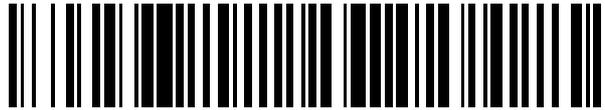


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 425**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2002 E 02772550 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1440083**

54 Título: **Moléculas**

30 Prioridad:

**25.10.2001 GB 0125638**  
**26.04.2002 GB 0209619**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.04.2013**

73 Titular/es:

**MEDICAL RESEARCH COUNCIL (100.0%)**  
**2nd Floor David Phillips Building Polaris House**  
**North Star Avenue Swindon Wiltshire**  
**SN2 1FL SWINDON, GB**

72 Inventor/es:

**CLARK, HOWARD;**  
**NADESALINGAM, PALANIYAR;**  
**REID, KENNETH BANNERMAN y**  
**STRONG, PETER**

**ES 2 401 425 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

Moléculas.

Se dan a conocer en el presente documento métodos de tratamiento y diagnóstico de una enfermedad, y moléculas y composiciones para su uso en tales métodos.

- 5 Se da a conocer un fragmento recombinante de proteína tensioactiva D, así como un ácido nucleico que codifica para esta proteína. Se demuestra que este fragmento conserva las propiedades beneficiosas de la proteína tensioactiva D, y se muestra que puede usarse para tratar diversas enfermedades. Estas enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias, incluyendo enfermedad pulmonar crónica, enfermedad pulmonar crónica neonatal, asma, incluyendo asma alérgica, particularmente provocada por ácaros del polvo doméstico, así como otras enfermedades. El fragmento de proteína tensioactiva D recombinante que se da a conocer también puede usarse para tratar alergias de diversas clases.

### Sumario

15

La materia de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

- Los presentes inventores han determinado que SP-D se une a ácido nucleico libre, particularmente ADN, mediante su actividad de unión a hidratos de carbono. Se cree que el reconocimiento de ADN libre es responsable de al menos algunos de los efectos beneficiosos de SP-D. Además, los inventores han determinado que las propiedades de unión a ADN de SP-D, así como otras propiedades de esta molécula, se conservan en un fragmento recombinante denominado rSP-D(n/CRD). Por tanto, según un primer aspecto, se da a conocer en el presente documento un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad.

- Se da a conocer en el presente documento, según un segundo aspecto, un método de tratamiento de un individuo que padece una enfermedad o de prevención de la aparición de una enfermedad en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo.

La enfermedad comprende preferiblemente una enfermedad inflamatoria, preferiblemente eccema.

- 35 La enfermedad puede comprender una enfermedad inflamatoria, preferiblemente una enfermedad pulmonar inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en: enfermedad pulmonar crónica neonatal, síndrome de dificultad respiratoria neonatal (SDR), síndrome de dificultad respiratoria del adulto, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias (EPOC), asma, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, enfisema, enfermedad pulmonar inflamatoria intersticial, sarcoidosis, neumonía, enfermedad pulmonar inflamatoria crónica, enfermedad pulmonar inflamatoria crónica neonatal.

Preferiblemente, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad pulmonar crónica neonatal, enfisema pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística y asma.

5 La enfermedad puede comprender una alergia. La alergia es preferiblemente una alergia a ácaros del polvo doméstico (*Dermatophagoides* spp), preferiblemente *Dermatophagoides pteronyssinus* o *Dermatophagoides farinae*, o a hongos o esporas fúngicas, preferiblemente *Aspergillus fumigatus*. La alergia se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: una alergia respiratoria estacional, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis no alérgica, rinitis vasomotora, rinitis irritante,  
10 una alergia contra pólenes de hierbas, pólenes de árboles o caspa de animales, una alergia asociada a asma alérgica, una alergia alimentaria y enfermedades oculares alérgicas.

La enfermedad puede ser una que está asociada a infección microbiana, incluyendo infección bacteriana e infección viral, preferiblemente una infección microbiana del pulmón.  
15

Se da a conocer en el presente documento, según un tercer aspecto, un método de reducción de la hiperreactividad de las vías respiratorias, los niveles de IgE séricos o la eosinofilia en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo.  
20

Como cuarto aspecto, se da a conocer en el presente documento un método de reducción del número de macrófagos alveolares en un individuo, preferiblemente potenciando el aclaramiento de macrófagos alveolares apoptóticos, o potenciando el aclaramiento de macrófagos alveolares necróticos, o ambos, comprendiendo el método administrar al individuo un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo.  
25

En realizaciones preferidas, el polipéptido de rSPD(n/CRD) comprende, preferiblemente consiste en, una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

Preferiblemente, se administra al individuo un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de rSPD(n/CRD), o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo, preferiblemente un ácido nucleico que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2.  
30

Se da a conocer en el presente documento, según un quinto aspecto, el uso de un polipéptido de rSPD(n/CRD), ácido nucleico, fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo en un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad.  
35

Se da a conocer en el presente documento, en un sexto aspecto, un polipéptido recombinante que comprende un fragmento de SP-D que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo.

40 En un séptimo aspecto, se a conocer en el presente documento un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para un polipéptido recombinante según el sexto aspecto de la invención. Preferiblemente, el ácido nucleico comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2.

Según un octavo aspecto, se da a conocer en el presente documento un vector, preferiblemente un vector de expresión, que comprende una secuencia de ácido nucleico según el séptimo aspecto.

5 Se da a conocer en el presente documento, según un noveno aspecto, una célula huésped transformada con un vector según el octavo aspecto.

Se da a conocer en el presente documento, según un décimo aspecto, una composición farmacéutica que comprende un polipéptido recombinante según el sexto aspecto, un ácido nucleico según el séptimo aspecto, un vector que comprende un ácido nucleico según el octavo aspecto, o una célula huésped según el noveno aspecto, junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 Como decimoprimer aspecto, se da a conocer en el presente documento un método de identificación de una molécula que se une a un polipéptido de rSPD(n/CRD), comprendiendo el método exponer un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo a una molécula candidata y detectar si la molécula candidata se une al polipéptido de rSPD(n/CRD), etc.

15 Según un decimosegundo aspecto, se da a conocer en el presente documento un método de identificación de un agonista o antagonista de un polipéptido de rSPD (n/CRD), comprendiendo el método: (a) proporcionar una célula u organismo; (b) exponer la célula u organismo a un polipéptido de rSPD(n/CRD), ácido nucleico, o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo; (c) exponer la célula a una molécula candidata; y (d) detectar un efecto mediado por rSPD(n/CRD).

20 El efecto mediado por rSPD(n/CRD) se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: reducción de la eosinofilia de sangre periférica, reducción de los niveles de IgE séricos, reducción de los niveles de IgG1 séricos, reducción de la hiperreactividad de las vías respiratorias, reducción del número de macrófagos alveolares, reducción de los niveles de fosfolípidos en lavado, regulación por disminución de la expresión de eotaxina, reducción en la expresión de MCP-1, regulación por disminución de la expresión de MIP-1 $\alpha$  y regulación por disminución de la expresión de MIP-2. El método comprende además preferiblemente aislar o sintetizar una molécula seleccionada o identificada.

30 Se da a conocer en el presente documento, según un decimotercer aspecto, una molécula identificada o seleccionada según el decimosegundo aspecto.

35 Se da a conocer en el presente documento, según un decimocuarto aspecto, una composición que comprende un polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo, junto con uno o más de los siguientes componentes: un extracto de pulmón, preferiblemente un extracto bovino, preferiblemente, de pulmón de ternero, o un componente del mismo, un fosfolípido, preferiblemente una fosfatidilcolina o una fosfatidilcolina disaturada, un ácido graso, una proteína asociada a tensioactivo, preferiblemente una proteína B asociada a tensioactivo o una proteína C asociada a tensioactivo, un alcohol cetílico, un alcohol de repetición de cadena larga, tiloxapol, palmitato de colfoscerilo (dipalmitoilfosfatidilcolina), ácido palmítico, tripalmitina, poractant alfa y cloruro de sodio.

Como decimoquinto aspecto, se da a conocer en el presente documento el uso de un polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD), o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo en una terapia de sustitución con tensioactivo.

5 Se da a conocer en el presente documento, según un decimosexto aspecto, un polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD), o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo en terapia de sustitución con tensioactivo para su uso en terapia de sustitución con tensioactivo.

10 Según un decimoséptimo aspecto, se da a conocer en el presente documento el uso de SP-D o un fragmento de la misma en la fabricación de una composición para el tratamiento de un estado que implica la producción de ADN libre sobre la superficie de células. SP-D y fragmentos de la misma, incluyendo rSP-D(n/CRD), se unen al ADN mediante su capacidad de unión a hidratos de carbono. Los fragmentos de SP-d, por consiguiente, conservan ventajosamente la capacidad de unión a hidratos de carbono de SP-D nativa. Se da a conocer en el presente documento un método para tratar a un paciente que padece un estado que implica la producción de ADN libre sobre la superficie de células que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad farmacéuticamente eficaz de SP-D o un fragmento de la misma.

20 Se da a conocer en el presente documento el uso de SP-D o un fragmento de la misma en la fabricación de una composición para el tratamiento de una infección crónica que da como resultado la acumulación de ácido nucleico libre en el pulmón. Por ejemplo, la infección puede ser bacteriana, viral o fúngica.

25 Se da a conocer en el presente documento el uso de SP-D o un fragmento de la misma en la fabricación de una composición para el tratamiento de fibrosis quística. En fibrosis quística, se produce ácido nucleico libre por células bacterianas en el pulmón, lo que conduce a formación de biopelícula bacteriana e infección pulmonar bacteriana persistente. SP-D y fragmentos de la misma también actúan opsonizando muchos patógenos pulmonares, aumentando la eficacia del tratamiento de la fibrosis quística.

30 En un aspecto adicional, se da a conocer en el presente documento el uso de SP-D o un fragmento de la misma en la fabricación de una composición para el aclaramiento de células necróticas y apoptóticas. Tales células tienen ADN en sus superficies, al que se unen SP-D y fragmentos de la misma para el aclaramiento mediado por fagocitos. Por tanto, se dan a conocer en el presente documento composiciones para el tratamiento de estados y enfermedades pulmonares tales como EPOC, inflamación crónica y asma crónica usando SP-D o fragmentos de la misma y métodos para tratar a un paciente que padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en fibrosis quística, enfermedades pulmonares, EPOC, inflamación crónica, infección bacteriana crónica, infección viral crónica, 35 infección fúngica crónica y asma crónica que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad farmacéuticamente eficaz de SP-D o un fragmento de la misma.

45 Todavía en un aspecto adicional, se da a conocer en el presente documento el uso de SP-D o un fragmento de la misma en la fabricación de una composición para el tratamiento de la producción de autoanticuerpos en enfermedades autoinmunitarias; así como un método para tratar a un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar a un paciente que necesita

tal tratamiento una cantidad farmacéuticamente eficaz de SP-D o un fragmento de la misma.

ADN libre o residuos de ADN de células necróticas o apoptóticas pueden actuar como autoantígeno, dando como resultado la producción de autoanticuerpos. El aclaramiento de tal ADN libre por SP-D y fragmentos de la misma reduce la producción de autoanticuerpos.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1A representa la estructura de un fragmento recombinante de SP-D humana (rSPD(n/CRD)). Éste está compuesto por trímeros de la región de cuello y el dominio de reconocimiento de hidratos de carbono (CRD) y se ha expresado, purificado y caracterizado en la Unidad de inmunquímica MRC en la Universidad de Oxford.

Figura 1B. SDS-PAGE de filtrado de cultivo de 1 semana de *Aspergillus fumigatus* que muestra una banda de 18 kDa dominante (Asp f 1).

Figura 2A. IgE sérica en modelo de ratón con Afu medida 3 días tras el tratamiento con 5 dosis diarias de 10 µg de rSPD (n/CRD) o PBS administradas por vía intranasal tras la exposición intranasal con Afu 1 wcf y tras la reexposición 1 semana más tarde con Afu solo. P=ratones no sensibilizados tratados con PBS, AP=ratones sensibilizados tratados con PBS, AR=ratones sensibilizados tratados con rSPD(n/CRD), APrc=ratones reexpuestos a Afu tratados con PBS, ARrc=ratones reexpuestos a Afu tratados con rSPD(n/CRD).

Figura 2B. IgE específica de Afu en modelo de ratón con Afu. Como la figura 2A anterior, pero se mide IgG1 específica de Afu.

Figura 3. Eosinofilia de sangre periférica en modelo de ratón con Afu medida 1 día tras el tratamiento con 4 dosis diarias de 10 µg de rSPD(n/CRD) o PBS administradas por vía intranasal tras la exposición intranasal con Afu 1 wcf y tras la reexposición 1 semana más tarde con Afu solo. P=ratones no sensibilizados tratados con PBS, AP=ratones sensibilizados tratados con PBS, AR=ratones sensibilizados tratados con rSPD(n/CRD), APrc=ratones reexpuestos a Afu tratados con PBS, ARrc=ratones reexpuestos a Afu tratados con rSPD(n/CRD).

Figuras 4A, 4B y 4C. Citocinas en modelo de ratón con Afu medidas 1 día tras el tratamiento con 2 dosis diarias de 10 µg de rSPD(n/CRD) administradas por vía intranasal tras la exposición intranasal con Afu 1wcf. Figura 4A, IL-12 medida en el bazo, figura 4B, IFN-γ medido en el bazo y figura 4C, IL-4 medida en el bazo. P=ratones no sensibilizados tratados con PBS, AP=ratones sensibilizados tratados con PBS, AR=ratones sensibilizados tratados con rSPD(n/CRD), AA=ratones sensibilizados tratados con rhSP-A.

Figuras 5A y 5B. Hiperreactividad de las vías respiratorias en modelo de ratón con Afu. Se tratan los ratones con 4 dosis diarias de 10 µg de rSPD(n/CRD) administradas por vía intranasal tras la exposición intranasal con Afu 1wcf. Se mide la pleuismografía 2 horas tras una reexposición intranasal con Afu 1wcf solo administrada 3 días tras la finalización del tratamiento. Figura 5A, respuesta a la dosis a dosis crecientes de metacolina. Figura 5B, respuesta a metacolina 30 mg/ml tras el

tratamiento con 4 dosis diarias de 10  $\mu$ g de rSPD(n/CRD) o rhSP-A administradas por vía intranasal tras la exposición intranasal con Afu 1wcf. P=ratones no sensibilizados tratados con PBS, AP=ratones sensibilizados tratados con PBS, AR=ratones sensibilizados tratados con rSPD(n/CRD), AA=ratones sensibilizados  
5 tratados con rfhSPA.

Figuras 6A y 6B. Secciones de pulmón teñidas con H&E de modelo de ratón con Afu de ratones sensibilizados tras el tratamiento, figura 6A con PBS, figura 6B con rSPD(n/CRD) o C ratones no sensibilizados tratados con PBS.

Figura 7A. Un análisis de IL-12 en los homogeinizados de pulmón de ratones sensibilizados con Der p tras el tratamiento medido mediante tinción de citocinas intracelulares seguido por análisis de FACS para el porcentaje de células altamente teñidas (PE>1000) positivas para IL-12. PBS= ratones no sensibilizados tratados con PBS. HP= ratones sensibilizados tratados con PBS. HR= ratones sensibilizados  
10 tratados con 10  $\mu$ g de rSP-D (N/CRD).

Figura 7B. Un análisis de IL-12 en los homogeinizados de bazo de ratones sensibilizados con Der p tras el tratamiento medido mediante tinción de citocinas intracelulares seguido por análisis de FACS para el porcentaje de células altamente teñidas (PE>1000) positivas para IL-12. PBS= ratones no sensibilizados tratados con PBS. HP= ratones sensibilizados tratados con PBS. HR= ratones sensibilizados  
15 tratados con 10  $\mu$ g de rSP-D (N/CRD). HB= ratones sensibilizados tratados con 10  $\mu$ g de BSA.

Figura 7C. Un análisis de IFN- $\gamma$  en los homogeneizados de bazo de ratones sensibilizados con Der p tras el tratamiento medido mediante tinción de citocinas intracelulares seguido por análisis de FACS para el porcentaje de células altamente teñidas (PE>1000) positivas para IFN- $\gamma$ . PBS= ratones no sensibilizados tratados con PBS. HP= ratones sensibilizados tratados con PBS. HR= ratones sensibilizados  
20 tratados con 10  $\mu$ g de rSP-D (N/CRD).

Figura 7D. Un análisis de TNF- $\alpha$  en los homogeneizados de bazo de ratones sensibilizados con Der p tras el tratamiento medido mediante tinción de citocinas intracelulares seguido por análisis de FACS para el porcentaje de células altamente teñidas (PE>1000) positivas para TNF- $\alpha$ . PBS= ratones no sensibilizados tratados con PBS. HP= ratones sensibilizados tratados con PBS. HR= ratones sensibilizados  
25 tratados con 10  $\mu$ g de rSP-D (N/CRD).

La figura 8A (titulada “respuesta de Penh promedio a una exposición de 1 min. con metacolina 20 mg/ml en el 4º día de tratamiento”) es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con rSPD(n/CRD) sobre la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) de ratones alérgicos, medida en el último día de los 4 días de tratamiento. Los ratones alérgicos se sensibilizan a *Dermatophagoides pteronyssinus*. El control de PBS representa ratones no sensibilizados tratados con PBS.  
35 Se muestra la respuesta de Penh promedio a una exposición de 1 minuto con metacolina 20 mg/ml en el 4º día de tratamiento. Eje X: izquierda: control de PBS, medio: Der p-PBS, derecha: Der p-rSPD; eje Y: % de Penh por encima del fondo.

La figura 8B (titulada “Hiperreactividad de las vías respiratorias en ratones alérgicos inducida por exposición con metacolina”) es un gráfico que muestra la respuesta a la dosis de metacolina, tras la reexposición con alérgeno 4 días tras el  
45

tratamiento con PBS o rSPD(n/CRD). Los ratones alérgicos se sensibilizan a *Dermatophagoides pteronyssinus*. El PBS-control de PBS representa ratones no sensibilizados tratados con PBS. Se mide la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) en ratones alérgicos inducida mediante exposición a metacolina. Eje X: metacolina (mg/ml); rombos: PBS-PBS, cuadrados: Der p-PBS, triángulos: Der p-rSPD.

La figura 9 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con rSP-D (N/CRD) sobre el número de macrófagos alveolares, tras lavado. Eje X: edad en semanas; eje Y: número de macrófagos alveolares x 10<sup>4</sup> por lavado de ratón.

10 La figura 10A muestra una citocentrifugación de células en lavado broncoalveolar. Se tiñen macrófagos alveolares con verde malaquita (paneles superiores) o cristal violeta (paneles inferiores) tras la citocentrifugación. Se muestra la morfología para sin tratamiento (paneles superior izquierdo), tratadas con BSA (paneles superior derecho) y tratadas con r-SP-D (paneles inferiores).

15 La figura 10B muestra una citocentrifugación de células en lavado broncoalveolar. Parte superior izquierda: células no tratadas de ratones deficientes en SP-D; parte superior derecha: células de ratones de tipo natural; parte inferior izquierda: células de ratones deficientes en SP-D tratadas con BSA; parte inferior derecha: células de ratones deficientes en SP-D tratadas con rSP-D.

20 La figura 11 (titulada "Fosfolípido en sobrenadante de lavado libre de células por ratón") es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con rSPD (N/CRD) sobre los niveles de fosfolípido en LBA totales. Se muestra el fosfolípido en sobrenadante de lavado libre de células por ratón. Eje X: edad en semanas; eje Y: fosfolípido en µg por ratón.

25 La figura 12 (titulada "Niveles de ARNm de quimiocinas en ratones deficientes en SP-D en comparación con TN y el efecto del tratamiento con rSP-D") son gráficos que muestran los niveles de ARNm de quimiocinas en ratones deficientes en SP-D en comparación con el tipo natural y el efecto del tratamiento con rSP-D (N/CRD).

30 La figura 13A muestra un resultado representativo de la citometría de flujo de dispersión frontal (tamaño celular) y dispersión lateral (granularidad) en ratones deficientes en SP-D en comparación con ratones de tipo natural.

La figura 13B muestra los patrones típicos de tinción de anexina V y PI de macrófagos de ratones deficientes en SP-D en comparación con ratones de tipo natural.

35 La figura 13C muestra el grado de marcaje conjunto de rSP-D marcada con FITC con células positivas para V y/o PI.

La figura 13D es un gráfico que muestra el porcentaje de células apoptóticas (panel superior) y células necróticas (panel inferior) en lavado broncoalveolar de ratones deficientes en SP-D no tratados, ratones de tipo natural, ratones tratados con rSPD(n/CRD), ratones tratados con PBS, ratones tratados con SP-A y ratones tratados con BSA.

40 La figura 14 es un gráfico que muestra las concentraciones de GM-CSF en lavado broncoalveolar de ratones de tipo natural, ratones deficientes en SP-D y ratones deficientes en SP-D tratados con rSPD(n/CRD).

La figura 15 muestra la microscopía confocal de macrófagos de tipo natural (paneles A y B) y ratones deficientes (paneles C y D), teñidos con FITC-dUTP (color verde). Las células en apoptosis avanzada se tiñen de color verde y las células en apoptosis temprana se identifican por una tinción punteada característica de fragmentos de ADN marcados en los extremos.

La figura 16 muestra la fagocitosis potenciada de macrófagos apoptóticos (marcados de color naranja) por macrófagos de color verde recién aislados.

La figura 17 muestra los niveles de colesterol plasmáticos en mM en ratones de tipo natural y ratones deficientes en SP-D.

La figura 18 muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión teñidas negativamente de ADN genómico y complejos entre SP-D y ADN. A. ADN genómico. B y C, ADN genómico complejado con rSPD(n/CRD); D, ADN genómico complejado con SP-D nativa.

La figura 19 demuestra que la unión entre rSPD(n/CRD) y manano sufre competencia por desoxirribonucleótidos. Se dejó que una concentración fijada de rSPD(n/CRD) (100 µg/ml) se uniese a manano biotinilado que estaba inmovilizado sobre un chip SA BIAcore en presencia de concentraciones indicadas de hexosas (A) o dNTP (B) en tampón salino que contiene CaCl<sub>2</sub> 5 mM.

La figura 20 muestra la inhibición de la unión a yoduro de propidio por rSPD(n/CRD).

La figura 21 muestra que macrófagos alveolares aislados de ratones deficientes en SP-D son defectuosos en el aclaramiento del ADN. Se aislaron macrófagos alveolares del lavado de pulmón de ratones de tipo natural (A, D) o ratones deficientes en SP-A (SP-A<sup>(-/-)</sup>) (B, E) o ratones deficientes en SP-D (SP-D<sup>(-/-)</sup>) (C, F), se lavaron y se incubaron con o bien tampón (A, B, C) o bien ADN de pulmón marcado con Cy3 (color rojo) (D, E, F). Se monitorizó la captación de ADN mediante FACS a FL2-H y se representó gráficamente frente a FL1-H no específico. Se indicó en la figura la proporción de macrófagos alveolares que captaban el ADN (D, E, F).

#### Descripción detallada

Se da a conocer la secuencia y el método de producción de un fragmento de SP-D recombinante, denominado en el presente documento "polipéptido de rSPD(n/CRD)". Hasta donde saben los inventores, la secuencia y producción del polipéptido rSPD(n/CRD) no se ha dado a conocer anteriormente. Se muestra que los polipéptidos de rSPD(n/CRD) pueden asociarse entre sí y formar trímeros en disolución.

En una realización altamente preferida, se describe el uso de polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD), o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo para su uso como terapia de sustitución con tensioactivo, particularmente para recién nacidos. El polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD), o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo puede emplearse adecuadamente para el tratamiento de enfermedades pulmonares neonatales, particularmente, enfermedades pulmonares crónicas neonatales.

Se demuestra que el polipéptido de rSPD(n/CRD) reduce la eosinofilia de sangre periférica y los niveles de IgE séricos totales, así como los niveles de IgG1, cuando se administra a ratones deficientes que carecen de proteína tensioactiva D y expuestos a alérgeno. Por tanto, el polipéptido de rSPD(n/CRD) es adecuado para su uso como modulador de reacciones de hipersensibilidad alérgicas en individuos. El polipéptido de rSPD(n/CRD) también es adecuado para su uso en el tratamiento de cualquier enfermedad o síndrome caracterizado por eosinofilia de sangre periférica, niveles de IgE séricos elevados, niveles de IgG1 elevados o cualquier combinación de éstos.

El polipéptido de rSPD(n/CRD) también puede usarse para la regulación de la inflamación mediada por macrófagos en el pulmón, así como en la defensa frente a la invasión por patógenos y en la modulación de respuestas inflamatorias a la infección y estímulos alérgicos.

Ratones, por ejemplo ratones de tipo natural C57B116, sensibilizados con y expuestos a alérgeno de ácaros del polvo doméstico muestran hiperreactividad de las vías respiratorias característica del asma alérgica. La administración del polipéptido de rSPD(n/CRD) a tales ratones reduce la hiperreactividad de las vías respiratorias. Por consiguiente, el polipéptido de rSPD(n/CRD) puede administrarse a individuos para tratar cualquier enfermedad o síndrome en el que se produzca hiperreactividad de las vías respiratorias, incluyendo asma alérgica.

Otras enfermedades para las que puede emplearse el tratamiento de polipéptido de rSPD(n/CRD) incluyen estados cutáneos, por ejemplo, eccema (que es una enfermedad mediada por Th2), así como alergias en general. Tales alergias incluyen alergias alimentarias, por ejemplo contra alérgenos tales como huevo, frutos de cáscara, cacahuete y leche. Otros alérgenos comunes incluyen pólenes, polvo, moho y mildiu, así como alérgenos de insectos, animales domésticos (perros, gatos, aves) y plantas. También se incluyen alergias respiratorias estacionales, denominadas comúnmente fiebre del heno, aeroalérgenos, que incluyen ácaros del polvo doméstico, esporas fúngicas, pólenes de hierbas, pólenes de árboles y caspa de animales.

Otras categorías de alergias, que pueden tratarse con rSPD(n/CRD), son las que podrían beneficiarse de la reducción en la hiperreactividad de las vías respiratorias, IgE sérica y eosinofilia que son factores importantes en la producción de los síntomas de alergia. Esto incluye el tratamiento de asma alérgica. También puede usarse rSPD(n/CRD) como tratamiento eficaz para estados que se beneficiarían de la regulación por incremento del sistema inmunitario mediado por células. Esto incluye acción antimicrobiana y el tratamiento de infecciones del pulmón.

Puede usarse rSPD(n/CRD) como tratamiento eficaz para estados que se beneficiarían de la regulación por incremento de la actividad de células citotóxicas naturales y la secreción de citocina IFN $\gamma$  por células del sistema inmunitario. Esto incluye el tratamiento de cáncer de pulmón y otros cánceres y neoplasias.

También puede usarse rSPD(n/CRD) como tratamiento eficaz para estados que se beneficiarían de la complementación de SP-D natural endógena con rSPD(n/CRD). Esto incluye el tratamiento de estados en los que el nivel de SP-D natural endógena es anómalamente bajo. Esto incluye el tratamiento de recién nacidos con trastornos del sistema tensioactivo del pulmón en los que el nivel de SP-D natural endógena es anómalamente bajo. Esto también incluye el tratamien-

to de pacientes con fibrosis quística en los que el nivel de SP-D del pulmón natural endógena es anómalamente bajo. Esto también incluye el tratamiento de pacientes con otras infecciones del pulmón en los que el nivel de SP-D natural endógena es anómalamente bajo.

- 5 En una realización adicional, pueden utilizarse las propiedades antialérgicas de SP-D para combatir enfermedades oculares alérgicas. Se da a conocer en el presente documento SP-D, o un fragmento de la misma tal como rSPD(n/CRD), para el tratamiento de estados oculares alérgicos.

10 Se ha medido los niveles de proteína tensioactiva D en lágrimas humanas y se ha encontrado que es de 132 ng/ml. El hecho de que SP-D tenga propiedades anti-alérgicas tal como se expone en el presente documento y esté presente en fluido lacrimonal humano sugiere que la proteína está implicada en el efecto antialérgico natural de las lágrimas. Puede añadirse SP-D o rSPD(n/CRD) a, por ejemplo, disolución de lentes de contacto para ayudar a compensar la irritación/inflamación por las lentes de contacto. Además, es una adición valiosa en el tratamiento de por ejemplo el síndrome de Sjogren, una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por ojos secos y boca seca (provocada por autoanticuerpos frente a componentes de glándulas lacrimales y salivales humanas). Se trata actualmente con complementación de lágrimas artificiales (tales como gotas oculares de hiperme-  
15 losa) y la adición de SP-D o fragmentos de la misma a tales formulaciones potencia el efecto protector de las lágrimas artificiales frente a infecciones oculares e inflamación de la córnea.

20 Cuando se hace referencia a rSPD(n/CRD) anteriormente, debe considerarse que se hace referencia al propio polipéptido o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo.

25 Cuando se hace referencia a un tratamiento de una enfermedad, debe considerarse que incluye la referencia al alivio de un síntoma de esa enfermedad. De manera preferible, sustancialmente todos los síntomas de un individuo que tiene tal enfermedad se alivian o eliminan. Debe considerarse que "enfermedad" incluye cualquier síndrome, así como cualquier estado que afecte a la salud o el bienestar de un individuo. Preferiblemente, se alivia en el individuo al que se le administra un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo, al menos un síntoma de la enfermedad o estado, es decir, revierte sustancialmente al estado de un individuo no afectado normal. Esto puede evaluarse por un médico usando un parámetro clínico relevante. Por ejemplo, la hiperreactividad de las vías respiratorias puede medirse usando los métodos expuestos en los ejemplos.

30 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de una persona de experiencia habitual en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.* (1995 y suplementos periódicos; Current Protocols in Molecular Biology, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, ADN Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990,  
35 40 45

In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: ADN Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press.

#### Proteína tensioactiva D RSPD(N/CRD)

Se ha identificado y caracterizado la proteína tensioactiva D anteriormente, en por ejemplo Rust, *et al* (1991), Human surfactant protein D: SP-D contains a C-type lectin carbohydrate recognition domain. Archives of biochemistry and biophysics. 290 (1), 116-126; Lu, *et al* (1992) Purification, Characterization and cDNA Cloning of Human Lung Surfactant Protein D. Biochem. J. 284, 785-802; Crouch, *et al* (1993) Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D). SP-D is encoded on chromosome 10q22.2-23.1. The Journal of biological chemistry. 268 (4), 2976-2983; Kolble, *et al* (1993) Assignment of the human pulmonary surfactant protein D gene (SFTP4) to 10q22-q23 close to the surfactant protein A gene cluster. Genomics. 17 (2), 294-298 (1993).

Cuando se usan los términos “proteína tensioactiva D”, “SP-D”, “hSP-D” y “SP-D natural”, se considerará que se refieren a cualquier polipéptido o ácido nucleico de proteína tensioactiva D (tal como requiera el contexto). Preferiblemente, sin embargo, debe considerarse que estos términos se refieren a proteína tensioactiva D humana, por ejemplo, las secuencias dadas a conocer en las referencias anteriores, o en los números de registro de GenBank NM\_003019.1, XM\_005776.2, X65018.1 y L05485.1. Lo más preferiblemente, la proteína tensioactiva D es una proteína tensioactiva D humana que tiene los números de registro de GenBank NM\_003019.1. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de SP-D humana se muestran en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 respectivamente.

#### Polipéptidos de proteína tensioactiva D recombinante RSPD(N/CRD)

Se proporciona un fragmento de polipéptido de proteína tensioactiva D (SP-D), al que se hace referencia como rSPD(n/CRD). La secuencia de un polipéptido de rSPD(n/CRD) de este tipo se muestra en SEQ ID NO: 1. rSP-D(N/CRD) también se denomina en este documento “rhSP-D”, y los dos términos deben considerarse sinónimos.

Cuando se emplea el término rSP-D, debe considerarse que se refiere generalmente a SP-D recombinante, ya corresponda a SP-D de longitud completa, preferiblemente SP-D humana (expresada de una manera recombinante), o un fragmento de ésta. Preferiblemente, debe considerarse que el término rSP-D se refiere a un fragmento recombinante de SP-D, preferiblemente SP-D humana. Preferiblemente, y cuando el contexto lo requiera, debe considerarse que “rSP-D” se refiere al fragmento de SP-D recombinante rSPD(n/CRD) descrito anteriormente.

Se entenderá que los polipéptidos dados a conocer en el presente documento no se limitan a la secuencia de rSPD(n/CRD) particular mostrada en SEQ ID NO: 1, sino que también incluye fragmentos de la misma. Los fragmentos particularmente preferidos incluyen los que tienen una o más actividades biológicas de rSPD(n/CRD).

Además, los polipéptidos de rSPD(n/CRD) también incluyen generalmente cualquier fragmento recombinante de SP-D, preferiblemente SP-D humana, que carece del dominio N-terminal y/o el dominio de colágeno, preferiblemente ambos. Por tanto, en una realización preferida, el polipéptido de rSPD(n/CRD) es un fragmento recombinante de SP-D, preferiblemente SP-D humana representada en SEQ ID NO: 4, que carece sustancialmente de los residuos 1-178. En una realización adicional preferida, el polipéptido de rSPD(n/CRD) es un fragmento recombinante de SP-D, preferiblemente la secuencia de SP-D humana mostrada en SEQ ID NO: 4, que comprende sustancialmente los residuos 179-355.

En una realización preferida, el residuo de prolina correspondiente a la posición 200 de la secuencia de SP-D humana (SEQ ID NO: 4) se reemplaza por otro residuo. Preferiblemente, el residuo de prolina se reemplaza por un residuo polar no cargado, por ejemplo, un residuo de cisteína, serina, treonina o metionina. En una realización altamente preferida, el residuo de prolina se reemplaza por un residuo de serina. Por tanto, el polipéptido de rSPD(n/CRD) puede comprender una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

También se incluyen fragmentos, homólogos, variantes y derivados de cada una de las secuencias anteriores.

En realizaciones preferidas, el polipéptido de rSPD(n/CRD) comprende una región de "cabeza" o dominio de reconocimiento de hidratos de carbono (CRD), que comprende sustancialmente los siguientes residuos:

**VELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAEAENAALQ  
QLVVAKNEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGSED  
CVEIFTNGKWDRACGEKRLVVCEF**

Preferiblemente, el polipéptido de rSPD(n/CRD) comprende medios para la multimerización, preferiblemente trimerización, con otro polipéptido de rSPD(n/CRD). Tales medios pueden incluir, por ejemplo, un resto de biotina que interacciona con y se une a un resto de avidina o estreptavidina sobre otro polipéptido de rSPD(n/CRD).

En realizaciones adicionales preferidas, el polipéptido de rSPD(n/CRD) comprende además una región de "cuello" que comprende sustancialmente los siguientes residuos:

**DVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKK**

Preferiblemente, una región de cuello de este tipo está en posición N-terminal con respecto al dominio de reconocimiento de hidratos de carbono (CRD).

En una realización preferida, el polipéptido de rSPD(n/CRD) comprende además al menos un tramo de Gly-Xaa-Yaa, preferiblemente una secuencia que comprende una pluralidad de repeticiones de Gly-Xaa-Yaa, lo más preferiblemente una secuencia que comprende 8 repeticiones de Gly-Xaa-Yaa. En una realización preferida, el polipéptido de rSPD(n/CRD) comprende además una secuencia N-terminal que comprende sustancialmente *GSPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLP*.

En una realización altamente preferida, el polipéptido de rSPD(n/CRD) comprende, preferiblemente consiste en, una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. Por

tanto, tal como se usa en este documento, debe considerarse preferiblemente que el término “polipéptido de rSPD(n/CRD)” se refiere a la secuencia a continuación

**GSPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQ  
YKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAEN  
AALQQLVVAKNEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDG  
GSEDCVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF**

(SEQ ID NO: 1) así como un fragmento, homólogo, variante o derivado de la misma.

Los polipéptidos dados a conocer también incluyen secuencias homólogas obtenidas de cualquier fuente, por ejemplo proteínas virales/bacterianas relacionadas, homólogos celulares y péptidos sintéticos, así como variantes o derivados de los mismos. Por tanto, los polipéptidos también incluyen los que codifican para homólogos de rSPD(n/CRD) de otras especies incluyendo animales tales como mamíferos (por ejemplo ratones, ratas o conejos), especialmente primates, más especialmente seres humanos. Más específicamente, los homólogos incluyen homólogos humanos.

Por tanto, se dan a conocer variantes, homólogos o derivados de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de rSPD(n/CRD) mostrada en SEQ ID NO: 1, así como variantes, homólogos o derivados de una secuencia de nucleótidos que codifica para tales secuencias de aminoácidos.

Preferiblemente, los polipéptidos de rSPD(n/CRD), variantes, homólogos, fragmentos y derivados dados a conocer en el presente documento comprenden una o más propiedades de rSPD(n/CRD), preferiblemente una o más actividades biológicas de rSPD(n/CRD). Por tanto, las variantes, etc. comprenden preferiblemente una o más actividades incluyendo pero sin limitarse a, actividad de unión a hidratos de carbono, actividad de multimerización, incluyendo actividad de trimerización, regulación por disminución de quimiocinas, reducción de la hiperreactividad de las vías respiratorias, reducción del número de macrófagos alveolares, reducción del nivel de fosfolípidos, cuando se administran a un animal que carece de SP-D, aumento del aclaramiento de macrófagos apoptóticos y/o necróticos, reducción de la eosinofilia de sangre periférica, reducción de IgE sérica, reducción de IgG1 sérica, así como cualquiera de las propiedades o actividades biológicas dadas a conocer en los ejemplos.

En el contexto de este documento, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos el 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o el 90% idéntica, preferiblemente al menos el 95 o el 98% idéntica al nivel de aminoácidos con respecto a al menos 50 ó 100, preferiblemente 200, 300, 400 ó 500 aminoácidos con la secuencia de rSPD(n/CRD) mostrada en SEQ ID NO: 1. En particular, debe considerarse normalmente la homología con respecto a las regiones de la secuencia que se sabe que son esenciales para la función de la proteína en vez de secuencias vecinas no esenciales. Esto es especialmente importante cuando se consideran secuencias homólogas de organismos relacionados de manera distante.

Aunque puede considerarse también la homología en cuanto a similitud (es decir, residuos de aminoácido que tienen funciones/propiedades químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en cuanto a identidad de secuencia.

5 Pueden realizarse comparaciones de homología a simple vista, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos pública y comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

10 Puede calcularse el % de homología con respecto a secuencias contiguas, es decir, se alinea una secuencia con la otra secuencia y se compara cada aminoácido en una secuencia directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina alineación "sin huecos". Normalmente, tales alineaciones sin huecos se realizan sólo a lo largo de un número de residuos relativamente corto (por ejemplo, menos de 50 aminoácidos contiguos).

15 Aunque éste es un método muy sencillo y constante, falla al tener en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o delección provocará que los siguientes residuos de aminoácido se salgan de la alineación, dando como resultado posiblemente por tanto una gran reducción en el % de homología cuando se realiza una alineación global. En consecuencia, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineaciones óptimas que tienen en consideración posibles inserciones y delecciones sin penalizar excesivamente la puntuación de homología global. Esto se logra insertando "huecos" en la alineación de secuencias para intentar maximizar la homología local.

20 Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por huecos" a cada hueco que se produce en la alineación de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencias con tan pocos huecos como sea posible (lo que refleja una relación superior entre las dos secuencias comparadas) logrará una puntuación superior que una con muchos huecos. Se usan normalmente "costes de huecos afines" que cargan un coste relativamente alto para la existencia de un hueco y una penalización más pequeña para cada residuo posterior en el hueco. Éste es el sistema de puntuación de huecos más comúnmente usado. Altas penalizaciones por huecos producirán por supuesto alineaciones optimizadas con menores huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten que se modifiquen las penalizaciones por huecos. Sin embargo, se prefiere usar los valores por defecto cuando se usa tal software para comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase a continuación) la penalización por huecos por defecto para secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y de -4 para cada extensión.

