiguiente, un procedimiento que identifique mutaciones o alelos, y proteínas mutadas identifica los individuos con riesgo de padecer enfisema, infecciones pulmonares, y varias enfermedades respiratorias. Los Ejemplos 18 y 19 son un protocolo de muestra para estas técnicas de diagnósticos.

Diagnóstico de pacientes con mutación en el gen de la SP-D

Ejemplo 18

60 Las mutaciones en el gen de la SP-D están implicadas probablemente en los síntomas y en la etiología del enfisema. Por consiguiente, las mutaciones se identifican mediante un análisis de la secuencia de un número estadísticamente significativo de los pacientes. Estas mutaciones se utilizan para producir un test de diagnóstico. Las mutaciones en el gen de la SP-D se detectan de las siguientes maneras: se realiza un análisis por PCR del gen de la SP-D utilizando los cebadores adecuados. Los fragmentos de PCR resultantes se analizan mediante SSCP y se secuencian para determinar la mutación o el alelo. Alternativamente, la hibridación diferencial del ADN genómico o del ADNc se utiliza para detectar mutaciones.

ES 2 311 307 T3

Diagnóstico de pacientes con la proteína SP-D mutada

Ejemplo 19

5 Se producen unos anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen específicamente la proteína SP-D mutada o un alelo de la SP-D asociado con el enfisema o con otra enfermedad pulmonar. Después, estos anticuerpos se utilizan para preparar un inmunoensayo del enzima cruzado para comprobar la susceptibilidad a estas enfermedades pulmonares. Los anticuerpos del Ejemplo 20 se pueden utilizar para este ensayo.

10 El Ejemplo 20 presenta un protocolo para la purificación o purificación posterior de anticuerpos monoclonales utilizando la tecnología transgénica.

Ejemplo 20

15 *Purificación de los anticuerpos monoclonales y policlonales específicos para la SP-D*

La producción de anticuerpos policlonales específicos con una reactividad elevada requiere la purificación exhaustiva del antígeno de interés. Hemos desarrollado varios anticuerpos monoclonales utilizando unos antígenos parcialmente purificados para inyectarse que han dado como resultado anticuerpos que presentan un título elevado con respecto al antígeno de interés y que también reaccionan ante las impurezas. Se han utilizado tejidos de fase sólida de los ratones transgénicos para extraer los anticuerpos no específicos de este antisuero. La Proteína Surfactante D (SP-D) se purificó utilizando una columna de maltosa con una elución de manganeso. La SP-D purificada se inyectó en conejos de Nueva Zelanda en un adyuvante incompleto de Freund. El antisuero resultante se probó con un lavado pulmonar total con Western blot que reveló uniones a la SP-D y a otras proteínas. El antisuero se dejó reaccionar durante la noche con un homogeneizado de pulmón de fase sólida de un ratón knockout mutante que no produce ninguna proteína SP-D. El antisuero se dejó reaccionar con el lavado pulmonar total después de la absorción mostrando reactividades sólo ante la SP-D. Este antisuero también se evaluó en experimentos inmunohistoquímicos que demostraron unas reactividades muy bajas en las secciones pulmonares de ratones SP-D knockout mutantes y unas reactividades muy específicas para las células de tipo II en los ratones control normales. Esta técnica mejora enormemente la capacidad para preparar unos anticuerpos altamente específicos con títulos grandes y elimina la necesidad de utilizar unos agentes de bloqueo cuando se utilizan anticuerpos absorbidos.

Estos anticuerpos se podrían utilizar para el diagnóstico, la purificación, y en futuras investigaciones de la proteína SP-D.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 311 307 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de una proteína SP-D de mamífero aislada, o vectores que expresan la proteína SP-D de mamífero, en la preparación de una formulación de un aerosol para el tratamiento del enfisema.

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho enfisema se ha desarrollado después de una lesión pulmonar crónica.

10 3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha proteína SP-D es adecuada para la administración intratraqueal.

4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha proteína SP-D se expresa a partir de un vector adenoviral.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

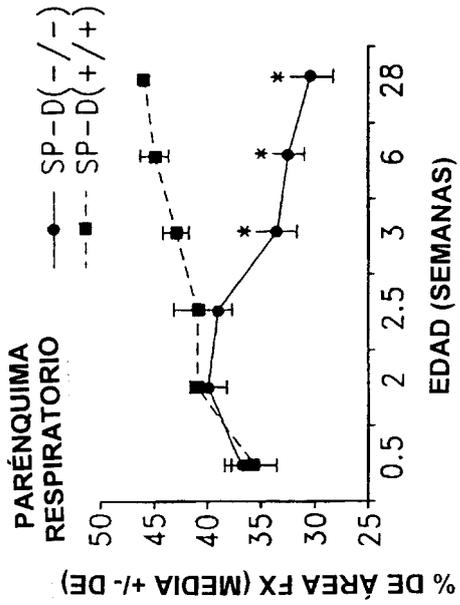


FIG. 1B

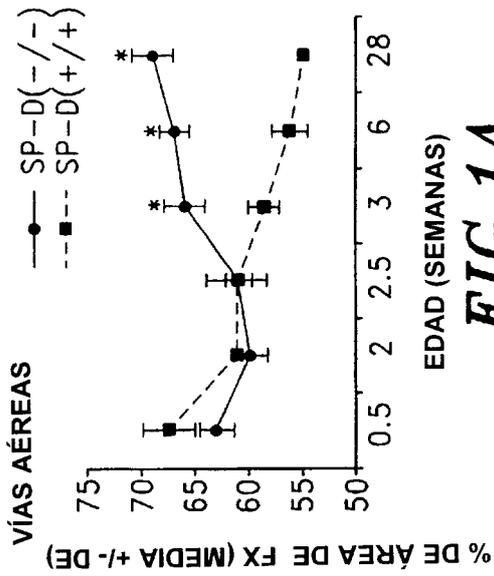


FIG. 1A

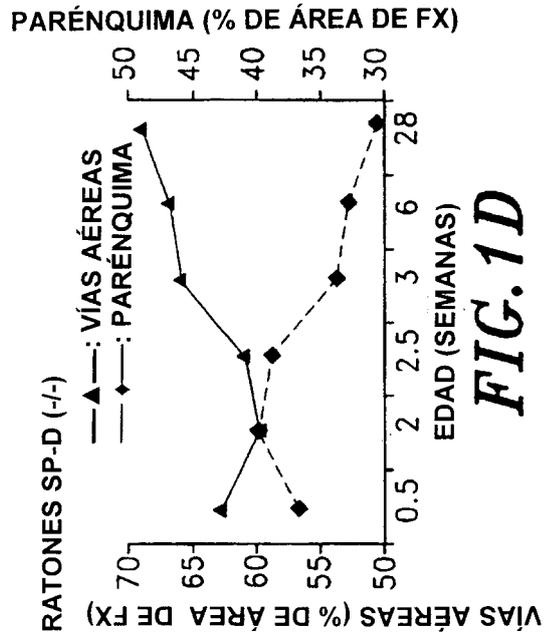


FIG. 1D

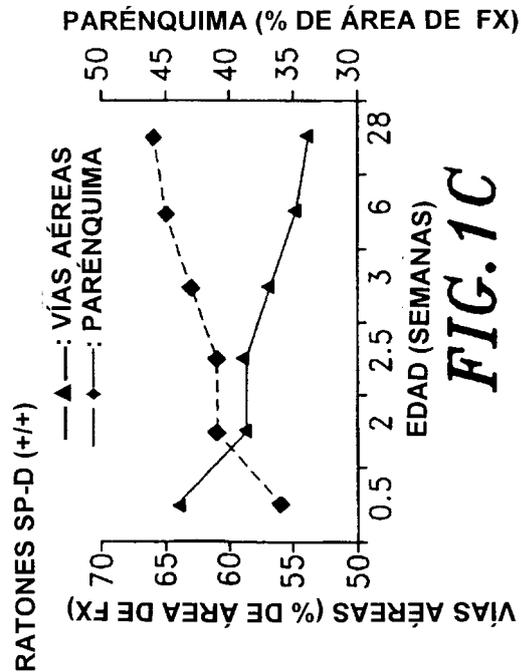
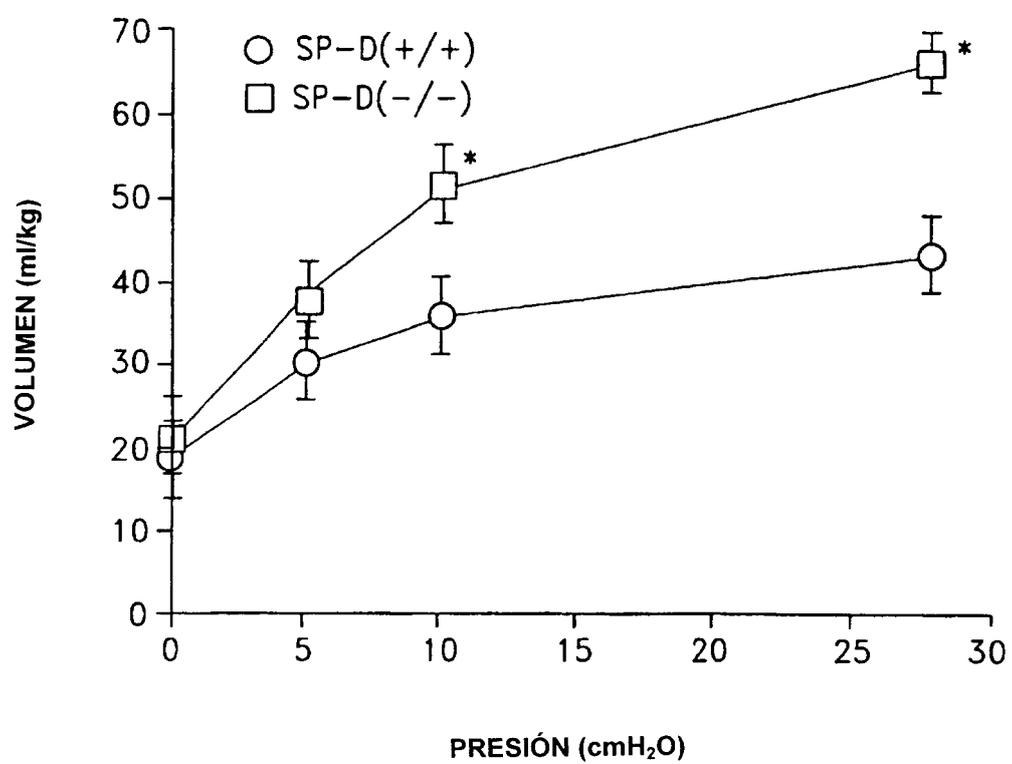