35 Por tanto, el cálculo del % de homología máxima requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, teniendo en consideración las penalizaciones por huecos. Un programa informático adecuado para llevar a cabo una alineación de este tipo es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, EE.UU.; Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387). Los ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999 *idem.* – capítulo 18),

FASTA (Atschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y el juego GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel *et al.*, 1999 *ídem.*, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, se prefiere usar el programa GCG Bestfit.

5 Aunque el % de homología final puede medirse en cuanto a identidad, el propio proceso de alineación no se basa normalmente en una comparación por parejas de todo o nada. En su lugar, se usa generalmente una matriz de puntuación de similitud escalada que asigna puntuaciones a cada comparación por parejas basándose en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de una ma-  
10 triz de este tipo comúnmente usada es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el juego BLAST de programas. Los programas de GCG Wisconsin usan generalmente o bien los valores por defecto públicos o bien una tabla de comparación de símbolos a medida si se suministra (véase el manual de usuario para detalles adicionales). Se prefiere usar los valores por defecto públicos para el pa-  
15 quete GCG, o en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Una vez que el software ha producido una alineación óptima, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software realiza esto normalmente como parte de la comparación de secuencias y genera  
20 un resultado numérico.

Los términos “variante” o “derivado” en relación con las secuencias de aminoácidos de la presente invención incluye cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazo de, deleción de o adición de uno (o más) aminoácidos de o en la secuencia siempre que la secuencia de aminoácidos resultante conserve  
25 sustancialmente la misma actividad que la secuencia no modificada, que tiene preferiblemente al menos la misma actividad que el polipéptido de rSPD(n/CRD) mostrado en SEQ ID NO: 1.

Pueden modificarse polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en los ejemplos, o fragmentos u homólogos de los mismos para su uso en los  
30 métodos y composiciones descritos en el presente documento. Normalmente, se hacen modificaciones que mantienen la actividad biológica de la secuencia. Pueden hacerse sustituciones de aminoácidos, por ejemplo desde 1, 2 ó 3 hasta 10, 20 ó 30 sustituciones siempre que la secuencia modificada conserve la actividad biológica de la secuencia no modificada. Alternativamente, pueden hacerse modi-  
35 ficaciones para inactivar deliberadamente uno o más dominios funcionales de los polipéptidos descritos en el presente documento. Los dominios funcionales de rSPD(n/CRD) incluyen el dominio de colágeno, la región de cuello y el dominio de reconocimiento de hidratos de carbono. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de análogos que no se producen de manera natural, por ejemplo pa-  
40 ra aumentar la semivida en plasma sanguíneo de un polipéptido administrado terapéuticamente.

Pueden hacerse sustituciones conservativas, por ejemplo según la tabla a continuación. Pueden sustituirse entre sí aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna:

45

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar – no cargado	C S T M
		N Q
	Polar - cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

Los polipéptidos también incluyen fragmentos de la secuencia de longitud completa de proteína tensioactiva D. Preferiblemente, los fragmentos comprenden al menos un epítipo. Se conocen bien en la técnica métodos de identificación de epítipos. Los fragmentos comprenderán normalmente al menos 6 aminoácidos, más preferiblemente al menos 10, 20, 30, 50 ó 100 aminoácidos.

SP-D recombinante, incluyendo r-SP-D(N/CRD) y sus fragmentos, homólogos, variantes y derivados, se preparan normalmente por medios recombinantes, por ejemplo tal como se describe a continuación en los ejemplos. Sin embargo, también pueden prepararse por medios sintéticos usando técnicas bien conocidas por personas expertas tales como síntesis en fase sólida. Las proteínas también pueden producirse como proteínas de fusión, por ejemplo para ayudar en la extracción y purificación. Los ejemplos de parejas de proteínas de fusión incluyen glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión al ADN y/o activación transcripcional) y  $\beta$ -galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de escisión proteolítica entre la pareja de proteína de fusión y la secuencia de proteína de interés para permitir la eliminación de las secuencias de proteínas de fusión. Preferiblemente, la proteína de fusión no dificultará la función de la secuencia de proteína de interés. También pueden obtenerse proteínas mediante purificación de extractos celulares a partir de células animales.

Los polipéptidos de rSPD(n/CRD), variantes, homólogos, fragmentos y derivados dados a conocer en el presente documento pueden estar en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que tales polipéptidos pueden mezclarse con portadores o diluyentes que no interferirán con el fin previsto de la proteína y todavía se considerarán sustancialmente aislados. Una variante, homólogo, fragmento o derivado de rSPD(n/CRD) también puede estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderá generalmente la proteína en una preparación en la que más del 90%, por ejemplo el 95%, 98% o el 99% de la proteína en la preparación es una proteína.

Los polipéptidos de rSPD(n/CRD), variantes, homólogos, fragmentos y derivados dados a conocer en el presente documento pueden marcarse con un marcador de revelado. El marcador de revelado puede ser cualquier marcador adecuado que permita que el polipéptido, etc. se detecte. Los marcadores adecuados incluyen radioisótopos, por ejemplo  $^{125}\text{I}$ , enzimas, anticuerpos, polinucleótidos y ligadores tales como biotina. Pueden usarse polipéptidos marcados en procedimientos de diagnóstico tales como inmunoensayos para determinar la cantidad de un polipép-

tido en una muestra. También pueden usarse polipéptidos o polipéptidos marcados en inmunoensayos serológicos o mediados por células para la detección de reactividad inmunitaria frente a dichos polipéptidos en animales y seres humanos usando protocolos convencionales.

- 5 Polipéptidos de rSPD(n/CRD), variantes, homólogos, fragmentos y derivados dados a conocer en el presente documento, opcionalmente marcados, también pueden fijarse a una fase sólida, por ejemplo la superficie de un pocillo de inmunoensayo o tira reactiva. Tales polipéptidos marcados y/o inmovilizados pueden envasarse en kits en un recipiente adecuado junto con reactivos, controles, instrucciones adecuados y similares. Tales polipéptidos y kits pueden usarse en métodos para la detección de anticuerpos frente a los polipéptidos o sus variantes alélicas o de especie mediante inmunoensayo.

- 15 Se conocen bien en la técnica métodos de inmunoensayo y comprenderán generalmente: (a) proporcionar un polipéptido que comprende un epítipo al que puede unirse un anticuerpo contra dicha proteína; (b) incubar una muestra biológica con dicho polipéptido en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo; y (c) determinar si se forma el complejo antígeno-anticuerpo que comprende dicho polipéptido.

- 20 Los polipéptidos de rSPD(n/CRD), variantes, homólogos, fragmentos y derivados dados a conocer en el presente documento pueden usarse en sistemas de cultivo celular *in vitro* o *in vivo* para estudiar el papel de sus correspondientes genes y homólogos de los mismos en la función celular, incluyendo su función en la enfermedad. Por ejemplo, pueden introducirse polipéptidos truncados o modificados en una célula para alterar las funciones normales que se producen en la célula.
- 25 Los polipéptidos pueden introducirse en la célula mediante expresión *in situ* del polipéptido a partir de un vector de expresión recombinante (véase a continuación). El vector de expresión porta opcionalmente un promotor inducible para controlar la expresión del polipéptido.

- 30 Se espera que el uso de células huésped apropiadas, tales como células de insecto o células de mamífero, proporcione modificaciones postraduccionales (por ejemplo miristoilación, glicosilación, truncamiento, lapidación y fosforilación de tirosinas, serinas o treoninas) tal como pueden necesitarse para conferir una actividad biológica óptima sobre productos de expresión recombinante. Tales sistemas de cultivo celular en los que se expresan los polipéptidos de rSPD(n/CRD), variantes, homólogos, fragmentos y derivados dados a conocer en el presente documento pueden usarse en sistemas de ensayo para identificar sustancias candidatas que interfieren con o potencian las funciones de los polipéptidos en la célula.

Ácidos nucleicos de proteína tensioactiva D recombinante RSPD(N/CRD)

- 40 Se da a conocer en el presente documento un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de rSPD(n/CRD), que se denomina "ácido nucleico de rSPD(n/CRD)". Se dan a conocer en el presente documento ácidos nucleicos que codifican para variantes, homólogos, derivados y fragmentos de rSPD (n/CRD), así como fragmentos, homólogos, derivados y variantes de ácidos nucleicos de rSPD(n/CRD).
- 45

Preferiblemente, el ácido nucleico de rSPD(n/CRD) se deriva de una secuencia de SP-D natural, por ejemplo, la secuencia de SP-D humana mostrada en SEQ ID NO: 3. Más preferiblemente, el ácido nucleico de rSPD(n/CRD) carece de una secuencia que codifica para el dominio N-terminal y/o el dominio de colágeno, preferiblemente ambos. En una realización preferida, el ácido nucleico de rSPD(n/CRD) es un fragmento recombinante de SP-D, preferiblemente SP-D humana representada en SEQ ID NO: 3, que carece sustancialmente de los residuos 1-594, o cualquier fragmento, homólogo, variante o derivado de la misma. En una realización preferida adicional, el ácido nucleico de rSPD(n/CRD) es un fragmento recombinante de SP-D, preferiblemente la secuencia de SP-D humana mostrada en SEQ ID NO: 3, que comprende sustancialmente los residuos 595-1128. También se incluyen fragmentos, homólogos, variantes y derivados de cada una de las secuencias anteriores.

En una realización preferida, se reemplaza un triplete que codifica para el residuo de prolina correspondiente a la posición 200 de la secuencia de SP-D humana (SEQ ID NO: 4) por un codón que codifica para otro residuo. Preferiblemente, el residuo de prolina se reemplaza por un residuo polar no cargado, por ejemplo, un residuo de cisteína, serina, treonina o metionina. En una realización altamente preferida, el residuo de prolina se reemplaza por un residuo de serina. Por tanto, preferiblemente, el ácido nucleico de rSPD(n/CRD) puede comprender un codón que codifica para una serina en la posición 598 a 560 de la secuencia de SP-D humana mostrada en SEQ ID NO: 3. Por tanto, un codón de reemplazo de este tipo puede incluir AGC, AGT, TCA, TCC, TCG y TCT. Lo más preferiblemente, el codón de reemplazo comprende AGC.

Preferiblemente, un ácido nucleico de rSPD(n/CRD) de este tipo codifica para el polipéptido de rSPD(n/CRD) que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. Un ácido nucleico de rSPD(n/CRD) comprende preferiblemente, más preferiblemente consiste en, una secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 2.

Tal como se usa en este caso en este documento, los términos “polinucleótido”, “nucleótido” y ácido nucleico pretenden ser sinónimos entre sí. “Polinucleótido” se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ADN o ARN no modificado o ADN o ARN modificado. Los “polinucleótidos” incluyen, sin limitación, ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más normalmente bicatenarios o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, “polinucleótido” se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con estructuras principales modificadas por motivos de estabilidad u otros. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases poco comunes tales como inosina. Se han hecho una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por tanto, “polinucleótido” abarca formas química, enzimática o metabólicamente modificadas de polinucleótidos tal como se encuentran normalmente en la naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células. “Polinucleótido” también abarca polinucleótidos relativamente cortos, a menudo denominados oligonucleótidos.

Un experto entenderá que numerosos polinucleótidos y ácidos nucleicos diferentes pueden codificar para el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Además, debe entenderse que los expertos, usando técnicas de rutina, pueden realizar sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos descritos en el presente documento reflejando el uso de codones de cualquier organismo huésped particular en el que van a expresarse los polipéptidos.

Ácidos nucleicos de rSPD(n/CRD), variantes, fragmentos, derivados y homólogos pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser mono o bicatenarios. También pueden ser polinucleótidos que incluyen dentro de los mismos nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen en la técnica varios tipos diferentes de modificación en oligonucleótidos. Estos incluyen estructuras principales de fosfonato de metilo y fosforotioato, además de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de este documento, debe entenderse que los polinucleótidos pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de potenciar la actividad *in vivo* o vida útil de polinucleótidos de interés.

Los términos “variante”, “homólogo” o “derivado” en relación a una secuencia de nucleótidos incluyen cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazo de, deleción de o adición de un (o más) ácido nucleico de o a la secuencia. Preferiblemente, dicha variante, homólogos o derivados codifican para un polipéptido que tiene actividad biológica.

Tal como se indicó anteriormente, con respecto a la homología de secuencia, preferiblemente hay al menos el 50 o el 75%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90% de homología con las secuencias mostradas en la lista de secuencias en el presente documento. Más preferiblemente, hay al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 98% de homología. Pueden realizarse comparaciones de homología de nucleótidos tal como se describió anteriormente. Un programa de comparación de secuencias preferido es el programa GCG Wisconsin Bestfit descrito anteriormente. La matriz de puntuación por defecto tiene un valor de coincidencia de 10 para cada nucleótido idéntico y de -9 para cada apareamiento erróneo. La penalización por creación de huecos por defecto es de -50 y la penalización por extensión de huecos por defecto es de -3 para cada nucleótido.

Se describen además secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse selectivamente con las secuencias presentadas en el presente documento, o cualquier variante, fragmento o derivado de las mismas, o con el complemento de cualquiera de las anteriores. Las secuencias de nucleótidos tienen preferiblemente al menos 15 nucleótidos de longitud, más preferiblemente al menos 20, 30, 40 ó 50 nucleótidos de longitud.

El término “hibridación” tal como se usa en el presente documento incluirá “el proceso mediante el cual una hebra de ácido nucleico se une con una hebra complementaria a través de apareamiento de bases” así como el proceso de amplificación tal como se lleva a cabo en tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa.

Los polinucleótidos que pueden hibridarse selectivamente con las secuencias de nucleótidos presentadas en el presente documento, o con su complemento, serán

generalmente al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80 o el 90% y más preferiblemente al menos el 95% o el 98% homólogas a las secuencias de nucleótidos correspondientes presentadas en el presente documento a lo largo de una región de al menos 20, preferiblemente al menos 25 ó 30, por ejemplo al menos  
 5 40, 60 ó 100 o más nucleótidos contiguos.

La expresión “que puede hibridarse selectivamente” significa que el polinucleótido usado como sonda se usa en condiciones en las que se encuentra que un polinucleótido diana se hibrida con la sonda a un nivel significativamente por encima del fondo. La hibridación de fondo puede producirse debido a otros polinucleótidos  
 10 presentes, por ejemplo, en la biblioteca de ADNc o ADN genómico que está examinándose. En este caso, el fondo implica un nivel de señal generada por la interacción entre la sonda y un miembro de ADN no específico de la biblioteca que es menos de 10 veces, preferiblemente menos de 100 veces tan intensa como la interacción específica observada con el ADN diana. La intensidad de la interacción  
 15 puede medirse, por ejemplo, mediante radiomarcaje de la sonda, por ejemplo, con <sup>32</sup>P.

Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del complejo de unión a ácido nucleico, tal como se enseña en Berger y Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, vol. 152,  
 20 Academic Press, San Diego CA), y confieren una “rigurosidad” definida tal como se explica a continuación.

La rigurosidad máxima se produce normalmente a aproximadamente T<sub>m</sub>-5°C (5°C por debajo de la T<sub>m</sub> de la sonda); alta rigurosidad a de aproximadamente 5°C a 10°C por debajo de T<sub>m</sub>; rigurosidad intermedia a de aproximadamente 10°C a  
 25 20°C por debajo de T<sub>m</sub>; y baja rigurosidad a de aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de T<sub>m</sub>. Tal como entenderán los expertos en la técnica, puede usarse una hibridación de rigurosidad máxima para identificar o detectar secuencias polinucleotídicas idénticas mientras que puede usarse una hibridación de rigurosidad intermedia (o baja) para identificar o detectar secuencias polinucleotídicas similares o relacionadas.  
 30

En un aspecto preferido, se dan a conocer en el presente documento secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con los ácidos nucleicos de rSPD(n/CRD), fragmentos, variantes, homólogos o derivados en condiciones rigurosas (por ejemplo 65°C y 0,1xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, citrato de Na<sub>3</sub> 0,015 M pH 7,0}).

35 Cuando el polinucleótido es bicatenario, ambas hebras del dúplex, o bien individualmente o bien en combinación, se abarcan por los métodos y las composiciones descritos en el presente documento. Cuando el polinucleótido es monocatenario, debe entenderse que también se incluye la secuencia complementaria de ese polinucleótido.

40 Pueden obtenerse de varios modos polinucleótidos que no son el 100% homólogos a las secuencias dadas a conocer en el presente documento pero que también se incluyen. Pueden obtenerse otras variantes de las secuencias por ejemplo estudiando con sonda bibliotecas de ADN preparadas a partir de una gama de individuos, por ejemplo individuos de diferentes poblaciones. Por ejemplo, pueden  
 45 identificarse homólogos de SP-D a partir de otros individuos, u otras especies. Pueden producirse ácidos nucleicos y polipéptidos de SP-D recombinantes adicionales identificando posiciones correspondientes en los homólogos, y sinteti-

zando o produciendo la molécula tal como se describe en otra parte en este documento. Además, puede identificarse la región de colágeno, la región de cuello y el dominio de unión a hidratos de carbono en tales homólogos por ejemplo mediante observación de secuencias o comparaciones asistidas por ordenador, y seleccionarse para su combinación en o producción de una SP-D recombinante que no es humana, pero que tiene una o más actividades biológicas de rSPD(n/CRD)

Además, pueden obtenerse otros homólogos virales/bacterianos o celulares de SP-D, particularmente homólogos celulares encontrados en células de mamífero (por ejemplo células de rata, ratón, bovinas y de primate), y tales homólogos y fragmentos de los mismos podrán en general hibridarse selectivamente con SP-D humana. Tales homólogos pueden usarse para diseñar ácidos nucleicos de rSPD(n/CRD) no humanos, fragmentos, variantes y homólogos. Puede llevarse a cabo mutagénesis por medios conocidos en la técnica para producir variedad adicional.

Pueden obtenerse secuencias de homólogos de SP-D estudiando con sonda bibliotecas de ADNc preparadas a partir de bibliotecas de ADN genómico de otras especies animales, y estudiando con sonda tales bibliotecas con sondas que comprenden todo o parte de cualquiera de los ácidos nucleicos de rSPD(n/CRD), fragmentos, variantes y homólogos, u otros fragmentos de SP-D en condiciones de rigurosidad de media a alta.

Se aplican consideraciones similares a la obtención de homólogos de especie y variantes alélicas de las secuencias de nucleótidos o polipeptídicas dadas a conocer en el presente documento.

También pueden obtenerse variantes y homólogos de cepa/especie usando PCR degenerada que usará cebadores diseñados para seleccionar como diana secuencias dentro de las variantes y los homólogos que codifican para secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de los ácidos nucleicos de rSPD(n/CRD). Pueden pronosticarse secuencias conservadas, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Pueden realizarse alineaciones de secuencias usando software informático conocido en la técnica. Por ejemplo, se usa ampliamente el programa GCG Wisconsin PileUp.

Los cebadores usados en la PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se usarán en condiciones de rigurosidad inferiores a las usadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia única contra secuencias conocidas. Se apreciará por el experto que la homología de nucleótidos global entre secuencias de organismos relacionados de manera distante es probable que sea muy baja y por tanto en estas situaciones la PCR degenerada puede ser el método de elección en vez de examinar bibliotecas con fragmentos marcados de las secuencias de rSPD(n/CRD).

Además, pueden identificarse secuencias homólogas buscando en bases de datos de nucleótidos y/o proteínas usando algoritmos de búsqueda tales como el juego BLAST de programas.

Alternativamente, tales polinucleótidos pueden obtenerse mediante mutagénesis dirigida al sitio de secuencias caracterizadas, por ejemplo, ácidos nucleicos de rSPD(n/CRD), o variantes, homólogos, derivados o fragmentos de los mismos. Esto puede ser útil cuando por ejemplo se requieren cambios de codones silen-

5 ciosos en secuencias para optimizar las preferencias de codones para una célula huésped particular en las que las secuencias polinucleotídicas están expresándose. Pueden desearse otros cambios de secuencias con el fin de introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

10 Los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden usarse para producir un cebador, por ejemplo, un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda por ejemplo marcada con un marcador de revelado por medios convencionales usando marcadores radiactivos o no radiactivos, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos 8, 9, 10 ó 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 ó 40 nucleótidos de longitud, y también se abarcan por el término "polinucleótidos" tal como se usa en el presente documento.

15 Pueden producirse polinucleótidos tales como sondas y polinucleótidos de ADN de manera recombinante, sintética, o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También pueden clonarse mediante técnicas convencionales.

20 En general, se producirán cebadores por medios sintéticos, que implican una fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada un nucleótido cada vez. Están fácilmente disponibles en la técnica técnicas para lograr esto usando técnicas automatizadas.

25 Se producirán generalmente polinucleótidos más largos usando medios recombinantes, por ejemplo usando técnicas de clonación de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará preparar un par de cebadores (por ejemplo de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) que flanquean una región de la secuencia objetivo de lípido que se desea clonar, poner los cebadores en contacto con ARNm o ADNc obtenido de una célula animal o humana, realizar una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que ocasionan la amplificación de la región deseada, aislar el fragmento amplificado (por ejemplo purificando la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperar el ADN amplificado. Los cebadores  
30 pueden diseñarse para que contengan sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de modo que el ADN amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

35 Los polinucleótidos o cebadores pueden llevar un marcador de revelado. Los marcadores adecuados incluyen radioisótopos tales como  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ , marcadores enzimáticos u otros marcadores proteicos tales como biotina. Tales marcadores pueden añadirse a polinucleótidos o cebadores y pueden detectarse usando técnicas conocidas *per se*. Pueden usarse polinucleótidos o cebadores o fragmentos de los mismos marcados o no marcados por un experto en la técnica en pruebas basadas en ácidos nucleicos para detectar o secuenciar polinucleótidos en el  
40 cuerpo humano o animal.

45 Tales pruebas para detectar comprenden generalmente poner en contacto una muestra biológica que contiene ADN o ARN con una sonda que comprende un polinucleótido o cebador en condiciones de hibridación y detectar cualquier dúplex formado entre la sonda y el ácido nucleico en la muestra. Tal detección puede lograrse usando técnicas tales como PCR o inmovilizando la sonda sobre un soporte sólido, eliminando el ácido nucleico en la muestra que no se hibrida con la sonda y luego detectando el ácido nucleico que se ha hibridado con la sonda. Alterna-

tivamente, el ácido nucleico de muestra puede inmovilizarse sobre un soporte sólido, y puede detectarse la cantidad de sonda unida a un soporte de este tipo. Pueden encontrarse métodos de ensayo adecuados de éste y otros formatos en por ejemplo los documentos WO89/03891 y WO90/13667.

- 5 Las pruebas para secuenciar nucleótidos, por ejemplo, los ácidos nucleicos de rSPD(n/CRD), implican poner en contacto una muestra biológica que contiene ARN o ADN diana con una sonda que comprende un polinucleótido o cebador en condiciones de hibridación y determinar la secuencia mediante, por ejemplo, el método de terminación de la cadena de didesoxi de Sanger (véase Sambrook *et al.*).

10 Un método de este tipo comprende generalmente alargar, en presencia de reactivos adecuados, el cebador mediante síntesis de una hebra complementaria al ARN o ADN diana y terminar selectivamente la reacción de alargamiento en uno o más de un residuo de A, C, G o T/U; dejar que se produzca la reacción de alargamiento de la hebra y de terminación; separar según el tamaño los productos alargados y determinar la secuencia de los nucleótidos en los que se ha producido terminación selectiva. Los reactivos adecuados incluyen una enzima ADN polimerasa, los desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP, un tampón y ATP. Se usan didesoxinucleótidos para la terminación selectiva.

#### 20 Vectores de ácido nucleico

Pueden incorporarse polinucleótidos, por ejemplo los descritos en el presente documento, en un vector replicable recombinante. El vector puede usarse para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Por tanto, en una realización adicional, se proporciona un método de preparación de polinucleótidos introduciendo un polinucleótido en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible y haciendo crecer la célula huésped en condiciones que ocasionan la replicación del vector. El vector puede recuperarse de la célula huésped. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias tales como *E. coli*, levaduras, líneas celulares de mamíferos y otras líneas celulares eucariotas, por ejemplo células de insecto Sf9.

35 Preferiblemente, un polinucleótido en un vector está operativamente unido a una secuencia de control que puede proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión. La expresión "operativamente unido" significa que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera prevista. Una secuencia reguladora "operativamente unida" a una secuencia codificante está ligada de tal forma que se logra la expresión de la secuencia codificante en una condición compatible con las secuencias de control.

40 Las secuencias de control pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de elementos reguladores de la transcripción adicionales para hacer que el nivel de transcripción dirigido por las secuencias de control sea más sensible a los moduladores de la transcripción.

45 Pueden transformarse o transfectarse vectores en una célula huésped adecuada tal como se describe a continuación para proporcionar la expresión de una proteína. Este proceso puede comprender cultivar una célula huésped transformada

con un vector de expresión tal como se describió anteriormente en condiciones para proporcionar la expresión por el vector de una secuencia codificante que codifica para la proteína, y recuperar opcionalmente la proteína expresada. Se elegirán vectores que son compatibles con la célula huésped usada.

- 5 Los vectores pueden ser por ejemplo vectores de plásmidos o virus dotados de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo un gen de resistencia a ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia a neomicina para un vector de mamífero. Pueden usarse vectores, por ejemplo, para transfectar o transformar una célula huésped.

15 Las secuencias de control operativamente unidas a secuencias que codifican para el polipéptido incluyen promotores/potenciadores y otras señales de regulación de la expresión. Estas secuencias de control pueden seleccionarse para que sean compatibles con la célula huésped para la que está diseñado el vector de expresión que va a usarse en la misma. El término promotor se conoce bien en la técnica y abarca regiones de ácido nucleico que oscilan en tamaño y complejidad desde promotores mínimos hasta promotores que incluyen potenciadores y elementos en el sentido de 5'.

- 20 El promotor se selecciona normalmente de promotores que son funcionales en células de mamífero, aunque pueden usarse promotores procarióticos y promotores funcionales en otras células eucariotas, tales como células de insecto. El promotor se deriva normalmente de secuencias promotoras de genes virales o eucariotas. Por ejemplo, puede ser un promotor derivado del genoma de una célula en la que va a producirse expresión. Con respecto a promotores eucariotas, pueden ser promotores que funcionan de una manera ubicua (tales como promotores de actina  $\alpha$ , actina  $\beta$ , tubulina) o, alternativamente, de una manera específica de tejido (tales como promotores de los genes para piruvato cinasa). También pueden ser promotores que responden a estímulos específicos, por ejemplo promotores que se unen a receptores de hormonas esteroideas. También pueden usarse promotores virales, por ejemplo el promotor de repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (LTR de MMLV), el promotor de LTR del virus del sarcoma de Rous (VSR) o el promotor IE de citomegalovirus humano (CMV).

35 También puede ser ventajoso que los promotores sean inducibles de modo que los niveles de expresión de los genes heterólogos puedan regularse durante el tiempo de vida de la célula. Inducible significa que los niveles de expresión obtenidos usando el promotor pueden regularse.

40 Además, cualquiera de estos promotores puede modificarse mediante la adición de secuencias reguladoras adicionales, por ejemplo secuencias potenciadoras. También pueden usarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes descritos anteriormente.

45 También pueden insertarse polinucleótidos en los vectores descritos anteriormente en una orientación antisentido para proporcionar la producción de ARN antisentido. También pueden producirse ARN antisentido u otros polinucleótidos antisentido por medios sintéticos. Tales polinucleótidos antisentido pueden usarse en un método de control de los niveles de ARN transcritos a partir de genes que com-

prenden uno cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento.

### Células huésped

- 5 Pueden introducirse vectores y polinucleótidos que comprenden o que codifican para ácidos nucleicos de rSPD(n/CRD), fragmentos, homólogos, variantes o derivados de los mismos en células huésped para el fin de replicar los vectores/polinucleótidos y/o expresar los polipéptidos codificados por los polinucleótidos. Aunque los polipéptidos pueden producirse usando células procariontas como
- 10 células huésped, se prefiere usar células eucariotas, por ejemplo células de levadura, insecto o mamífero, en particular células de mamífero.

Pueden introducirse vectores/polinucleótidos en células huésped adecuadas usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como transfección, transformación y electroporación. Cuando van a administrarse vectores/polinucleótidos a animales, se conocen en la técnica varias técnicas, por

15 ejemplo infección con vectores virales recombinantes tales como retrovirus, virus del herpes simple y adenovirus, inyección directa de ácidos nucleicos y transformación biolística.

### Expresión y purificación de proteínas

20 Pueden usarse células huésped que comprenden polinucleótidos para expresar polipéptidos, tales como polipéptidos de rSPD(n/CRD), fragmentos, homólogos, variantes o derivados de los mismos. Pueden cultivarse células huésped en condiciones adecuadas que permiten la expresión de las proteínas. La expresión de

25 los polipéptidos puede ser constitutiva de manera que se produzcan de manera continua, o inducible, requiriendo un estímulo para iniciar la expresión. En el caso de expresión inducible, la producción de proteína puede iniciarse cuando se requiera mediante, por ejemplo, la adición de una sustancia inductora al medio de cultivo, por ejemplo dexametasona o IPTG.

30 Pueden extraerse los polipéptidos de las células huésped mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo lisis enzimática, química y/o osmótica y alteración física.

También pueden producirse los polipéptidos de manera recombinante en un sistema libre de células *in vitro*, tal como el sistema de reticulocitos de conejo TnT™

35 (Promega).

### Anticuerpos

Se dan a conocer en el presente documento anticuerpos monoclonales o policlonales frente a polipéptidos o fragmentos de los mismos. Por tanto, se da a conocer en el presente documento un procedimiento para la producción de anticuerpos

40 monoclonales o policlonales frente a un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo.

Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un polipéptido inmunogénico

que lleva un(os) epítipo(s) de un polipéptido. Se recoge suero del animal inmunizado y se trata según procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales frente a un epítipo de un polinucleótido contiene anticuerpos frente a otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse mediante cromatografía de inmunoafinidad. Se conocen en la técnica técnicas para producir y procesar antisueros policlonales. Con el fin de que puedan prepararse tales anticuerpos, se dan a conocer en el presente documento polipéptidos o fragmentos de los mismos haptenizados con otro polipéptido para su uso como inmunógenos en animales o seres humanos.

Un experto en la técnica puede producir también fácilmente anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopos en los polipéptidos. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas se conoce bien. Pueden crearse células inmortales que producen anticuerpos mediante fusión celular, y también mediante otras técnicas tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con virus de Epstein-Barr. Pueden examinarse paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra epítopos en los polipéptidos para determinar diversas propiedades; es decir, para determinar la afinidad de isotipo y epítipo.

Una técnica alternativa implica examinar bibliotecas de presentación en fago en las que, por ejemplo, el fago expresa fragmentos scFv en la superficie de su cubierta con una gran variedad de regiones determinantes de complementariedad (CDR). Esta técnica se conoce bien en la técnica.

Anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, que se dirigen contra epítopos de polipéptidos son particularmente útiles en diagnóstico, y los que son neutralizantes son útiles en inmunoterapia pasiva. Pueden usarse anticuerpos monoclonales, en particular, para generar anticuerpos anti-idiotipo. Los anticuerpos anti-idiotipo son inmunoglobulinas que portan una "imagen interna" del antígeno del agente contra el que se desea protección.

Se conocen en la técnica técnicas para generar anticuerpos anti-idiotipo. Estos anticuerpos anti-idiotipo también pueden ser útiles en terapia.

Para los fines de esta invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique lo contrario, incluye fragmentos de anticuerpos completos que conservan su actividad de unión para un antígeno diana. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')<sub>2</sub>, así como anticuerpos de cadena sencilla (scFv). Además, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados, por ejemplo tal como se describe en el documento EP-A-239400.

Pueden usarse anticuerpos en un método de detección de polipéptidos presentes en muestras biológicas mediante un método que comprende: (a) proporcionar un anticuerpo; (b) incubar una muestra biológica con dicho anticuerpo en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo; y (c) determinar si se forma el complejo antígeno-anticuerpo que comprende dicho anticuerpo.

Las muestras adecuadas incluyen extractos de tejidos tales como tejidos de cerebro, mama, ovario, pulmón, colon, páncreas, testículos, hígado, músculo y hueso o de crecimientos neoplásicos derivados de tales tejidos.

Pueden unirse anticuerpos a un soporte sólido y/o envasarse en kits en un recipiente adecuado junto con reactivos, controles, instrucciones adecuados y similares.

### Ensayos

5

Se dan a conocer ensayos que son adecuados para identificar sustancias que se unen a polipéptidos de rSPD(n/CRD), o fragmentos, homólogos, variantes o derivados de los mismos.

10 En general, tales ensayos de unión implican exponer un polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo a una molécula candidata y detectar una interacción o unión entre el polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo y la molécula candidata. El ensayo de unión puede realizarse *in vitro* o *in vivo*.

15 Se dan a conocer ensayos para identificar sustancias que pueden potenciar las actividades del polipéptido de rSPD(n/CRD). Tales compuestos pueden emplearse como agonistas del polipéptido de rSPD(n/CRD), y por ejemplo pueden administrarse conjuntamente a un individuo para potenciar cualquier efecto deseado.

20 En general, un ensayo para identificar tales sustancias o compuestos implica proporcionar una célula u organismo, exponer la célula u organismo a un polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo, exponer la célula a una molécula candidata y detectar un efecto asociado con rSPD(n/CRD). Puede detectarse cualquier efecto mediado por polipéptidos de rSPD(n/CRD), tal como se da a conocer en este documento, particularmente los ejemplos.

25 En particular, el efecto mediado por polipéptidos de rSPD(n/CRD) se elige preferiblemente del grupo que consiste en: reducción de la eosinofilia de sangre periférica, reducción de los niveles de IgE séricos, reducción de los niveles de IgG1 séricos, reducción de la hiperreactividad de las vías respiratorias, reducción del número de macrófagos alveolares, reducción de los niveles de fosfolípidos en lavado, regulación por disminución de la expresión de eotaxina, reducción de la expresión de MCP-1, regulación por disminución de la expresión de MIP-1 $\alpha$  y regulación por disminución de la expresión de MIP-2.

30 Con el fin de identificar agonistas, se detecta un efecto aditivo o preferiblemente sinérgico. Por tanto, aunque el polipéptido de rSPD(n/CRD) solo, por ejemplo, puede reducir el nivel o número, o regular por disminución la expresión de una molécula, los ensayos identifican moléculas que reducen adicionalmente el nivel, número o regulan por disminución adicionalmente la expresión de una molécula. Por tanto, preferiblemente, la molécula candidata conjuntamente con el polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo, regula por disminución la expresión de, o reduce el nivel o número, en más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90% o más en comparación con el polipéptido de rSPD(n/CRD) solo. Por tanto, por ejemplo, una molécula candidata adecuada para su uso como agonista es una que puede potenciar en un 10% más

45

la reducción del número de macrófagos alveolares lograda por el polipéptido de rSPD(n/CRD) solo.

A la inversa, los ensayos para identificar antagonistas implican la detección de una reducción en el efecto mediado por polipéptidos de rSPD(n/CRD). Preferiblemente, la regulación por disminución de la expresión o la reducción del número o nivel logrado por el polipéptido de rSPD(n/CRD) se reduce en presencia de una molécula candidata adecuada. Preferiblemente, la reducción es de al menos el 10%, preferiblemente al menos el 20%, preferiblemente al menos el 30%, preferiblemente al menos el 40%, preferiblemente al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, preferiblemente al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90% o más en comparación con un polipéptido de rSPD(n/CRD) solo. Por tanto, por ejemplo, una molécula candidata adecuada para su uso como antagonista es una que puede reducir en un 10% más la reducción del número de macrófagos alveolares lograda por el polipéptido de rSPD(n/CRD) solo.

Como ilustración, si N1 es el número de macrófagos alveolares en un organismo no tratado, y N2 el número en un organismo expuesto a polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo, el número de macrófagos alveolares disminuye en  $R = (N1-N2)/N1 \times 100\%$ . Los agonistas aumentan R, en un factor x, en el que x es mayor de 1 (por ejemplo, x = 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100 etc.); mientras que los antagonistas disminuyen R, en un factor x, en el que x es menor de 1 (por ejemplo, x = 0,9, 0,9, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 etc.).

Por ejemplo, un organismo puede exponerse a un polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo y una molécula candidata, y detectarse el nivel de eosinófilos periféricos, o IgE sérica o IgG1 sérica, o cualquier combinación. También puede detectarse la detección de la hiperreactividad de las vías respiratorias, o números de macrófagos alveolares, de un organismo expuesto a un polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD), o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo, junto con una molécula candidata.

Moléculas candidatas preferidas son las que proporcionan un efecto aditivo o sinérgico en combinación con rSPD(n/CRD).

También se dan a conocer ensayos para identificar antagonistas del polipéptido de rSPD(n/CRD). Tales ensayos implican detectar un efecto reducido sobre la exposición de una célula u organismo a un polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo conjuntamente con una molécula candidata.

En una realización preferida, los ensayos se realizan sobre organismos completos en vez de células. Preferiblemente, el organismo es uno que padece una enfermedad tal como se da a conocer en este documento, o presenta uno o más síntomas de tal enfermedad. En una realización altamente preferida, el organismo es uno que no expresa proteína tensioactiva D. Preferiblemente, un organismo de este tipo comprende un gen de SP-D alterado o deletado. Más preferiblemente, el organismo es un ratón (*Mus musculus*), preferiblemente un ratón deficiente en SP-D, preparado tal como se describe en Botas, C., *et al.*, Altered surfactant

homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(20): págs. 11869-74.

### Moléculas candidatas

- 5 Las moléculas candidatas adecuadas para su uso en los ensayos anteriores incluyen péptidos, especialmente de desde aproximadamente 5 hasta 30 o de 10 a 25 aminoácidos de tamaño. Pueden usarse péptidos de paneles de péptidos que comprenden secuencias al azar o secuencias que se han variado de manera sistemática para proporcionar un panel de péptidos diversos de manera máxima.
- 10 Las moléculas candidatas adecuadas también incluyen productos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos y anticuerpos con injerto de CDR). Además, pueden examinarse bibliotecas combinatorias, péptidos y peptidomiméticos, entidades químicas definidas, oligonucleótidos y bibliotecas de productos naturales para
- 15 determinar la actividad. Las moléculas candidatas pueden usarse en un examen inicial en lotes de, por ejemplo, 10 tipos de moléculas por reacción, y las moléculas de los lotes que muestran potenciación o reducción de un efecto mediado por polipéptidos de rSPD(n/CRD) se someten a prueba individualmente.

### Bibliotecas

- 20 Pueden emplearse bibliotecas de moléculas candidatas, tales como bibliotecas de polipéptidos o ácidos nucleicos, en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Tales bibliotecas se exponen a una célula u organismo en presencia de un polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento,
- 25 homólogo, variante o derivado del mismo, y se detecta un efecto mediado por polipéptidos de rSPD(n/CRD).

- Se conocen en la técnica protocolos de selección para aislar miembros deseados de bibliotecas grandes, tal como se tipifica mediante técnicas de presentación en fago. Tales sistemas, en los que se presentan diversas secuencias peptídicas sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos (Scott y Smith (1990 citado anteriormente), han demostrado ser útiles para crear bibliotecas de fragmentos de anticuerpo (y las secuencias de nucleótidos que codifican para los mismos) para la selección y amplificación *in vitro* de fragmentos de anticuerpo específicos que se unen a un antígeno diana. Las secuencias de nucleótidos que codifican para las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se unen a fragmentos génicos que codifican para señales líder que las dirigen al espacio periplásmico de *E. coli* y como resultado se presentan los fragmentos de anticuerpo resultantes sobre la superficie del bacteriófago, normalmente como fusiones con proteínas de la cubierta de bacteriófagos (por ejemplo, pIII o pVIII). Alternativamente, se presentan fragmentos de anticuerpo de manera externa sobre cápsidas de fago lambda (fagocuerpos). Una ventaja de los sistemas de presentación basados en fagos es que, debido a que son sistemas biológicos, pueden amplificarse miembros seleccionados de la biblioteca simplemente haciendo crecer el fago que contiene el miembro seleccionado de la biblioteca en células bacterianas. Además, puesto que la secuencia de nucleótidos que codifica para el miembro de la biblioteca de polipéptidos está contenido en un vector de fago o fagémido, la secuenciación, expresión y posterior manipulación genética es relativamente sencilla.
- 30
- 35
- 40
- 45

Se conocen bien en la técnica métodos para la construcción de bibliotecas de presentación de anticuerpos en bacteriófagos y bibliotecas de expresión en fago lambda (McCafferty *et al.* (1990) citado anteriormente; Kang *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 4363; Clackson *et al.* (1991) Nature, 352: 624; Lowman *et al.* (1991) Biochemistry, 30: 10832; Burton *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 10134; Hoogenboom *et al.* (1991) Nucleic Acids Res., 19: 4133; Chang *et al.* (1991) J. Immunol., 147: 3610; Breitling *et al.* (1991) Gene, 104: 147; Marks *et al.* (1991) citado anteriormente; Barbas *et al.* (1992) citado anteriormente; Hawkins y Winter (1992) J. Immunol., 22: 867; Marks *et al.*, 1992, J. Biol. Chem., 267: 16007; Lerner *et al.* (1992) Science, 258: 1313). Tales técnicas pueden modificarse si es necesario para la expresión generalmente de bibliotecas de polipéptidos.

Un enfoque particularmente ventajoso ha sido el uso de bibliotecas de fagos de scFv (Bird, R.E., *et al.* (1988) Science 242: 423-6, Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 5879-5883; Chaudhary *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 1066-1070; McCafferty *et al.* (1990) citado anteriormente; Clackson *et al.* (1991) citado anteriormente; Marks *et al.* (1991) citado anteriormente; Chiswell *et al.* (1992) Trends Biotech., 10: 80; Marks *et al.* (1992) citado anteriormente). Se han descrito diversas realizaciones de bibliotecas de scFv presentados sobre proteínas de la cubierta de bacteriófagos. También se conocen refinamientos de los enfoques de presentación en fago, por ejemplo tal como se describe en los documentos WO96/06213 y WO92/01047 (Medical Research Council *et al.*) y el documento WO97/08320 (Morphosys, citado anteriormente).

Las tecnologías alternativas de selección de bibliotecas incluyen sistemas de expresión en bacteriófago lambda, que pueden examinarse directamente como placas de bacteriófagos o como colonias de lisógenos, ambos tal como se describió anteriormente (Huse *et al.* (1989) Science, 246: 1275; Caton y Koprowski (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87; Mullinax *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 8095; Persson *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 2432) y son de uso en la invención. Estos sistemas de expresión pueden usarse para examinar un gran número de diferentes miembros de una biblioteca, del orden de  $10^6$  o incluso más. Otros sistemas de examen se basan, por ejemplo, en la síntesis química directa de miembros de la biblioteca. Un método implica claramente la síntesis de péptidos sobre un conjunto de clavijas o varillas, tal como se describe en el documento WO84/03564. Se describe un método similar que implica síntesis de péptidos sobre perlas, que forma una biblioteca de péptidos en la que cada perla es un miembro individual de la biblioteca, en la patente estadounidense n.º 4.631.211 y se describe un método relacionado en el documento WO92/00091. Una mejora significativa de los métodos basados en perlas implica etiquetar cada perla con una etiqueta identificadora única, tal como un oligonucleótido, para facilitar la identificación de la secuencia de aminoácidos de cada miembro de la biblioteca. Estos métodos basados en perlas mejorados se describen en el documento WO93/06121.

Otro método de síntesis química implica la síntesis de matrices de péptidos (o peptidomiméticos) sobre una superficie de una manera que coloca cada miembro de la biblioteca distinto (por ejemplo, secuencia peptídica única) en una ubicación diferenciada, predefinida en la matriz. La identidad de cada miembro de la biblioteca se determina mediante su ubicación espacial en la matriz. Se determinan las

ubicaciones en la matriz en las que se producen interacciones de unión entre una molécula predeterminada (por ejemplo, un receptor) y miembros reactivos de la biblioteca, identificando de ese modo las secuencias de los miembros reactivos de la biblioteca basándose en la ubicación espacial. Estos métodos se describen en  
5 la patente estadounidense n.º 5.143.854; documentos WO90/15070 y WO92/10092; Fodor *et al.* (1991) *Science*, 251: 767; Dower y Fodor (1991) *Ann. Rep. Med. Chem.*, 26: 271.

Otros sistemas para generar bibliotecas de polipéptidos o nucleótidos implican el uso de maquinaria enzimática libre de células para la síntesis *in vitro* de los  
10 miembros de la biblioteca. En un método, se seleccionan moléculas de ARN mediante rondas alternas de selección frente a un ligando diana y amplificación por PCR (Tuerk y Gold (1990) *Science*, 249: 505; Ellington y Szostak (1990) *Nature*, 346: 818). Puede usarse una técnica similar para identificar secuencias de ADN que se unen a un factor de transcripción humano predeterminado (Thiesen y Bach  
15 (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18: 3203; Beaudry y Joyce (1992) *Science*, 257: 635; documentos WO92/05258 y WO92/14843). De un modo similar, puede usarse traducción *in vitro* para sintetizar polipéptidos como método para generar bibliotecas grandes. Estos métodos que comprenden generalmente complejos de polisomas estabilizados se describen adicionalmente en los documentos  
20 WO88/08453, WO90/05785, WO90/07003, WO91/02076, WO91/05058, y WO92/02536. Sistemas de presentación alternativos que no están basados en fagos, tales como los dados a conocer en el documento WO95/22625 y WO95/11922 (Affymax) usan los polisomas para presentar polipéptidos para su selección.

## 25 Bibliotecas combinatorias

Las bibliotecas, en particular, bibliotecas de moléculas candidatas, pueden estar adecuadamente en forma de bibliotecas combinatorias (también conocidas como bibliotecas químicas combinatorias).

30 Una "biblioteca combinatoria", tal como se usa el término en este documento, es una colección de múltiples especies de compuestos químicos que consisten en subunidades seleccionadas al azar. Pueden examinarse bibliotecas combinatorias para detectar moléculas que pueden potenciar, aumentar, reducir o minimizar el efecto mediado por polipéptidos de rSPD(n/CRD) cuando se exponen a una célula  
35 u organismo.

Actualmente están disponibles diversas bibliotecas combinatorias de compuestos químicos, incluyendo bibliotecas contra enzimas proteolíticas y no proteolíticas, bibliotecas de agonistas y antagonistas de receptores acoplados a proteína G (GPCR), bibliotecas activas contra dianas distintas de GPCR (por ejemplo, integrinas, canales iónicos, interacciones de dominios, receptores nucleares y factores de transcripción) y bibliotecas de oncología de células completas y dianas anti-infecciosas, entre otras. Se proporciona una revisión exhaustiva de bibliotecas combinatorias, en particular su construcción y usos en Dolle y Nelson (1999),  
40 *Journal of Combinatorial Chemistry*, vol. 1 n.º 4, 235-282. Se hace referencia también a *Combinatorial peptide library protocols* (editado por Shmuel Cabilly, Totowa, N.J.: Humana Press, c1998. *Methods in Molecular Biology*; v. 87).

Las referencias adicionales que describen bibliotecas combinatorias químicas, su producción y uso incluyen las disponibles de la URL <http://www.netsci.org/Science/Combichem/>, incluyendo The Chemical Generation of Molecular Diversity. Michael R. Pavia, Sphinx Pharmaceuticals, una división de Eli Lilly (publicado en julio de 1995); Combinatorial Chemistry: A Strategy for the Future - MDL Information Systems discusses the role its Project Library plays in managing diversity libraries (publicado en julio de 1995); Solid Support Combinatorial Chemistry in Lead Discovery and SAR Optimization, Adnan M. M. Mjalli y Barry E. Toyonaga, Ontogen Corporation (publicado en julio de 1995); Non-Peptidic Bradykinin Receptor Antagonists From a Structurally Directed Non-Peptide Library. Sarvajit Chakravarty, Babu J. Mavunkel, Robin Andy, Donald J. Kyle\*, Scios Nova Inc. (publicado en julio de 1995); Combinatorial Chemistry Library Design using Pharmacophore Diversity Keith Davies y Clive Briant, Chemical Design Ltd. (publicado en julio de 1995); A Database System for Combinatorial Synthesis Experiments - Craig James y David Weininger, Daylight Chemical Information Systems, Inc. (publicado en julio de 1995); An Information Management Architecture for Combinatorial Chemistry, Keith Davies y Catherine White, Chemical Design Ltd. (publicado en julio de 1995); Novel Software Tools for Addressing Chemical Diversity, R. S. Pearlman, Laboratory for Molecular Graphics and Theoretical Modeling, College of Pharmacy, Universidad de Texas (publicado en junio/julio de 1996); Opportunities for Computational Chemists Afforded by the New Strategies in Drug Discovery: An Opinion, Yvonne Connolly Martin, Computer Assisted Molecular Design Project, Abbott Laboratories (publicado en junio/julio de 1996); Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity Course at the University of Louisville: A Description, Arno F. Spatola, Department of Chemistry, Universidad de Louisville (publicado en junio/julio de 1996); Chemically Generated Screening Libraries: Present and Future. Michael R. Pavia, Sphinx Pharmaceuticals, una división de Eli Lilly (publicado en junio/julio de 1996); Chemical Strategies For Introducing Carbohydrate Molecular Diversity Into The Drug Discovery Process. Michael J. Sofia, Transcell Technologies Inc. (publicado en junio/julio de 1996); Data Management for Combinatorial Chemistry. Maryjo Zaborowski, Chiron Corporation y Sheila H. DeWitt, Parke-Davis Pharmaceutical Research, división de Warner-Lambert Company (publicado en noviembre de 1995); y The Impact of High Throughput Organic Synthesis on R&D in Bio-Based Industries, John P. Devlin (publicado en marzo de 1996).

Las técnicas de química combinatoria están obteniendo una gran aceptación entre los métodos modernos para la generación de nuevos compuestos de partida farmacéuticos (Gallop, M. A. *et al.*, 1994, *J. Med. Chem.* 37:1233-1251; Gordon, E. M. *et al.*, 1994, *J. Med. Chem.* 37:1385-401.). Un enfoque combinatorio en uso se basa en una estrategia que implica la síntesis de bibliotecas que contienen una estructura diferente en cada partícula del soporte de fase sólida, la interacción de la biblioteca con un receptor soluble, la identificación de la "perla" que interacciona con la diana macromolecular y la determinación de la estructura portada por la "perla" identificada (Lam, K. S. *et al.*, 1991, *Nature* 354:82-84). Una alternativa a este enfoque es la liberación secuencial de alícuotas definidas de los compuestos a partir del soporte sólido, con posterior determinación de su actividad en disolución, identificación de la partícula de la que se liberó el compuesto activo y dilucidación de su estructura mediante secuenciación directa (Salmon, S. E. *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11708-11712), o leyendo su código (Kerr, J. M. *et al.*, 1993, *J. Am. Chem. Soc.* 115:2529-2531; Nikolaiev, V. *et al.*, 1993, *Pept.*

Res. 6:161-170; Ohlmeyer, M. H. J. *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922-10926).

Pueden sintetizarse bibliotecas combinatorias aleatorias solubles usando un principio sencillo para la generación de mezclas equimolares de péptidos que se describió por primera vez por Furka (Furka, A. *et al.*, 1988, Xth International Symposium on Medicinal Chemistry, Budapest 1988; Furka, A. *et al.*, 1988, 14th International Congress of Biochemistry, Praga 1988; Furka, A. *et al.*, 1991, Int. J. Peptide Protein Res. 37:487-493). También se ha descrito la construcción de bibliotecas solubles para el examen iterativo (Houghten, R. A. *et al.* 1991, Nature 354:84-86).  
5 K. S. Lam dio a conocer la técnica novedosa e inesperadamente poderosa de uso de bibliotecas combinatorias aleatorias insolubles. Lam sintetizó bibliotecas combinatorias aleatorias sobre soportes de fase sólida, de modo que cada soporte tenía un compuesto de prueba de estructura molecular uniforme, y examinó las bibliotecas sin eliminación previa de los compuestos de prueba del soporte mediante protocolos de unión de fase sólida (Lam, K. S. *et al.*, 1991, Nature 354:82-84).  
10  
15

Por tanto, una biblioteca de moléculas candidatas puede ser una biblioteca combinatoria sintética (por ejemplo, una biblioteca química combinatoria), un extracto celular, un fluido corporal (por ejemplo, orina, sangre, lágrimas, sudor o saliva) u otra mezcla de productos naturales o sintéticos (por ejemplo, una biblioteca de moléculas pequeñas o una mezcla de fermentación).  
20

Una biblioteca de moléculas puede incluir, por ejemplo, aminoácidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas o fragmentos de péptidos o proteínas; ácidos nucleicos (por ejemplo, antisentido; ADN; ARN; o ácidos nucleicos peptídicos, PNA); aptámeros; o hidratos de carbono o polisacáridos. Cada miembro de la biblioteca puede ser singular o puede ser una parte de una mezcla (por ejemplo, una biblioteca comprimida). La biblioteca puede contener compuestos purificados o puede ser "sucia" (es decir, que contiene una cantidad significativa de impurezas). Pueden usarse también bibliotecas disponibles comercialmente (por ejemplo, de Afymetrix, ArQule, Neose Technologies, Sarco, Ciddco, Oxford Asymmetry, Maybridge, Aldrich, Panlabs, Pharmacopoeia, Sigma o Tripose) con los métodos descritos en el presente documento.  
25  
30

Además de bibliotecas tal como se describieron anteriormente, pueden usarse bibliotecas especiales denominadas archivos de diversidad para evaluar la especificidad, fiabilidad o reproducibilidad de los nuevos métodos. Los archivos de diversidad contienen un gran número de compuestos (por ejemplo, 1000 o más moléculas pequeñas) representativos de muchas clases de compuestos que podrían dar como resultado posiblemente detección no específica en un ensayo. Están disponibles comercialmente archivos de diversidad o pueden ensamblarse también a partir de compuestos individuales disponibles comercialmente de los proveedores enumerados anteriormente.  
35  
40

#### Sustancias candidatas

Las sustancias candidatas adecuadas incluyen péptidos, especialmente de desde aproximadamente 5 hasta 30 o de 10 a 25 aminoácidos de tamaño, basados en la secuencia de los polipéptidos descritos en los ejemplos, o variantes de tales péptidos en los que se han sustituido uno o más residuos. Pueden usarse pépti-  
45

dos de paneles de péptidos que comprenden secuencias al azar o secuencias que se han variado de manera sistemática para proporcionar un panel de péptidos diversos de manera máxima.

5 Las sustancias candidatas adecuadas también incluyen productos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos y anticuerpos con injerto de CDR) que son específicos para un polipéptido. Además, pueden examinarse bibliotecas combinatorias, péptidos y peptidomiméticos, entidades químicas definidas, oligonucleótidos y bibliotecas de productos naturales para examinar su actividad como inhibidores  
10 de la unión de un polipéptido a la maquinaria del ciclo de división celular, por ejemplo el aparato mitótico/meiótico (tales como microtúbulos). Pueden usarse las sustancias candidatas en un examen inicial en lotes de, por ejemplo, 10 sustancias por reacción, y las sustancias de los lotes que muestran inhibición se someten a prueba individualmente. Entonces, pueden someterse a prueba sustancias candidatas que muestran actividad en exámenes *in vivo* tales como los descritos  
15 a continuación en sistemas de células completas, tales como células de mamífero que se expondrán al inhibidor y se someterán a prueba para detectar la inhibición de cualquiera de los estadios del ciclo celular.

#### Ensayos de unión a polipéptidos

20 Un tipo de ensayo para identificar sustancias que se unen a un polipéptido implica poner en contacto un polipéptido, que está inmovilizado sobre un soporte sólido, con una sustancia candidata no inmovilizada determinando si y/o en qué grado el polipéptido y la sustancia candidata se unen entre sí. Alternativamente, la sustancia  
25 candidata puede estar inmovilizada y el polipéptido no inmovilizado. Esto puede usarse para detectar sustancias que pueden unirse a polipéptidos de rSPD(n/CRD), o fragmentos, homólogos, variantes o derivados de los mismos.

En un método de ensayo preferido, el polipéptido está inmovilizado sobre perlas tales como perlas de agarosa. Normalmente, esto se logra expresando el polipéptido de rSPD(n/CRD), o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo  
30 como una proteína de fusión con GST en bacterias, levaduras o líneas celulares eucariotas superiores y purificando la proteína de fusión con GST de extractos celulares brutos usando perlas de glutatión-agarosa (Smith y Johnson, 1988). Como control, la unión de la sustancia candidata, que no es una proteína de fusión con  
35 GST, al polipéptido inmovilizado se determina en ausencia del polipéptido. Se determina entonces la unión de la sustancia candidata al polipéptido inmovilizado. Este tipo de ensayo se conoce en la técnica como ensayo de precipitación de GST. De nuevo, la sustancia candidata puede estar inmovilizada y el polipéptido no inmovilizado.

40 También es posible realizar este tipo de ensayo usando sistemas de purificación por afinidad diferentes para inmovilizar uno de los componentes, por ejemplo Ni-NTA agarosa y componentes etiquetados con histidina.

La unión del polipéptido de rSPD(n/CRD), o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo a la sustancia candidata puede determinarse mediante una  
45 variedad de métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el componente no inmovilizado puede estar marcado (con, por ejemplo, un marcador radiactivo, una etiqueta de epítopo o un conjugado de enzima-anticuerpo). Alternativamente, la

unión puede determinarse mediante técnicas de detección inmunológicas. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede someterse a inmunotransferencia de tipo Western y la inmunotransferencia estudiarse con sonda con un anticuerpo que detecta el componente no inmovilizado. También pueden usarse técnicas de ELISA.

- 5 Normalmente, se añaden sustancias candidatas a una concentración final de desde 1 hasta 1000 nmol/ml, más preferiblemente desde 1 hasta 100 nmol/ml. En el caso de anticuerpos, la concentración final usada es normalmente de desde 100 hasta 500 µg/ml, más preferiblemente desde 200 hasta 300 µg/ml.

### Unión a ADN

10

Cuando se libera del entorno nuclear, el ácido nucleico tal como ADN puede provocar inflamación en los tejidos circundantes. Aunque se conocen varias proteínas de unión a ADN, las proteínas o los receptores que están implicados en el aclaramiento del ADN del pulmón y otros tejidos no están claramente establecidos. Los presentes inventores han descubierto que SP-D se une eficazmente a ADN (y ARN total) de origen bacteriano, de bacteriófagos y cromosómico.

15

La microscopía electrónica muestra que el fragmento recombinante de rSPD(n/CRD) (rSPD(n/CRD)) puede unirse eficazmente al ADN. Aunque sin querer restringirse a la teoría, los inventores han determinado que los nucleótidos, los bloques de construcción del ADN, pueden competir con el manano por la unión a rSPD(n/CRD), lo que sugiere que esta proteína puede unirse al ADN mediante su actividad de unión a hidratos de carbono. Además, la presencia de un fragmento similar a colágeno corto en este fragmento recombinante puede proporcionar también una capacidad añadida para que se una al ADN, eficazmente. Además, rSPD(n/CRD) compete con el yoduro de propidio por la unión del ADN sobre células apoptóticas, lo que indica que la proteína se une al ADN que se encuentra sobre la superficie de estas células. El reconocimiento del ADN sobre la superficie es probable que sea uno de los modos importantes de aclaramiento de las células apoptóticas del pulmón.

20

25

30 Varias aplicaciones para SP-D y fragmentos de la misma, especialmente rSPD(n/CRD); están mediadas por las propiedades de unión a ADN de estas moléculas. Por ejemplo:

35

40

1) Varias enfermedades, muchas de las cuales implican infección bacteriana crónica, fúngica y viral dan como resultado la acumulación de ácido nucleico libre en el pulmón. La fibrosis quística es una de tales enfermedades, y se produce infección persistente en el pulmón sólo tras la formación de biopelícula bacteriana, que requiere ADN libre extracelular. Puesto que SP-D nativa y rSPD(n/CRD) se unen a ADN libre, estas proteínas potencian el aclaramiento de ADN y minimizan la formación de biopelícula. La rSPD(n/CRD) también opsoniza muchos microbios pulmonares, y actúa posiblemente reduciendo o eliminando la colonización por patógenos en pacientes con fibrosis quística.

45

2) SP-D y rSPD(n/CRD) pueden unirse al ADN. Por tanto, células que contienen ADN en sus superficies, tales como células apoptóticas y necróticas, también se reconocen por SP-D y rSPD(n/CRD). Estos hechos proporcionan una explicación mecánica por la que las células que provocan inflamación se reconocen por la rSPD(n/CRD) para el aclaramiento mediado por fagocitos, *in vivo*. Pueden usarse

SP-D y fragmentos de la misma para tratar estados y enfermedades pulmonares tales como EPOC, inflamación crónica y asma crónica.

- 3) ADN libre o residuos de ADN de células necróticas y apoptóticas pueden actuar como autoantígeno. Por tanto, rSPD(n/CRD), al producir el aclaramiento de ADN libre (o ARN), ayuda en la reducción de la producción de autoanticuerpos en enfermedades autoinmunitarias.

### Enfermedades inflamatorias

El término “inflamación” se usa en el presente documento para referirse a la respuesta del tejido vivo al daño. Puede usarse un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo para tratar la inflamación, incluyendo una enfermedad inflamatoria, administrando a un individuo que padece tal enfermedad el polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo.

Las causas de la inflamación incluyen daño físico, sustancias químicas, microorganismos u otros agentes. En una realización preferida, el polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo se usa para tratar una enfermedad inflamatoria, aunque puede usarse para tratar cualquier inflamación que resulte de cualquier causa.

La respuesta inflamatoria consiste en cambios en el flujo sanguíneo, aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos y escape de las células de la sangre a los tejidos. La inflamación aguda es de corta duración, durando sólo unos pocos días. Sin embargo, si dura más tiempo, se denomina entonces inflamación crónica. Diversos ejemplos de inflamación aguda que pueden conocerse son dolor de garganta, reacciones en la piel a un arañazo o una quemadura o picadura de insecto, y hepatitis aguda y así sucesivamente. Sin embargo, hay excepciones históricas ocasionales tales como neumonía, inflamación del pulmón en vez de neumonitis y pleuresía, inflamación de la pleura en vez de pleuritis.

### Infecciones microbianas

Los virus conducen a muerte de células individuales por multiplicación intracelular. Las bacterias liberan exotoxinas específicas (compuestos químicos sintetizados por las mismas que inician específicamente la inflamación o endotoxinas, que están asociadas con sus paredes celulares). Adicionalmente, algunos organismos provocan inflamación mediada inmunológicamente a través de reacciones de hipersensibilidad. Infecciones parasitarias e inflamación tuberculosa son casos en los que la hipersensibilidad es importante.

### Reacciones de hipersensibilidad

Se produce una reacción de hipersensibilidad cuando un estado alterado de receptividad inmunológica provoca una reacción inmunitaria inapropiada o excesiva que daña los tejidos. Todas tienen mediadores celulares o químicos similares a los implicados en inflamación.

Agentes físicos

El daño tisular que conduce a la inflamación puede producirse a través de traumatismo físico, radiación ultravioleta u otra radiación ionizante, quemaduras o enfriamiento excesivo (“quemadura por congelación”).

Productos químicos irritantes y corrosivos

Los productos químicos corrosivos (ácidos, álcalis, agentes oxidantes) provocan inflamación a través de daño macroscópico en los tejidos. Sin embargo, agentes infecciosos pueden liberar irritantes químicos específicos que conducen directamente a inflamación.

La inflamación implica normalmente al menos una de las siguientes características:

Necrosis de tejidos: La muerte de tejidos por la falta de oxígeno o nutrientes que resulta del flujo de sangre inadecuado (infarto) es un potente estímulo inflamatorio. El borde de un infarto reciente muestra a menudo una respuesta inflamatoria aguda. Enrojecimiento (rubor): Un tejido inflamado de manera aguda aparece de color rojo, por ejemplo piel afectada por quemaduras solares, celulitis debida a infección bacteriana o conjuntivitis aguda. Esto se debe a la dilatación de pequeños vasos sanguíneos dentro de la zona dañada. Acaloramiento (calor): Se observa aumento de temperatura sólo en partes periféricas del cuerpo, tales como la piel. Se debe a un aumento del flujo de sangre (hiperemia) a través de la región, dando como resultado dilatación vascular y el suministro de sangre caliente a la zona. La fiebre sistémica, que resulta de algunos de los mediadores químicos de la inflamación, también contribuye a la temperatura local. Hinchazón (tumor): La hinchazón resulta del edema, la acumulación de líquido en el espacio extravascular como parte del exudado de fluido, y en un grado mucho menor, de la masa física de las células inflamatorias que migran a la zona. Dolor: Para el paciente, el dolor es una de las características mejor conocidas de la inflamación aguda. Resulta parcialmente del estiramiento y la distorsión de tejidos debido al edema inflamatorio y, en particular, del pus bajo presión en una cavidad de absceso. Algunos de los mediadores químicos de la inflamación aguda, incluyendo bradisinina, las prostaglandinas y serotonina, se sabe que inducen dolor. Pérdida de función: El movimiento de una zona inflamada se inhibe de manera consciente y refleja por el dolor, mientras que la hinchazón grave puede inmovilizar físicamente los tejidos.

Por tanto, se proporciona el alivio de un síntoma de inflamación, incluyendo un síntoma enumerado anteriormente, mediante la administración de un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo a un individuo que padece inflamación o una enfermedad inflamatoria.

40 Enfermedad pulmonar inflamatoria

En una realización altamente preferida, se usa un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo para tratar una enfermedad pulmonar inflamatoria.

Tal como se usa el término en el presente documento, debe considerarse que “enfermedad pulmonar inflamatoria” significa cualquier enfermedad o estado que implica inflamación del pulmón, o cualquier parte del pulmón o sistemas asociados tales como las vías respiratorias, tráquea, etc. La enfermedad pulmonar inflamatoria puede ser aguda o crónica, y puede resultar de o ir acompañada de alguna otra enfermedad o síndrome. En una realización preferida, la enfermedad pulmonar inflamatoria comprende una enfermedad pulmonar inflamatoria crónica.

Los ejemplos de enfermedades pulmonares inflamatorias incluyen enfermedad pulmonar crónica neonatal, síndrome de dificultad respiratoria neonatal (SDR), síndrome de dificultad respiratoria del adulto, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias (EPOC), asma, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, enfisema, enfermedad pulmonar inflamatoria intersticial, sarcoidosis, neumonía, enfermedad pulmonar inflamatoria crónica, enfermedad pulmonar inflamatoria crónica neonatal.

Pueden tratarse individuos que padecen tales enfermedades, o aliviarse sus síntomas, mediante la administración de un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo al individuo. Preferiblemente, tal tratamiento da como resultado el aclaramiento de macrófagos alveolares, preferiblemente macrófagos alveolares apoptóticos. El tratamiento también puede dar como resultado adicionalmente o como alternativa el aclaramiento de macrófagos necróticos. Pueden detectarse células necróticas y apoptóticas y distinguirse mediante los ensayos expuestos a continuación.

#### Enfermedad pulmonar crónica neonatal

La enfermedad pulmonar crónica neonatal es un estado multifactorial asociado con inflamación recurrente e infección tras parto prematuro. Hay varios factores que suponen un aumento del riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar crónica incluyendo parto prematuro, ventilación prolongada, infección recurrente en el periodo neonatal, deficiencia de tensioactivo y aumento de marcadores inflamatorios en el periodo neonatal, incluyendo el número de macrófagos alveolares en muestras de succión traqueal. Se sabe que los lactantes prematuros son deficientes en proteínas tensioactivas incluyendo SP-D.

La enfermedad pulmonar crónica neonatal humana surge del daño inflamatorio y estrés oxidativo tras ventilación asistida prolongada, normalmente tras parto prematuro. La supervivencia tras el parto prematuro ha aumentado drásticamente desde la irrupción de la terapia de sustitución con tensioactivo artificial para el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria neonatal, aunque hasta el 40% de los lactantes que sobreviven tras el nacimiento a menos de 28 semanas de gestación desarrollan enfermedad pulmonar inflamatoria crónica. Las estrategias de sustitución con tensioactivo actuales no incluyen proteína tensioactiva D. El daño pulmonar en este entorno está mediado por macrófagos alveolares activados. Ratones deficientes en SP-D proporcionan un modelo para la inflamación mediada por macrófagos en el pulmón caracterizada por la presencia de grandes números de macrófagos alveolares activados.

Se demuestra en los ejemplos que la administración intranasal de rSP-D (N/CRD) a ratones deficientes en SP-D modula el proceso inflamatorio en los pulmones disminuyendo el número de macrófagos activados y alterando su fenotipo. Los re-

- sultados demuestran una potente propiedad antiinflamatoria de rSP-D (N/CRD) e indican una aplicación clínica directa de rSP-D (N/CRD) en la prevención de la enfermedad pulmonar inflamatoria crónica en recién nacidos mediante administración directa o incluyendo rSP-D (N/CRD) en la formulación de terapias de tensioactivo actuales. Pueden emplearse también ácidos nucleicos que codifican para rSPD(n/CRD), así como fragmentos, homólogos, variantes y derivados. También puede tratarse la inflamación pulmonar crónica que provoca enfisema (por ejemplo en fumadores, deficientes en niveles naturales de SP-D) mediante la administración de rSP-D (N/CRD).
- Por tanto, se proporciona el tratamiento de enfermedad pulmonar crónica neonatal, o cualquier síntoma de una enfermedad de este tipo, mediante la administración de un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo.

### Terapia de sustitución con tensioactivo

- Esta sección describe la terapia de sustitución con tensioactivo, para la que se usa adecuadamente el polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo dado a conocer en el presente documento. En particular, el polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo puede emplearse para la terapia de sustitución con tensioactivo en el recién nacido.

- La terapia de sustitución con tensioactivo se describe en detalle en Respir Care 1994:39(8):824-829, de la que se deriva esta sección. Se han publicado directrices para la terapia de sustitución con tensioactivo, por ejemplo, las directrices de práctica clínica de la AARC. Un médico, siguiendo tales directrices, podrá administrar polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo como parte de un programa de terapia de sustitución con tensioactivo.

- El tensioactivo endógeno, natural, es un compuesto compuesto por fosfolípidos, lípidos neutros y proteínas (1-5) que forma una capa entre la superficie alveolar y el gas alveolar y reduce el colapso alveolar disminuyendo la tensión superficial dentro de los alveolos. (3-5) La deficiencia de tensioactivo está asociada casi siempre con la formación de membranas hialinas en el pulmón inmaduro y la aparición de síndrome de dificultad respiratoria (SDR), una causa principal de morbilidad en lactantes prematuros. (3) Sin tensioactivo, los alveolos pueden no inflarse nunca o pueden colapsarse al espirar y se requiere una fuerza desmesurada para reexpandirlos al inspirar, lo que conduce al desarrollo de SDR. (3,5) La incidencia de SDR está relacionada más con la inmadurez de los pulmones que con la edad de gestación. (6) Sin embargo, en general, cuanto más prematuro sea el lactante, menor será la producción de tensioactivo y más alta será la probabilidad de SDR. (4,6) Se ha mostrado que la instilación traqueal directa de tensioactivo reduce la morbilidad en lactantes con SDR. (7-25)

- Puede extraerse tensioactivo de lavado de pulmón animal y de líquido amniótico humano o producirse a partir de materiales sintéticos. Según los métodos y composiciones descritos en el presente documento, puede usarse polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo para la terapia de sustitución con tensioactivo, particularmente en el recién

nacido. Puede usarse polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo solo, o en combinación con terapias de sustitución con tensioactivo conocidas.

- 5 Han surgido dos estrategias básicas para la sustitución con tensioactivo: (1) tratamiento profiláctico o preventivo en el que se administra tensioactivo en el momento del nacimiento o poco después del mismo a lactantes que corren un alto riesgo de desarrollar SDR y (2) tratamiento de rescate o terapéutico en el que se administra tensioactivo tras el inicio de la ventilación mecánica en lactantes con SDR confirmado clínicamente. (2,10-12,26,27).
- 10 La terapia de sustitución con tensioactivo se administra normalmente por personal entrenado en la sala de administración o en una unidad de cuidados intensivos neonatal.

#### Indicaciones para la terapia de sustitución con tensioactivo

- 15 4.1 La administración profiláctica puede indicarse en 4.1.1 lactantes con alto riesgo de desarrollar SDR debido a una corta gestación (< 32 semanas) (8,10-12,21,25-29) o bajo peso al nacer (< 1,300 g), (21-25,28) lo que sugiere fuertemente inmadurez de los pulmones. 4.1.2 Lactantes en los que hay pruebas de laboratorio de deficiencia de tensioactivo tales como razón de lecitina/esfingomielinina inferior a 2:1, (11,14,28,30,31) prueba de estabilidad de burbujas que indica inmadurez de los pulmones, (15,32) o la ausencia de fosfatidilglicerol. (11,14,22-24,28,30) 4.2 Se indica administración de rescate o terapéutica en lactantes prematuros o a término 4.2.1 que requieren intubación endotraqueal y ventilación mecánica debido a 4.2.1.1 aumento del trabajo de respiración tal como se indica por un aumento en la tasa respiratoria, retracciones subesternales y supraesternales, gruñidos y aleteo nasal, (8,11,14-16,29,33-35) 4.2.1.2 requisitos de oxígeno crecientes tal como se indica por el color de la piel pálido o cianótico, agitación y disminuciones en PaO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub> o SpO<sub>2</sub> que exigen un aumento de FIO<sub>2</sub> por encima de 0 (4011,12,15,26,33,36-38) y 4.2.2 tienen pruebas clínicas de SDR (13,39) incluyendo 4.2.2.1 radiografía torácica característica de SDR, (8,11-16,33,34,36,37,40-42) 4.2.2.2 presión media en las vías respiratorias superior a 7 cm de H<sub>2</sub>O para mantener una adecuada PaO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub> o SpO<sub>2</sub>. (11,14,15,26,43)

#### Contraindicaciones

- 35 La terapia de sustitución con tensioactivo está contraindicada para los siguientes estados: 5.1 la presencia de anomalías congénitas incompatibles con la vida más allá del periodo neonatal, (8,14,15,26,28,29,31,33,36,41,44) 5.2 dificultad respiratoria en lactantes con pruebas de laboratorio de madurez de los pulmones. (9,14,27-29,33,36,41)
- 40 Los peligros y complicaciones que surgen de la terapia de sustitución con tensioactivo incluyen: 6.1 las complicaciones del procedimiento que resultan de la administración del tensioactivo incluyen 6.1.1 obstrucción del tubo endotraqueal (ETT) por tensioactivo; (2); 6.1.2 desaturación de hemoglobina y aumento de la necesidad de O<sub>2</sub> complementario; (11,33,41); 6.1.3 bradicardia debida a hipoxia; (9,33,41,45); 6.1.4 taquicardia debida a agitación, con refluo del tensioactivo hacia el ETT; (34,41); 6.1.5 deposición en la faringe de tensioactivo; 6.1.6 admi-

nistración de tensioactivo a sólo un pulmón; 6.1.7 administración de una dosis subóptima tras cálculo erróneo o error en la reconstitución. 6.2 Las complicaciones fisiológicas de la terapia de sustitución con tensioactivo incluyen 6.2.1 apnea, (7,13,15); 6.2.2 hemorragia pulmonar, (12,15,18,32,34,38,46,47); 6.2.3 tapones  
 5 de moco, (48); 6.2.4 aumento de la necesidad de tratamiento para PDA, (18,29,30); 6.2.5 aumento marginal en la retinopatía de la prematuridad, (11); 6.2.6 barotraumatismo que resulta del aumento en la distensibilidad de los pulmones tras la sustitución con tensioactivo y no cambiar los parámetros del ventilador en consecuencia. (30,49)

10 El tensioactivo administrado profilácticamente puede administrarse a algunos lactantes en los que no se había desarrollado SDR. (10,12,26,33). Cuando se administra profilácticamente tensioactivo en la sala de administración, la colocación del ETT puede no haberse verificado mediante radiografía torácica dando como resultado la administración involuntaria a sólo un pulmón o al estómago. (26) La administración profiláctica de tensioactivo puede retrasar la estabilización del paciente.  
 15 (26). Pueden producirse atelectasia y lesión pulmonar antes de la administración terapéutica. (26,33). Debe evitarse el aspirado traqueal tras la administración del tensioactivo. (9,11,13,14,27,33, 38,44,50). No todos los lactantes que se han tratado con una única dosis de tensioactivo experimentan una respuesta positiva 39  
 20 o la respuesta puede ser transitoria. La posición recomendada para la administración del tensioactivo puede comprometer además al lactante inestable. (9,11,12,14,16,28,33,38-40)

Un médico puede emprender una evaluación de la necesidad de determinar que  
 25 están presentes indicaciones válidas. Lo siguiente se realiza normalmente para esto: 8.1 Evaluación de la inmadurez de los pulmones antes de la administración profiláctica de tensioactivo mediante la edad de gestación y el peso al nacer y/o mediante evaluación de laboratorio del aspirado traqueal o gástrico. 8.2 Establecimiento del diagnóstico de SDR mediante criterios de radiografía torácica y el requisito de ventilación mecánica en presencia de corta gestación y/o bajo peso al  
 30 nacer.

Se realiza la evaluación del desenlace según lo siguiente: 9.1 Requisito de reducción en FIO<sub>2</sub> (12,33,34,36-39,41,44) 9.2 Reducción en el trabajo de respiración (51) 9.3 Mejora en los volúmenes pulmonares y campos pulmonares tal como se indica mediante radiografía torácica (13,16,33,40) 9.4 Mejora en la mecánica pulmonar (por ejemplo, distensibilidad, resistencia de las vías respiratorias, VT, VE, presión transpulmonar) y volumen pulmonar (es decir, FRC) (42,43,50,52-59) 9.5 Reducción en los requisitos de ventilador (PIP, PEEP, Paw) (2,8,9,12,13,27,30,33,36-39,41,44,50,52) 9.6 Mejora en la razón de PO<sub>2</sub> arterial con respecto a alveolar (PO<sub>2</sub> a/A), índice de oxígeno (13,16,28,30,33,34,37-  
 40 41,44).