FIG. 1C

**FIG.2**

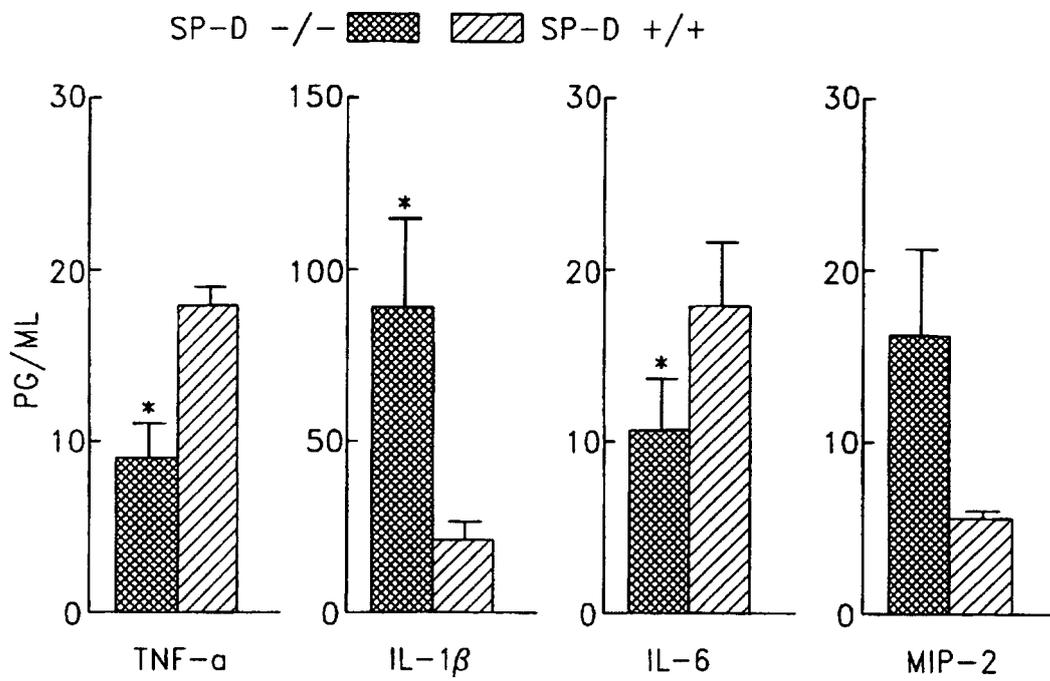


FIG.3

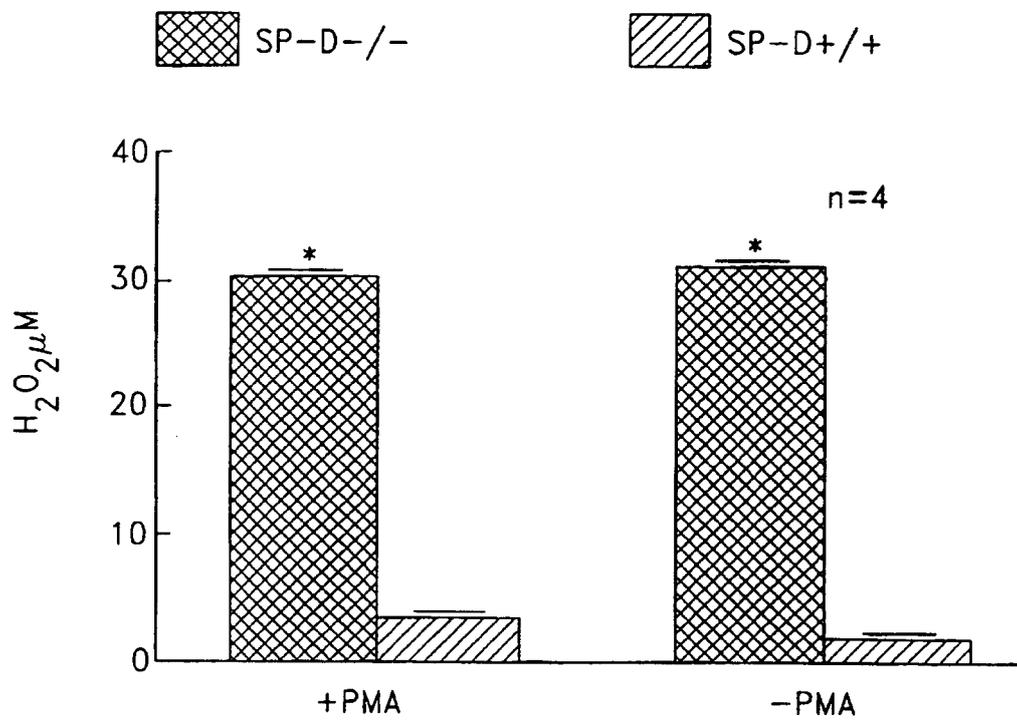


FIG.4

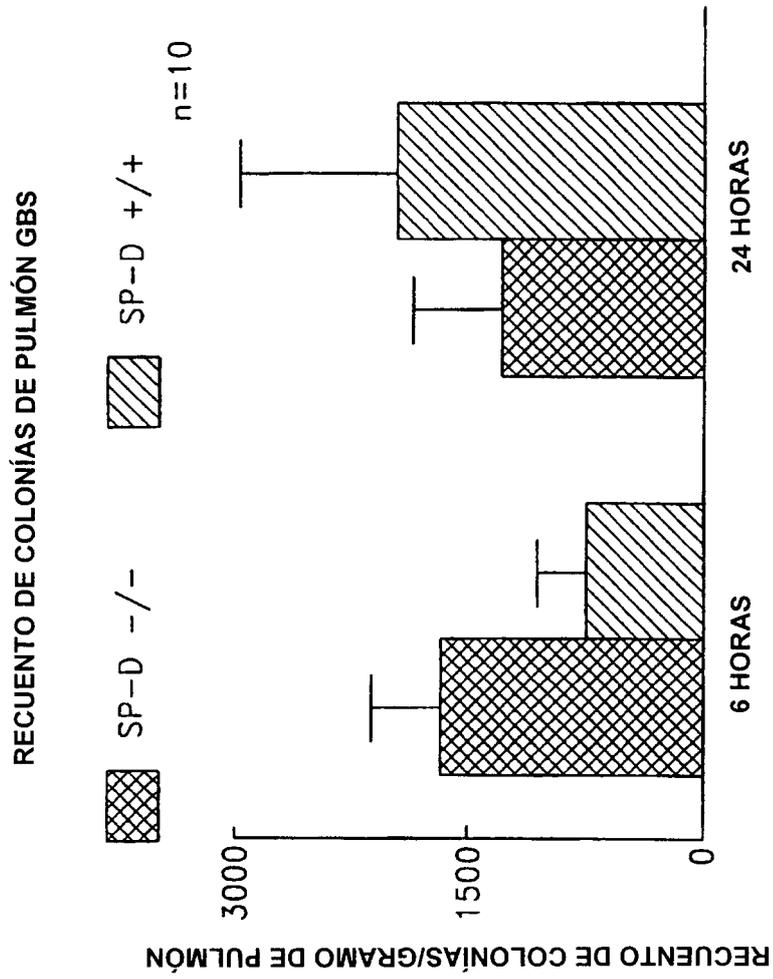