### Recursos

Deben observarse procedimientos de administración recomendados para preparaciones específicas de tensioactivo. 10.1 Equipo (10-14,16,26-  
 45 28,33,34,39,40,50,60) 10.1.1 Equipo de administración 10.1.1.1 Jeringuilla que contiene la dosis ordenada de tensioactivo, calentada hasta temperatura ambiente (11,12,16,38,40) 10.1.1.2 Catéter o tubo de alimentación 5-Fr, o conector de tubo

endotraqueal con orificio de administración 10.1.1.3 Ventilador mecánico o ventilador manual (bolsa de resucitación) (8,16,33,36,38-40,44,50,52) 10.1.2 Equipo de resucitación 10.1.2.1 Laringoscopio y tubo endotraqueal (10-12,14,16,26,38) 10.1.2.2 Bolsa de resucitación manual (9-12,16,26-28,36,39,40,50) y manómetro de las vías respiratorias 10.1.2.3 Fuente de oxígeno combinado (9,16,28,44) 5  
10.1.2.4 Equipo de aspiración (es decir, catéteres, guantes estériles, tubos y frasco de recogida, y generador de vacío) (9,33,50,60) 10.1.2.5 Calentador radiante listo para usar 10.1.3 Equipo de monitorización 10.1.3.1 Monitor de volumen tidal neonatal si está disponible (50) 10.1.3.2 Monitor de presión de las vías respiratorias 10.1.3.3 Oxímetro de pulso o monitor de PCO<sub>2</sub> transcutánea (11,26,34,39-41,52) 10.1.3.4 Monitor cardiorrespiratorio 10.2 Personal. La terapia de sustitución con tensioactivo debe realizarse bajo la dirección de un médico por personal acreditado (por ejemplo, CRTT, RRT, RN) que demuestran competentemente 10.2.1 uso apropiado, comprensión y dominio del equipo y los aspectos técnicos de la terapia de sustitución con tensioactivo; 10.2.2 conocimiento y comprensión exhaustivos del manejo del ventilador neonatal y la anatomía y fisiopatología pulmonar; 10.2.3 experiencia en la evaluación de pacientes neonatales, incluyendo la capacidad para reconocer y responder a reacciones adversas y/o complicaciones del procedimiento; 10.2.4 conocimiento y comprensión de la historia del paciente y del estado clínico; 10.2.5 conocimiento y comprensión del manejo de las vías respiratorias; 10.2.6 capacidad para interpretar signos vitales y variables de gases sanguíneos medidos y monitorizados; 10.2.7 uso apropiado, comprensión y dominio de los procedimientos y el equipo de resucitación de emergencia; 10.2.8 capacidad para evaluar y documentar el desenlace (sección 9.0); 10.2.9 comprensión y aplicación apropiada de precauciones universales. 25

### Monitorización

Lo siguiente debe monitorizarse como parte de la terapia de sustitución con tensioactivo. 11.1 Variables que van a monitorizarse durante la administración del tensioactivo 11.1.1 Posición y colocación apropiadas del dispositivo de administración 11.1.2 Parámetros del ventilador y FIO<sub>2</sub> (8,9,11,13-15,27-29,33,36,38,44) 30 11.1.3 Reflujo del tensioactivo hacia el ETT (34,41) 11.1.4 Posición del paciente (es decir, dirección de la cabeza) (9,11,33) 11.1.5 Movimiento de la pared torácica (61) 11.1.6 Saturación de oxígeno por oximetría de pulso (11,26,34,39-41,52) 35 11.1.7 Frecuencia cardíaca, respiraciones, expansión torácica, color de la piel y vigor (16,26,27,34,41,45,52) 11.2 Variables que van a monitorizarse tras la administración del tensioactivo 11.2.1 Mediciones invasivas y no invasivas de gases de sangre arterial (8,9,11,12-16,26-29,33,36,38,39,41,44) 11.2.2 Radiografía torácica (11-16,28,36,38-40,44) 11.2.3 Parámetros del ventilador (PIP, PEEP, Paw) y FIO<sub>2</sub> 40 (8,9,11,13-16,28,29,33,36,38) 11.2.4 Volúmenes y mecánica pulmonares 11.2.5 Frecuencia cardíaca, respiraciones, expansión torácica, color de la piel y vigor (16,26,27,34,41,45,52) 11.2.6 Sonidos de la respiración (11,38) 11.2.7 Tensión arterial (3,16,33,40,44,45).

### Frecuencia

45 Las dosis repetidas de tensioactivo están supeditadas al diagnóstico continuado de SDR. La frecuencia con la que se realiza la sustitución con tensioactivo debe depender del estado clínico del paciente y de la indicación para realizar el proce-

dimiento. Dosis adicionales de tensioactivo, administradas a intervalos de 6 a 24 horas, pueden estar indicadas en lactantes que experimentan requisitos de ventilador crecientes o cuyos estados no mejoran tras la dosis inicial. (7,9,11,12,14,15,26,30, 34,37,39,52)

5 Control de infecciones

13.1 Deben implementarse precauciones universales (62). 13.2 Debe ponerse en práctica una técnica aséptica. 13.3 Deben anotarse y seguirse directrices de control de infecciones apropiadas para el paciente.

10 Fibrosis quística

Se muestra en los ejemplos que el polipéptido de rSPD(n/CRD) puede reducir el número de macrófagos alveolares. Por consiguiente, puede administrarse polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo en enfermedades pulmonares en las que los macrófagos alveolares desempeñan un papel en el proceso inflamatorio, por ejemplo, fibrosis quística, asma y enfisema. rSP-D (N/CRD) tiene también propiedades terapéuticas en procesos inflamatorios mediados por macrófagos en otros sitios, por ejemplo en aterosclerosis.

20 La fibrosis quística es una enfermedad genética que afecta aproximadamente tanto a niños como a adultos.

La fibrosis quística provoca que el cuerpo produzca un moco anómalamente espeso, pegajoso debido al transporte defectuoso de sodio y cloruro (sal) dentro de las células que revisten órganos tales como los pulmones y el páncreas, o sus superficies externas. El moco espeso de la fibrosis quística también obstruye el páncreas, impidiendo que las enzimas alcancen los intestinos para ayudar a descomponer y digerir el alimento.

La fibrosis quística tiene una variedad de síntomas. Los más comunes son: piel con sabor muy salino; tos persistente, respiración sibilante o neumonía; apetito excesivo pero escaso aumento de peso; y deposiciones voluminosas. La prueba de sudor es la prueba de diagnóstico convencional para la fibrosis quística, que mide la cantidad de sal en el sudor. Un alto nivel de sal indica que una persona tiene fibrosis quística.

El tratamiento de la fibrosis quística depende del estadio de la enfermedad y de qué órganos están implicados. Un medio de tratamiento, la terapia física torácica, requiere percusión vigorosa (usando el cuenco de la mano) sobre la espalda y el tórax para desplazar el moco espeso de los pulmones. También se usan antibióticos para tratar infecciones pulmonares y se administran por vía intravenosa, mediante píldoras y/o vapores medicados que se inhalan para abrir las vías respiratorias obstruidas. Cuando la fibrosis quística afecta al sistema digestivo, el cuerpo no absorbe suficientes nutrientes. Por tanto, la gente con fibrosis quística puede necesitar alimentarse con una dieta enriquecida y necesita tomar tanto enzimas como vitaminas de sustitución.

Según los métodos y las composiciones descritos en el presente documento, se alivia un síntoma de un paciente que padece fibrosis quística mediante la adminis-

tración de polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo. El síntoma de fibrosis quística incluye preferiblemente cualquiera de los síntomas enumerados anteriormente. Preferiblemente, un paciente que padece fibrosis quística se trata mediante la administración de un polipéptido de este tipo, homólogo, fragmento o derivado.

### Alergias

Los tratamientos existentes para las alergias implican normalmente el uso a largo plazo de esteroides para deprimir el sistema inmunitario. Hay efectos secundarios no deseados con la terapia con esteroides a largo plazo. Se demuestra que puede usarse polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo para aliviar los síntomas de la alergia, o para tratar la alergia.

El tratamiento con rSPD(n/CRD) parece no tener efectos adversos en ratones y no es probable que genere efectos secundarios no deseados en seres humanos. Un ciclo de tratamiento corto con rSPD(n/CRD) puede revertir la sensibilización alérgica subyacente conduciendo a una inmunoterapia eficaz. Esto es una mejora significativa sobre los protocolos de inmunoterapia de desensibilización existentes que implican normalmente una serie de inyecciones de alérgeno a lo largo de un periodo de años.

Las alergias adecuadas para el tratamiento con polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo incluyen una alergia respiratoria estacional, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis no alérgica, rinitis vasomotora, rinitis irritante, una alergia contra pólenes de hierbas, pólenes de árboles o caspa de animales, una alergia asociada a asma alérgica y alergias alimentarias. En particular, y tal como se describe en otra parte, puede usarse polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo para tratar alergias a ácaros del polvo doméstico (*Dermatophagoides* spp), preferiblemente *Dermatophagoides pteronyssinus* o *Dermatophagoides farinae*, o a hongos o esporas fúngicas, preferiblemente *Aspergillus fumigatus*. Preferiblemente, los alérgenos están comprendidos en heces de *Dermatophagoides* spp.

### Asma

El asma es un estado respiratorio caracterizado por obstrucción del flujo de aire en los tubos bronquiales. Los síntomas provocados por esta obstrucción incluyen tos, opresión en el tórax, respiración sibilante y disnea. Aunque los problemas están separados a menudo por periodos libres de síntomas, el asma es una enfermedad crónica.

Una amplia variedad de “desencadenantes” pueden iniciar un episodio de asma. El desencadenante más común son alérgenos, aspirina y tartrazina, irritantes, conservantes y aditivos alimentarios, infecciones respiratorias virales y ejercicio físico.

Los alérgenos son sustancias a los que individuos susceptibles pueden llegar a ser alérgicos. Son una fuente principal de problemas en niños y adultos. Los alér-

genos comunes incluyen polen de plantas (árboles, hierbas y césped), caspa de animales, ácaros del polvo doméstico, mohos y determinados alimentos. Cuando un individuo alérgico entra en contacto con uno de estos alérgenos, una serie de acontecimientos provocan que el cuerpo libere determinados compuestos químicos (mediadores) que desencadenan entonces el asma.

Del diez al veinte por ciento de los asmáticos experimentan una disminución significativa en su función pulmonar tras tomar aspirina; pueden producirse reacciones similares con un grupo relacionado de medicamentos denominados agentes anti-inflamatorios no esteroideos y con tartrazina (colorante alimentario amarillo n.º 5). Aire frío, humo, productos químicos industriales, perfume, pintura y humos de gasolina son todos ejemplos de irritantes que pueden provocar asma, probablemente estimulando receptores de irritantes en las vías respiratorias. Estos receptores, a su vez, provocan que los músculos que rodean las vías respiratorias se constriñan, dando como resultado un ataque asmático. Rara vez, aditivos alimentarios tales como sulfitos pueden desencadenar asma. Infecciones respiratorias virales son la causa principal de ataques de asma agudos.

Durante un ataque de asma, los tubos bronquiales hiperactivos de un asmático se estrechan en respuesta a determinados desencadenantes. Durante un ataque, los músculos que rodean los tubos bronquiales se contraen, estrechando los conductos de aire. También se produce inflamación a lo largo del revestimiento de las vías respiratorias, que produce hinchazón y reducción adicional del tamaño de las vías respiratorias. Además, las glándulas mucosas a lo largo del interior de los conductos de aire producen moco en exceso que se acumula en los conductos de aire ya estrechados. El resultado final es que la respiración, especialmente la exhalación, se hace extremadamente difícil. El aire queda atrapado detrás de los conductos bronquiales estrechados y hay una disminución en el oxígeno disponible para el cuerpo.

Los broncodilatadores son los fármacos más comúnmente prescritos para tratar el asma. Relajan los músculos que rodean las vías respiratorias, dando como resultado dilatación de los tubos bronquiales. Los broncodilatadores pueden inhalarse, tomarse por vía oral o inyectarse. El aire frío, seco, por ejemplo, inhalado durante el ejercicio a través de la boca también puede desencadenar asma.

Los fármacos actuales usados para tratar los síntomas del asma incluyen teofilinas de acción prolongada, agonistas beta inhalados u orales, cromolina y esteroides inhalados u orales. Para asmáticos alérgicos, la inmunoterapia (vacuna contra la alergia) puede ofrecer alivio frente a alérgenos que no pueden evitarse. La inmunoterapia aumenta la tolerancia de un paciente a alérgenos que promueven síntomas del asma.

### Asma alérgica

El asma también puede desencadenarse por la exposición a alérgenos (“asma alérgica”).

El asma alérgica se caracteriza por periodos de hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) que se producen en reacciones de hipersensibilidad de fase temprana y de fase tardía en respuesta a provocación por alérgenos. La respuesta de fase temprana está mediada por la desgranulación de mastocitos de las vías res-

piratorias con la liberación de histamina y otros broncoconstrictores. La respuesta de fase tardía comienza tras el flujo de entrada de células inflamatorias tales como eosinófilos y linfocitos y la liberación posterior de mediadores inflamatorios y citocinas, que conducen a AHR crónica.

- 5 Los ácaros del polvo doméstico son una de las causas principales de asma alérgica (Platts-Mills, T. A., y M. D. Chapman. 1987. Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control. *J Allergy Clin Immunol.* 80:755-75; Platts-Mills, T. A., E. B. Mitchell, M. D. Chapman, y P. W. Heymann. 1987. Dust mite allergy: its clinical significance. *Hosp Pract (Off Ed).* 22:91-3, 97-100; Pollart, S. M.,  
10 M. D. Chapman, y T. A. Platts-Mills. 1987. House dust sensitivity and environmental control. *Prim Care.* 14:591-603.).

Puede usarse un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo, por ejemplo tal como se describe en el presente documento, para tratar el asma alérgica. Preferiblemente, el polipéptido de rSPD(n/CRD),  
15 fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo se emplea para tratar la alergia, o asma alérgica, provocada por ácaros del polvo doméstico.

Ácaros del polvo doméstico se refiere a cualquier organismo de *Dermatophagoides* spp. Preferiblemente, el organismo de *Dermatophagoides* es *Dermatophagoides pteronyssinus* o *Dermatophagoides farinae*. El asma alérgica también puede  
20 desarrollarse como resultado de la exposición de un individuo a hongos o esporas fúngicas, y los métodos y las composiciones descritos en el presente documento incluyen el tratamiento de tal asma o alergia, incluyendo cualquier alergia contra antígenos de *Aspergillus fumigatus*.

#### Enfisema pulmonar y enfermedad pulmonar obstructiva crónica

25 En una realización particular, se usa un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo, por ejemplo tal como se describe en el presente documento, para tratar el enfisema pulmonar o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

30 El enfisema es un problema de salud pública masivo para el que no hay tratamientos satisfactorios. El humo de los cigarrillos induce apoptosis de macrófagos alveolares *in vitro* (Aoshiba, K., Tamaoki, J., y Nagai, A. 2001. Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L1392) e *in vivo* (Aoshiba *et al*, citado anteriormente) y Majo  
35 *et al* han notificado recientemente que la apoptosis en muestras de tejido pulmonar de fumadores mostraba una relación bilineal con la cantidad de humo, aumentando bruscamente en fumadores con enfisema y concluyen que la apoptosis podría ser uno de los mecanismos de destrucción del pulmón que conducen al desarrollo de enfisema Majo, J., Ghezzi, H., y Cosio, M. G. 2001. Lymphocyte  
40 population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 17: 946. Se propone que SP-D es deficiente en fumadores, y que esto promueve la apoptosis y contribuye al enfisema en este grupo de pacientes. Se demuestra que la administración de rSP-D (N/CRD) a ratones deficientes en SP-D reduce los números de células apoptóticas; por consiguiente, la terapia con rSP-D  
45 (N/CRD) en seres humanos puede inhibir un mecanismo que contribuye al enfisema provocado por fumar cigarrillos.

### Citocinas

5 En una realización adicional, se usa el polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo para modular los niveles de citocinas en un individuo. Preferiblemente, el nivel de citocinas inflamatorias se regula por disminución. Los ejemplos de citocinas inflamatorias incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), así como cualquier citocina que medie en la migración de macrófagos alveolares al pulmón y actúe aumentando la proliferación celular.

10 Se demuestra la modulación de los niveles de GM-CSF mediante la administración de polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo en el ejemplo 9 (figura 14).

15 El término "citocina" puede usarse para referirse a cualquiera de varias moléculas solubles (por ejemplo, glicoproteínas) liberadas por células del sistema inmunitario, que actúan no enzimáticamente a través de receptores específicos regulando respuestas inmunitarias. Las citocinas se asemejan a hormonas porque actúan a bajas concentraciones unidas con alta afinidad a un receptor específico. Preferiblemente, el término "citocina" se refiere a un grupo diverso de péptidos y proteínas solubles que actúan como reguladores humorales a concentraciones de nano a picomolares y que, en condiciones no bien normales o bien patológicas, modulan las actividades funcionales de tejidos y células individuales.

25 Los ejemplos particulares de citocinas que son adecuadas para su uso en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento incluyen interleucinas, linfoquina, interferón, factores estimulantes de colonias (CSF) tales como factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), GSF, factores de activación de plaquetas (PAF), factor de necrosis tumoral (TNF).

30 Por tanto, se incluyen interleucinas tales como IL1, IL2 e IL4, así como interferones tales como IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ . También pueden emplearse adecuadamente factores de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  (caquetina), TNF- $\beta$  (linfo toxina).

35 Citocinas preferidas son las que pueden reclutar respuestas inmunitarias, por ejemplo, estimulación de células dendríticas o actividad de células T citotóxicas, o que pueden reclutar macrófagos al sitio diana. En una realización altamente preferida, la citocina comprende IL-2, GM-CSF o GSF.

### Apoptosis

40 Según los métodos y las composiciones descritos en el presente documento, la administración de un polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo a un individuo puede reducir el número de macrófagos alveolares, en particular el número de macrófagos alveolares apoptóticos, o macrófagos alveolares necróticos o ambos. Sin querer restringirse a una teoría particular, se prevé que el polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo logre esto

potenciando el aclaramiento de macrófagos apoptóticos y/o necróticos del cuerpo del individuo.

Preferiblemente, el tratamiento con polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo da como resultado al menos un 10% más de aclaramiento de macrófagos apoptóticos y/o necróticos, preferiblemente al menos un 20% más de aclaramiento. Lo más preferiblemente, el tratamiento con polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo da como resultado al menos un 40%, 60%, 80% o más de aclaramiento de macrófagos apoptóticos y/o necróticos.

La muerte celular puede producirse por cualquiera de dos mecanismos distintos, necrosis o apoptosis. Además, determinados compuestos químicos y células se dice que son citotóxicos para la célula, es decir, provocan su muerte.

“Necrosis” (también denominada muerte celular “accidental”) se refiere al proceso patológico que se produce cuando se exponen células a un ataque físico o químico grave. Se produce necrosis cuando se exponen células a una variación extrema con respecto a las condiciones fisiológicas (por ejemplo, hipotermia, hipoxia) que puede dar como resultado daño a la membrana plasmática. En condiciones fisiológicas, se provoca daño directo a la membrana plasmática por agentes como el complemento y virus líticos. La necrosis comienza con una alteración de la capacidad de la célula para mantener la homeostasis, que conduce a un flujo de entrada de agua e iones extracelulares. Los orgánulos intracelulares, lo más particularmente las mitocondrias, y toda la célula se hinchan y se rompen (lisis celular). Debido a la descomposición final de la membrana plasmática, el contenido citoplasmático incluyendo las enzimas lisosómicas se liberan al líquido extracelular. Por tanto, *in vivo*, la muerte celular necrótica está asociada a menudo con daño tisular extenso que da como resultado una respuesta inflamatoria intensa.

“Apoptosis” (muerte celular “normal” o “programada”) se refiere al proceso fisiológico mediante el que se eliminan células no deseadas o sin utilidad durante el desarrollo y otros procesos biológicos normales. La apoptosis es un modo de muerte celular que se produce en condiciones fisiológicas normales y la célula es un participante activo en su propio fallecimiento (“suicidio celular”). Se encuentra lo más a menudo durante el recambio celular normal y la homeostasis tisular, la embriogénesis, la inducción y el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria, el desarrollo del sistema nervioso y la atrofia del tejido dependiente del sistema endocrino. Las células que experimentan apoptosis muestran rasgos bioquímicos y morfológicos característicos. Estos rasgos incluyen agregación de la cromatina, condensación nuclear y citoplasmática, partición del citoplasma y núcleo en vesículas unidas a la membrana (cuerpos apoptóticos) que contienen ribosomas, mitocondrias morfológicamente intactas y material nuclear. *In vivo*, estos cuerpos apoptóticos se reconocen y fagocitan rápidamente por o bien macrófagos o bien células epiteliales adyacentes. Debido a este eficaz mecanismo para la eliminación de células apoptóticas *in vivo*, no se generan respuestas inflamatorias. *In vitro*, los cuerpos apoptóticos así como los fragmentos celulares restantes se hinchan en última instancia y finalmente se lisan. Esta fase terminal de muerte celular *in vitro* se ha denominado “necrosis secundaria”.

La tabla 1 resume las diversas diferencias observables entre necrosis y apoptosis. Cualquiera de estas diferencias, solas o en combinación, pueden someterse a en-

sayo con el fin de determinar si está produciéndose muerte celular por apoptosis o por necrosis.

	<b>Necrosis</b>	<b>Apoptosis</b>
<b>Rasgos morfológicos</b>	<p>Pérdida de integridad de la membrana</p> <p>Comienza con el hinchamiento del citoplasma y las mitocondrias</p> <p>Finaliza con lisis celular total</p> <p>Sin formación de vesículas, lisis completa</p> <p>Disgregación (hinchamiento) de orgánulos</p>	<p>Formación de ampollas en la membrana, pero no pérdida de integridad</p> <p>Agregación de la cromatina en la membrana nuclear</p> <p>Comienza con la retracción del citoplasma y la condensación del núcleo</p> <p>Finaliza con la fragmentación de la célula en cuerpos más pequeños</p> <p>Formación de vesículas unidas a la membrana (cuerpos apoptóticos)</p> <p>Las mitocondrias padecen fugas debido a la formación de poros que implican a proteínas de la familia bcl-2.</p>
<b>Rasgos bioquímicos</b>	<p>Pérdida de regulación de la homeostasis del hierro</p> <p>Sin requisitos de energía (proceso pasivo, se produce también a 4°C)</p> <p>Digestión al azar de ADN (frotis de ADN tras electroforesis en gel de agarosa)</p> <p>Fragmentación del ADN tras la lisis (= acontecimiento tardío de muerte)</p>	<p>Proceso rigurosamente regulado que implica etapas de activación y enzimáticas</p> <p>Dependiente de energía (ATP) (proceso activo, no se produce a 4°C)</p> <p>Fragmentación de ADN de longitud mono y oligonucleosómica no al azar (patrón de marcador de tamaño molecular tras electroforesis en gel de agarosa)</p> <p>Fragmentación del ADN antes de la lisis</p> <p>Liberación de diversos factores (citocromo C, AIF) al citoplasma por las mitocondrias</p> <p>Activación de la cascada de caspasas</p> <p>Alteraciones en la asimetría de la</p>

		membrana (es decir, translocación de fosfatidilserina desde el citoplasma hasta el lado extracelular de la membrana)
<b>Significación fisiológica</b>	<p>Afecta a grupos de células contiguas</p> <p>Provocada por alteraciones no fisiológicas (ataque del complemento, virus líticos, hipotermia, hipoxia, isquemia, venenos metabólicos)</p> <p>Fagocitosis por macrófagos</p> <p>Respuesta inflamatoria significativa</p>	<p>Afecta a células individuales</p> <p>Inducida por estímulos fisiológicos (falta de factores de crecimiento, cambios en el entorno hormonal)</p> <p>Fagocitosis por células adyacentes o macrófagos</p> <p>Sin respuesta inflamatoria</p>

Tabla 1: Rasgos diferenciales y significancia de necrosis y apoptosis

Se hace referencia a los siguientes documentos, que describen la apoptosis en detalle, así como diversos ensayos para medir la muerte celular por apoptosis:

5 Schwartzman, R. A. y Cidlowski, J. A. (1993). *Endocrine Rev.* 14, 133; Vermes, I. y Haanan, C. (1994). *Adv. Clin. Chem.* 31, 177; Berke, G. (1991). *Immunol. Today* 12, 396; Krähenbühl, O. y Tschopp, J. (1991). *Immunol. Today* 12, 399; Van Furth, R. y Van Zwet, T. L. (1988). *J. Immunol; Methods* 108,45. Cohen, J. J. (1993) Apoptosis. *Immunol. Today*14, 126; Savill, J. S. *et al.* (1989). *J. Clin. Invest.* 83, 865; Wyllie, A. H. (1980). *Nature* 284, 555; Leist, M. *et al.* (1994) *Biochemica* n.º 3, 18-20; Fraser, A. y Evan, G. (1996) *Cell* 85, 781-784; Duke, R C. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80,6361; Duke, R. C. y Cohen, J. J. (1986). *Lymphokine Res.* 5, 289; Trauth, B. C. *et al.* (1994) *Eur. J. Cell. Biol.* 63, 32, supl. 40; Matzinger, P. (1991). *J. Immunol; Methods* 145, 185; Kaeck, M. R. (1993); *Anal. Biochem.* 208, 393; Prigent, P. *et al.* (1993). *J. Immunol; Methods* 160, 139; Huang, P. y Plunkett, W. (1992); *Anal. Biochem.* 207, 163 Bortner, C. D. *et al.* (1995) *Trends Cell Biol.* 5, 21; Gold, R. *et al.* (1994); *Lab. Invest.* 71, 219.

La apoptosis y la citotoxicidad mediada por células se caracteriza por escisión del ADN genómico en fragmentos diferenciados antes de la disgregación de la membrana. Por consiguiente, la apoptosis puede someterse a ensayo midiendo la fragmentación del ADN, por ejemplo, observando la presencia de marcadores de tamaño molecular del ADN. Los fragmentos de ADN pueden someterse a ensayo, por ejemplo, como “marcadores de tamaño molecular” (con los múltiplos de 180 pb como “peldaños” del marcador de tamaño molecular) derivados de poblaciones de células, o mediante cuantificación de fragmentos de ADN complejados con histonas mediante, por ejemplo, ELISA. Un ensayo de este tipo se basa en un inmunoensayo de tipo “sándwich” de una etapa para detectar nucleosomas. El procedimiento implica sedimentar células mediante centrifugación y desechar el sobrenadante (que contiene ADN de células necróticas que se escapó a través de la membrana durante la incubación). Se resuspenden las células y se incuban en tampón de lisis. Tras la lisis, se sedimentan núcleos intactos mediante centrifuga-

ción. Se transfiere una alícuota del sobrenadante a un pocillo recubierto con estreptavidina de una placa de microtitulación, y se unen los nucleosomas en el sobrenadante con dos anticuerpos monoclonales, anti-histona (marcado con biotina) y anti-ADN (conjugado con peroxidasa). Los complejos anticuerpo-nucleosoma se unen a la placa de microtitulación mediante la estreptavidina. Los complejos anticuerpo-histona inmovilizados se lavan tres veces para eliminar componentes celulares que no son inmunorreactivos, y se incuban la muestra con sustrato de peroxidasa (ABTS®). Se determina entonces la cantidad de producto coloreado (y por tanto, de complejos anticuerpo-histona inmovilizados) espectrofotométricamente.

10 Varias proteasas están implicadas en los estadios tempranos de la apoptosis. Por tanto, la apoptosis puede someterse a ensayo detectando la presencia de, además de, o en lugar de, sometiendo a ensayo la actividad de, proteasas inducidas por apoptosis tales como caspasas, por ejemplo, caspasa 3. La activación de caspasas puede analizarse de diferentes modos, por ejemplo, mediante un ensayo enzimático *in vitro* de, por ejemplo, lisados celulares capturando la caspasa y midiendo la escisión proteolítica de un sustrato adecuado. Además, pueden someterse a ensayo caspasas mediante la detección de la escisión de un sustrato de caspasas *in vivo* tal como PARP (poli-ADP-ribosa-polimerasa). Pueden detectarse fragmentos escindidos de PARP con un anticuerpo adecuado tal como un anticuerpo anti-PARP. Ensayos de proteasas y ensayos de fragmentación del ADN son especialmente adecuados para someter a ensayo la apoptosis en poblaciones celulares.

También están disponibles métodos para estudiar la apoptosis en células individuales, tales como ensayos de marcaje enzimático ISNT y TUNEL. Tal como se indicó anteriormente, la degradación extensa del ADN es un acontecimiento característico que se produce a menudo en los estadios tempranos de la apoptosis. La escisión del ADN produce fragmentos de ADN bicatenarios, de bajo peso molecular (mono y oligonucleosomas) así como roturas monocatenarias ("mellas") en ADN de alto peso molecular. En TUNEL, se detectan tales roturas de la hebra de ADN mediante marcaje enzimático de los extremos terminales 3'-OH libres con nucleótidos modificados adecuados (tales como X-dUTP, X = biotina, DIG o fluoresceína). Las enzimas de marcaje adecuadas incluyen ADN polimerasa (traslado de mellas) en ISNT ("traslado de mellas *in situ*") y desoxinucleotidil transferasa terminal (marcaje de extremos) en TUNEL ("marcaje de extremos cortados por X-dUTP mediado por TdT"; Huang, P. y Plunkett, W., 1992, *Anal. Biochem.* 207, 163; Bortner, C. D. *et al.*, 1995, *Trends Cell Biol.* 5, 21).

La apoptosis también puede someterse a ensayo midiendo alteraciones de la membrana, incluyendo: pérdida de residuos de ácido siálico terminales de las cadenas laterales de glicoproteínas de la superficie celular, exponiendo nuevos residuos de azúcar; surgimiento de glicoproteínas de superficie que pueden servir como receptores para moléculas adhesivas secretadas por macrófagos tales como trombospondina; y pérdida de asimetría en fosfolípidos de la membrana celular, alterando tanto la hidrofobicidad como la carga de la superficie de la membrana. En particular, la anexina V anticoagulante humana es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca<sup>2+</sup>, de 35-36 kilodalton que tiene una alta afinidad por fosfatidilserina (PS). En células viables normales, PS está ubicada en la superficie citoplasmática de la membrana celular. Sin embargo, en células apoptóticas, PS se transloca desde la cara interna hasta la externa de la membrana

plasmática, exponiéndose por tanto PS al entorno celular externo. Por tanto, puede usarse anexina V para detectar fosfatidilserina expuesta de manera asimétrica en la superficie de células apoptóticas (Homburg, C. H. E. *et al.* 1995, *Blood* 85, 532; Verhoven, B. *et al.*, 1995, *J. Exp. Med.* 182, 1597). Además, pueden usarse tintes de ADN tales como DAPI, bromuro de etidio y yoduro de propidio, etc. para la tinción diferencial para distinguir células viables y no viables. También pueden usarse perfiles del contenido en ADN; por tanto, células apoptóticas permeabilizadas dejan escapar ADN de bajo peso molecular, y la detección de “picos sub-G 1”, o células “A 0” (células con tinción de ADN inferior que la de células de G 1) puede detectarse mediante, por ejemplo, citometría de flujo. También pueden detectarse cambios morfológicos característicos de apoptosis de esta manera.

También puede usarse para someter a ensayo la apoptosis la detección de proteínas relacionadas con apoptosis tales como ced-3, ced-4, ced-9 (Ellis, H. M. y Horvitz, H. R, 1986, *Cell* 44, 817-829; Yuan, J. Y. y Horvitz, H. R., 1990, *Dev. Biol.* 138, 33-41; Hentgartner, M. O., Ellis, R E. y Horvitz, H. R, 1992, *Nature* 356, 494-499.), Fas (CD95/Apo-1; Enari *et al.*, 1996, *Nature* 380, 723-726), Bcl-2 (Baffy, G. *et al.*, 1993, *J. Biol. Chem.* 268, 6511-6519; Miyashita, T. y Reed, J. C., 1993, *Blood* 81, 151-157; Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. y Korsmeyer, S. J., 1993, *Cell* 74, 609-619), p53 (Yonish-Rouach, E. *et al.*, 1991, *Nature* 352, 345-347), etc. mediante el uso de anticuerpos.

#### Otras indicaciones

Los hallazgos mostrados en los ejemplos apoyan un papel terapéutico de rSP-D (N/CRD) en enfermedades en las que la regulación o el aclaramiento defectuoso de macrófagos alveolares apoptóticos y necróticos contribuye a la inflamación pulmonar crónica. Los ejemplos de tales indicaciones se comentaron anteriormente, en particular, el entorno de deficiencia de SP-D relativa tal como enfermedad pulmonar crónica del recién nacido prematuro y en fumadores (que tienen niveles de SP-D disminuidos) que corren el riesgo de desarrollar enfisema debido a inflamación pulmonar crónica.

Los datos presentados en los ejemplos muestran que SP-D está implicada en la regulación y el aclaramiento de células apoptóticas, y que puede usarse polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo para potenciar el aclaramiento de células apoptóticas tales como macrófagos alveolares apoptóticos. Por consiguiente, puede usarse polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo para tratar aterosclerosis, anomalías del desarrollo, por ejemplo, desarrollo pulmonar posnatal anómalo en enfermedad pulmonar neonatal tras parto prematuro, una enfermedad asociada a remodelación defectuosa de tejidos inflamados, proliferación celular y cáncer.

#### Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial basada en la acción de diversos factores de riesgo que se hacen efectivos con antecedentes genéticos apropiados. La aterosclerosis se caracteriza por la formación de células espumosas (es decir, macrófagos y células de músculo liso que han captado lipoproteínas de

baja densidad modificadas químicamente, por ejemplo, oxidadas (oxLDL). Se ha demostrado el fenotipo pulmonar de ratones deficientes en SP-D, tal como se muestra en los ejemplos, en particular que los macrófagos son altamente anómalos y espumosos y hay alteraciones del recambio de fosfolípidos en el pulmón. Se sabe que SP-D está presente en cantidades apreciables en el suero, especialmente en determinados estados patológicos.

Por tanto, se proporciona que la alteración del recambio de lípidos en el suero confiere un aumento del riesgo de aterosclerosis. Por consiguiente, puede usarse rSP-D (N/CRD) para tratar la aterosclerosis.

Se han medido los niveles de colesterol en el suero de ratones deficientes y de tipo natural y muestran que los niveles de colesterol son superiores en ratones deficientes (véase la figura 17). Se sabe que altos niveles de colesterol confieren un aumento del riesgo de aterosclerosis. Por tanto, se da a conocer que la complementación con SP-D recombinante, por ejemplo, rSP-D (N/CRD) por vía intravenosa, corrige esta anomalía.

Además, se ha mostrado recientemente que la apoptosis desempeña un papel principal en la modulación de la generación de lesiones ateroscleróticas en células vasculares (Martinet W, Kockx MM. Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. *Curr Opin Lipidol*. Octubre de 2001; 12(5):535-41; Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res*. Febrero de 2000; 45(3):736-46). La apoptosis de macrófagos podría ser beneficiosa para la estabilidad de las placas siempre que se eliminen los cuerpos apoptóticos. Sin embargo, las células apoptóticas que no se eliminan en la placa activan la trombina, lo que podría inducir adicionalmente trombosis dentro de las placas. Puede concluirse que la apoptosis en aterosclerosis primaria es perjudicial puesto que podría conducir a rotura de placas y trombosis. Se muestra en los ejemplos que el tratamiento con SP-D recombinante reduce los números de macrófagos apoptóticos en los pulmones de ratones deficientes en SP-D.

Por tanto, una posible aplicación de SP-D recombinante administrada por vía intravenosa es la reducción de células apoptóticas perjudiciales (por ejemplo macrófagos) en la vasculatura, que puede reducir el riesgo de desarrollo de aterosclerosis. Por tanto, puede usarse rSPD (N/CRD) para tratar o prevenir uno cualquiera o más de los síntomas de aterosclerosis.

### Composiciones farmacéuticas

Se observa que pueden producirse polipéptidos de rSPD(n/CRD) en grandes cantidades a bajo coste en una forma bioactiva, permitiendo por primera vez el desarrollo de formulaciones de tensioactivo que contienen rSP-D (N/CRD) o de la administración conjunta de rSP-D (N/CRD) por separado mediante aerosolización, nebulización, administración intranasal o intratraqueal. La preparación es estable y mantiene su bioactividad tras el secado por congelación y la resuspensión, facilitando su almacenamiento. A diferencia de la terapia actual con corticosteroides que tienen efectos secundarios sistémicos no deseados, rSP-D (N/CRD) parece no tener efectos adversos en ratones y no es probable que genere efectos secundarios en seres humanos.

Aunque es posible que la composición que comprende el polipéptido o ácido nucleico de rSPD(n/CRD) se administre sola, es preferible formular el principio activo como una formulación farmacéutica. Por tanto, se dan a conocer composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptido o ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un  
5 fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo. Tales composiciones farmacéuticas son útiles para la administración de polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo a un individuo para el tratamiento o alivio de síntomas tal como se describe.

La composición puede incluir el polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD),  
10 fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo, un compuesto estructuralmente relacionado o una sal ácida del mismo. Las formulaciones farmacéuticas comprenden una cantidad eficaz de polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo, junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Una “cantidad eficaz” de un polipéptido,  
15 ácido nucleico de rSPD(n/CRD), homólogo, variante o derivado del mismo es la cantidad suficiente para aliviar al menos un síntoma de una enfermedad tal como se describe, por ejemplo, una enfermedad inflamatoria, preferiblemente eccema, una enfermedad pulmonar inflamatoria, enfermedad pulmonar crónica neonatal, síndrome de dificultad respiratoria neonatal (SDR), síndrome de dificultad respiratoria del adulto, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias (EPOC),  
20 asma, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, enfisema, enfermedad pulmonar inflamatoria intersticial, sarcoidosis, neumonía, enfermedad pulmonar inflamatoria crónica, enfermedad pulmonar inflamatoria crónica neonatal, una alergia, alergia a ácaros del polvo doméstico (*Dermatophagoides* spp), preferiblemente *Dermatophagoides pteronyssinus* o *Dermatophagoides farinae*, o a hongos o esporas fúngicas, preferiblemente *Aspergillus fumigatus*, una alergia respiratoria estacional, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis no alérgica, rinitis vasomotora, rinitis irritante,  
25 una alergia contra pólenes de hierbas, pólenes de árboles o caspa de animales, una alergia asociada a asma alérgica, una alergia alimentaria, infección microbiana, incluyendo infección bacteriana e infección viral, preferiblemente una infección microbiana del pulmón.

La cantidad eficaz variará dependiendo del síndrome o enfermedad particular que va a tratarse o aliviarse, así como otros factores incluyendo la edad y el peso del paciente, cómo de avanzado esté el estado patológico, la salud general del paciente,  
35 la gravedad de los síntomas y si el polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo está administrándose solo o en combinación con otras terapias.

Se conocen bien en la técnica portadores farmacéuticamente aceptables y varían con la forma y el modo deseados de administración de la formulación farmacéutica. Por ejemplo, pueden incluir diluyentes o excipientes tales como cargas, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes, agentes tensioactivos, lubricantes y similares. Normalmente, el portador es un sólido, un líquido o un portador vaporizable, o una combinación de los mismos. Cada portador debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros componentes en la formulación y no perjudicial para el paciente. El portador debe ser biológicamente aceptable sin provocar una reacción adversa (por ejemplo respuesta inmunitaria) cuando se administra al huésped.  
45

Las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento incluyen las adecuadas para administración tópica y oral, prefiriéndose formulaciones tópicas en las que el tejido afectado es principalmente la piel o epidermis (por ejemplo, psoriasis, eccema y otras enfermedades epidérmicas). Las formulaciones tópicas incluyen aquellas formas farmacéuticas en la que la composición se aplica externamente mediante contacto directo con la superficie de la piel que va a tratarse. Una forma farmacéutica convencional para aplicación tópica incluye una impregnación, una pomada, una crema, una loción, una pasta, un gel, una barra, un pulverizador, un aerosol, un baño de aceite, una disolución y similares. La terapia tópica se administra mediante diversos vehículos, la elección del vehículo puede ser importante y generalmente está relacionada con si va a tratarse una enfermedad aguda o crónica. Como ejemplo, una enfermedad de proliferación de la piel aguda se trata generalmente con preparaciones secantes acuosas, mientras que una enfermedad de proliferación de la piel crónica se trata con preparaciones hidratantes. Las impregnaciones son el método más fácil de secar erupciones húmedas agudas. Las lociones (polvo en suspensión acuosa) y disoluciones (medicamentos disueltos en un disolvente) son ideales para zonas vello-sas e intertriginosas. Las pomadas son emulsiones de agua en aceite, son las más eficaces para agentes hidratantes, apropiadas para erupciones escamosas secas, pero son grasientas y dependiendo del sitio de la lesión algunas veces no se desean. Según sea apropiado, pueden aplicarse en combinación con un vendaje, particularmente cuando se desea aumentar la penetración de la composición de agente al interior de la lesión. Las cremas o emulsiones de aceite en agua y los geles son absorbibles y son los más cosméticamente aceptables para el paciente. (Guzzo *et al*, en Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, 9<sup>a</sup> ed., págs. 1593-15950 (1996)). Las formulaciones de crema incluyen generalmente componentes tales como vaselina, lanolina, polietilenglicoles, aceite mineral, glicerina, palmitato de isopropilo, estearato de glicerilo, alcohol cetearílico, acetato de tocoferilo, miristato de isopropilo, alcohol de lanolina, simeticona, carbomen, metilcloriotiazolinona, metilisotiazolinona, ciclometicona e hidroxipropilmetilcelulosa, así como mezclas de los mismos.

Otras formulaciones para aplicación tópica incluyen champús, jabones, lociones para agitar, y similares, particularmente las formuladas para dejar un residuo sobre la piel subyacente, tal como el cuero cabelludo (Arndt *et al*, en Dermatology In General Medicine 2:2838 (1993)).

En general, la concentración de la composición de polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo en la formulación tópica está en una cantidad de aproximadamente el 0,5 al 50% en peso de la composición, preferiblemente de aproximadamente el 1 al 30%, más preferiblemente de aproximadamente el 2-20%, y lo más preferiblemente de aproximadamente el 5-10%. La concentración usada puede ser la parte superior del intervalo inicialmente, a medida que el tratamiento continúa, la concentración puede disminuirse o la aplicación de la formulación puede ser menos frecuente. Las aplicaciones tópicas se aplican a menudo dos veces al día. Sin embargo; puede ser eficaz la aplicación una vez al día de una dosis mayor o aplicaciones más frecuentes de una dosis más pequeña. El estrato córneo puede actuar como reservorio y permitir una penetración gradual de un fármaco en las capas de la piel viable a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

En una aplicación tópica, debe penetrar una cantidad suficiente de principio activo en la piel de un paciente con el fin de obtener un efecto farmacológico deseado. Se entiende generalmente que la absorción del fármaco en la piel es una función de la naturaleza del fármaco, el comportamiento del vehículo y la piel. Tres variables principales explican las diferencias en la tasa de absorción o flujo de diferentes fármacos tópicos o el mismo fármaco en diferentes vehículos; la concentración de fármaco en el vehículo, el coeficiente de reparto del fármaco entre el estrato córneo y el vehículo y el coeficiente de difusión del fármaco en el estrato córneo. Para que el tratamiento sea eficaz, un fármaco debe cruzar el estrato córneo que es responsable de la función de barrera de la piel. En general, una formulación tópica que ejerce una alta penetración en la piel *in vitro* es eficaz *in vivo*. Ostrenga *et al* (J. Pharm. Sci., 60:1175-1179 (1971)) demostraron que la eficacia *in vivo* de esteroides aplicados por vía tópica era proporcional a la tasa de penetración de esteroides en piel humana dermatomizada *in vitro*.

Puede incorporarse en la formulación un potenciador de la penetración en la piel que es dermatológicamente aceptable y compatible con el agente para aumentar la penetración del/de los compuesto(s) activo(s) desde la superficie de la piel a los queratinocitos epidérmicos. Un potenciador de la piel que aumenta la absorción del/de los compuesto(s) activo(s) en la piel reduce la cantidad de agente necesaria para un tratamiento eficaz y proporciona un efecto de más larga duración de la formulación. Se conocen bien en la técnica potenciadores de la penetración en la piel. Por ejemplo, dimetilsulfóxido (patente estadounidense n.º 3.711.602); ácido oleico, tensioactivo de 1,2-butanodiol (Cooper, J. Pharm. Sci., 73:1153-1156 (1984)); una combinación de etanol y ácido oleico o alcohol oleílico (documento EP 267,617), 2-etil-1,3-hexanodiol (documento WO 87/03490); decilmetilsulfóxido y Azone.RTM. (Hadgraft, Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet, 21:165-173 (1996)); alcoholes, sulfóxidos, ácidos grasos, ésteres, Azone.RTM., pirrolidonas, urea y polioles (Kalbitz *et al*, Pharmazie, 51:619-637 (1996)).

Se sabe que terpenos tales como 1,8-cineol, mentona, limoneno y nerolidol (Yamane, J. Pharmacy & Pharmacology, 47: 978-989 (1995)); Azone.RTM. y Transcutol (Harrison *et al*, Pharmaceutical Res. 13:542-546 (1996)); y ácido oleico, polietilenglicol y propilenglicol (Singh *et al*, Pharmazie, 51:741-744 (1996)) mejoran la penetración en la piel de un principio activo.

Los niveles de penetración de un agente o composición pueden determinarse mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el radiomarcaje del compuesto activo seguido por la medición de la cantidad de compuesto radiomarcado absorbida por la piel permite a un experto en la técnica determinar los niveles de la composición absorbidos usando cualquiera de varios métodos de determinación de la penetración en la piel del compuesto de prueba. Las publicaciones que se refieren a estudios de penetración en la piel incluyen Reifenrath, W G y G S Hawkins. The Weaning Yorkshire Pig as an Animal Model for Measuring Percutaneous Penetration. En: Swine in Biomedical Research (M. E. Tumbleson, Ed.) Plenum, Nueva York, 1986, y Hawkins, G. S. Methodology for the Execution of In Vitro Skin Penetration Determinations. En: Methods for Skin Absorption, B W Kemppainen y W G Reifenrath, Eds., CRC Press, Boca Raton, 1990, págs. 67-80; y W. G. Reifenrath, Cosmetics & Toiletries, 110:3-9 (1995).

Para algunas aplicaciones, es preferible administrar una forma de agente o composición de acción prolongada usando formulaciones conocidas en la técnica, ta-

les como polímeros. El agente puede incorporarse en un parche dérmico (Junginger, H. E., en *Acta Pharmaceutica Nordica* 4:117 (1992); Thacharodi *et al*, en *Biomaterials* 16:145-148 (1995); Niedner R, en *Hautarzt* 39: 761-766 (1988)) o un vendaje según métodos conocidos en la técnica, para aumentar la eficacia de administración del fármaco a las zonas que van a tratarse.

Opcionalmente, las formulaciones tópicas dadas a conocer en el presente documento pueden tener excipientes adicionales por ejemplo; conservantes tales como metilparabeno, alcohol bencílico, ácido sórbico o compuesto de amonio cuaternario; estabilizadores tales como EDTA, antioxidantes tales como hidroxitolueno butilado o hidroxianisol butilado y tampones tales como citrato y fosfato.

La composición farmacéutica puede administrarse en una formulación oral en forma de comprimidos, cápsulas o disoluciones. Se administra una cantidad eficaz de la formulación oral a pacientes de 1 a 3 veces al día hasta que los síntomas de la enfermedad se alivian. La cantidad eficaz de agente depende de la edad, el peso y el estado de un paciente. En general, la dosis oral diaria de agente es inferior a 1200 mg, y superior a 100 mg. La dosis oral diaria preferida es de aproximadamente 300-600 mg. Se presentan convenientemente formulaciones orales en una forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica de farmacia. La composición puede formularse junto con un portador farmacéuticamente aceptable para dar cualquier forma farmacéutica deseada. Las formas farmacéuticas unitarias típicas incluyen comprimidos, píldoras, polvos, disoluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos, cápsulas, supositorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima la composición de agente con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y cuando sea necesario, conformando el producto. El principio activo puede incorporarse en una variedad de materiales básicos en forma de un líquido, polvo, comprimidos o cápsulas para proporcionar una cantidad eficaz de principio activo para tratar la enfermedad.

Otros agentes terapéuticos adecuados para su uso en el presente documento son cualquier fármaco compatible que sea eficaz para el fin previsto, o fármacos que son complementarios a la formulación de agente. La formulación utilizada en una terapia de combinación puede administrarse simultáneamente, o secuencialmente con otro tratamiento, de manera que se logra un efecto combinado.

#### Composiciones de terapia con tensioactivo

El desarrollo de terapias con tensioactivo que contienen rSP-D (N/CRD) puede aplicarse al tratamiento de síndrome de dificultad respiratoria neonatal, en lugar de formulaciones actuales o conjuntamente con formulaciones actuales.

La terapia con tensioactivo actual para el síndrome de dificultad respiratoria del recién nacido incluye las siguientes:

#### Beractant (Survanta)

Beractant (Survanta) es un extracto de pulmón bovino semisintético que contiene fosfolípidos, ácidos grasos y proteínas B (7 mcg/ml) y C (203 mcg/ml) asociadas a tensioactivo. Beractant se administra a una dosis pediátrica de 100 mg (es decir,

4 ml)/kg dividida en 4 alícuotas administradas con una separación de al menos 6 h (intratraqueal).

Calfactant (Infasurf)

- 5 Calfactant (Infasurf) es un extracto de pulmón de ternero natural que contiene fosfolípidos, ácidos grasos y proteínas B asociadas a tensioactivo. Se fabrica por Ross, y se administra a (260 mcg/ml) y C (390 mcg/ml).

SURVANTA® (beractant) suspensión intratraqueal

- 10 SURVANTA® (beractant) es un tensioactivo pulmonar no pirogénico, estéril destinado a uso intratraqueal. Es un extracto de pulmón bovino natural que contiene fosfolípidos, lípidos neutros, ácidos grasos y proteínas asociadas a tensioactivo al que se añaden palmitato de colfoscerilo (dipalmitoilfosfatidilcolina), ácido palmítico y tripalmitina para normalizar la composición e imitar las propiedades de reducción de la tensión superficial de tensioactivo de pulmón natural. La composición  
15 resultante proporciona fosfolípidos 25 mg/ml (incluyendo fosfatidilcolina disaturada 11,0-15,5 mg/ml), triglicéridos 0,5-1,75 mg/ml, ácidos grasos libres 1,4-3,5 mg/ml y menos de 1,0 mg/ml de proteína. Se suspende en disolución de cloruro de sodio al 0,9%, y se esteriliza por calor. SURVANTA no contiene conservantes. Su contenido en proteína consiste en dos proteínas asociadas a tensioactivo hidrófobas,  
20 de bajo peso molecular conocidas comúnmente como SP-B y SP-C. No contiene la proteína asociada a tensioactivo hidrófila, de gran peso molecular conocida como SP-A.

INFRASURF suspensión intratraqueal (Forest)

- 25 Infasurf® (calfactant) suspensión intratraqueal es un tensioactivo de pulmón no pirogénico, estéril destinado a instilación intratraqueal sólo. Es un extracto de tensioactivo natural de pulmones de ternero que incluye fosfolípidos, lípidos neutros y proteínas B y C asociadas a tensioactivo (SP-B y SP-C). No contiene conservantes.  
30

- Infasurf es una suspensión de color blanquecino de calfactant en disolución de cloruro de sodio acuosa al 0,9%. Tiene un pH de 5,0 - 6,0. Cada mililitro de Infasurf contiene 35 mg de fosfolípidos totales (incluyendo 26 mg de fosfatidilcolina de los que 16 mg son fosfatidilcolina disaturada) y 0,65 mg de proteínas incluyendo  
35 0,26 mg de SP-B.

EXOSURF Neonatal para suspensión intratraqueal (Glaxo Wellcome)

- EXOSURF NEONATAL (palmitato de colfoscerilo, alcohol cetílico, tiloxapol) para suspensión intratraqueal es un tensioactivo de pulmón sintético libre de proteínas  
40 almacenado a vacío como un polvo liofilizado estéril. EXOSURF NEONATAL se reconstituye con agua estéril para inyección libre de conservantes antes de su administración mediante instilación intratraqueal. Cada vial de 10 ml contiene 108 mg de palmitato de colfoscerilo, comúnmente conocido como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), 12 mg de alcohol cetílico, 8 mg de tiloxapol y 47 mg de cloruro de sodio. Pueden haberse añadido hidróxido de sodio o ácido clorhídrico para  
45

ajustar el pH. Cuando se reconstituye con 8 ml de agua estéril para inyección, la suspensión de EXOSURF NEONATAL contiene palmitato de colfoscerilo 13,5 mg/ml, alcohol cetílico 1,5 mg/ml y tiloxapol 1 mg/ml en NaCl 0,1 N. La suspensión aparece de color blanco lechoso con un pH de 5 a 7 y una osmolalidad de 185 mOsm/kg.

Los nombres químicos de los compuestos de EXOSURF NEONATAL son los siguientes: palmitato de colfoscerilo: sal interna de hidróxido de (R)-4-hidroxi-N,N,N-trimetil-10-oxo-7[(1-oxohexadecil)oxi]-3,5,9-trioxa-4-fosfapentacosan-1-aminio, 4-óxido; alcohol cetílico: (1-hexadecanol); y tiloxapol: polímero de 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol con formaldehído y oxirano.

En EXOSURF NEONATAL, que está libre de proteínas, el alcohol cetílico actúa como agente de extensión para el DPPC en la superficie de contacto aire-líquido. Tiloxapol, un alcohol de repetición de cadena larga polimérico, es un tensioactivo no iónico que actúa dispersando tanto DPPC como alcohol cetílico. Se añade cloruro de sodio para ajustar la osmolalidad.

### CUROSURF®

Nombre comercial: Curosurf. Principio activo: poractant alfa. Concentración/concentraciones: 120 mg de fosfolípido/1,5 ml o 240 mg de fosfolípido/viales de 3 ml. Forma(s) farmacéutica(s): Suspensión intratecal. Nombre de la compañía: Dey, LP. Disponibilidad: Sólo con receta, para uso profesional sólo. \*Fecha de aprobación por la FDA: 18 de noviembre de 1999.

Por consiguiente, se da a conocer el uso de composiciones que incluyen cualquiera de los componentes de las terapias dados a conocer anteriormente, preferiblemente un principio activo, conjuntamente con polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo, como terapia con tensioactivo. Por tanto, se da a conocer una composición que comprende un extracto de pulmón junto con un polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo. El extracto de pulmón puede comprender un extracto de pulmón bovino, preferiblemente, de ternero junto con fosfolípidos (tales como fosfatidilcolina y fosfatidilcolina disaturada) y/o ácidos grasos. La composición puede incluir además una proteína asociada a tensioactivo, por ejemplo una proteína B asociada a tensioactivo o una proteína C asociada a tensioactivo. También pueden añadirse otros componentes tales como alcohol cetílico, alcoholes de repetición de cadena larga, tiloxapol, palmitato de colfoscerilo (dipalmitoilfosfatidilcolina), ácido palmítico y tripalmitina, poractant alfa y cloruro de sodio.

En particular, se dan a conocer composiciones correspondientes a cada uno de Beractant (Survanta); Calfactant (Infasurf); SURVANTA® (beractant); INFRA-SURF; EXOSURF Neonatal; y CUROSURF; en las que cada composición comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, ácido nucleico de rSPD(n/CRD) o un fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo.

### Aspectos adicionales

Los aspectos adicionales incluyen los siguientes:

Un método de potenciación de los niveles de MCP-1 o los niveles de MIP1 $\alpha$ , o ambos, en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo.

5 Un método de potenciación de los niveles de citocinas, preferiblemente los niveles de IFN $\gamma$ , en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo.

10 También se da a conocer un método de regulación por incremento de un componente del sistema inmunitario mediado por células, o de regulación por incremento de la actividad de células citotóxicas naturales, o ambos, en un individuo mediante la administración de un polipéptido de rSPD(n/CRD), fragmento, homólogo, variante o derivado del mismo.

### Ejemplos

15 Ejemplo 1. Materiales y Métodos

#### Fragmento de proteína tensioactiva D recombinante (rSP-D (N/CRD))

20 El fragmento de proteína tensioactiva D recombinante (rSP-D (N/CRD)) usado en estos experimentos es una forma truncada de SP-D humana. Se expresa el fragmento en *E. coli* a partir de un plásmido que contiene ADNc para el fragmento de SP-D humana (el constructo) insertado en un vector pET y transformado en *E. coli* para su expresión usando procedimientos de fermentación convencionales.

25 El constructo está compuesto por un tramo corto de 8 tripletes Gly-XaaYaa N-terminales (mostrado en cursiva) con una sustitución de prolina por serina en la posición 2 seguido por la región de cuello de 28 residuos (mostrada en negrita) y el dominio de reconocimiento de hidratos de carbono (CRD) de 125 residuos de SP-D humana.

*GSPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGQVQHLOAAFSQYKKV*  
**ELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSA AENAALQQLVVA**  
**KNEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGSEDCVEIFTNGKW**  
**NDRACGEKRLVVCEF**

30 Se muestra en la figura 1A un diagrama esquemático que muestra la estructura de rSP-D (N/CRD). (A): Dodecámero de proteína tensioactiva D; (B): Trímero de SP-D; (C): Diagrama de cintas de la estructura global de la región de cabeza-cuello de SP-D.

35 Una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de rSPD(n/CRD) tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2.

### Generación de constructo de expresión de rSP-D (N/CRD) en vector pET pET21d

5 Se cortó una secuencia que codifica para la SP-D humana (cuello/CRD) y que incluía un tramo corto que codifica para 8 tripletes Gly-XaaYaa N-terminales de un clon de SP-D humana previamente generado pBCSK1 (Kishore, U., *et al.*, The alpha-helical neck region of human lung surfactant protein D is essential for the binding of the carbohydrate recognition domains to lipopolysaccharides and phospholipids. *Biochem J*, 1996. 318(Pt 2): págs. 505-11) mediante digestión con Xba 1 y Hind-3. Se purifica entonces el fragmento resultante mediante electroforesis en agarosa y se liga en un vector pET-21d (Novagen) que se digiere con Nhe1 y Hind 3. El vector pET-21d está disponible de Novagen con el número de catálogo 69743-3. Su secuencia se conoce en la técnica, y se describe en, por ejemplo, bibliografía de Novagen (por ejemplo, tal como se encuentra en <http://www.novagen.com/>).

### Preparación de rSP-D (N/CRD)

20 Se usó entonces el nuevo constructo así generado para transformar células competentes (DH5 $\alpha$ ). Se purifica ADN de plásmido que comprende este constructo rSP-D(cuello/CRD) tras crecimiento de células a partir de una colonia transformada mediante métodos convencionales.

25 Se transforma el plásmido que contiene ADNc para rSPD(n/CRD) (cuello/CRD) en un vector pET en BL21( $\lambda$ DE3) pLysS y se selecciona una única colonia y se diluye en 1 ml de LB complementado con ampicilina 100  $\mu$ g/ml y cloranfenicol 25  $\mu$ g/ml (LB+). Esto se diluye adicionalmente 1000 veces y se extienden 100  $\mu$ l sobre una placa de agar y se incuban durante la noche. Se recoge el cultivo resultante de colonias mediante raspado con una espátula con cuchilla plana y se resuspenden en 50 ml de LB+. Se usa una alícuota de 5 ml de esto para inocular frascos de 2 l que contienen 500 ml de LB+. Se encuentra que este procedimiento es superior a la práctica más común de hacer crecer un cultivo durante la noche en medio de crecimiento. El crecimiento de colonias en una fase estacionaria reduce el contacto entre células y reduce la proporción de mutantes en el inóculo que no portan el plásmido de expresión.

35 También se encuentra que es importante no superar 500 ml de LB/2 l de frasco con el fin de lograr niveles de expresión óptimos.

Se hacen crecer los cultivos a  $A_{600}$  de 0,6-0,8 seguido por inducción con IPTG 0,4 mM durante 2-3 h.

### Purificación del fragmento de proteína tensioactiva D recombinante rSP-D (N/CRD)

40 Se recogen células mediante centrifugación y se lisan en Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 0,1% v/v, PMSF 0,1 mM, pH 7,5 y se sonicán durante 3 minutos. Se expresa el rSPD(n/CRD) en cuerpos de inclusión insolubles y se recoge mediante centrifugación a 10000 x g. Se repite esta etapa tres veces  
45 y se solubilizó el sedimento de cuerpos de inclusión purificados, que contenían el

rSPD(n/CRD), en 100 ml de urea 8 M, 2-mercaptoetanol 100 mM, pH 7,5 y se clarificó mediante centrifugación a alta velocidad.

5 Se diluye la disolución de urea en 1 l de TrisHCl 20 mM, pH 7,5 y se añaden 50 ml de resina de intercambio aniónico Q-Sepherose (Pharmacia) y se mezcla a 20°C durante 30 min. Se adsorbió la resina en una columna FPLC, se lavó extensamente con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, y se eluye el rSPD(n/CRD) con Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5.

10 Se precipita la proteína de las fracciones pico mediante una dilución 10:1 en acetona a 4°C durante 30 min. Se recoge el precipitado mediante centrifugación a alta velocidad y se disuelve en 100 ml de urea 8 M y se dializa frente a 10 l de Tris-HCl 20 mM, NaCl 130 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7,4, durante la noche a 4°C.

15 Se mezcla entonces el dializado con 20 ml de maltosa-agarosa durante varias horas hasta durante la noche en Tris-HCl 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,4. Esta etapa de incubación larga facilita probablemente las fases finales de replegamiento para dar la proteína activa.

20 Se empaqueta la maltosa-agarosa en una columna FPLC y se lava con el mismo tampón que contiene NaCl 1 M para eliminar proteínas no específicas. El lavado con alta concentración de sal eluye aproximadamente el 25-50% del material absorbente a DO<sub>280</sub> total unido a la columna. SDS-PAGE muestra trazas de rSPD(n/CRD) (aproximadamente el 10%), que es presumiblemente rSPD(n/CRD) de baja afinidad que no puede plegarse completamente para dar la estructura tridimensional correcta. Puesto que estas preparaciones de rSPD(n/CRD) van a usarse en estudios estructurales y en experimentos en ratones, se considera aconsejable no incluir esta fracción. Además, el material absorbente a DO<sub>280</sub> total en la alta concentración de sal es bastante más de lo que podría atribuirse a este rSPD(n/CRD) y se debe probablemente a ADN bacteriano y otras sustancias que se consideran no deseables en una preparación para administrar a animales.

30 Se eluyó entonces el rSPD(n/CRD) unido con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, azida de sodio al 0,02% (p/v) pH 7,4, que contenía EDTA 5 mM para eliminar el Ca requerido para la unión mediada por CRD de rSPD(n/CRD).

35 Se concentran las fracciones pico usando una célula con agitación Amicon con una membrana de MWCO 10000 hasta 5 ml y se cargan sobre una columna de filtración en gel Superose 12 de 100 ml (Pharmacia) en un tampón de ejecución de Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, azida de sodio al 0,02% (p/v) pH 7,4. El rSPD(n/CRD) eluyó como un único pico correspondiente a un peso molecular de 60 kDa.

40 Esta etapa permite la disociación final de cualquier impureza que podría haberse purificado conjuntamente hasta esta fase y en presencia de EDTA cualquier hidrato de carbono se disociará del rSPD(n/CRD) y se esperaría que se eluyese en el volumen de inclusión total de la columna (100 ml) puesto que deben tener un peso molecular inferior.

45 Esta etapa también permite una evaluación de la homogeneidad de la preparación de proteína mediante la asimetría del pico de proteína y la ausencia de hombros. Se desechan las fracciones fuera del pico principal. Se recogen las fracciones agrupadas y se concentran hasta 2 mg/ml antes de proceder a la siguiente etapa.

La recuperación de rSPD(n/CRD) tras la filtración en gel es normalmente del 80% del material absorbente a  $DO_{280}$  total cargado. Esto indica que al menos el 20% de éste no se debe a rSPD (n/CRD) y refuerza la necesidad de incluir la filtración en gel como etapa final.

- 5 Se reducen los niveles de endotoxina haciendo pasar el rSPD(n/CRD) purificado en Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, azida de sodio al 0,02% (p/v) pH 7,4 a través de una columna de polimixina B de 10 ml (Detoxi-Gel, Pierce).

#### Modificación de rSP-D mediante marcaje con FITC

- 10 Para evaluar la unión *in vitro* a macrófagos aislados mediante BAL de ratones, se marca rSP-D con la sonda reactiva con amina FITC (Sigma) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se incuban 50  $\mu$ g de FITC con 1 mg de rSP-D en 200 ml de tampón bicarbonato de sodio 0,1 M pH 9,0 a temperatura ambiente durante 2 horas.
- 15 Se separa entonces la proteína marcada de FITC libre usando una columna G-25. Se incuba FITC-rSP-D (20  $\mu$ g/ml) con macrófagos alveolares recién aislados de ratones deficientes en SP-D y de tipo natural en tampón de unión (Hepes 10 mM, NaCl 140 mM,  $CaCl_2$  2,5 mM) y se evalúa para determinar el comarcaje con anexina V marcada con PE o yoduro de propidio tal como se explica resumidamente a continuación mediante citometría de flujo en un sistema de FACS Consort 32.

#### Preparación de antígeno de *Aspergillus fumigatus* (Afu 1wcf)

- 25 Se hace crecer *Aspergillus fumigatus* (Afu) en un medio sintético (M199, Sigma Chemicals) como un cultivo estacionario durante 1 semana a 37°C. Arruda, *et al.*, (Arruda, L. K., B. J. Mann, y M. D. Chapman. 1992. Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp f I, in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of Aspergillus-related enfermedades. J Immunol. 149:3354-9) demuestran que la expresión de Asp f1, un alérgeno principal, es máxima tras 1 semana y tiende a disminuir durante periodos de incubación más largos.

- 35 Se destruye el cultivo de 1 semana añadiendo timerosal al 0,1% durante 12 horas. Se filtra el cultivo a través de lana de vidrio y finalmente a través de una membrana de 0,45  $\mu$ m para eliminar todos los materiales particulados y posibles esporas y entonces se dializa con 3 cambios de tampón frente a agua. Se liofiliza el dializado para dar un polvo marrón.

- Hay una banda principal a 18 kDa, que corresponde a Asp f 1. También es evidente una banda correspondiente a Asp f 2 (37 kDa). Se secuencian el extremo N-terminal de la banda de 18 kDa dando la secuencia ATWTCINQQLNP, correspondiente a la secuencia N-terminal para Asp f 1.

- 40 Se demuestra también mediante ELISA que el filtrado de cultivo de 1 semana (1wcf) se reconoce por suero humano de pacientes alérgicos a Afu obtenido del National Institute of Biological Standards and Control.

Cepas transgénicas

Se ha notificado previamente la generación de ratones deficientes en SP-D con direccionamiento génico (Botas, C., Poulain, F., Akiyama, J., Brown, C., Allen, L., Goerke, J., Clements, J., Carlson, E., Gillespie, A. M., Epstein, C. y Hawgood, S. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 11869-74.).

Se alimentan a voluntad ratones deficientes en SP-D retrocruzados 10 generaciones en un antecedente de C57B16 y se albergan en aisladores en un entorno libre de patógenos en la Biomedical Services Unit, Universidad de Oxford. Se obtienen ratones de tipo natural C57B16 libres de patógenos para experimentos de control de Harlan-OLAC, Shaw's farm, Bicester, Oxfordshire. Se aprueban todos los protocolos experimentales por la autoridad en materia de licencias de la U.K. Home Office y por el Comité de Ética de la Universidad de Oxford.

Administración de rSP-D, rSP-A y albúmina sérica bovina (BSA)

Se sometieron ratones deficientes en SP-D de 6 semanas de edad a múltiples administraciones intranasales de proteína o PBS solo a lo largo de un periodo de 3-6 semanas usando uno de tres protocolos.

Para cada administración de proteína, se anestesian ligeramente los ratones con isoflurano antes de aplicarse rSP-D o proteína control (30 µg, 25 µg o 10 µg de rSP-D, rSP-A o BSA en 50 µl de PBS) a las fosas nasales usando una micropipeta estéril. Se sujetan los ratones erguidos tras cada dosis hasta que se inhala todo el fluido. En el primer protocolo de tratamiento, doce ratones recibieron dosis de 30 µg de rSP-D cada tres días desde la edad de seis semanas. Se sacrifican seis ratones tras tres semanas para el ensayo del número de macrófagos alveolares y el contenido en fosfolípido alveolar. Los seis ratones restantes en el grupo de tratamiento completaron seis semanas de tratamiento antes del sacrificio y ensayo. En el segundo protocolo de tratamiento, se tratan los ratones desde la edad de 12 semanas con dosis de 10 µg de rSP-D, rSP-A, BSA cinco veces a la semana durante tres semanas antes del sacrificio y ensayo. Controles adicionales son ratones no tratados y ratones tratados con PBS. Para evaluar el efecto del tratamiento desde la edad de cuatro semanas, antes de que se produzca un aumento significativo en los números de macrófagos alveolares, se tratan seis ratones en un tercer protocolo durante dos semanas con dosis de 30 µg de rSP-D. Se sacrifican estos ratones a la edad de seis semanas para el ensayo de fosfolípidos y números de macrófagos alveolares, y se comparan con controles de edad coincidente no tratados.

Lavado broncoalveolar (BAL)

Para el aislamiento de macrófagos alveolares (por ejemplo para un ensayo de apoptosis), se sacrifican 4-6 ratones en cada grupo de tratamiento mediante asfixia con dióxido de carbono y se someten a lavado broncoalveolar (BAL) con RPMI estéril.

Se inserta una cánula estéril en la tráquea y se ata en su posición con hilo. Usando una jeringuilla de 2 ml, se lavan los pulmones con volúmenes de 1 ml de

tampón de lavado, cuatro veces para producir un volumen de lavado total de aproximadamente 3 ml. Se centrifuga entonces el líquido de BAL a 250 g durante 5 minutos a temperatura ambiente para sedimentar los macrófagos alveolares. Se lavan las células mediante resuspensión en 1 ml de PBS y se sedimentan de nuevo mediante centrifugación en una centrífuga de mesa a 1000 rpm durante 2 minutos. Se resuspenden entonces las células y se incuban con anexina V marcada con FITC y yoduro de propidio durante 10 minutos. Se analizan entonces las muestras para detectar la tinción mediante citometría de flujo de FACS.

#### Preparaciones de citocentrifugación de macrófagos alveolares

Se resuspenden macrófagos alveolares aislados mediante lavado broncoalveolar usando PBS con EDTA 0,25 mM y centrifugación a 250 g en 1 ml de PBS. Se toman alícuotas para el recuento de células totales mediante hemocitómetro tras la tinción con verde malaquita o cristal violeta y preparación de portaobjetos de citocentrifugación usando procedimientos convencionales. Los recuentos de células diferenciales en preparaciones de citocentrifugación tras la tinción con Diff-Quik (Scientific Products, McGaw Park, IL) confirman que el 98% de las células aisladas de este modo son macrófagos alveolares.

#### Marcaje *in vitro* de macrófagos alveolares de ratón

Se marcan *in vitro* macrófagos alveolares aislados de BAL de ratones deficientes y de tipo natural con colorantes de rastreo celular de color naranja y verde fluorescentes. Cell Tracker™ Orange que consiste en CMTMR (isómeros mezclados de 5-(y-6)-((4-clorometil)benzoil)amino)tetrametilrodamina y Cell Tracker™ Green (Molecular probes, Eugene, Oregón) que consiste en CMFDA (diacetato de 5-clorometilfluoresceína) contienen un grupo clorometilo ligeramente reactivo con tiol. Una vez dentro de la célula, el grupo clorometilo reacciona con tioles intracelulares, transformando la sonda en un aducto de éter de colorante fluorescente impermeable en la célula. El reactivo no conjugado en exceso se difunde de manera pasiva al medio extracelular. Cell Tracker Orange no necesita actividad esterasa para ser fluorescente, mientras que Cell Tracker Green es incoloro hasta que se escinde por esterasas intracelulares.

#### Mediciones de proteínas y fosfolípidos totales en líquido de lavado broncoalveolar

A los puntos de tiempo indicados en experimentos individuales, se sacrifican 4-6 ratones en cada grupo de tratamiento mediante asfixia con dióxido de carbono y se someten a lavado broncoalveolar (BAL) con PBS estéril que contiene EDTA 0,25 mM. Se lavan los pulmones con 1 ml cuatro veces para producir un volumen de lavado total de aproximadamente 3 ml. Se centrifuga el líquido de BAL a 250 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se determina la concentración de proteína total en el sobrenadante libre de células usando ácido bicinonínico como sustrato. Se extrae líquido de BAL libre de células en cloroformo-metanol y se deduce el fosfolípido total de la concentración de fósforo.

45

Niveles de rSP-D en líquido de BAL de ratón

Se analizan diluciones en serie de BALF libre de células de ratones tratados con rSP-D para determinar el contenido en rSP-D mediante metodología de ELISA de tipo "sándwich" usando anticuerpos policlonales monoespecíficos biotinilados y no biotinilados generados contra SP-D humana recombinante. Este anticuerpo no mostró reactividad cruzada con SP-A de ratón o SP-D de ratón. Se usan curvas patrón que usan SP-D humana recombinante para calcular las cantidades absolutas de rSP-D alveolar recuperadas a puntos de tiempo específicos tras la administración.

Citometría de flujo y detección de células apoptóticas y necróticas

Se aíslan células de BAL de ratones deficientes en SP-D con RPMI en PBS y se analizan en un sistema de FACS Consort 32 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) para caracterizar la población de macrófagos por tamaño y granularidad. Se desechan preparaciones de células con tinción de sangre obvia. Se detectan células apoptóticas y células necróticas mediante tinción con anexina V y yoduro de propidio (PI) usando un kit de tinción Annexin-V-FLUOS (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Las células apoptóticas y necróticas exponen fosfatidilserina (PS), que está presente normalmente en la cara interna de la membrana celular, en la cara externa, lo que permite que la anexina V se una a PS en la superficie de la célula (Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. y Reutelingsperger, C. (1995) J Immunol Methods 184, 39-51). Se tiñen alícuotas de células con anexina V marcada de manera fluorescente y se someten a contratinción con PI para detectar células necróticas primarias o secundarias. En experimentos de comarraje, también se evalúa la unión de rSP-D marcada con FITC a células que se tiñen con anexina V marcada con PE o PI (Pharmingen, San Diego, CA) tras compensación para el solapamiento de señales fluorescentes.

Análisis de datos

Se facilitan los resultados como medias  $\pm$  errores estándares de la media ( $x \pm EE$ ). Se realizan comparaciones entre grupos de animales a puntos de tiempo individuales con pruebas de la t bilaterales suponiendo una varianza desigual. Se acepta significación a  $P < 0,05$ .

Ejemplo 2. Modulación de la hipersensibilidad alérgica en un modelo murino de hipersensibilidad alérgica a *Aspergillus fumigatus*

La forma truncada de SP-D humana compuesta por trímeros del cuello y dominios CRD, expresada y purificada en *E. coli* y denominada rSPD(n/CRD), es activa funcionalmente como modulador de reacciones de hipersensibilidad alérgica en ratones. En este presente estudio, se han reproducido la modulación de la eosinofilia, la IgE e IgG1 séricas, en C57BL/6, demostrando por tanto que los efectos no son exclusivos para ratones BALB/c.

Los parámetros medidos en el presente estudio son IgE e IgG1 séricas y eosinofilia de sangre periférica que están todas significativamente elevadas en el modelo de ratón de alergia a alérgenos de *Aspergillus fumigatus* se reducen todas significativamente mediante tratamiento intranasal con rSPD(n/CRD).

- 5 Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se propone que rSPD(n/CRD) promueve un cambio de las poblaciones de linfocitos T de Th2 a Th1. Esto culmina en la reducción observada de IgE sérica y eosinofilia, que son componentes principales en la alergia.

#### Preparación de rSPD(n/CRD)

10

- Se clona el ADNc para el cuello/CRD, que incluye una región corta del tallo de colágeno (8 Gly-X-Y) y que representa los residuos 179-355 de la secuencia de proteína madura a partir de ADN de biblioteca de pulmón humano y se inserta en un vector pET-21d (Novagen, Nottingham). Se transforma el plásmido en BL21( $\lambda$ DE3) pLysS y se selecciona una única colonia y vuelve a sembrarse en placa para dar 100-400 colonias / placa. Se raspan éstas y se usan para inocular frascos de agitación que contienen 500 ml de medio LB complementado con ampicilina 100 mg/ml y cloranfenicol 25 mg/ml y se hacen crecer hasta una DO600 de 0,6-0,8 seguido por inducción con IPTG 0,4 mM durante 2-3 h. Se recogen las células mediante centrifugación y se lisan en Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 al 0,1% v/v, PMSF 0,1 mM, pH 7,5 y se sonicán durante 3 minutos. Se expresa el rSPD(n/CRD) en cuerpos de inclusión insolubles y se recoge mediante centrifugación y se lava 4 veces a 10000 x g. Se solubiliza el sedimento en 100 ml de urea 8 M, 2-mercaptoetanol 100 mM, pH 7,5 y se clarifica mediante centrifugación y se repliega mediante diálisis durante la noche frente a 10 l de Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM (TCB). Se separa rSPD(n/CRD) replegado de rSPD(n/CRD) desnaturalizado mediante absorción sobre maltosa-agarosa (Sigma-Aldrich, Poole, RU) y se eluye con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, que contiene EDTA 5 mM tras lavar en primer lugar la columna con TCB que contiene NaCl 1 M para eliminar impurezas. La purificación final es mediante columna de filtración en gel (Superose 12, Amersham Pharmacia, RU) en un tampón de ejecución de Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, azida de sodio al 0,02% (p/v) pH 7,4 (TSE). El rSPD(n/CRD) eluyó como un único pico correspondiente a un peso molecular de 60 kDa. Se reducen los niveles de endotoxina haciendo pasar el rSPD(n/CRD) purificado a través de una columna de polimixina B de 10 ml (Detoxi-Gel, Pierce & Warriner, RU) y sólo se usan preparaciones que contienen menos de 5 pg/mg de rSPD(n/CRD).

#### Antígeno de *Aspergillus fumigatus* (Afu 1wcf)

- 40 Se hace crecer *Aspergillus fumigatus* (Afu) en un medio sintético (M199, Sigma Chemicals) como un cultivo estacionario durante 1 semanas a 37°C. Arruda, *et al*, [Arruda LK, Mann BJ, Chapman MD. Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp f1, in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus*-related enfermedades. J Immunol 1992; 149:3354-9] demostraron que la expresión de Asp f1, un alérgeno principal, es máxima tras 1 semana y tiende a disminuir durante periodos de incubación más largos. Se destruye el cultivo de 1 semana añadiendo timerosal al 0,1% (p/v) durante 12 horas a 4°C. Se

filtra el cultivo a través de lana de vidrio y finalmente a través de una membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  para eliminar todos los materiales particulados y posibles esporas y entonces se dializa con 3 cambios de tampón frente a agua. Se liofiliza el dializado para dar un polvo marrón. La SDS PAGE (figura 1B) de 1wcf reveló una banda principal a 18 kDa, que corresponde a Asp f 1. También es evidente una banda correspondiente a Asp f 2 (37 kDa). Se secuencía el extremo N-terminal de la banda de 18 kDa dando la secuencia ATWTCINQQLNP, correspondiente a la secuencia N-terminal para Asp f 1. Se demuestra también mediante ELISA que el filtrado de cultivo de 1 semana (1wcf) se reconoce por suero humano de pacientes alérgicos a Afu obtenido del National Institute of Biological Standards and Control.

### Sensibilización

En este estudio, se sensibilizan ratones C57BL/6 hembra de seis semanas de edad mediante inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 200  $\mu\text{g}$  de Afu 1wcf mezclado con alumbre (1:4 v/v) en 100  $\mu\text{l}$  de PBS administradas una vez a la semana durante 4 semanas.

### Exposición a alérgeno y tratamiento

Se exponen ratones sensibilizados con 50  $\mu\text{l}$  que contienen 10  $\mu\text{g}$  de Afu 1wcf administrados por vía intranasal (i.n.). A esto le sigue el tratamiento con PBS o 10  $\mu\text{g}$  de rSPD(n/CRD) en 50  $\mu\text{l}$  de PBS administrados i.n. La exposición y el tratamiento se realizan en una base diaria tal como se describe en los resultados. En algunos experimentos, se usa una proteína control de SP-A humana recombinante de longitud completa (proporcionada amablemente por Byk Gulden Pharmaceuticals) a una concentración de 10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ . En un experimento separado, se monitoriza el destino de rSPD(n/CRD) obteniendo BAL de diferentes ratones a diversos tiempos tras la aplicación intranasal de rSPD(n/CRD) en 50  $\mu\text{l}$  de PBS y sometiendo a ensayo rSPD(n/CRD) usando un anticuerpo policlonal generado contra rSPD(n/CRD) que no reconoce SP-A o SP-D de ratón. Estos resultados muestran que podía contabilizarse al menos un 50% de rSPD(n/CRD) en el BAL tomado 30 minutos tras la administración y no podía medirse nada tras 24 h.