FIG.5

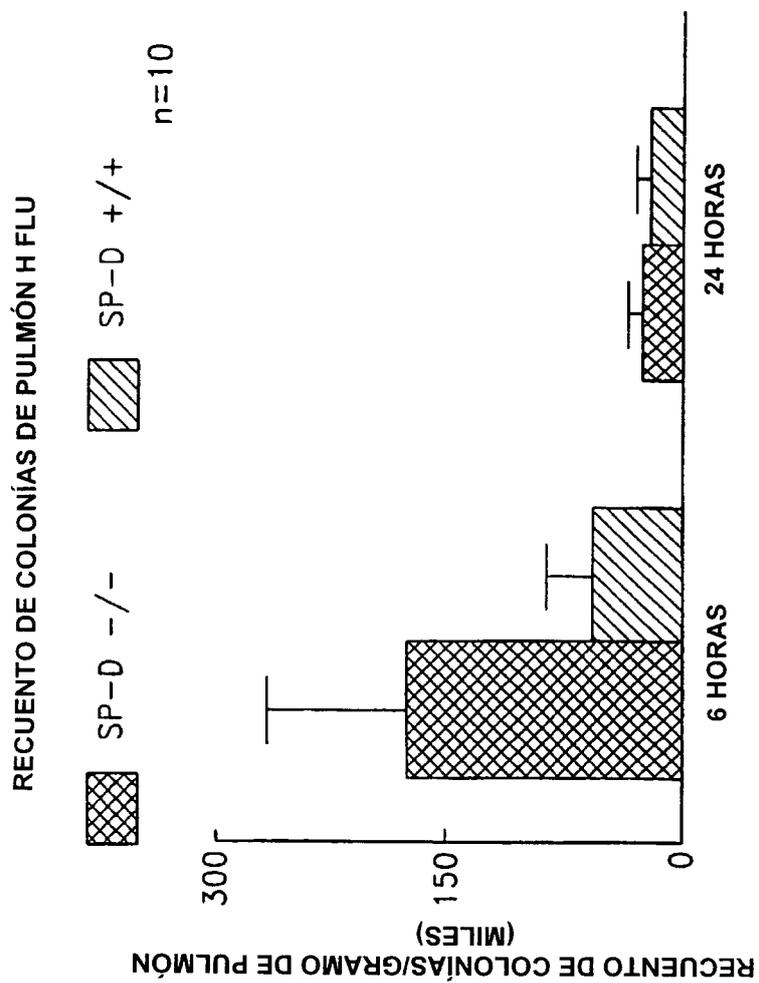


FIG. 6

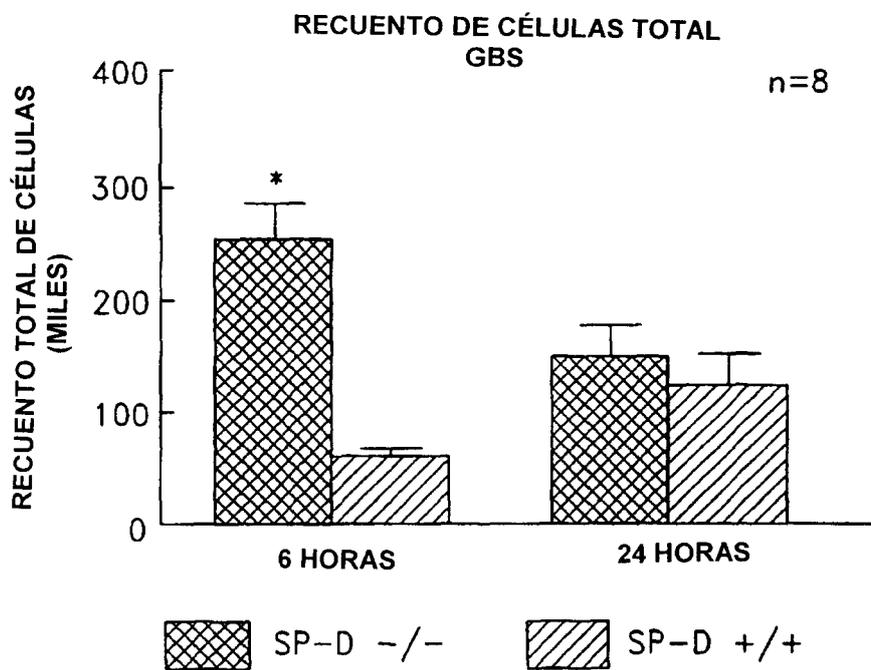


FIG. 7A

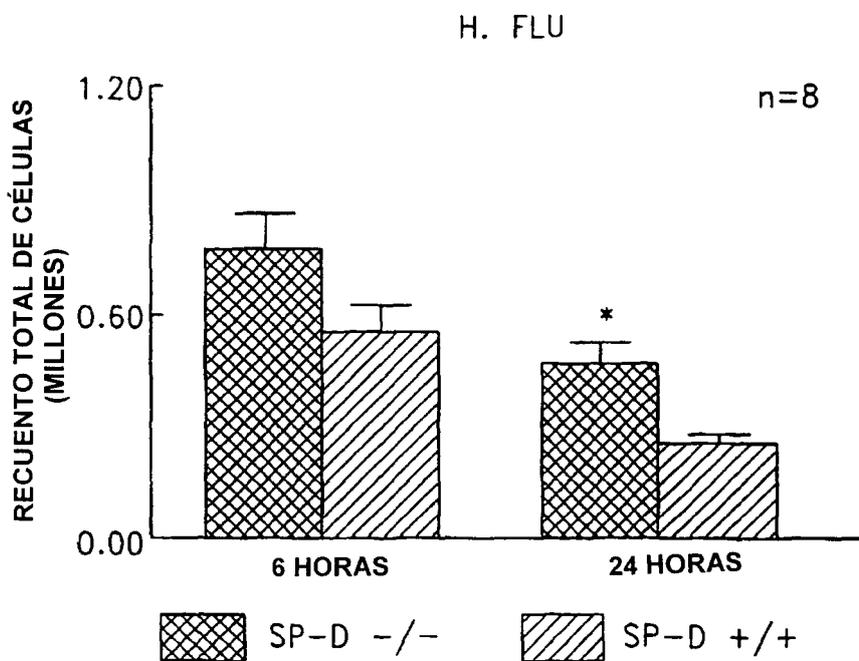