### Eosinófilos de sangre periférica

Se recoge sangre de la vena de la cola de los ratones (n=4-8 / grupo) para la estimación de los eosinófilos. Se mide el recuento de leucocitos totales con un contador de células automático y se determina la proporción de eosinófilos mediante recuento diferencial de frotis de sangre teñidos con May-Grunwald-Giemsa. Se expresan los resultados como  $10^6$  células / ml.

### IgE sérica e IgG1 específica de Afu

Se mide IgE sérica total mediante ELISA de tipo "sándwich" (BD PharMingen, Cowley, RU) en sangre diluida en serie a partir de una dilución máxima de 1:20 para proporcionar valores, que son lineales con respecto a una curva patrón de IgE de ratón. Se expresan los resultados en mg/ml. Se mide IgG1 específica de Afu mediante ELISA usando placas de 96 pocillos recubiertas con extracto de

alérgeno de Afu. Se detecta el anticuerpo con anticuerpos anti-IgG1 de ratón marcado con HRP. Se expresan los resultados como unidades de absorbancia relativa (DO450).

#### SP-D y SP-A de ratón endógenas en el pulmón

5 Inmediatamente después del sacrificio inmunitario mediante asfixia con CO<sub>2</sub>, se realiza lavado broncoalveolar con 3x1ml de PBS, que se agrupan y se ajustan los volúmenes mediante la adición de PBS a 4 ml para todas las muestras y se centrifugan para eliminar las células. Se miden SP-D y SP-A mediante ELISA usando  
10 anticuerpos policlonales generados contra SP-D y SPA de ratón recombinantes (proporcionados amablemente por el Dr. P. Lawson). Se muestra que estos anticuerpos no reaccionan de manera cruzada con SP-D o SP-A humana y son específicos para SP-D o SP-A de ratón, respectivamente. Se expresan los resultados como µg/ml de BAL.

#### 15 Tinción de citocinas intracelulares.

Tras el tratamiento, se sacrifican los ratones de manera humanitaria mediante asfixia con CO<sub>2</sub> y se extirpan sus bazos y se homogeneizan en PBS. Se filtra el homogeneizado y se lisan los glóbulos rojos con reactivo de lisis de cloruro de  
20 amonio (BD Pharmingen) y se fijan con paraformaldehído al 4% (v/v) durante 20 min. Se lavan las células con PBS complementado con suero de ternero inactivado con calor al 3% (v/v) con azida de sodio al 0,1%(p/v) (FSB), se resuspenden en DMSO al 10% (v/v) en FSB y se almacenan a -80°C. Se permeabilizan las células con tampón de lavado Cytoperm (CPB, BD Biosciences, Cowley, RU) durante  
25 15 min. a 4°C y se bloquean alícuotas de 10<sup>6</sup> células mediante incubación durante 30 min. a 4°C con CPB complementado con IgG de rata 50 µg/ml. Se tiñen las citocinas intracelulares con 1 µg de anticuerpo monoclonal anti-citocinas de ratón conjugado con PE (BD Biosciences) incubado durante 60 min. a 4°C. Se lavan las células con CPB seguido por FSB y se resuspenden en 500 1 FSB. Se  
30 realiza citometría de flujo con un citómetro de flujo FACScan (Beckton Dickinson, Mountain View, California) usando el software CellQuest. Se recogen datos para 20000 células. El FSC promedio de células de bazo es de 100 en todos los casos. Se activan las células teñidas (FSC>100, FL2>100) y se calcula la proporción de estas células que se tiñen intensamente para PE (PE>1000). Se expresan los resultados como el % de células intensamente teñidas tras la resta de la fluorescencia de fondo para células no teñidas incubadas con IgG de rata (% de PE>1000).  
35

#### Histología del pulmón

Inmediatamente tras el tratamiento, se fijan los pulmones de 2-4 ratones de cada  
40 grupo de tratamiento en formalina tamponada neutra al 10% (v/v) y se envían para un análisis independiente. Se incrustan los pulmones en parafina, se cortan y se tiñen con hematoxilina y eosina. Se evalúan los cortes para determinar la inflamación peribronquial y se asignan puntuaciones en una escala de 0-4, correspondiente a una puntuación de normal a grave, respectivamente [Sur S, Wild JS, Choudhury BK *et al.* Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. J Immunol 1999; 162:6284-93].  
45

Pletismografía de cuerpo entero.

- En este estudio, se mide la hiperreactividad de las vías respiratorias usando pletismografía de cuerpo entero no restringida [Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K *et al.* Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:766-75] con un sistema de cuatro cámaras (Buxco, Sharon, Connecticut). En primer lugar, se exponen los ratones con antígeno intranasal y se dejan recuperar durante 2 horas antes de colocarse en las cámaras y monitorizarse su respiración durante 10 min. Cuando se aclimatan, se mide su respuesta de nivel inicial durante 5 min. Se someten entonces los ratones a 1 min. de PBS aerosolizado, seguido por dosis progresivamente crecientes de metacolina (5, 10, 20, 30, 40 mg/ml de PBS). Se registran las respuestas durante 5 min. en cada caso con un intervalo corto entre medias para permitir que regresen a la Penh de nivel inicial.
- Cada grupo contenía 4-8 ratones. Se presentan los resultados como el % de elevación de Penh con respecto al nivel inicial tras una exposición de metacolina.

Estadística

- Los resultados son el promedio de 4-8 ratones / grupos y las barras de error son  $\pm$  EEM. Se determina la significación mediante una prueba de la t de Student bilateral. Se acepta significación para  $P < 0,05$ .

Resultados del ejemplo 2

- Se muestran los resultados del tratamiento de ratones sensibilizados con SP-D recombinante en las figuras 2, 3, 4 y 5.

Se reducen IgE sérica, IgG1 específica de Afu y eosinofilia de sangre periférica mediante rSPD(n/CRD) en un antecedente genético diferente

- Para determinar si el tratamiento con rSPD(n/CRD) es eficaz en un antecedente genético diferente, se establece un modelo de ABPA en ratones C57BL/6 y para determinar si rSPD(n/CRD) podía modular la hipersensibilidad alérgica durante la exposición con alérgeno, se exponen en primer lugar los ratones sensibilizados con 10  $\mu$ g de Afu 1wcf y se tratan 1 hora después. IgE sérica medida 3 días tras el tratamiento con 5 dosis diarias de 10  $\mu$ g de rSPD(n/CRD), administradas por vía intranasal a ratones expuestos con alérgeno, está significativamente reducida ( $P < 0,001$ ) y esta reducción se mantiene tras la reexposición con 3 dosis diarias de 10  $\mu$ g de Afu 1wcf administradas la siguiente semana (figura 2A). También se mide una reducción significativa en IgG1 específica de Afu (figura 2B) y eosinofilia de sangre periférica medidas tras el tratamiento de ratones expuestos con alérgeno y reexpuestos con alérgeno solo la siguiente semana (figura 3).

El tratamiento con rSPD(n/CRD) da como resultado una elevación en IL-12 e IFN- $\gamma$  y una reducción en IL-4

La reducción en IgE y eosinofilia de sangre periférica sugiere una modulación

sistémica del nivel de citocinas, y estas citocinas se miden mediante tinción intracelular. IL-12 (figura 4A) medida en el bazo, 1 día tras el tratamiento durante 2 días con 10  $\mu\text{g}$  de rSPD(n/CRD), administrados por vía intranasal a ratones expuestos a alérgeno, está significativamente reducida ( $P < 0,05$ ), así como IFN- $\gamma$  (figura 4B). La medición de IL-4 mostró una disminución hasta el nivel medido en ratones no sensibilizados (figura 4C). El mismo tratamiento con rhSP-A (proteína tensioactiva A humana recombinante, SP-A) no produjo estos efectos.

El tratamiento con rSPD(n/CRD) da como resultado una reducción de la hiperreactividad de las vías respiratorias.

10 Ratones tratados con 4 dosis diarias de 10  $\mu\text{g}$  de rSPD

(n/CRD) administradas 1-2 horas tras la exposición con alérgeno mostraron una reducción significativa ( $P < 0,05$ ) en la hiperreactividad de las vías respiratorias al reexponerse con alérgeno 3 días tras la finalización del tratamiento (día 7) en todas las dosis de metacolina sometidas a prueba (figura 5A). Ratones tratados con 10  $\mu\text{g}$  de rhSP-A (proteína tensioactiva A humana recombinante) del mismo modo no mostraron una reducción significativa en AHR (figura 5B).

El tratamiento con rSPD(n/CRD) da como resultado una reducción de la inflamación pulmonar

20 De los ratones sensibilizados en este estudio, 4 de los 6 ratones tratados con PBS tenían una puntuación de 2+ y de los 5 en el grupo de tratamiento con rSPD (n/CRD) 4 tenían una puntuación de 1. La puntuación para ratones no sensibilizados es 0. Las secciones de pulmón ilustran la reducción en la infiltración celular en los pulmones (figura 6).

25 SP-D y SP-A de ratón endógenas.

Los niveles endógenos de SP-D medidos en el BAL de ratones alérgicos están elevados 6 veces desde un nivel de  $0,25 \pm 0,015 \mu\text{g/ml}$  en BAL de ratones normales hasta  $1,4 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$ , mientras que no se encuentran diferencias para el nivel de SP-A endógena que se mide a  $1,3 \pm 0,1 \text{ mg/ml}$  en BAL de ratones normales, sensibilizados y tratados. El tratamiento con 5 dosis diarias de 10  $\mu\text{g}$  de rSPD(n/CRD) no produjo ningún cambio en el nivel de SP-D o SP-A endógenas.

35 Ejemplo 3. Modulación de la hipersensibilidad alérgica en un modelo murino de hipersensibilidad alérgica a ácaros del polvo doméstico (*Dermatophagoides pteronyssinus*)

Derp/IL-2/Pulmón

40 La figura 7A muestra que el tratamiento intranasal con rSP-D (N/CRD) da como resultado una potenciación en la respuesta a IL-12 a la exposición con alérgeno en los pulmones de ratones alérgicos a Der p.

Un análisis de IL-12 en los homogeneizados de pulmón de ratones sensibilizados con Der p tras el tratamiento medida mediante tinción de citocinas intracelulares seguido por análisis de FACS para el porcentaje de células altamente teñidas

(PE>1000) positivas para IL-12. PBS= ratones no sensibilizados tratados con PBS. HP= ratones sensibilizados tratados con PBS. HR= ratones sensibilizados tratados con 10 µg de rSP-D (N/CRD). Se expusieron en primer lugar los ratones sensibilizados con 50 UA de extracto de alérgeno Der p administrado por vía intranasal. El tratamiento fue mediante instilación intranasal de 10 µg de rSP-D(N/CRD) administrados poco después de la exposición. Se repitieron la exposición y el tratamiento en 4 días consecutivos. Se reexpusieron los ratones con Der p solo 4 días tras el tratamiento y se sacrificaron el siguiente día.

#### Derp/IL-2/Bazo

La figura 7B muestra pruebas de que el tratamiento intranasal con rSP-D (N/CRD) da como resultado una potenciación en la respuesta de IL-12 a la exposición con alérgeno en el bazo de ratones alérgicos a Der p.

Un análisis de IL-12 en los homogeneizados de bazo de ratones sensibilizados con Der p tras el tratamiento medida mediante tinción de citocinas intracelulares seguido por análisis de FACS para el porcentaje de células altamente teñidas (PE>1000) positivas para IL-12. PBS= ratones no sensibilizados tratados con PBS. HP= ratones sensibilizados tratados con PBS. HR= ratones sensibilizados tratados con 10 µg de rSP-D (N/CRD). HB= ratones sensibilizados tratados con 10 µg de BSA. Se expusieron en primer lugar los ratones sensibilizados con 50 UA de extracto de alérgeno Der p administrado por vía intranasal. El tratamiento fue mediante instilación intranasal de 10 µg de rSP-D (N/CRD) administrados poco después de la exposición. Se repitieron la exposición y el tratamiento en 4 días consecutivos. Se reexpusieron los ratones con Der p solo 4 días tras el tratamiento y se sacrificaron el siguiente día. (n=4-8/grupo. Elevación de 1,7x).

#### Derp/INF- $\alpha$ /Bazo

La figura 7C muestra pruebas de que el tratamiento intranasal con rSP-D (N/CRD) da como resultado una potenciación en la respuesta de IFN- $\gamma$  a la exposición con alérgeno en los bazos de ratones alérgicos a Der p.

Un análisis de IFN- $\gamma$  en los homogeneizados de bazo de ratones sensibilizados con Der p tras el tratamiento medido mediante tinción de citocinas intracelulares seguido por análisis de FACS para el porcentaje de células altamente teñidas (PE>1000) positivas para IFN- $\gamma$ . PBS= ratones no sensibilizados tratados con PBS. HP= ratones sensibilizados tratados con PBS. HR= ratones sensibilizados tratados con 10 µg de rSP-D (N/CRD). Se expusieron en primer lugar los ratones sensibilizados con 50 UA de extracto de alérgeno Der p administrado por vía intranasal. El tratamiento fue mediante instilación intranasal de 10 µg de rSP-D (N/CRD) administrados poco después de la exposición. Se repitieron la exposición y el tratamiento en 4 días consecutivos. Se reexpusieron los ratones con Der p solo 4 días tras el tratamiento y se sacrificaron el siguiente día. (n=4-8/grupo.  $P<0,05$ . Elevación de 2,7x).

#### Derp/TNP- $\alpha$ /Bazo

La figura 7D muestra pruebas de que el tratamiento intranasal con rSP-D (N/CRD)

da como resultado una potenciación de la respuesta de TNF- $\alpha$  a la exposición con alérgeno en los bazos de ratones alérgicos a Der p.

Un análisis de TNF- $\alpha$  en los homogeneizados de bazo de ratones sensibilizados con Der p tras el tratamiento medido mediante tinción de citocinas intracelulares seguido por análisis de FACS para el porcentaje de células altamente teñidas (PE>1000) positivas para TNF- $\alpha$ . PBS= ratones no sensibilizados tratados con PBS. HP= ratones sensibilizados tratados con PBS. HR= ratones sensibilizados tratados con 10  $\mu$ g de rSP-D (N/CRD). Se expusieron en primer lugar los ratones sensibilizados con 50 UA de extracto de alérgeno Der p administrado por vía intranasal. El tratamiento fue mediante instilación intranasal de 10  $\mu$ g de rSP-D (N/CRD) administrados poco después de la exposición. Se repitieron la exposición y el tratamiento en 4 días consecutivos. Se reexpusieron los ratones con Der p solo 4 días tras el tratamiento y se sacrificaron el siguiente día. (n=4-8/grupo. Elevación de 1,5x).

15 Ejemplo 4. Efecto del tratamiento con rSPD(n/CRD) sobre la hiperreactividad de las vías respiratorias en un modelo murino de hipersensibilidad alérgica a ácaros del polvo doméstico (*Dermatophagoides pteronyssinus*)

El asma alérgica se caracteriza por periodos de hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR). Se sabe que la AHR altera los patrones de respiración incluyendo una prolongación del tiempo de espiración. Este cambio puede cuantificarse mediante la medición de la pausa espiratoria potenciada (Penh).

En este estudio, se mide la hiperreactividad de las vías respiratorias usando ple-tismografía de cuerpo entero no restringida con un sistema de 4 cámaras (Buxco, Sharon, CT, EE.UU.). Se extrae un flujo de aire de desviación constante a través del sistema con el fin de evitar la acumulación de CO<sub>2</sub>. A medida que los ratones respiran en la cámara de ratones, se miden las fluctuaciones de la presión mediante transductores y se comparan con una cámara de referencia. Estas fluctuaciones se producen por cambios en el volumen torácico durante el ciclo de respiración. La broncoconstricción produce diferencias en la forma de las excursiones de presión y es lo más pronunciada durante la espiración. Estos cambios de forma pueden cuantificarse mediante el algoritmo para la pausa potenciada (Penh), que representa la dificultad en la espiración y es una característica de la respiración en asmáticos.

$$Penh = \frac{Te - Tr}{Tr} \times \frac{PEP}{PIP}$$

35 Te es el tiempo espiratorio, Tr es el tiempo de relajación, PEP es la presión espiratoria pico y PIP es la presión inspiratoria pico.

Se provoca AHR exponiendo los ratones a metacolina nebulizada, *in situ*. La metacolina (cloruro de acetil- $\beta$ -metilcolina) es un análogo metabólicamente estable del neurotransmisor acetilcolina y provoca contracción del músculo liso dando como resultado broncoconstricción provocada. La AHR provocada de ratones asmáticos se mide mediante un aumento en Penh relativa con respecto a ratones normales.

## Métodos

5 *Sensibilización.* Se sensibilizan ratones C57BL/6 hembra mediante 4 inyecciones i.p. a la semana de extracto de Der p normalizado (Greer Labs., EE.UU.) con alumbre.

10 *Inducción de inflamación de las vías respiratorias y tratamiento.* Se administran a ratones sensibilizados 50 unidades de alergia de extracto de Der p en PBS, por vía intranasal (i.n.), precedido por la administración i.n. de PBS o 10 µg de rSPD(n/CRD), denominada administración conjunta secuencial, en 4 días sucesivos. Se deja que los animales se recuperen durante al menos 30 min. antes de la segunda administración i.n.

15 *Pletismografía de cuerpo entero.* Vuelven a colocarse los ratones en las cuatro cámaras y se monitoriza su respiración durante 10 min. Cuando se aclimatan, se mide su respuesta de nivel inicial durante 5 min. A continuación, se someten a 1 min. de PBS aerosolizado, seguido por dosis progresivamente crecientes de metacolina. Se registran las respuestas durante 5 min. cada caso con un intervalo corto entremedias para permitir que regresen al nivel inicial.

20 *Estadística.* Cada grupo contiene 4-8 ratones. Se expresa Penh como el % de aumento promedio con respecto al valor de nivel inicial para los ratones en cada grupo. Las barras de error son  $\pm$  EEM. Se determina la significación mediante pruebas de la t apareadas.

## Resultados del ejemplo 4

25 El tratamiento con rSPD(n/CRD) produce una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) en AHR tal como se mide mediante la respuesta de Penh en pletismografía de cuerpo entero, al final del periodo de tratamiento (figura 8A; metacolina 20 mg/ml). Se mantuvo esta disminución significativa cuando se reexponen los ratones con alérgeno 4 días tras el tratamiento ( $p < 0,002$ ) tal como se muestra en la figura 8B (respuesta a la dosis de metacolina con reexposición).

30 Este estudio en un modelo de ratón de alergia a ácaros del polvo doméstico muestra por primera vez que la administración intranasal de rSPD(n/CRD) reduce significativamente la hiperreactividad de las vías respiratorias, que es una característica principal del asma. Esto proporciona pruebas de la utilidad de rSPD(n/CRD) en el tratamiento de los síntomas de las reacciones de hipersensibilidad alérgica respiratoria incluyendo asma alérgica.

40 Es de importancia que rSPD(n/CRD) puede reducir la AHR incluso en presencia de exposición a alérgeno sostenida tal como se demuestra por su eficacia durante la administración conjunta secuencial con alérgeno Der p. Esto refleja la situación con la que se encuentran sujetos alérgicos estacionales o aquéllos expuestos constantemente a aeroalérgenos, que es un problema principal en la alergia a ácaros del polvo doméstico.

El hallazgo más notable es que el tratamiento con rSPD(n/CRD) tiene un efecto a largo plazo sobre los mecanismos subyacentes tal como se muestra mediante la AHR significativamente reducida con la reexposición con alérgeno solo. Por tanto,

el tratamiento con rSPD (n/CRD) proporciona una estrategia de desensibilización eficaz para personas que padecen alergia y asma alérgica.

Ejemplo 5. Efecto de SP-D recombinante sobre ratones deficientes

5 Los siguientes tres ejemplos describen experimentos en los que se reemplaza la función de SP-D en ratones deficientes en SP-D usando SP-D humana recombinante.

Los ratones deficientes en SP-D que no expresan SP-D tienen un número aumentado de macrófagos, muchos de los cuales son de aspecto anómalo. Hay un exceso de fosfolípido tensioactivo en el espacio alveolar, lo que indica un proceso inflamatorio de grado bajo crónico en ausencia de SP-D. Estos ratones desarrollan posteriormente lesión pulmonar y fibrosis y enfisema y proporcionan un modelo para la contribución hecha a la lesión pulmonar y la inflamación de la deficiencia de SP-D (tal como se observa en el lactante prematuro y en fumadores, grupos de pacientes con deficiencia de SP-D congénita y adquirida, respectivamente). El efecto sobre este proceso inflamatorio del tratamiento con rSP-D (N/CRD) humano, fragmento truncado expresado de manera recombinante, se evalúa en ratones deficientes en SP-D.

Se producen ratones deficientes en SP-D tal como se describe en Botas, C., *et al.*, Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(20): págs. 11869-74. Se produce SP-D humana recombinante tal como se describió anteriormente.

Se administra por vía intranasal SP-D recombinante o control de BSA a ratones desde la edad de 6 semanas. Se administran un total de 7 dosis de 30 microgramos a lo largo de 6 semanas, hasta que los animales tienen 12 semanas de edad. Se sacrifican cuatro ratones tras 3 semanas de tratamiento y se someten a lavado broncoalveolar para los recuentos celulares del número de macrófagos alveolares y la estimación del fosfolípido. Se repiten los experimentos descritos tres veces.

Estos ejemplos demuestran que puede usarse rSPD(n/CRD) como tratamiento eficaz para la enfermedad pulmonar inflamatoria.

Ejemplo 6. Efecto de SP-D recombinante sobre ratones deficientes tal como se evalúa mediante los números de macrófagos alveolares

Se cuenta el número de macrófagos teñidos con verde malaquita o cristal violeta en un hemocitómetro y se evalúa la morfología de los macrófagos tras la citocentrifugación.

La figura 9 muestra el número de macrófagos alveolares contados en ratones no tratados y demuestra que el número de células es aproximadamente tres veces las contadas en ratones de tipo natural a las 6 semanas y a las 9 semanas y 12 semanas es casi cuatro veces el tipo natural. Se mantiene el número de macrófagos en ratones deficientes no tratados, de modo que hay números comparables de células recogidas a partir del lavado a las 16 semanas. Sin embargo, tras el tratamiento con rSP-D (N/CRD), el número de macrófagos alveolares en BAL de ratones deficientes en SP-D se reduce en aproximadamente un 50%, hasta niveles aproximadamente dos veces los observados en ratones de tipo natural de

edad comparable. La figura 9 también muestra que los números de macrófagos alveolares aumentan en ratones deficientes en SP-D en comparación con ratones de tipo natural a las 15 semanas.

5 Se muestra el efecto del tratamiento con rSP-D sobre el número de macrófagos alveolares aislados a partir de líquido de BAL. En contraposición al tratamiento con rhSP-A, BSA o PBS, el número de macrófagos disminuye significativamente en ratones deficientes en SP-D tratados con rSP-D a las 9, 12 y 15 semanas. Los números de macrófagos en animales tratados con rSP-D siguen siendo superiores que en ratones de tipo natural en todas las edades.

10 La figura 10A muestra una citocentrifugación de células en lavado broncoalveolar. Se tiñen las células con verde malaquita (paneles superiores) o cristal violeta (paneles inferiores). Queda claro que hay menos macrófagos alveolares en ratones tratados con rSP-D (N/CRD) y tienen un aspecto más normal con muy pocos macrófagos espumosos agrandados visibles por campo de gran aumento, en  
15 comparación con ratones no tratados o tratados con BSA.

La figura 10B muestra una citocentrifugación de células en lavado broncoalveolar. Las células de ratones deficientes en SP-D son grandes, espumosas y a menudo multinucleadas. En contraposición a ratones tratados con BSA o SP-A, los macrófagos alveolares de ratones tratados con rSP-D tienen un aspecto normal más  
20 frecuentemente, con menos células agrandadas y espumosas. Este efecto se cuantifica mediante citometría de flujo de dispersión frontal y lateral.

Ejemplo 7. Efecto de SP-D recombinante sobre ratones deficientes tal como se somete a ensayo mediante análisis de fosfolípido tensioactivo

25 Se lleva a cabo la extracción de fosfolípido a partir de BAL y se cuantifica el fosfolípido mediante el ensayo de fósforo de Bartlett, tal como se describe en Bartlett, G.R, Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem., 1959. 234: págs. 466-468.

30 Se muestran los resultados en la figura 11. No hay diferencias detectables en los fosfolípidos sometidos a ensayo tras 3 semanas de tratamiento en ratones que habían alcanzado 9 semanas de edad, mientras que la cantidad de fosfolípido recuperable en el lavado tras 6 semanas de tratamiento está muy reducida.

35 Se muestran resultados adicionales referentes a las mediciones de proteínas y fosfolípidos totales en BAL libre de células en la figura 11B. Hay un marcado aumento en los niveles de fosfolípido de BAL en ratones deficientes en SP-D a las 6 semanas de edad. No hay diferencias en los niveles de fosfolípido en ratones que recibieron dos semanas de tratamiento rSP-D desde la edad de cuatro semanas en comparación con ratones de seis semanas de edad no tratados.

40 Los mismos ratones usados en el experimento de recuento de macrófagos alveolares (figura 9) que se trataron desde la edad de seis semanas durante tres o seis semanas también se someten a ensayo para determinar el fosfolípido en BAL libre de células. No hay diferencias en fosfolípidos de BAL tras tres semanas de tratamiento (edad de sacrificio nueve semanas) en comparación con controles de nueve semanas de edad no tratados. Sin embargo, ratones tratados durante seis  
45 semanas (sacrificados para el ensayo a la edad de 12 semanas) muestran una

reducción del 50% en el fosfolípido en exceso en comparación con controles de doce semanas de edad no tratados ( $P < 0,05$ ). No hay ningún efecto de tratamiento significativo sobre los niveles de proteínas totales del lavado a ninguna edad.

5 Se determinan los niveles de colesterol plasmático en ratones deficientes en SP-D, tal como se muestra en la figura 17. Esta figura compara el colesterol plasmático en mM entre ratones de tipo natural y ratones deficientes en SP-D. Se realizó una prueba apareada, con una diferencia hipotética de 0. La diferencia media es 0,988, el DF es 8, el valor de T es -2,885 y el valor de P es 0,0204.

10 Ejemplo 8. Efecto de SP-D recombinante sobre ratones deficientes tal como se somete a ensayo mediante los niveles de quimiocinas

15 Para evaluar posibles mecanismos que explican los hallazgos de número de macrófagos alveolares reducido, un efecto aparentemente específico de rSP-D, se aísla el ARN total de pulmones de ratones deficientes tratados con rSP-D (N/CRD) y controles no tratados y se someten a ensayo los niveles de ARNm para varios factores quimiotácticos mediante ensayo de protección de ribonucleasa usando el conjunto de moldes de múltiples sondas mCK-5 de Pharminogen según las instrucciones del fabricante. Se realizan ensayos de protección de ribonucleasa sobre ARN de pulmón total.

20 Los resultados se normalizan a través de las muestras para comprobar la carga igualitaria de ARN de pulmón total usando la señal de ARNm para L32 y GAPDH. Se carga cada muestra por duplicado en 2 concentraciones, usando 3 ratones para cada grupo.

25 Se muestran los resultados en la figura 12. Puede observarse que hay diferencias significativas en los niveles de ARNm iniciales entre ratones deficientes en SP-D y ratones de tipo natural. Específicamente, los niveles de eotaxina, el factor quimiotáctico específico de eosinófilos, aumentan en un 100% en ratones deficientes en comparación con ratones de tipo natural. Además, esto disminuye mediante el tratamiento con rSP-D (N/CRD). Estas observaciones son estadísticamente significativas al nivel del 5% usando la prueba de la t para datos independientes. 30 Los niveles de ARNm de MCP-1 aumentan 6 veces en ratones deficientes en comparación con ratones de tipo natural, y esto también disminuye mediante el tratamiento con rSP-D (N/CRD). Se observa un efecto similar sobre los niveles de MIP-1 alfa y sobre MIP 2 excepto porque no hay ningún efecto significativo del tratamiento con rSP-D (N/CRD) sobre los niveles de ARNm de MIP-2. Una observación final es que los niveles de TCA-3 aumentan 4 veces en ratones deficientes frente a ratones de tipo natural, pero el tratamiento con rSP-D (N/CRD) no tiene ningún efecto sobre el aumento de la expresión de TCA-3. 35

40 Ejemplo 9. rSP-D (N/CRD) promueve el aclaramiento de macrófagos alveolares apoptóticos

45 El proceso de muerte celular regulada por apoptosis evita la necrosis celular y la liberación consiguiente del contenido intracelular proinflamatorio. Dado el exceso de números de macrófagos alveolares en ratones deficientes en SP-D, se mide el número de células que experimentan apoptosis en ratones deficientes y se compara con ratones de tipo natural.

Se plantea la hipótesis de que la lesión pulmonar mediada por la presencia de grandes números de macrófagos alveolares se debe en parte al aclaramiento alterado de macrófagos alveolares apoptóticos con desencadenamiento posterior de una respuesta inflamatoria debido al aumento de necrosis de macrófagos alveolares.

#### Citometría de flujo y detección de células apoptóticas y necróticas

Se aíslan macrófagos alveolares de ratones mediante lavado broncoalveolar tal como se describió anteriormente.

La figura 13A muestra un resultado representativo de la citometría de flujo de dispersión frontal (tamaño celular) y dispersión lateral (granularidad) en ratones deficientes en SP-D en comparación con ratones de tipo natural. Se cuentan diez mil células en cada ratón a partir de cada grupo (n=6 por grupo). Los histogramas muestran una población de células más grandes y más granulares en ratones deficientes en SP-D consecuente con los aspectos de la citocentrifugación de macrófagos espumosos agrandados en ratones deficientes en SP-D en comparación con los aislados de ratones de tipo natural.

Se muestra el efecto del tratamiento con rSP-D sobre la dispersión frontal y lateral de la población de células usando superposiciones de histogramas representativos, e indica una población de células con menos macrófagos alveolares anómalamente grandes y granulares, consecuente con los aspectos de la citocentrifugación. El tratamiento con rhSP-A, PBS o BSA no tuvo ningún efecto sobre los histogramas de dispersión frontal y lateral.

#### Apoptosis y necrosis en macrófagos alveolares

Se aíslan macrófagos alveolares de ratones mediante lavado broncoalveolar tal como se describió anteriormente y se someten a ensayo para detectar apoptosis y necrosis midiendo la unión de anexina V marcada con FITC (que se une a fosfatidilserina de superficie expuesta en células apoptóticas) y yoduro de propidio (que se une a células necróticas) mediante análisis de FACS.

Tal como se muestra en las figuras 13B, 13C y 13D, hay una gran diferencia en el número de macrófagos apoptóticos y necróticos en lavado de ratones deficientes en SP-D en comparación con ratones de tipo natural.

#### Tinción con anexina V y PI de macrófagos alveolares recién aislados

La figura 13B muestra los patrones típicos de tinción con anexina V y PI de macrófagos de ratones deficientes en SP-D en comparación con ratones de tipo natural. De manera consecuente, el número de macrófagos, que se tiñen con anexina V, es significativamente superior en ratones deficientes en SP-D en comparación con ratones de tipo natural, y hay un aumento de tres a cuatro veces en el número de células que se teñían con tanto anexina V como PI en ratones deficientes en SP-D. El punto de corte arbitrario mostrado en la figura, que divide la población de células en cuadrantes, permite el cálculo de los porcentajes de células que se tiñen con PI o anexina V solo en cada caso.

Comarcaje de células positivas para anexina V y/o PI con rSP-D marcado con FITC.

La figura 13C muestra el grado de comarcaje de rSP-D marcado con FITC con células positivas para anexina V y/o PI. Los resultados son representativos de tres experimentos. Los gráficos de puntos muestran la unión preferente de FITC-rSP-D a células necróticas (positivas para PI) y apoptóticas (positivas para anexina V) tempranas. Globalmente, FITC-rSP-D se une a una proporción superior de células aisladas de ratones deficientes, en comparación con ratones de tipo natural (45 $\pm$ 6% frente a 15  $\pm$  1,8%). Del pequeño número de células positivas para anexina V en ratones de tipo natural, FITC-rSP-D se une a un 80  $\pm$  6%, en comparación con sólo un 1  $\pm$  0,5% de células negativas para anexina V. En ratones deficientes, un 55  $\pm$  4% de AM positivas para anexina V se unían a FITC-rSP-D, en comparación con sólo un 3,5  $\pm$  1,7% de células negativas para anexina V. FITC-rSP-D se unía a todas las células que se teñían con PI de ratones de tipo natural o deficientes. Por tanto, hay un bajo nivel de unión de FITC-rSP-D a células sanas (negativas para PI, negativas para anexina V) de ratones de tipo natural y ratones deficientes en comparación con la unión a células positivas para anexina V o PI. La incubación conjunta de células recién aisladas con FITC-anexina V y rSP-D no marcado no afectó de manera significativa a la unión de anexina V (no mostrado), lo que indica que no hay interacciones directas entre anexina V y rSP-D, ni ninguna competición por rSP-D de la unión de anexina V a su ligando fosfatidilserina.

Análisis y tratamiento con rSP-D

La figura 13D muestra que ratones deficientes en SP-D tienen un aumento de diez veces en la proporción de macrófagos alveolares apoptóticos en lavado broncoalveolar en comparación con ratones de tipo natural (deficientes 74%  $\pm$  8% frente a 6%  $\pm$  2% en tipo natural) y un aumento de seis veces en macrófagos alveolares necróticos (25%  $\pm$  8% en deficientes frente a 4  $\pm$  2% en tipo natural). La terapia sustitutiva intranasal durante 3-6 semanas con rSP-D (N/CRD) aumenta el aclaramiento de macrófagos alveolares apoptóticos y necróticos del espacio alveolar en animales deficientes en SP-D, mientras que un tratamiento similar con albúmina sérica bovina o proteína tensioactiva A (SP-A) no tiene ningún efecto.

También se muestra en la figura el efecto del tratamiento con rSP-D sobre los porcentajes de células que se tiñen con o bien PI o bien anexina V.

Los porcentajes de macrófagos apoptóticos son del 25%  $\pm$  4% en ratones tratados con rSP-D (N/CRD) frente al 76%  $\pm$  10% en controles. El tratamiento con rSP-D (N/CRD) reduce el porcentaje de macrófagos necróticos en lavado de ratones deficientes en SP-D (aproximadamente del 25%) hasta niveles comparables con el tipo natural (el 5% frente al 4%). El efecto global del tratamiento con rSP-D (N/CRD) es disminuir el número absoluto de macrófagos alveolares en el pulmón, junto con los niveles de citocinas proinflamatorias y los fosfolípidos tensioactivos en exceso en un 50%.

No hay ningún efecto significativo del tratamiento con rhSP-A, BSA o PBS sobre el porcentaje de células que se tiñen con anexina V y/o PI. En contraposición, el tratamiento con rSP-D dio como resultado una reducción significativa en el número de células positivas para anexina V y/o PI en el BAL de ratones deficientes en

SP-D, aunque el número de células positivas para anexina V y/o PI es todavía significativamente superior que en el tipo natural.

#### Modulación de los niveles de GM-CSF en lavado broncoalveolar

5 Se muestra la modulación de los niveles de GM-CSF en lavado broncoalveolar en la figura 14. Tal como puede observarse, la concentración de GM-CSF en lavado broncoalveolar de ratones de tipo natural es de aproximadamente 50 pg/ml, en comparación con aproximadamente 185 pg/ml en ratones deficientes en SP-D. El tratamiento de tales ratones deficientes con rSP-D (N/CRD) reduce los niveles de  
10 GM-CSF hasta aproximadamente 120 pg/ml.

Los resultados de análisis bioquímicos y de citometría de flujo son consecuentes con el examen de citocentrifugación e histología del pulmón de macrófagos alveolares recogidos del lavado broncoalveolar.

#### Microscopía confocal

15 La figura 15 muestra la microscopía confocal de macrófagos de ratones de tipo natural (paneles A y B) y deficientes (paneles C y D), teñidos con FITC-dUTP (verde). Las células en apoptosis avanzada se tiñen de verde y las células en apoptosis temprana se identifican mediante la tinción punteada característica de fragmentos de ADN marcados en los extremos.  
20

#### Detección de fagocitosis de macrófagos necróticos y apoptóticos teñidos de naranja mediante macrófagos recién aislados teñidos de verde

25 Se aíslan células de ratones deficientes tal como se describió anteriormente y se incuban con colorante Orange Cell Tracker durante la noche a temperatura ambiente. El comarcaje con anexina V-FITC confirma que el 80-90% de estas células están doblemente marcadas con colorante naranja y son positivas para anexina V. Se incuban células recién aisladas con Cell Tracker Green según las instrucciones del fabricante. Muchas células no se tiñen con Cell Tracker Green que depende de células vivas (figura 16, cuadrante inferior izquierdo, panel A), y se marcaron satisfactoriamente una proporción de células (figura 16, cuadrante inferior derecho, panel A)  
30

El panel A muestra el resultado del mezclado inmediato de poblaciones de células naranjas y verdes. Usando la compuerta indicada para excluir células no teñidas y fluorescencia doble de fondo (indicada en el panel B), los paneles C y D muestran  
35 doble marcaje tras la incubación conjunta de células durante 15 minutos a 37 grados sin SP-D (panel C) y con SP-D (panel D) a 4 mcg/ml. El número de células doblemente marcadas se potencia en presencia de SP-D en un 80%.

40 Estos resultados en ratones deficientes en SP-D revelan un papel crítico para SP-D en la regulación del aclaramiento de macrófagos apoptóticos y necróticos e indican que la terapia a base de rSP-D (N/CRD) proporciona un enfoque novedoso en un espectro de enfermedad pulmonar que implica procesos inflamatorios mediados por macrófagos alveolares y otras enfermedades.

Sin embargo, los datos mostrados referentes a la implicancia de SP-D en la regulación y el aclaramiento de células apoptóticas también tienen implicaciones para anomalías del desarrollo (por ejemplo, desarrollo pulmonar posnatal anómalo en enfermedad pulmonar neonatal tras parto prematuro), remodelación de tejidos inflamados, proliferación celular y cáncer.

### Ejemplo 10

Se somete a prueba la unión de SP-D y rSPD(n/CRD) (denominado fragmento recombinante de SP-D, rSPD(n/CRD)) a ADN de una variedad de modos. En un primer ensayo, se usa microscopía electrónica para demostrar complejos entre ADN y SP-D, y ADN y rf-SP-D. Véase la figura 18. Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica demuestran que SP-D y rSPD (n/CRD) se unen a ADN eficazmente.

En un segundo ensayo, mostrado en la figura 19, la unión entre rSPD(n/CRD) y el hidrato de carbono manano se ve sometida a competición por desoxirribonucleótidos, lo que sugiere que SP-D se une a ADN mediante su capacidad de unión a hidratos de carbono. Los desoxirribonucleótidos compiten eficazmente por la unión a SP-D con manano inmovilizado, mostrando que los nucleótidos se unen en disolución.

En un tercer ensayo, mostrado en la figura 20, se incubaron macrófagos alveolares aislados de los ratones deficientes en SP-D (principalmente apoptóticos), con concentraciones indicadas de rSPD(n/CRD) seguido por yoduro de propidio, y se determinó el yoduro de propidio de color rojo que se unía a la célula mediante análisis de FACS. En presencia de rSPD(n/CRD) 4 y 20 µg/ml, el 11,4 y el 2,1% de las células contenían yoduro de propidio, respectivamente, en comparación con el 16,8% en ausencia de la proteína. Estos resultados muestran que rSPD(n/CRD) se une a ADN en las células apoptóticas.

Para obtener pruebas del defecto en el aclaramiento de ADN *in vivo*, se aislaron macrófagos alveolares de ratones deficientes en SP-d (SP-D<sup>(-/-)</sup>) y se comparó su capacidad para captar ADN con el de ratones de tipo natural y deficientes en SP-A (SP-A<sup>(-/-)</sup>). Los datos (figura 21) muestran que los macrófagos alveolares aislados de ratones deficientes en SP-D producían poco (4,0%) aclaramiento de ADN en comparación con el de ratones de tipo natural (10,5%) o deficientes en SP-A (13,2). Estos resultados sugieren que SP-D desempeña un papel importante en la ruta de aclaramiento de ADN en el pulmón.

### Bibliografía

- Platts-Mills, T. A., y M. D. Chapman. 1987. Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control. *J Allergy Clin Immunol.* 80:755-75.
- Platts-Mills, T. A., E. B. Mitchell, M. D. Chapman, y P. W. Heymann. 1987. Dust mite allergy: its clinical significance. *Hosp Pract (Off Ed).* 22:91-3, 97-100.
- Pollart, S. M., M. D. Chapman, y T. A. Platts-Mills. 1987. House dust sensitivity and environmental control. *Prim Care.* 14:591-603.
- Arruda, L. K., B. J. Mann, y M. D. Chapman. 1992. Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp f I, in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus*-related diseases. *J Immunol.* 149:3354-9.

- Cai, G. Z., G. L. Griffin, R. M. Senior, W. J. Longmore, y M. A. Moxley. 1999. Recombinant SP-D carbohydrate recognition domain is a chemoattractant for human neutrophils. *Am J Physiol.* 276:L131-6.
- 5 Hickling, T. P., H. Bright, K. Wing, D. Gower, S. L. Martin, R. B. Sim, y R. Malhotra. 1999. A recombinant trimeric surfactant protein D carbohydrate recognition domain inhibits respiratory syncytial virus infection *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Immunol.* 29:3478-84.
- 10 Kishore, U., L. E. A. Leigh, P. Eggleton, P. Strong, M. V. Perdikoulis, A. C. Willis, y K. B. Reid. 1998. Functional characterization of a recombinant form of the C-terminal, globular head region of the B-chain of human serum complement protein, C1q. *Biochem J.* 333:27-32.
- 15 Madan, T., U. Kishore, A. Shah, P. Eggleton, P. Strong, J. Y. Wang, S. S. Aggrawal, P. U. Sarma, y K. B. Reid. 1997. Lung surfactant proteins A and D can inhibit specific IgE binding to the allergens of *Aspergillus fumigatus* and block allergen-induced histamine release from human basophils. *Clin Exp Immunol.* 110:241-9.
- 20 Madan, T., U. Kishore, M. Singh, P. Strong, H. Clark, E. M. Hussain, K. B. Reid, y P. U. Sarma. 2001. Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by *Aspergillus fumigatus* antigens and allergens. *J Clin Invest.* 107:467-75.
- Madan, T., U. Kishore, M. Singh, P. Strong, E. M. Hussain, K. B. Reid, y P. U. Sarma. 2001. Protective role of lung surfactant protein d in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun.* 69:2728-31.
- 25 Awasthi S, Coalson JJ, Yoder BA, Crouch E, King RJ. Deficiencies in lung surfactant proteins A and D are associated with lung infection in very premature neonatal baboons. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Feb;163(2):389-97.
- 30 Wert SE, Yoshida M, LeVine AM, Ikegami M, Jones T, Fisher JH, Korfhagen TR, Whitsett JA. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 de mayo de 2000; 97(11):5972-7.
- Madan, T., *et al.*, Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by *Aspergillus fumigatus* antigens and allergens. *J Clin Invest*, 2001. 107(4): p.467-75.
- 35 Se hace referencia a las siguientes citas numeradas en "Terapia sustitutiva con tensioactivo":
1. Jobe A. Surfactant treatment for respiratory distress syndrome. *Respir Care* 1986; 31(6):467-476.
2. Berry D. Neonatology in the 1990's: surfactant replacement therapy becomes a reality. *Clin Pediatr* 1991; 30(3): 167-170.
- 40 3. Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child* 1959; 97:517-523.

- 4.von Neergard K. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik: die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Ges Exp Med* 1929; 66:373.
- 5.Hallman M, Teramo K, Ylikorkala O, Merritt TA. Natural surfactant substitution in respiratory distress syndrome. *J Perinat Med* 1987; 15:463-468.
- 6.Stableman MT. Acute respiratory disorders in the newborn. En: Avery G, ed. *Neonatology*. Philadelphia: JB Lippincott, 1975:221-249.
- 7.Horbar JD, Wright EC, Onstad L. Decreasing mortality associated with the introduction of surfactant therapy: an observational study of neonates weighing 601 to 1300 grams at birth. *Pediatrics* 1993; 92(2):191-196.
- 8.Lang MJ, Hall RT, Reddy NS, Kurth CG, TA Merritt. A controlled trial of human surfactant replacement therapy for severe respiratory distress syndrome in very low birth weight infants. *J Pediatr* 1990; 116(2):295-300.
- 9.Hoekstra RE, Jackson JC, Myers TF, Frantz ID III, Stem ME, Powers WF, *et al.* Improved neonatal survival following multiple doses of bovine surfactant in very premature neonates at risk for respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1991; 88(1):10-18.
- 10.Kattwinkel J, Bloom BT, Delmore P, Davis CL, Farrell E, Friss H, *et al.* Prophylactic administration of calf lung surfactant extract is more effective than early treatment of respiratory distress syndrome in neonates of 29 through 32 weeks' gestation. *Pediatrics* 1993; 92(1):90-98.
- 11.Merritt TA, Hallman M, Berry C, Pohjavuori M, Edwards DK, Jaaskelainen J, *et al.* Randomized, placebo-controlled trial of human surfactant given at birth versus rescue administration in very low birth weight infants with lung immaturity. *J Pediatr* 1991; 118(4):581-594.
- 12.Dunn MS, Shennan AT, Zayack D, Possmayer F. Bovine surfactant replacement therapy in neonates of less than 30 weeks' gestation: a randomized controlled trial of prophylaxis versus treatment. *Pediatrics* 1991; 87(3): 377-386.
- 13.Long W, Thompson T, Sundell H, Schumacher R, Volberg F, Guthrie R, *et al.* Effects of two rescue doses of a synthetic surfactant on mortality rate and survival without bronchopulmonary dysplasia in 700- to 1350-gram infants with respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1991; 118(4):595-605.
- 14.Liechty EA, Donovan E, Purohit D, Gilhooly J, Feldman B, Noguchi A, *et al.* Reduction of neonatal mortality after multiple doses of bovine surfactant in low birth weight neonates with respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1991; 88(1):19-28.
- 15.Long W, Corbet A, Cotton R, Courtney S, Mc Guinness G, Walter D, *et al.* A controlled trial of synthetic surfactant in infants weighing 1250 g or more with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1991; 325(24):1696-1703.
- 16.Fujiwara T, Konishi M, Chida S, Okuyama K, Ogawa Y, Takecuchi Y, *et al.* Surfactant replacement therapy with a single postventilatory dose of a reconstituted bovine surfactant in preterm neonates with respiratory distress syndrome: final

- analysis of a multicenter, double-blind, randomized trial and comparison with similar trials. *Pediatrics* 1990; 86(5):753-764.
- 5 17.The OSIRIS Collaborative Group. Early versus delayed neonatal administration of a synthetic surfactant-the judgement of OSIRIS. *Lancet* 1992; 340(8832):1363-1369.
- 18.Ferrara TB, Hoekstra RE, Couser RJ, Gaziano EP, Calvin SE, Payne NR, *et al.* Survival and follow-up of infants born at 23 to 26 weeks of gestational age: effects of surfactant therapy. *J Pediatr* 1994; 124(1):119-124.
- 10 19.Hallman M, Merritt TA, Jarvenpaa A-L, Boynton B, Mannino F, Gluck L, *et al.* Exogenous human surfactant for treatment of severe respiratory distress syndrome: a randomized prospective clinical trial. *J Pediatr* 1985; 106(6): 963-969.
- 15 20.Berry DD, Pramanik AK, Phillips JB III, Buchter DS, Kanarek KS, Easa D, *et al.* Comparison of the effect of three doses of a synthetic surfactant on the alveolar-arterial oxygen gradient in infants weighing > or = 1250 grams with respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1994; 124(2):294-301.
- 21.Gortner L, Bartmann P, Pohlandt F, Bernsau U, Porz F, Hellwege HH, *et al.* Early treatment of respiratory distress syndrome with bovine surfactant in very pre-term infants: a multicenter controlled clinical trial. *Pediatr Pulmonol* 1992; 14(1):4-9.
- 20 22.Corbet AJ, Long WA, Murphy DJ, Garcia-Prats JA, Lombardy LR, Wold DE. Reduced mortality in small premature infants treated at birth with a single dose of synthetic surfactant. *J Paediatr Child Health* 1991; 27(4):245-249.
- 23.Bose C, Corbet A, Bose G, Garcia-Prats J, Lombardy L, Wold D, *et al.* Improved outcome at 28 days of age for very low birth weight infants treated with a single dose of a synthetic surfactant. *J Pediatr* 1990; 117:947-953.
- 25 24.Corbet A, Bucciarelli R, Goldman S, Mammel M, Wold D, Long W, y el American Exosurf Pediatric Study Group. Decreased mortality rate among small premature infants treated at birth with a single dose of synthetic surfactant: a multicenter controlled trial. *J Pediatr* 1991; 118(2):277-284.
- 30 25.Merritt TA, Hallman M, Bloom BT, Berry C, Benirschke K, Sahn D, *et al.* Prophylactic treatment of very premature infants with human surfactant. *N Engl J Med* 1986; 315(13):785-790.
- 35 26.Kendig JW, Notter RH, Cox C, Reubens LJ, Davis JM, Maniscalco WM, *et al.* A comparison of surfactant as immediate prophylaxis and as rescue therapy in newborns of less than 30 weeks' gestation. *N Engl J Med* 1991; 324(13):865-871.
- 27.Egberts J, de Winter JP, Sedin G, deKleine MJ, Broberger U, van Bel F, *et al.* Comparison of prophylaxis and rescue treatment with Curosurf in neonates less than 30 weeks' gestation: a randomized trial. *Pediatrics* 1993; 92 (6):768-774.
- 40 28.Soll RF, Hoekstra RE, Fangman JJ, Corbet AJ, Adams JM, James LS, *et al.* Multicenter trial of single-dose modified bovine surfactant extract (Survanta) for prevention of respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1990; 85 (6):1092-1102.

29. Heldt GP, Pesonen E, Merritt TA, Elias W, Sahn DJ. Closure of the ductus arteriosus and mechanics of breathing in preterm infants after surfactant replacement therapy. *Pediatr Res* 1989; 25(3):305-310.
- 5 30. Hallman M, Merritt TA, Bry K, Berry C. Association between neonatal care practices and efficacy of exogenous human surfactant: results of a bicenter randomized trial. *Pediatrics* 1992; 91(3):552-560.
- 10 31. Lotze A, Knight GR, Martin GR, Bulas DI, Hull WM, O'Donnell RM, *et al.* Improved pulmonary outcome after exogenous surfactant therapy for respiratory failure in term infants requiring extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr* 1993; 122(2):261-268.
32. Raju TN, Langenberg P. Pulmonary hemorrhage and exogenous surfactant therapy: a meta-analysis. *J Pediatr* 1993; 123(4):603-610.
- 15 33. Horbar JD, Soll RF, Sutherland JM, Kotagal U, Philip AGS, Kessler DL, *et al.* A multicenter randomized, placebocontrolled trial of surfactant therapy for respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1989; 320(15): 959-965.
34. Horbar JD, Wright LL, Soll RF, Fanaroff AA, Korones SB, Shankaran S, *et al.* A multicenter randomized trial comparing two surfactants for the treatment of neonatal respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1993; 123(5): 757-766.
- 20 35. Hazan J, Chessex P, Piedboeuf B, Bourgeois M, Bard H, Long W. Energy expenditure during synthetic surfactant replacement therapy for neonatal respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1992; 120(2, parte 2):S29-S33.
36. Speer CP, Harms K, Herting E, Neumann N, Curstedt T, Robertson B. Early versus late surfactant replacement therapy in severe respiratory distress syndrome. *Lung* 1990; 168(supl.):870-876.
- 25 37. Khammash H, Perlman M, Wojtulewicz, J, Dunn M. Surfactant therapy in full-term neonates with severe respiratory failure. *Pediatrics* 1993; 92(1):135-139.
38. Stevenson D, Walther F, Long W, Sell M, Paul T, Gong A, *et al.* Controlled trial of a single dose of synthetic surfactant at birth in premature infants weighing 500 to 699 grams. *J Pediatr* 1992; 120(2, Parte 2):S3-S12.
- 30 39. Dunn MS, Shennan AT, Possmayer F. Single- versus multiple-dose surfactant replacement therapy in neonates of 30 to 36 weeks' gestation with respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1990; 86(4):564-571.
- 35 40. Hellstrom-Westas L, Bell AH, Skov L, Greisen G, Svenningsen NW. Cerebroelectrical depression following surfactant treatment in preterm neonates. *Pediatrics* 1992; 89(4):643-647.
41. Zola EM, Gunkel JH, Chan RK, Lim MO, Knox I, Feldman BH, *et al.* Comparison of three dosing procedures for administration of bovine surfactant to neonates with respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1992; 122(3):453-459.
- 40 42. Annibale DJ, Hulsey TC, Wallin LA, Engstrom PC. Clinical diagnosis and management of respiratory distress in preterm neonates: effect of participation in a controlled trial. *Pediatrics* 1992; 90(3):397-400.

43. Goldman SL, Bosque E, McCann E, Lewis K. Pulmonary mechanics in premature infants one month after treatment with synthetic surfactant. *J Pediatr* 1992; 120(2, parte 2):S25-S28.
- 5 44. Speer CP, Robertson B, Curstedt T, Halliday HL, Compagnone D, Gefeller O, *et al.* Randomized European multicenter trial of surfactant replacement therapy for severe neonatal respiratory distress syndrome: single versus multiple doses of Curosurf. *Pediatrics* 1992; 89(1):13-20.
45. Gunkel JH, Banks PL. Surfactant therapy and intracranial hemorrhage: review of the literature and results of new analyses. *Pediatrics* 1993; 92(6):775-786.
- 10 46. Zola EM, Overbach AM, Gunkel JH, Mitchell BR, Nagle BT, DeMarco NG, *et al.* Treatment investigational new drug experience with Survanta (beractant). *Pediatrics* 1993; 91(3):546-551.
47. van Houten J, Long W, Mullett M, Finer N, Derleth D, McMurray B, *et al.* Pulmonary hemorrhage in premature infants after treatment with synthetic surfactant: an autopsy evaluation. *J Pediatr* 1992; 120(2, parte 2):S40-S44. Aparece una errata en *J Pediatr* 1992; 120(5):762.
- 15 48. Rubin BK, Ramirez O, King M. Mucus rheology and transport in neonatal respiratory distress syndrome and the effect of surfactant therapy. *Chest* 1992; 101(4):1080-1085.
- 20 49. Goldsmith LS, Greenspan JS, Rubenstein SD, Wolfson MR, Shaffer TH. Immediate improvement in lung volume after exogenous surfactant: alveolar recruitment versus increased distention. *J Pediatr* 1991; 119(3):424-428.
50. Bhutani VK, Abbasi S, Long WA, Gerdes JS. Pulmonary mechanics and energetics in preterm infants who had respiratory distress syndrome treated with synthetic surfactant. *J Pediatr* 1992; 120(2, parte 2):S18-S24.
- 25 51. Bhat R, Dziedzic K, Bhutani VK, Vidyasagar D. Effect of single dose surfactant on pulmonary function. *Crit Care Med* 1990; 18(6):590-595.
52. Abbasi S, Bhutani VK, Gerdes JS. Long-term pulmonary consequences of respiratory distress syndrome in preterm infants treated with exogenous surfactant. *J Pediatr* 1993; 122:446-452.
- 30 53. Davis JM, Veness-Meehan K, Notter RH, Bhutani VK, Kendig JW, Shapiro DL. Changes in pulmonary mechanics after the administration of surfactant to infants with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1988; 319(8):476-479.
54. Armsby DH, Bellon G, Carlisle K, Rector D, Baldwin R, Stevenson DK, *et al.* Delayed compliance increase in infants with respiratory distress syndrome following synthetic surfactant. *Pediatr Pulmonol* 1992; 14(4):206-213.
- 35 55. Courser RJ, Ferrara TB, Ebert J, Hoekstra RE, Fangman JJ. Effects of exogenous surfactant therapy on dynamic compliance during mechanical breathing in preterm infants with hyaline membrane disease. *J Pediatr* 1990; 116(1): 119-124.
- 40 56. Svenningsen NW, Bjorklund L, Vilstrup C, Werner O. Lung mechanics (FRC and static pressure-volume diagram) after endotracheal surfactant instillation: preliminary observations. *Biol Neonate* 1992; 61(supl. 1):44-47.

57. Pfenninger J, Aebi C, Bachmann D, Wagner BP. Lung mechanics and gas exchange in ventilated preterm infants during treatment of hyaline membrane disease with multiple doses of artificial surfactant (Exosurf). *Pediatr Pulmonol* 1992; 14(1):10-15.
- 5 58. Kelly E, Bryan H, Possmayer F, Fmdova H, Bryan C. Compliance of the respiratory system in newborn infants pre- and postsurfactant replacement therapy. *Pediatr Pulmonol* 1993; 15(4):225-230.
59. Yuksel B, Greenough A, Gamsu HR. Respiratory function at follow-up after neonatal surfactant replacement therapy. *Respir Med* 1993; 87(3):217-221.
- 10 60. Kääpä P, Seppanen M, Kero P, Saraste M. Pulmonary hemodynamics after synthetic surfactant replacement in neonatal respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1993; 123(1):115-119.
61. Sitler CG, Turnage CS, McFadden BE, Smith EO, Adams JM. Pump administration of exogenous surfactant: effects on oxygenation, heart rate, and chest wall movement of premature infants. *J Perinatol* 1993; 13(3):197-200.
- 15 62. Centers for Disease Control. Actualización: Universal Precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR* 1988; 37: 377-382,387-388.

Lista de secuencias

20

SEQ ID NO: 1

Secuencia de aminoácidos de rSPD(n/CRD)

**GSPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKV  
ELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAENAALQQLVVA  
KNEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGSEDCVEIFTNGKW  
NDRACGEKRLVVCEF**

SEQ ID NO: 2

25 Secuencia de nucleótidos de rSPD(n/GRD)

**GGAAGCCCGGATTGAAGGGGACAAAGGCATTCCTGGAGACAAAGGAGCAAAGGGAGAA  
AGTGGGCTTCCAGATGTTGCTTCTCTGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTA  
CAGCACCTCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTTGAGCTCTTCCAAATGGCCAA  
AGTGTGGGGAGAAGATTTTCAAGACAGCAGGCTTTGTAAAACCATTTACGGAGGCACAG  
CTGCTGTGCACACAGGCTGGTGGACAGTTGGCCTCTCCACGCTCTGCCGCTGAGAATGCC  
GCCTTGCAACAGCTGGTCGTAGCTAAGAACGAGGCTGCTTTCCTGAGCATGACTGATTCC  
AAGACAGAGGGCAAGTTACCTACCCACAGGAGAGTCCCTGGTCTATTCCAATGGGCC  
CCAGGGGAGCCCAACGATGATGGCGGGTCAGAGGACTGTGTGGAGATCTTACCAATGGC  
AAGTGAATGACAGGGCTTGTGGAGAAAAGCGTCTTGTGGTCTGCCAGTTCTGA**

SEQ ID NO: 3

Secuencia de nucleótidos del clon de ADNc de SP-D humana (número de registro NM\_003019.1)

ATGCTGCTCTTCCTCCTCTCTGCACTGGTCTGCTCACACAGCCCCTGGGCTACCTGGAA  
GCAGAAATGAAGACCTACTCCCACAGAACAATGCCCAGTGCTTGCACCCTGGTCATGTGT  
AGCTCAGTGGAGAGTGGCCTGCCTGGTCGCGATGGACGGGATGGGAGAGAGGGCCCTCGG  
GGCGAGAAGGGGGACCCAGGTTTGCCAGGAGCTGCAGGGCAAGCAGGGATGCCTGGACAA  
GCTGGCCCAGTTGGGCCAAAAGGGGACAATGGCTCTGTTGGAGAACCTGGACCAAAGGGA  
GACACTGGGCCAAGTGGACCTCCAGGACCTCCCGGTGTGCCTGGTCCAGCTGGAAGAGAA  
GGTGCCTTGGGGAAGCAGGGGAACATAGGACCTCAGGGCAAGCCAGGCCCAAAGGAGAA  
GCTGGGCCTAAAGGAGAAGTAGGTGCCCCAGGCATGCAGGGCTCGGCAGGGGCAAGAGGC  
CTCGCAGGCCCTAAGGGAGAGCGAGGTGTCCCTGGTGAGCGTGGAGTCCCTGGAAACACA  
GGGGCAGCAGGGTCTGCTGGAGCCATGGGTCCCCAGGGAAGTCCAGGTGCCAGGGGACCC  
CCGGGATGAAGGGGGACAAAGGCATTCTGAGACAAAGGAGCAAAGGGAGAAAGTGGG

CTTCCAGATGTTGCTTCTCTGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCAC  
CTCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTTGAGCTCTTCCCAAATGGCCAAAGTGTG  
GGGGAGAAGATTTTCAAGACAGCAGGCTTTGTAACCATTACGGAGGCACAGCTGCTG  
TGCACACAGGCTGGTGGACAGTTGGCCTCTCCACGCTCTGCCGCTGAGAATGCCGCCTTG  
CAACAGCTGGTCTAGCTAAGAACGAGGCTGCTTTCCTGAGCATGACTGATTCCAAGACA  
GAGGGCAAGTTCACCTACCCACAGGAGAGTCCCTGGTCTATTCCAAGTGGGCCCCAGGG  
GAGCCCAACGATGATGGCGGGTCAGAGGACTGTGTGGAGATCTTCACCAATGGCAAGTGG  
AATGACAGGGCTTGTGGAGAAAAGCGTCTTGTGGTCTGCGAGTTCTGA

5 SEQ ID NO: 4

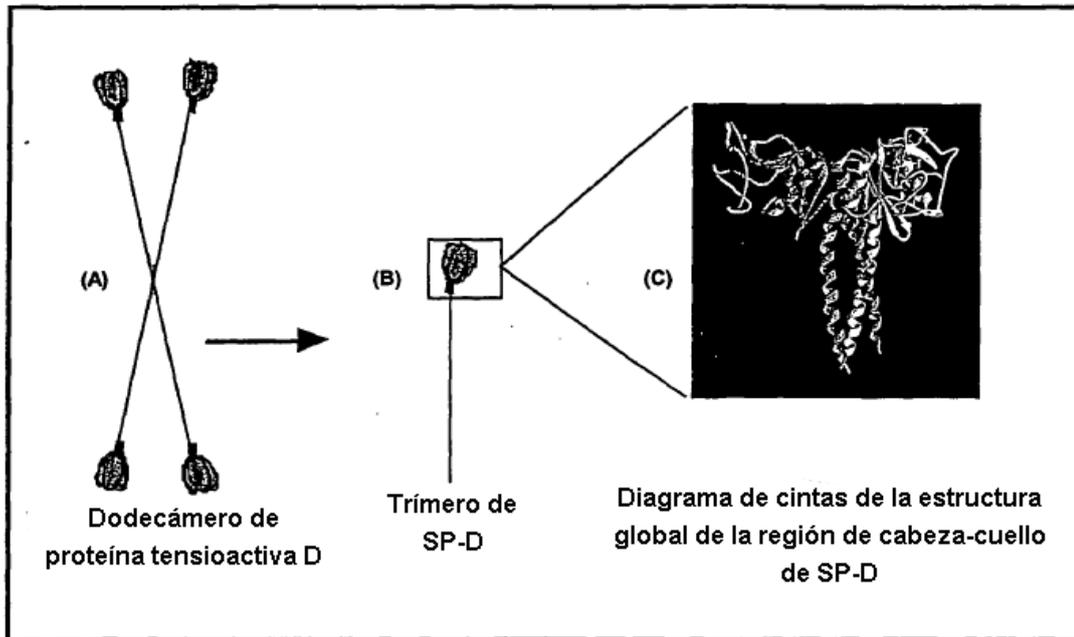
Secuencia de aminoácidos de SP-D humana (traducida de SEQ ID NO: 3)

MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTMPSACTLVMCSSVESGLPGRDGRDREGPR  
GEKGDPLPGAAGQAGMPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGPSGPPGPPGVPGPAGRE  
GALGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAAPGMQGSAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNT  
GAAGSAGAMGPQGS PGARGPPGLKGDGKI PGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGQVQH  
LQAAFSQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAENAAL  
QQLVVAKNEAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGSEDCVEIFTNGKW  
NDRACGEKRLVVCEF\*

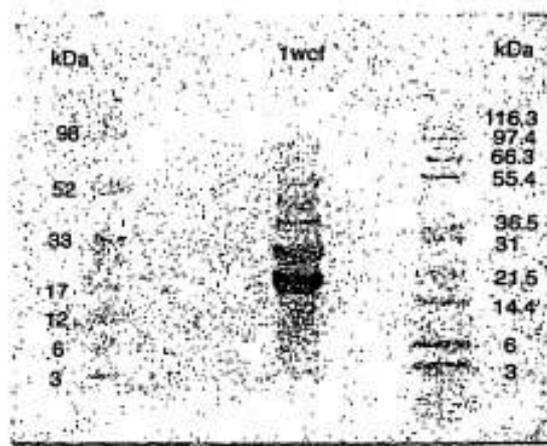
## REIVINDICACIONES

1.        Uso de proteína tensioactiva D (SP-D) que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4, o un fragmento que comprende al menos 100 aminoácidos de la misma que tiene actividad de unión a hidratos de carbono, en la fabricación de una composición para el tratamiento de una infección microbiana del pulmón.  
5
2.        Uso de proteína tensioactiva D (SP-D) que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4, o un fragmento que comprende al menos 100 aminoácidos de la misma que tiene actividad de unión a hidratos de carbono, en la fabricación de una composición para el tratamiento de fibrosis quística.
- 10 3.        Uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 de un polipéptido recombinante que comprende, que consiste preferiblemente en, un fragmento de SP-D que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.
- 15 4.        Uso de un fragmento recombinante de polipéptido de proteína tensioactiva D (rSP-D(N/CRD)) que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o un fragmento o variante de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con SEQ ID NO: 1 y que tiene actividad de unión a hidratos de carbono, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad pulmonar crónica neonatal, síndrome de dificultad respiratoria neonatal, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, fibrosis pulmonar, enfisema, enfermedad pulmonar inflamatoria intersticial, sarcoidosis, neumonía, enfermedad pulmonar inflamatoria crónica o enfermedad pulmonar inflamatoria crónica neonatal.  
20
- 25 5.        Uso según la reivindicación 4, que usa un polipéptido de rSP-D(N/CRD) que comprende, consiste preferiblemente en, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