FIG. 7B

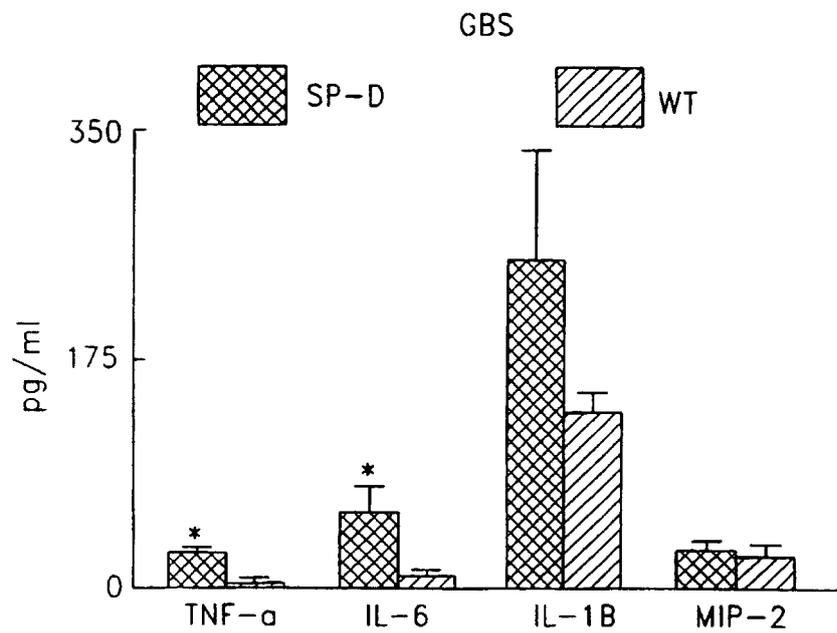


FIG. 8A

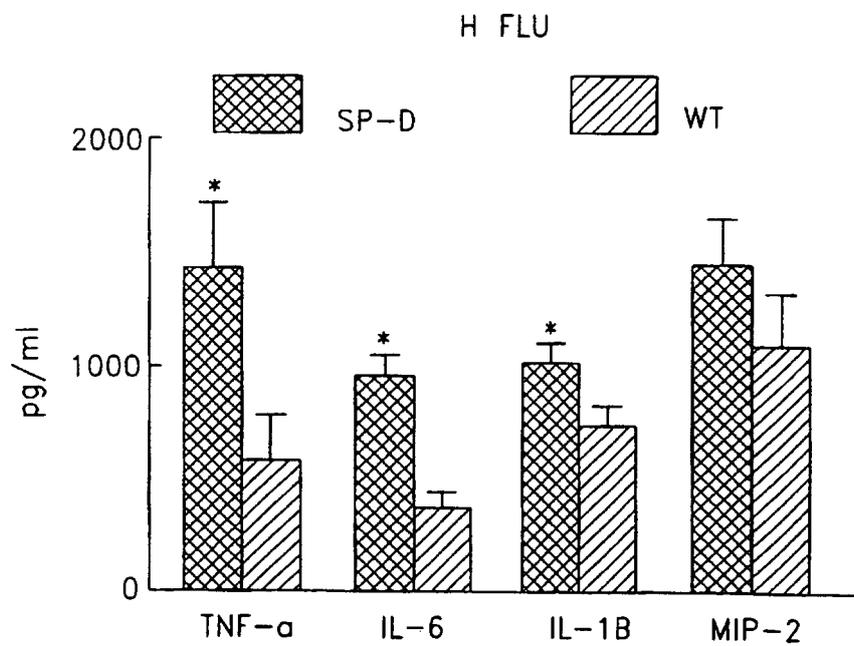


FIG. 8B

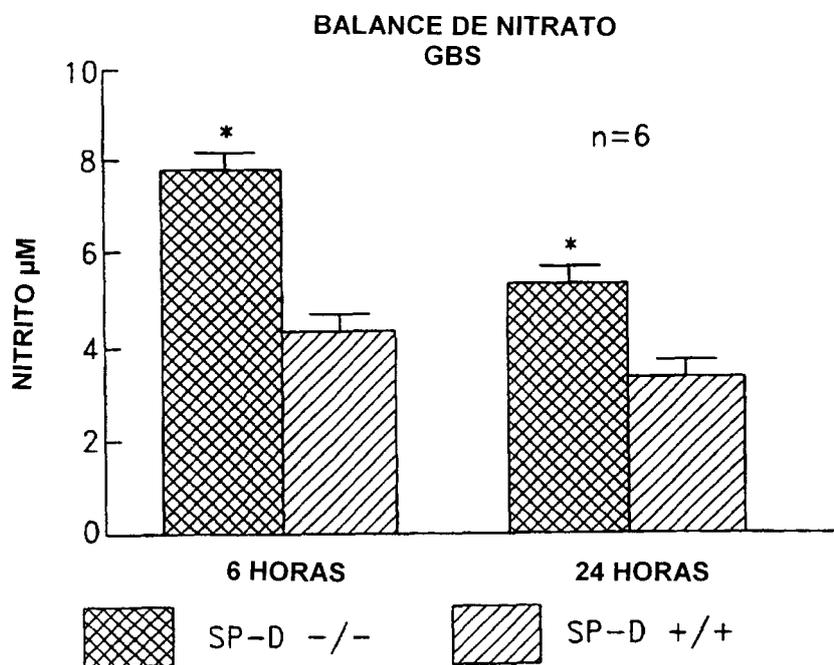


FIG.9A

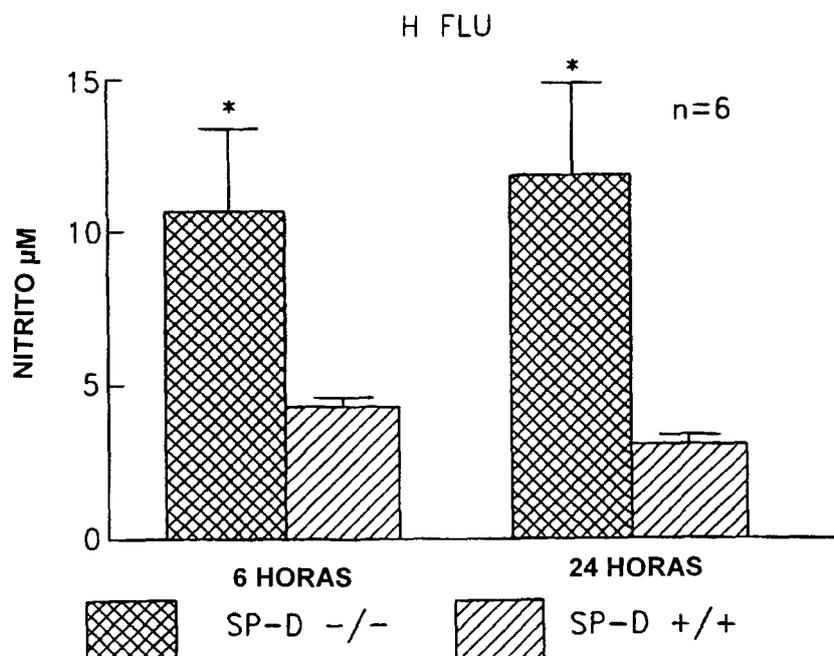


FIG.9B

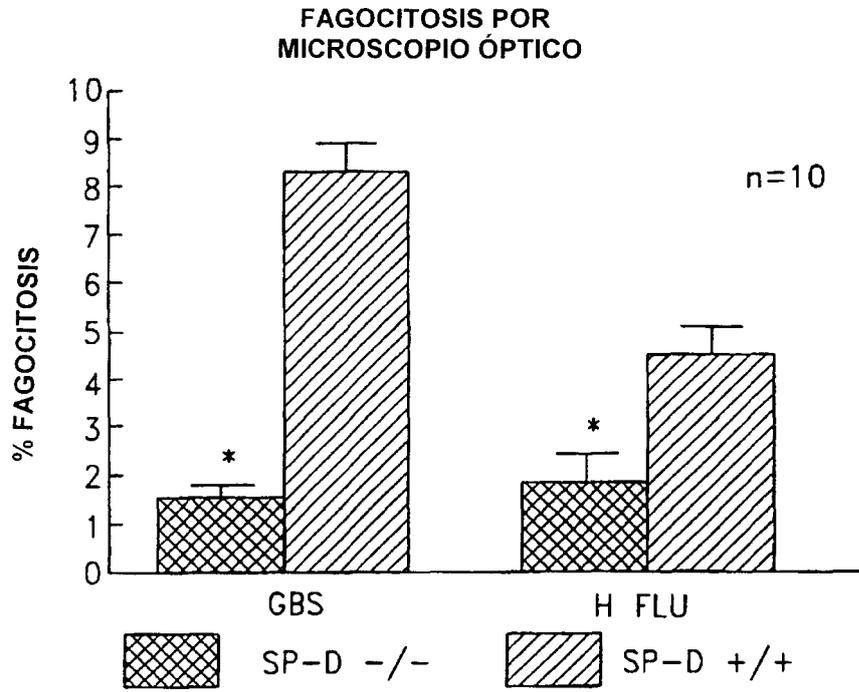


FIG. 10A

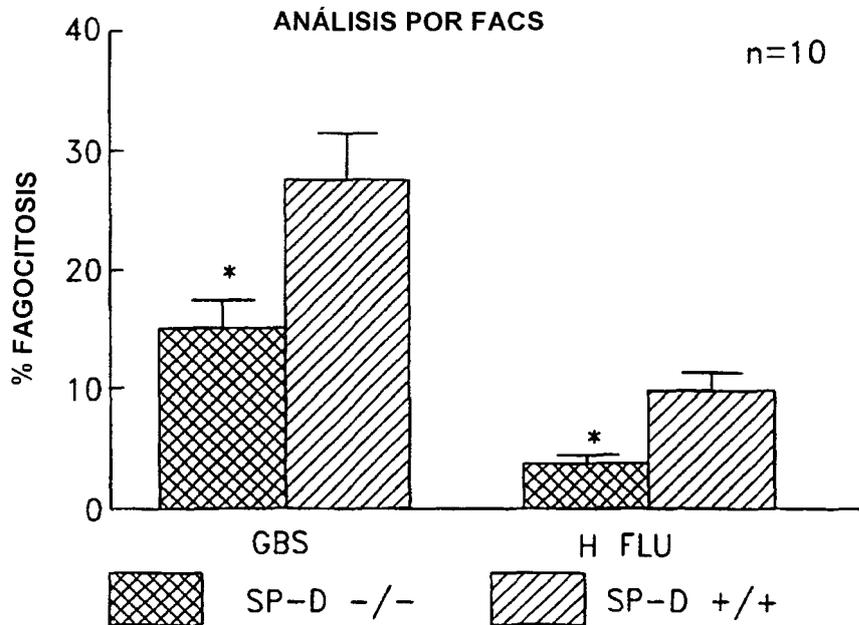