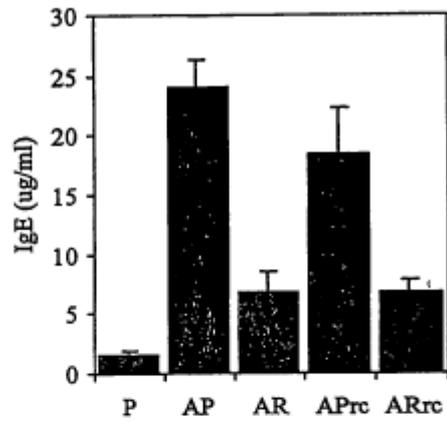
**FIGURA 1A**



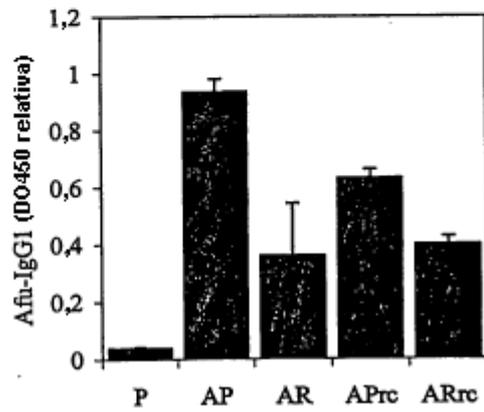
**FIGURA 1B**



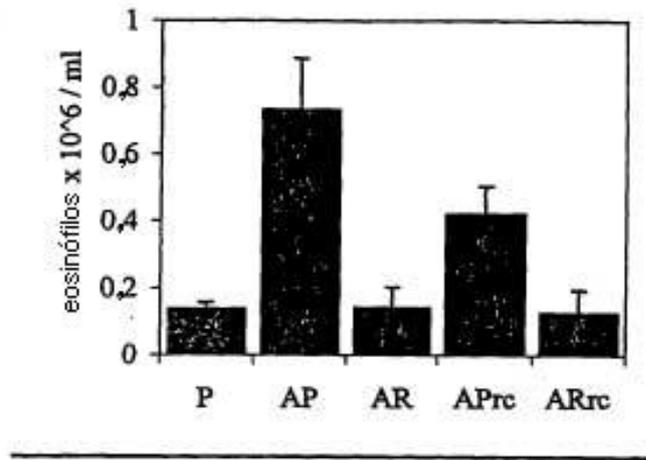
**FIGURA 2A**



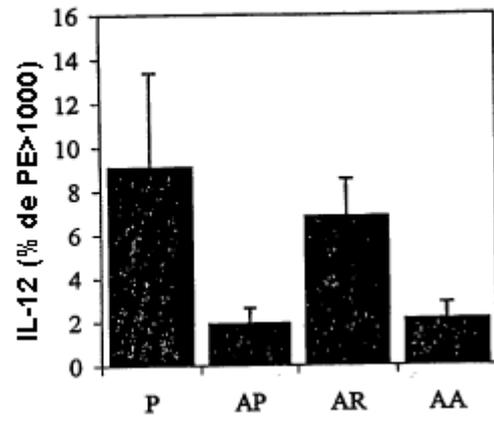
**FIGURA 2B**



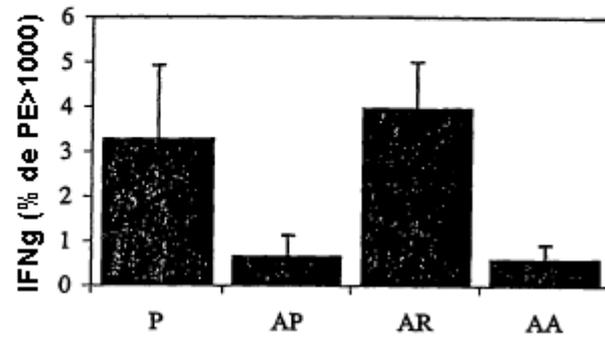
**FIGURA 3**



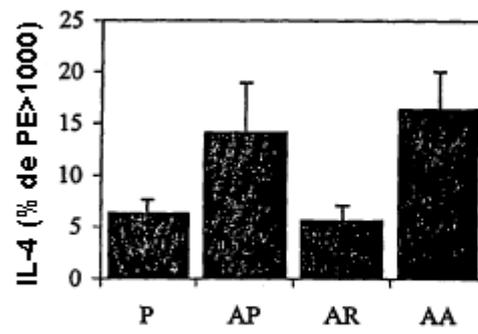
**FIGURA 4A**



**FIGURA 4B**

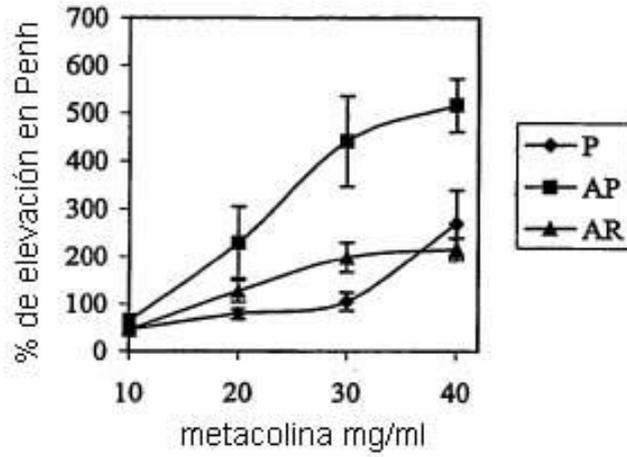


**FIGURA 4C**

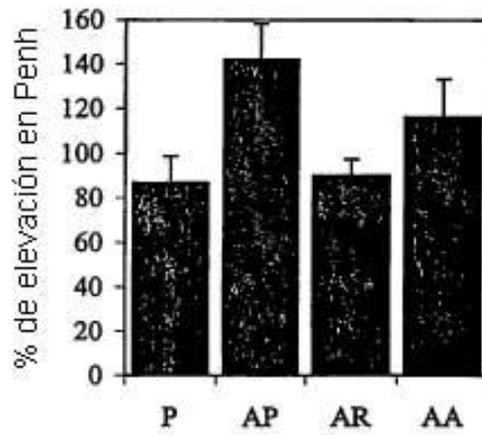


**Fig.4c**

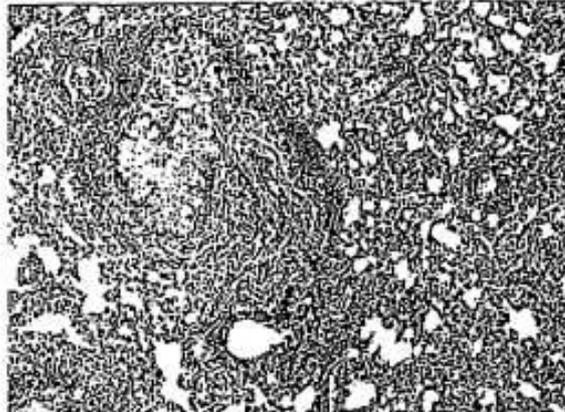
**FIGURA 5A**



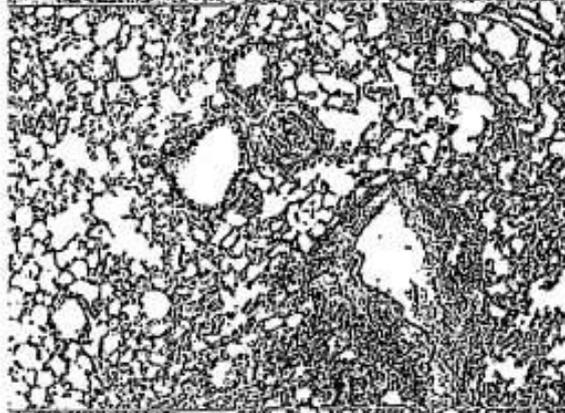
**FIGURA 5B**



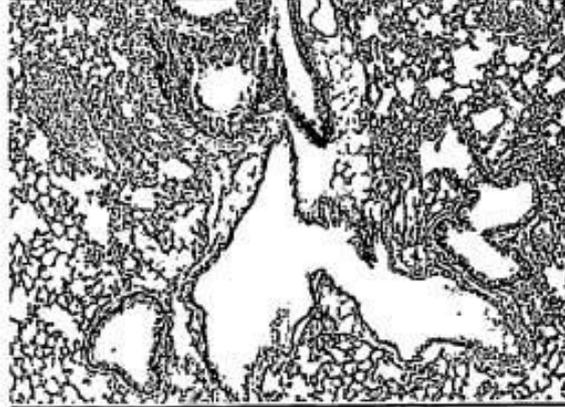
**FIGURA 6A**



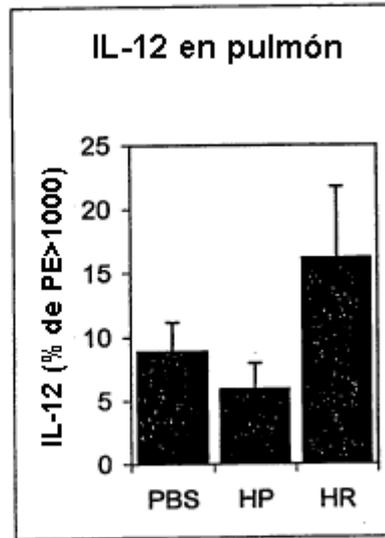
**FIGURA 6B**



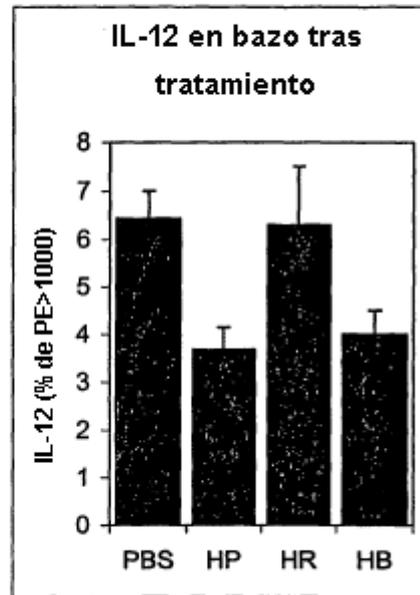
**FIGURA 6C**



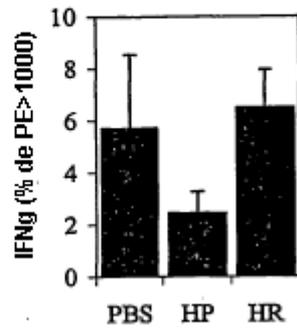
**FIGURA 7A**



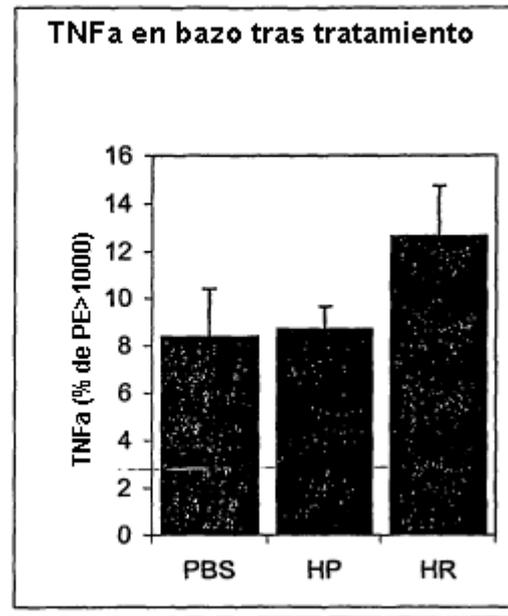
**FIGURA 7B**



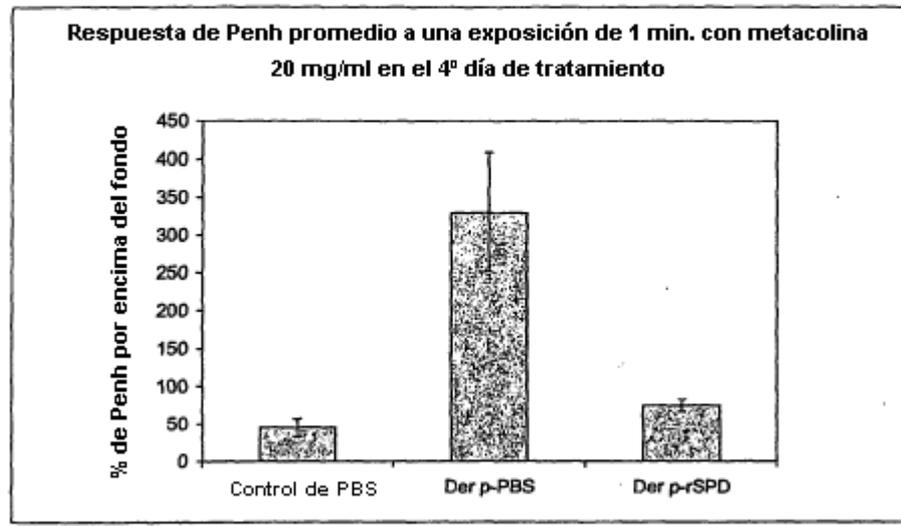
**FIGURA 7C**



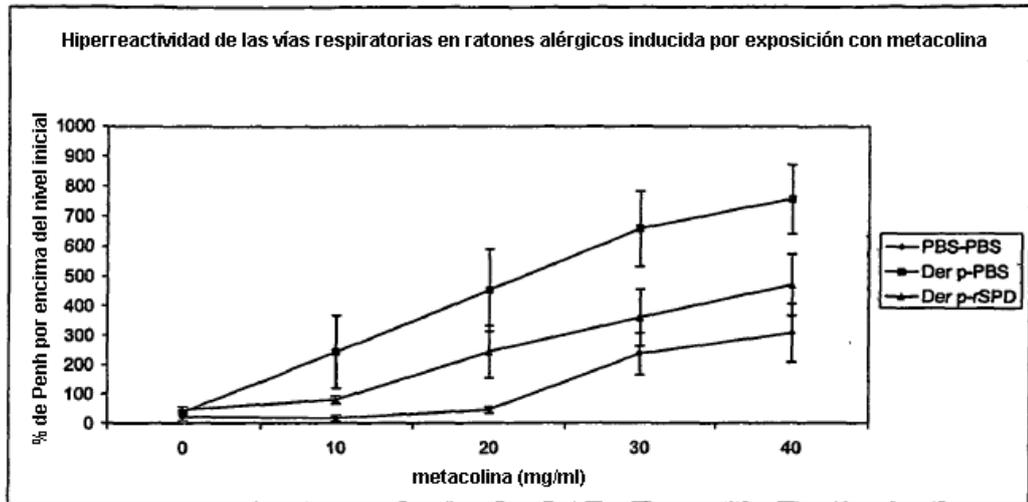
**FIGURA 7D**



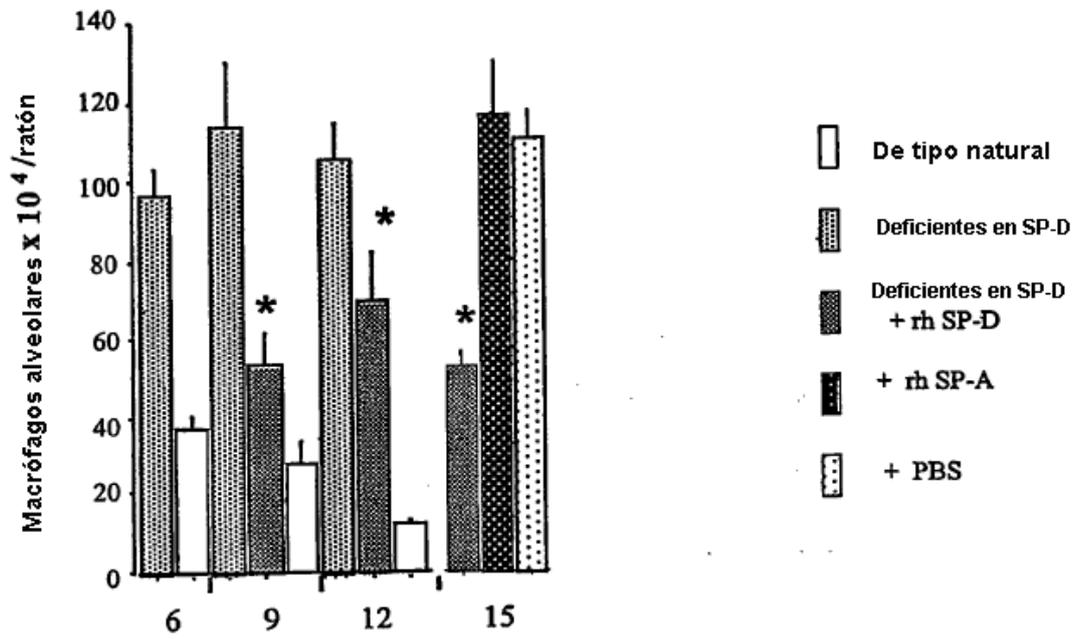
**FIGURA 8A**



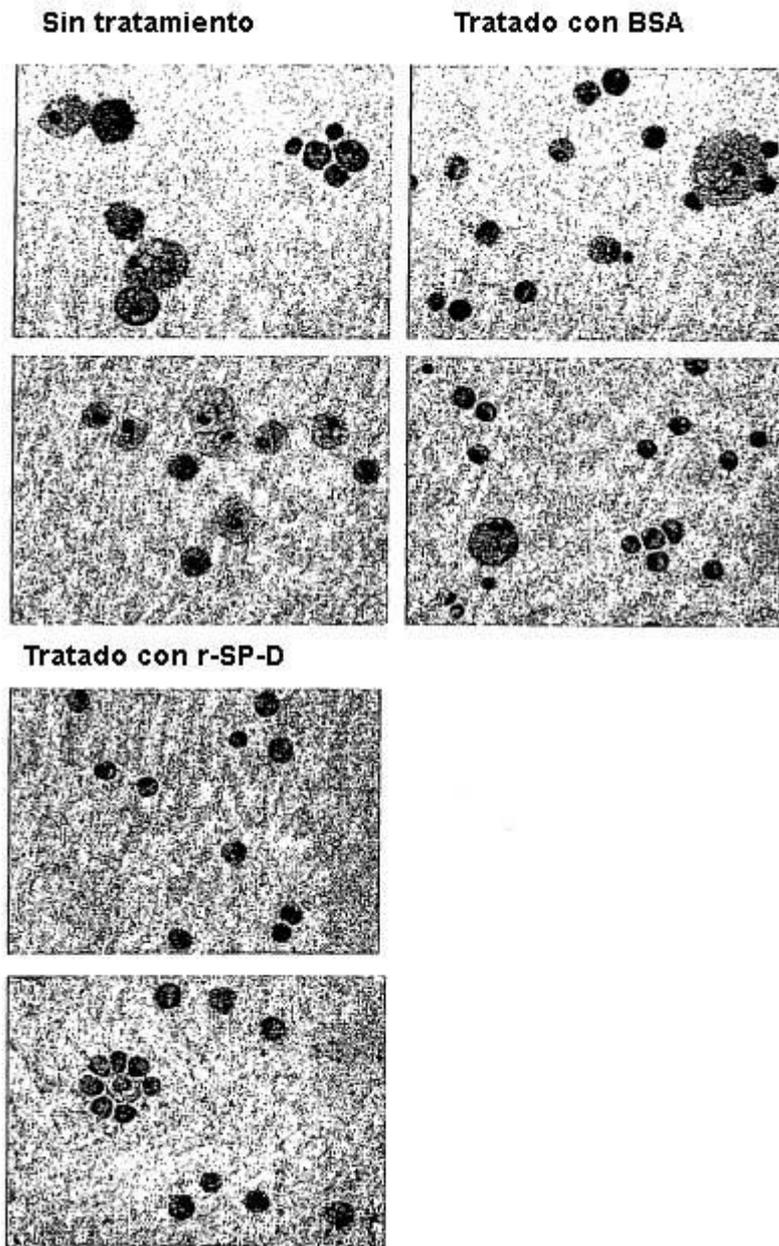
**FIGURA 8B**



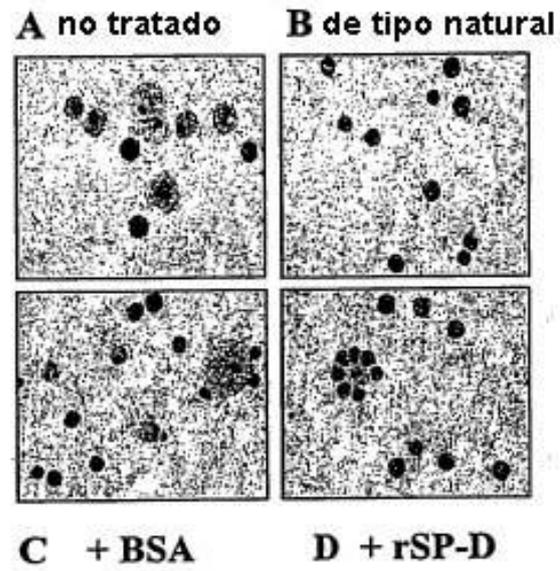
**FIGURA 9**



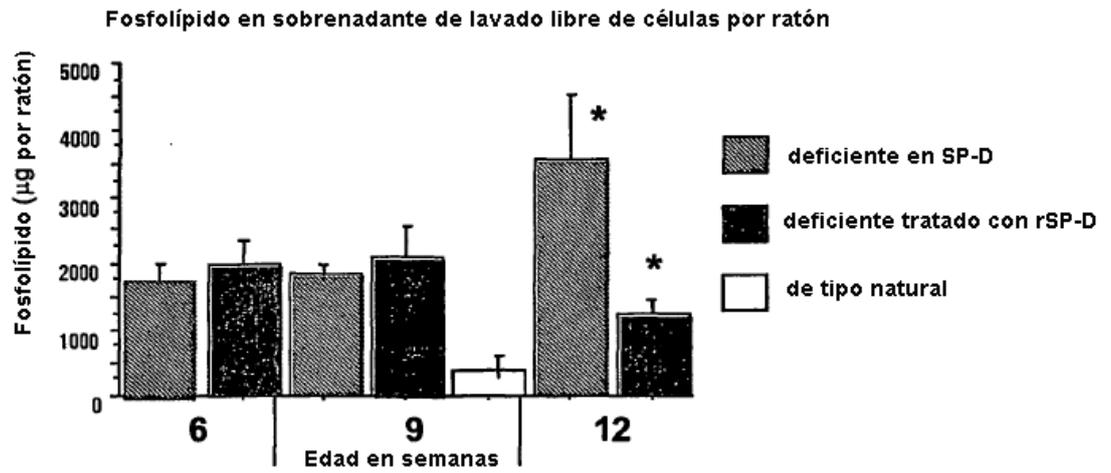
**Figura 10A**



**FIGURA 10B**

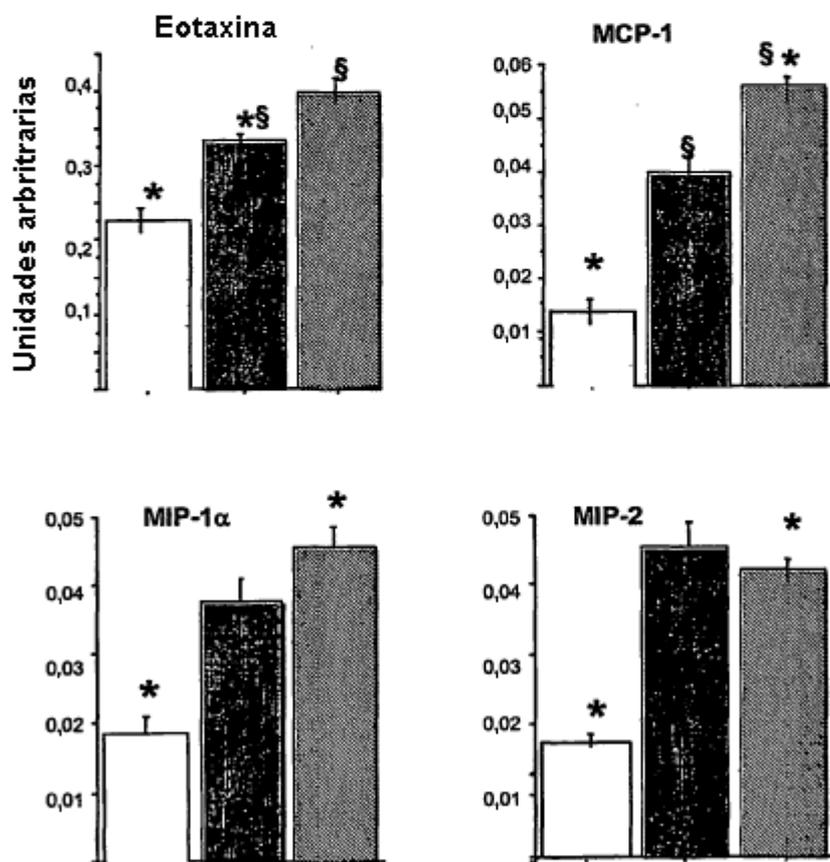


**FIGURA 11**

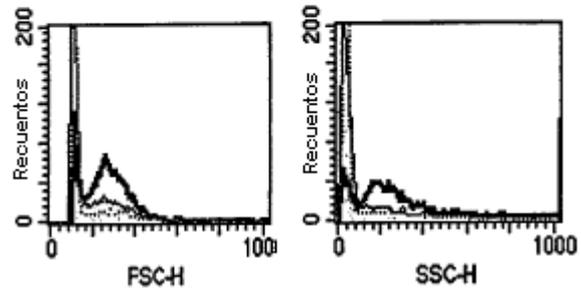


**FIGURA 12**

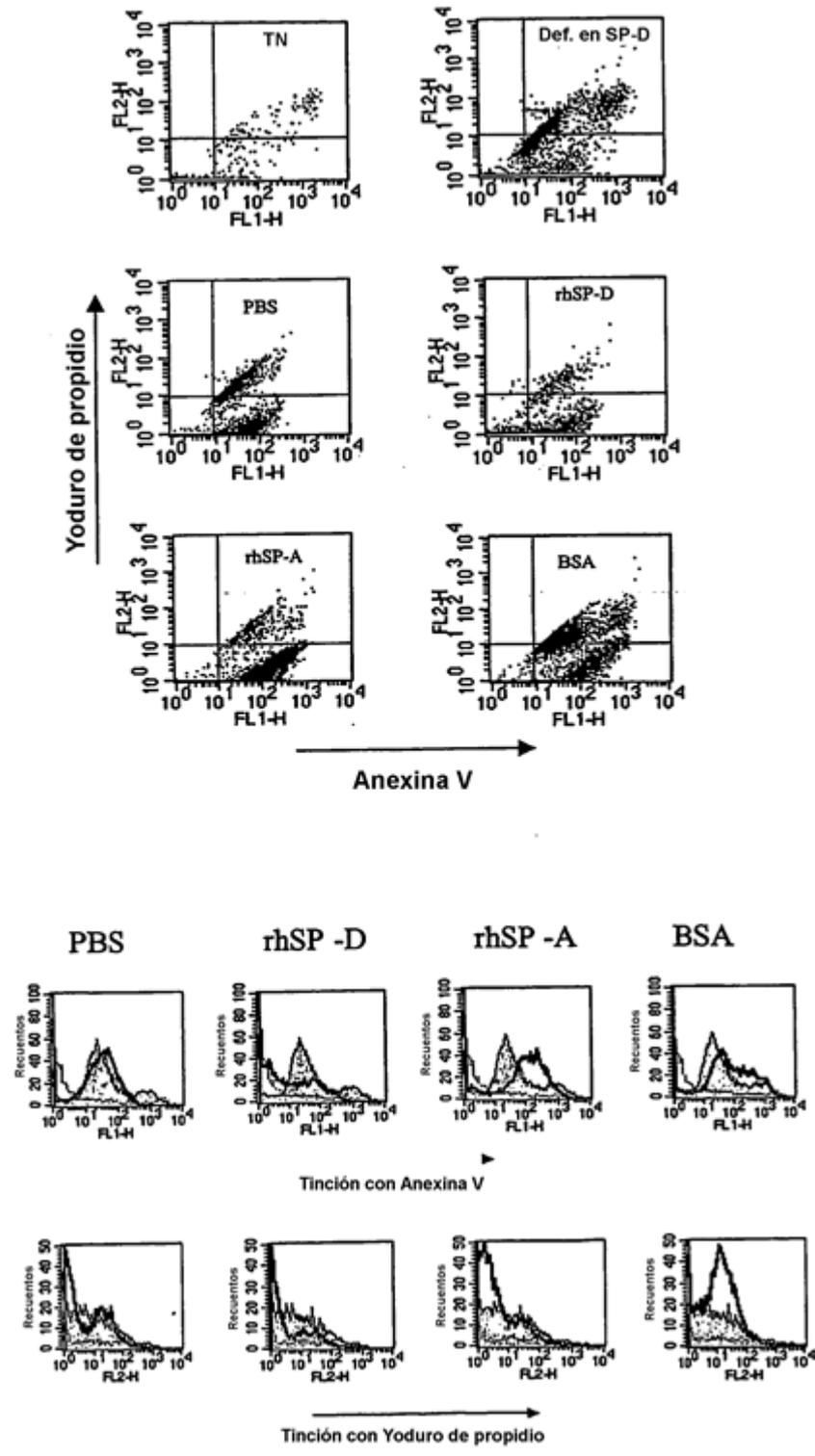
**Niveles de ARNm de quimiocinas en ratones deficientes en SP-D en comparación con TN y el efecto de tratamiento con rSP-D**



**FIGURA 13A**



**FIGURA 13B**



**FIGURA 13C**

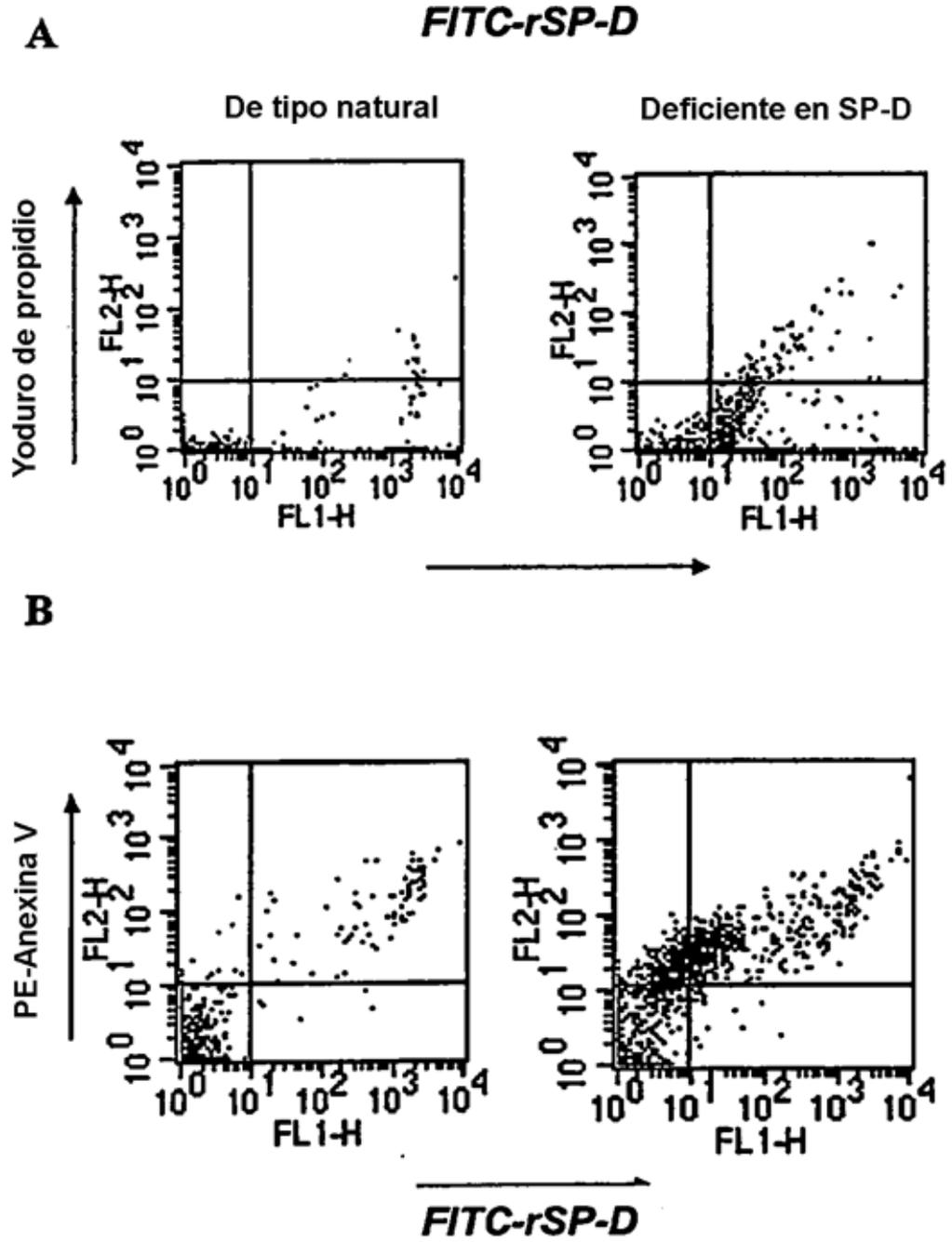
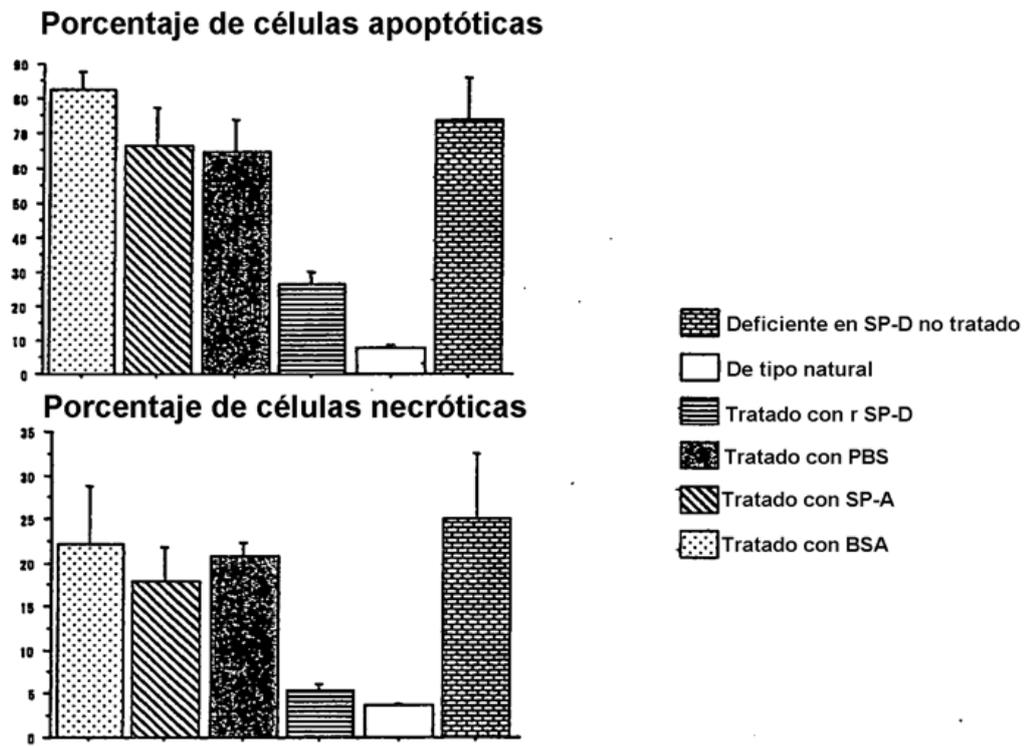
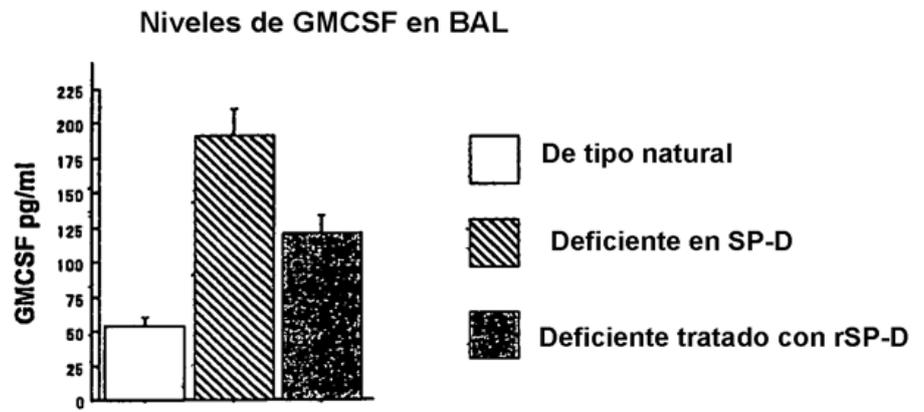


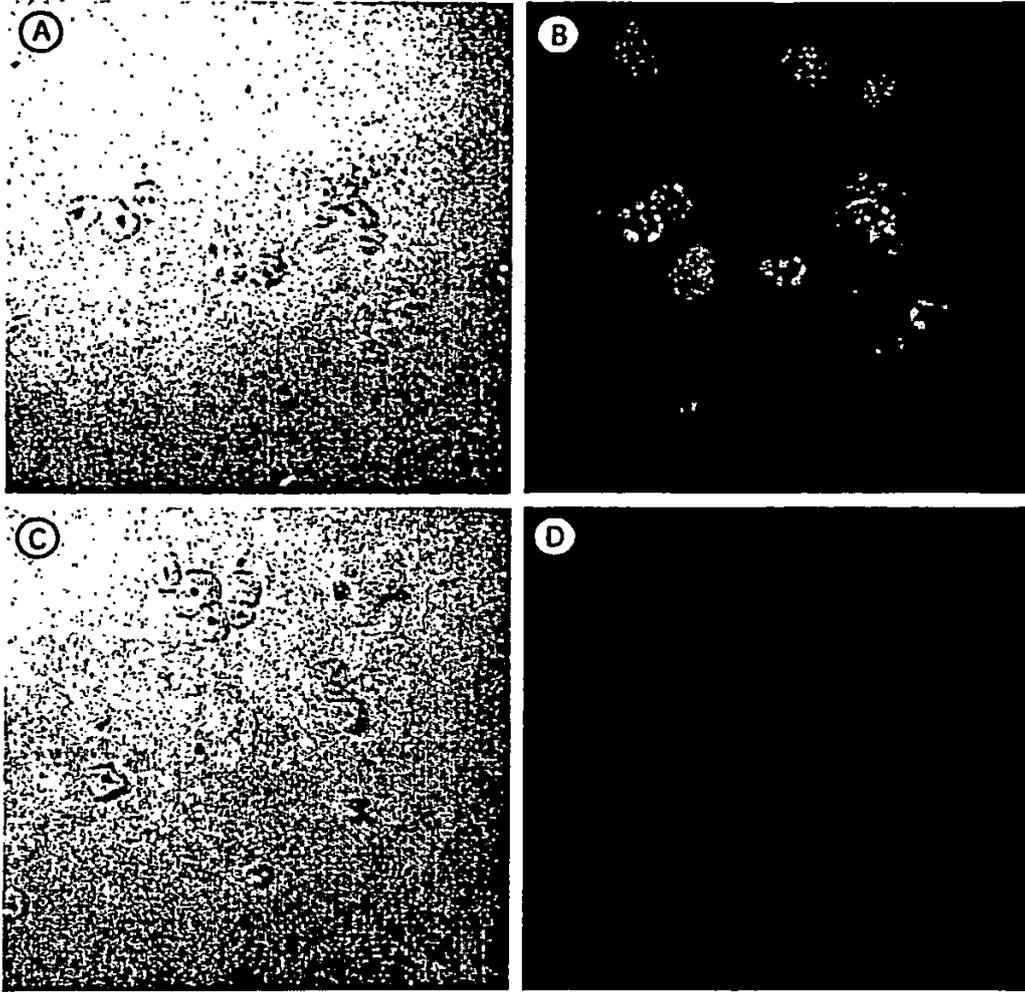
FIGURA 13D



**FIGURA 14**

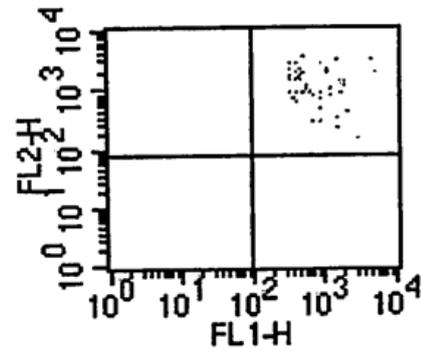
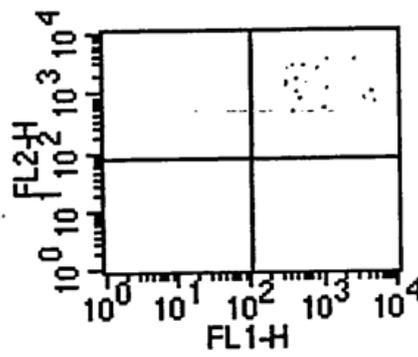
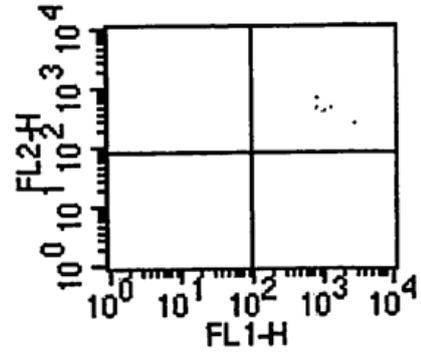
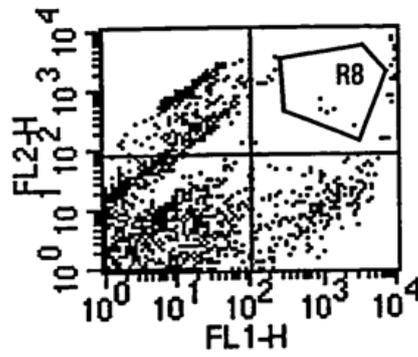


**FIGURA 15**



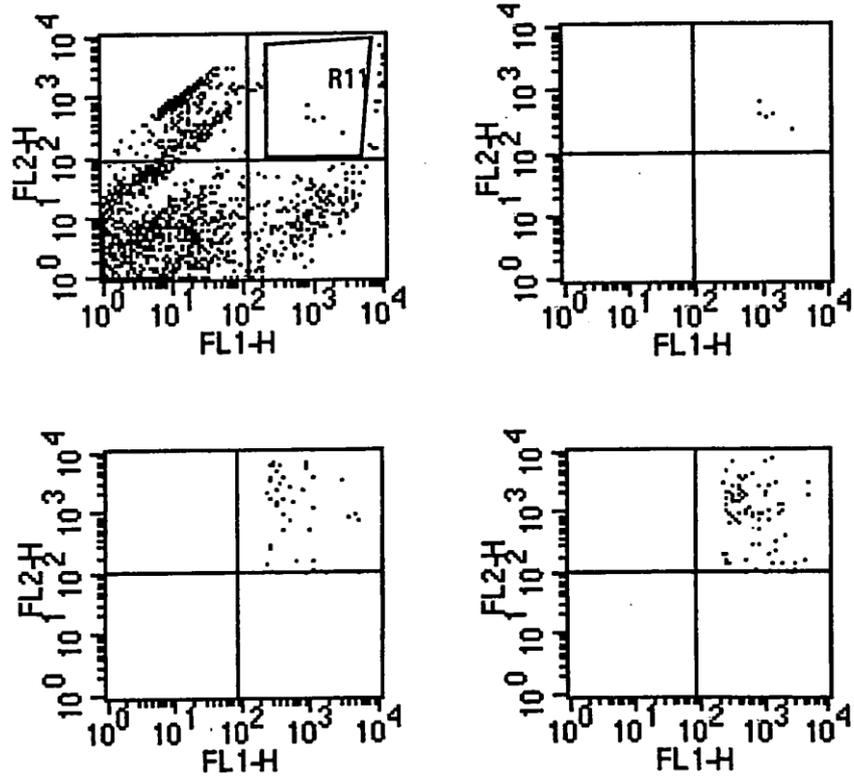
**FIGURA 16**

**Tinción de color naranja**



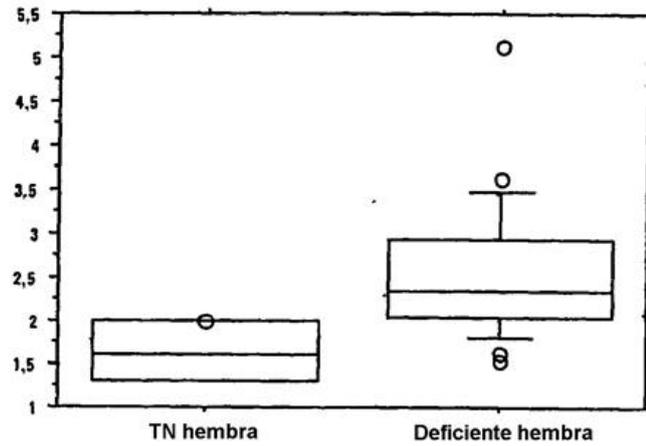
**Tinción de color verde**

**FIGURA 16**



**FIGURA 17**

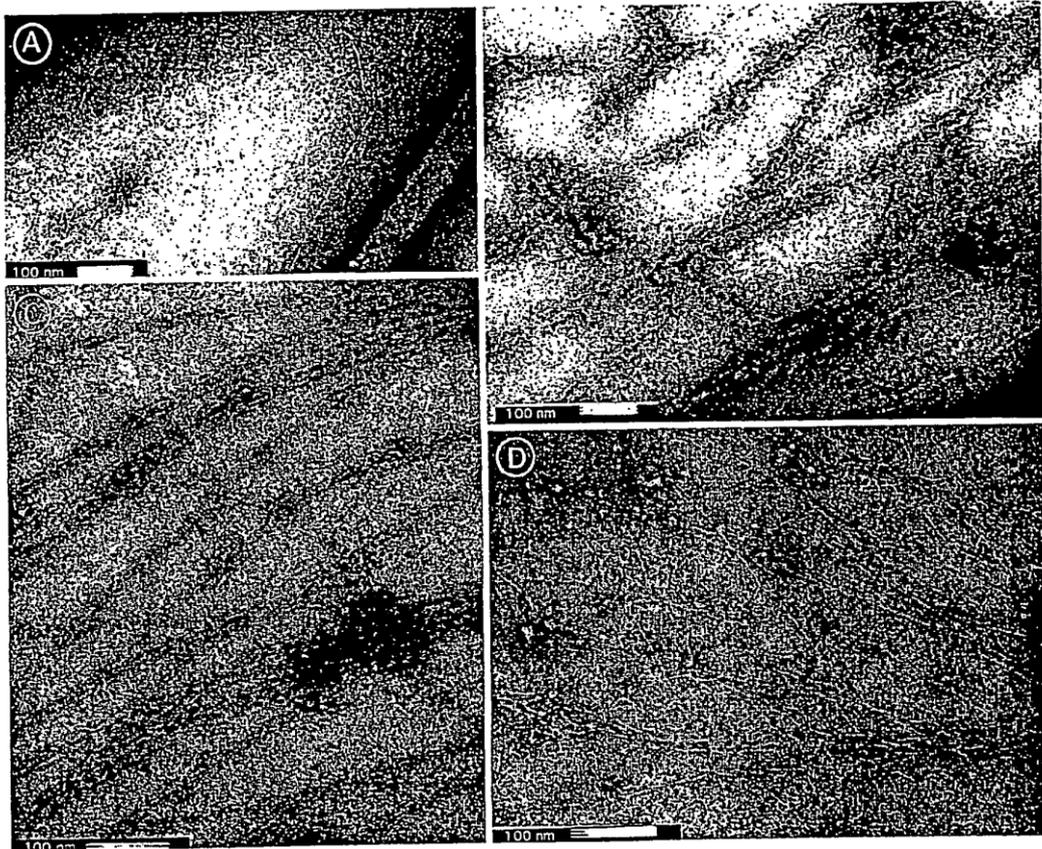
**Colesterol plasmático (mM) en ratones deficientes en SP-D y TN**



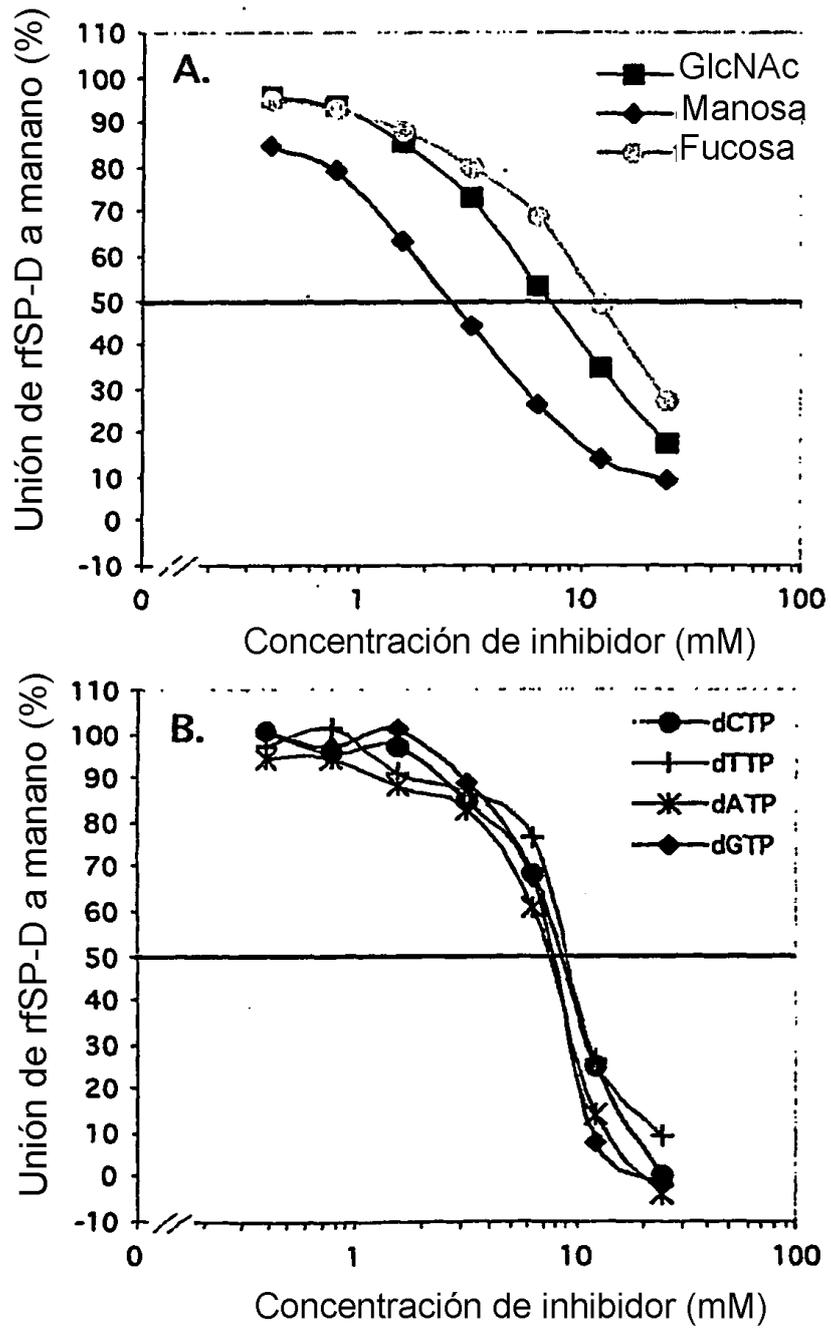
Diferencia hipotética  
de la prueba de la t apareada = 0

	Dif. media	DF	Valor de t	Valor de P
TN hembra, deficiente hembra	0,888	8	-2,885	0,0204

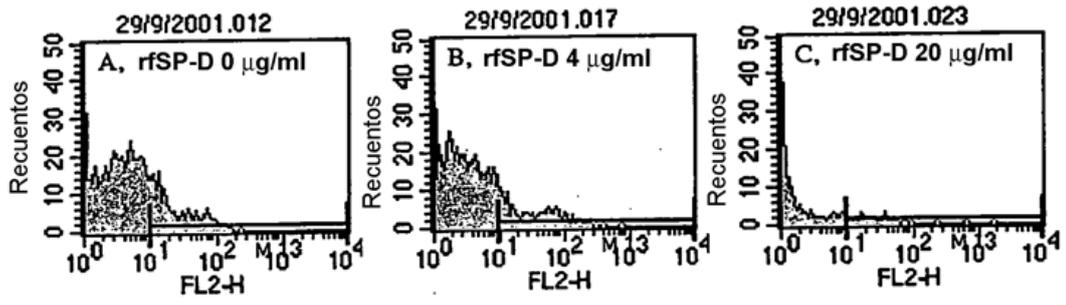
**FIGURA 18**



**FIGURA 19**



**FIGURA 20**



**FIGURA 21**