FIG. 10B

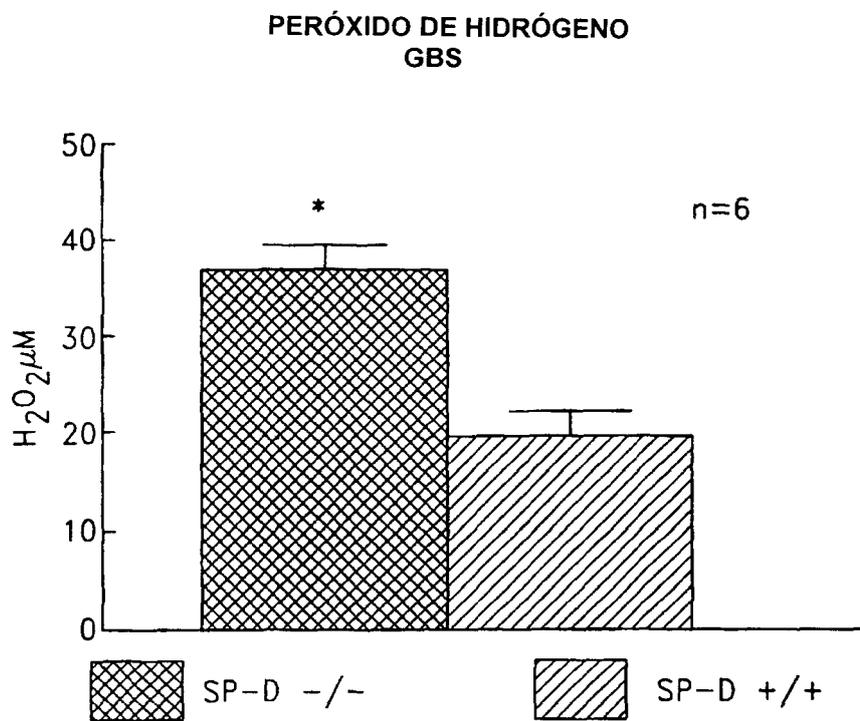


FIG. 11A

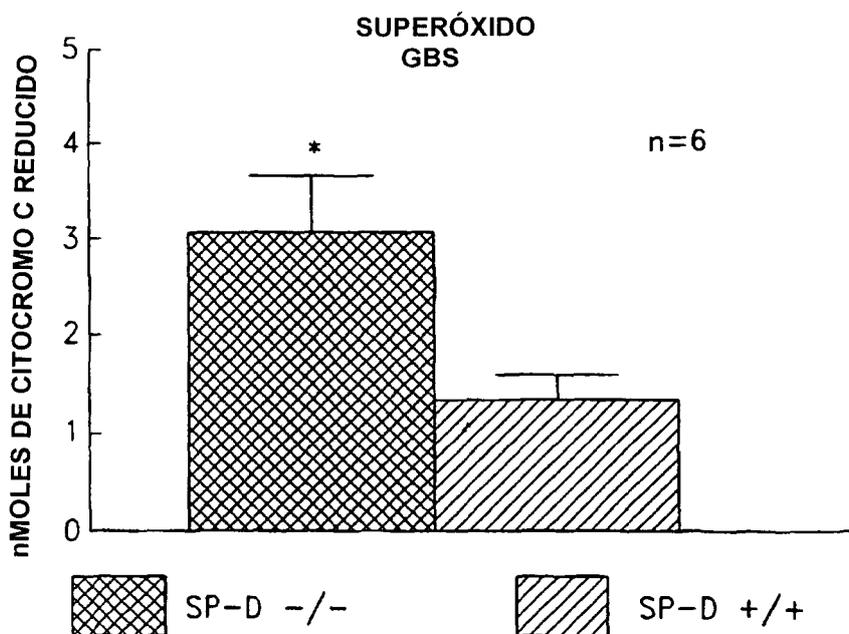
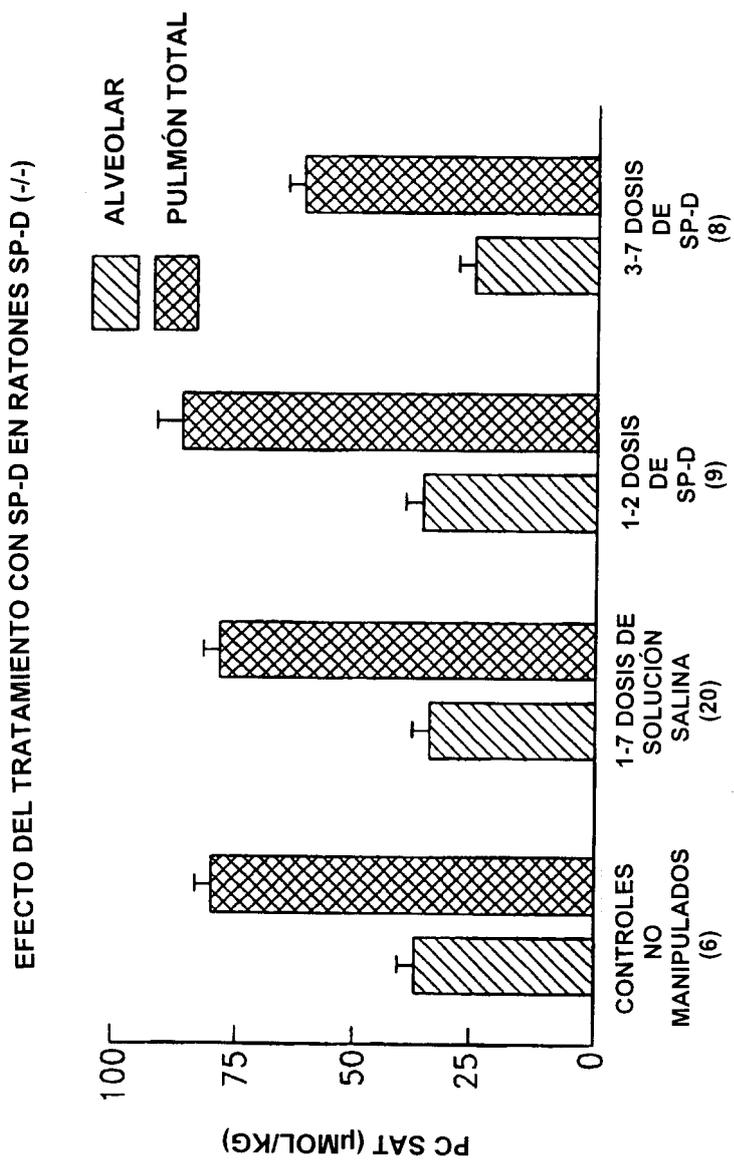


FIG. 11B



*p < 0,04 VS CONTROLES

FIG. 12

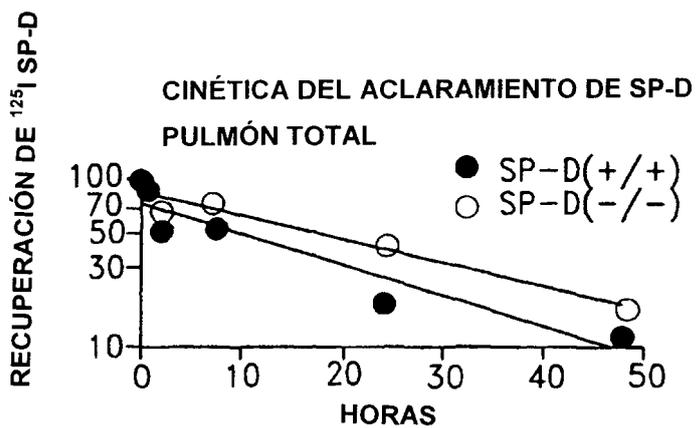


FIG. 13A

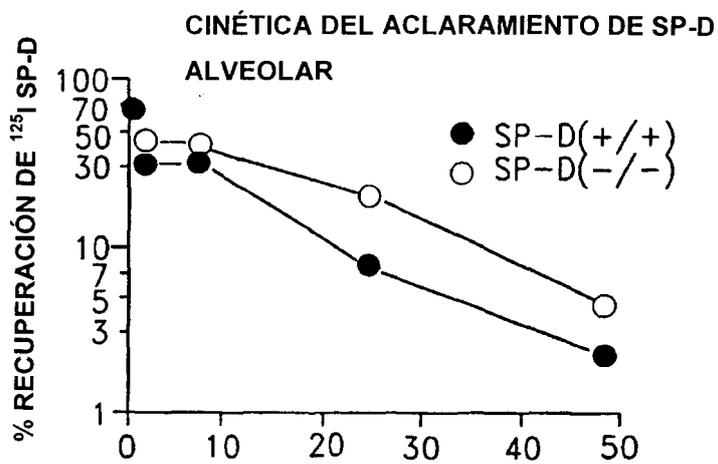


FIG. 13B

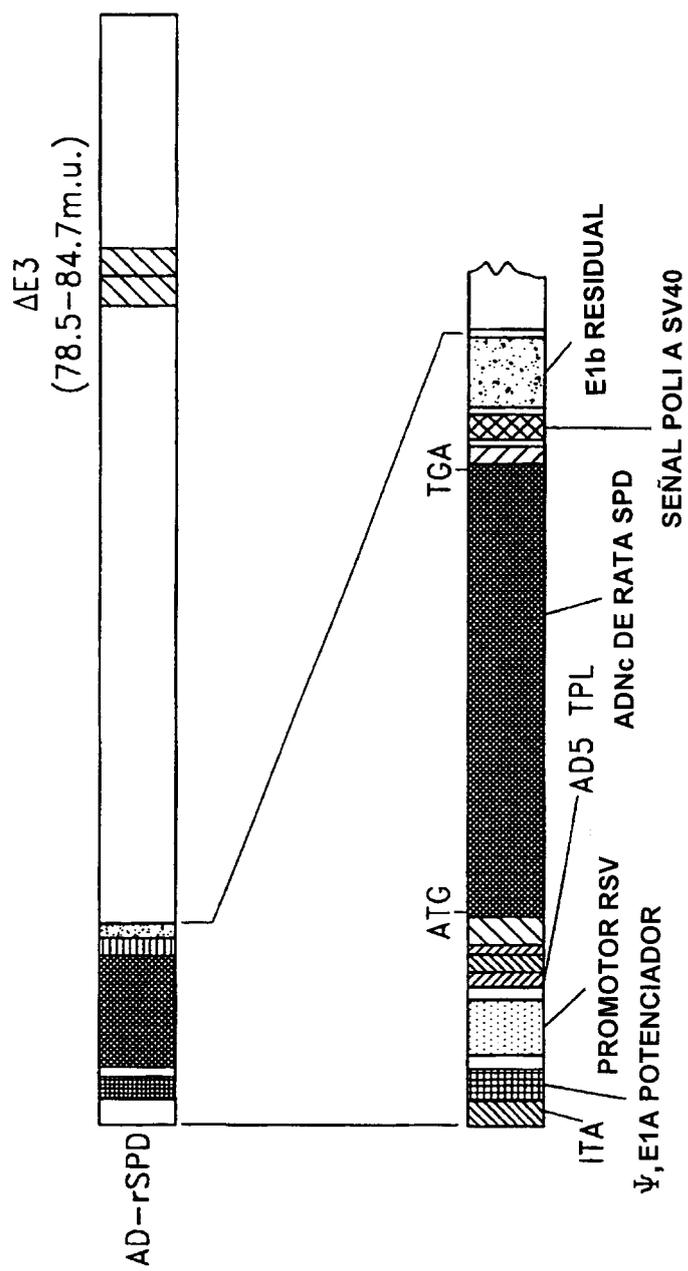


FIG. 14

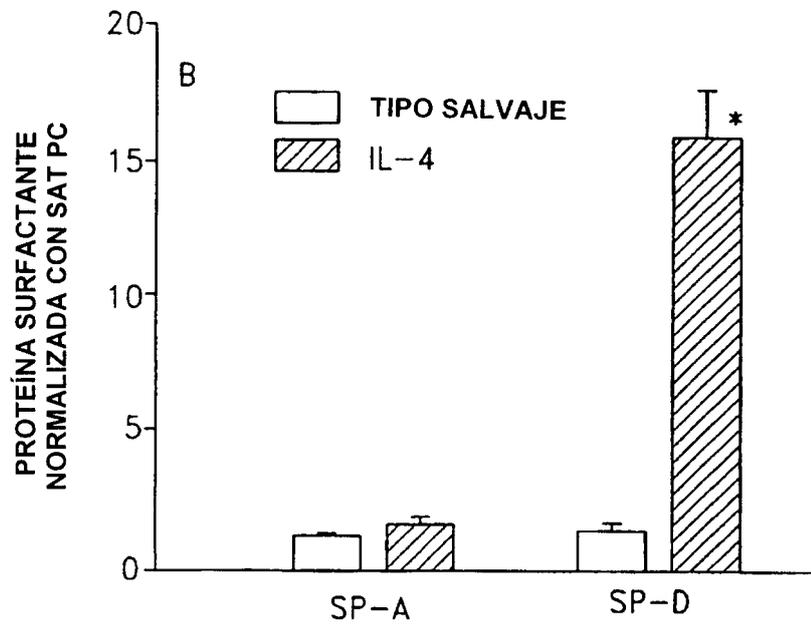


FIG. 15